

FABÍOLA REGINA STEVAN

**ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO* DE HETEROPOLISSACARÍDEOS
SULFATADOS E/OU CARBOXILADOS, ISOLADOS DE MACROALGAS
MARINHAS, SOBRE CÉLULAS HeLa**

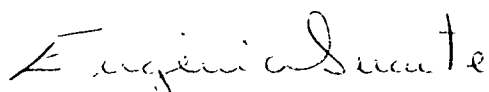
Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Bioquímica da Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Ciências-Bioquímica.

CURITIBA
2001


FABIOLA REGINA STEVAN

ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO* DE HETEROPOLISSACARÍDEOS 'SULFATADOS E/OU CARBOXILADOS, ISOLADOS DE MACROALGAS MARINHAS, SOBRE CÉLULAS HeLa

Tese aprovada como requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências-Bioquímica, no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelas professoras:



Dr^a. Maria Eugênia Rabello Duarte – Orientadora
Universidade Federal do Paraná



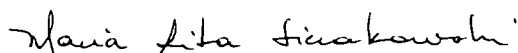
Dr^a. Lúcia de Oliveira Sampaio
Universidade Federal de São Paulo



Dr^a. Círcio Lesniowski Delgobo
Universidade Federal de Santa Catarina



Dr^a. Eliana Borba Carneiro
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Dr^a. Maria Rita Sierakowski
Universidade Federal do Paraná

ORIENTADORES:

Prof^a. Dr^a. Maria Eugênia Rabello Duarte

Prof. Dr. Marcello Iacomini

Prof^a. Dr^a. Maria Benigna Martinelli de Oliveira

Ao meu tesouro Felipe
Aos meus pais Cláudio e Yara

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a vida e a oportunidade de escolher como vive-la;

A todos os meus familiares, e em especial a meus Pais, Cláudio e Yara Luiza Stevan por terem participado com amor de todos os momentos de minha vida, e pela atenção prestada ao neto sempre que necessário;

Ao meu filho Felipe Luiz Stevan Marconcin que, apesar do tempo que não pude dedicar-lhe sempre foi compreensivo e soube participar destes momentos sempre ao meu lado. Te amo muito;

Para Fábio Roberto Hancke pelos ótimos momentos que passamos juntos, por seu amor e companheirismo. Te amo;

Prof.^a. Dr.^a. Maria Eugênia Rabello Duarte pela sua orientação, voto de confiança, apoio sempre necessário, além do imenso empenho e comprometimento com a pesquisa de polissacarídeos de Algas Marinhas;

Prof. Dr. Marcello Iacomini, pela sua orientação, constante estímulo e apoio, durante todo período de realização desta tese.

Prof.^a. Dr.^a. Maria Benigna Martinelli de Oliveira, obrigada por novamente ter depositado seu voto de confiança, por sua dedicação costumeira, sua amizade e estímulo que proporcionaram meu amadurecimento científico e também pessoal.

Prof.^a. Dr.^a. Dorly de Freitas Buchi não tenho palavras para expressar o quanto admiro seu profissionalismo, carisma, amizade, espiritualidade, que me acompanharam não só no auxílio imprescindível para a realização deste trabalho, como em momentos especiais, onde sua palavra foi sempre acolhedora;

Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga pelo auxílio prestado em preciosos momentos deste trabalho, pela sua amizade, seu carinho e incentivo que são e serão sempre valiosos;

Prof. Dr. Waldemiro Gremski por sua amizade, desde o início da minha vida científica, porque pelo ingresso em seu Laboratório, para iniciação científica, iniciei este árduo, porém belo, caminho;

Prof. Dr. Phillip Albert James Gorin pelo seu bom humor constante, profissionalismo e pela pessoa que nos estimula como modelo de vida;

Prof.^a. Dr.^a. Fany Reicher e Prof.^a. Dr.^a. Joana Lea Ganter pelo empréstimo de equipamentos, os quais auxiliaram a realização de parte desta tese;

Prof.^a. Dr.^a. Juliana Maurer Menestrina e Prof.^a. Dr.^a. Cirene Lesniowski Delgobo,

por sua amizade em todas as horas, sem as quais não seria possível fazer esta caminhada, pois foram vocês que mais me apoiaram e motivaram durante todo o Mestrado e também o Doutorado, que tenho certeza se estenderá por toda a vida;

Prof.^a. Dr.^a. Selma Faria Zawadski Baggio, mil obrigados pela sua sempre prestimosa amizade, e também por seu apoio constante, no campo profissional e pessoal,;

Para D. Dionéia Gonçalves pelo imenso amor que sentimos uma pela outra, e também pelo seu apoio sempre constante. Mil beijos;

Prof. Dr. Marcos José Machado e Prof.^a. Dr.^a. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão sempre estarão no meu coração como amigos queridos;

Aos colegas do Laboratório de Química de Carboidratos de Algas Marinhas Gladis Anne Horacek Majczak, Siumara Túlio, Jean Patrick Cauduro, Adriano Gonçalves Vianna, Diogo Ducatti, Flávia Cristina J. Pinto, Daniele Cordeiro Chaves, Alexandre Orsato, Rosiane G. M. Zibetti, Paula Cristina de Sousa Faria, Alan Guilherme Gonçalves, Sérgio Ascêncio por enfrentarmos sempre juntos as lutas do dia-a-dia no laboratório, e pela força sempre bem vinda;

Marco André Cardoso, muito obrigada pelo auxílio prestado na fase química deste trabalho, e também por sua amizade, que muito prezo;

Rodrigo Arantes Reis, Fernanda Faganoli Simas, Simone Gräebin, Prof. Dr. Aducto Bellarmino de Pereira Netto pelos momentos de descontração e amizade;

Para Priscila Greboge e Ana Paula Abud, por terem sido muito amigas e companheiras em períodos distintos deste trabalho;

Maria Laura Assef, Rodrigo Bagattelli, Ana Paula Azambuja, Jayme Bordini Júnior, Luciana Lopes, meus queridos amigos, obrigada por tudo;

Mariana da Rocha Piemonte, obrigada por sua amizade e também pelo auxílio nos experimentos de Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura;

Vera Lúcia Pereira dos Santos, Célia Regina C. Franco, Adriana Brás Moreira, Rafael Bertoni da Silveira, Andréa Senff Ribeiro, Loara Feitosa (*in memoriam*), Vera Cristina Zanetti, Cândido Thomaz Pereira, pelas palavras de amizade;

Ruth Janice G. Schadeck, Luiz Fernando Fávero, Manoel Carlos T. Quintilhan, Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, por suas palavras de estímulo;

Marco Randi, por suas palavras de estímulo, e também pelo auxílio para o trabalho de morfometria das células HeLa;

À Prof.^a. Dr.^a. Edith Fanta pelo empréstimo do fotomicroscópio e à Prof.^a. Sonia Regina Grotzner, pelo treinamento;

Sr. Herculano Salviano dos Reis Filho (“Seu” Nino), Rosalina de Moraes e Eliane Regina Nascimento Mendes pela preciosa ajuda, prestimosa colaboração como consultoria histotecnológica;

Para Prof.^a Dr.^a Maria Eliane Merlin Rocha, Prof.^a Dr.^a Eva Gunnila Skare Carnieri, Prof. Dr. Aníbal de Paiva Campelo, Prof.^a Dr.^a Maria Lúcia Klüppel, Prof. Dr. Aguinaldo José do Nascimento pelo apoio e amizade sincera;

Aos colegas do Laboratório de Oxidações Biológicas, Dr.^a Eneida Janiscki Daloci, Prof.^a Dr.^a Silvia Cadena, Prof.^a Dr.^a Fabiana Mansani, Priscila Iansen dos Santos, Guilhermina Rodrigues Noletto, Júlio César Cardoso, Wellington Luciano Braguini, Andreia Mariante Rocha, Fabiane Fortes, Prof. Dr. Luiz Fernando Pereira, Ana Paula Newton;

À Prof.^a Dr.^a Glacy Terezinha Zancan pelo grande auxílio no início do doutorado, pelas análises prestimosas dos relatórios e como membro da banca interna, enriquecendo grandemente este trabalho;

Aos colegas Fabíola Iagher, Ana Paula Busato, Luciane Lazarini, Angela Okasaki, Renato Bochichio e Andréia pela amizade cultivada durante todo o tempo;

Para Gisele Eliane Peressutti, pela sua amizade e todos os ótimos momentos vividos neste final de doutorado;

Prof.^a Dr.^a Eliana Borba Carneiro pelo auxílio prestado sempre que necessário e por sua estimada amizade;

Ao amigo Eduardo Luiz Voigt que esteve comigo durante parte desta caminhada, e me auxiliou sempre que necessário;

José Augusto Florêncio (*in memoriam*), amigo querido, companheiro de luta, saiba que estará sempre nos nossos corações, esteja onde estiver...;

Para Fábio Henrique de Carvalho, Marcos Luiz Pessatti e Maurício Passos pelo bom humor;

Aos amigos João Armando Brancher, Simone Grande e Tiago Martinello pelas palavras de estímulo e bom humor constante;

Para Prof.^a Dr.^a Iara Maria Pereira Machado, Prof. Dr. Hidevaldo Machado, Prof. Dr. Júlio César Ferreira, Juliana Rocha Lopes Ramos, Humberto Josue de Oliveira Ramos, Maria Lúcia Ishida e Cláudia Cristina Didonete por seu bom humor e carisma;

Selene Lobo Elífió, Cíntia Mara Ribas de Oliveira, Prof.^a Dr.^a Sandra Woranovickz Bandeira, Patrícia Maria Stuelp, Guilherme Lanzi Sassaki, Patrícia Lanzi Sassaki, Clarice Aoki Osaku por suas palavras de incentivo;

A todos os amigos que se fizeram presentes em alguma etapa da minha vida,

sendo com isto muito importantes no crescimento e formação do meu caráter;

Ao Sr. Maurício Pereira Cantão, do Laboratório de Análise da COPEL-UFPR, pelo alto nível profissional nas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura;

Ao Centro de Microscopia Eletrônica – nas pessoas de Daura Regina Eiras Stofella, Vera Regina Fontana Pionteke, Rosi Kruger e Sra. Matilde Machado de Oliveira pelo imenso auxílio prestado;

Ao Doutorando César Augusto Tischer, pela sua presteza e sua disponibilidade na realização das análises de GC-MS e ao Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá, pelas análises de RMN, por suas conversas e auxílios sempre necessários à realização da parte química deste trabalho;

Ivana Barbola, Marcos Flávio Goes de Moraes por sua inestimável amizade e acolhimento quando cheguei à UEPG, e por me abrigarem em sua casa sempre que possível;

Aos queridos colegas do Departamento de Biologia Geral da UEPG, Roberto Ferreira Arttoni, José Rosa Gomes, Ines Matozo Takeda, Marco Antonio Gimenes Basso, Maria Albertina de Miranda Soares, Ana Maria Gealh, Carla Cristina Kanunfre, Cristina Lúcia Santana Ayub, Célia Maria da Lozzo Lopes, Marcia Paes de Oliveira, Akemi Teramoto de Camargo, Marcos Pileggi, Sônia Alvim Veiga Pileggi, Rosângela Capuano Tarvino, Rosemari Segecin Moro, Mara Cristina de Almeida, Rosilda Aparecida Kovaliczn com quem compartilho a luta por uma Universidade Pública de qualidade;

Aos funcionários da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas, pela presteza e boa vontade no atendimento;

À Chefia, Vice-Chefia e aos funcionários do Departamento de Biologia Geral da UEPG, pelo convívio e apoio prestados;

À Chefia, Vice-Chefia e aos funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPR, pelo convívio em paz;

Ao diretor do Setor de Ciências Biológicas, da UFPR, Prof. Dr. Oldemir Carlos Manguili, pelo apoio e incentivo durante a realização deste trabalho;

À Coordenação e Vice-coordenação de Pós-Graduação em Bioquímica, desta Universidade;

Ao CNPq e PRONEX-Carboidratos pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 ASPECTOS GERAIS DOS POLISSACARÍDEOS DE ALGAS MARINHAS	2
1.2 ASPECTOS GERAIS DOS POLISSACARÍDEOS DE RHODOPHYTAS (ALGAS VERMELHAS)	3
1.3 ASPECTOS GERAIS DOS POLISSACARÍDEOS DE PHAEOPHYTAS (ALGAS PARDAS)	6
1.4 EVIDÊNCIAS DA AÇÃO BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS	11
1.5 AÇÃO BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS DE ALGAS marinhas EM CÉLULAS ANIMAIS	13
1.6 ESTRUTURA E FUNÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR EM CÉLULAS ANIMAIS	16
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 REAGENTES	25
3.2 ALGAS	25
3.3 CÉLULAS	26
3.4 MÉTODOS GERAIS	26
3.5 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FUCANAS ISOLADAS DA ALGA PARDA <i>Sargassum stenophyllum</i>	27
3.6 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FRAÇÃO FP.	27
3.7 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO FD2	30
3.7.1 CARBOXI-REDUÇÃO	30
3.7.2 SULFATAÇÃO	30
3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS	31
3.8.1 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DOS POLISSACARÍDEOS E REDUÇÃO DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE	31
3.8.2 ACETILAÇÃO	31
3.8.3 DOSAGEM DE AÇÚCARES TOTAIS	31
3.8.4 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO URÔNICO	31
3.8.5 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA	32
3.8.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SULFATO	32
3.9 METILAÇÃO	32

3.10 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	32
3.10.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA (GLC)	32
3.11 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS	33
3.11.1 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO 13 (RMN - ¹³ C)	33
3.11.2 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DE INFRAVERMELHO (FT-IR)	33
3.12 MÉTODOS ELETROFORÉTICOS	33
3.13 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>Porphyra columbina</i>, <i>Bostrychia montagnei</i>, <i>Laminaria brasiliensis</i> E <i>Sargassum stenophyllum</i> EM CÉLULAS HeLa.	34
3.14 CULTIVO CELULAR	34
3.14.1 PROCEDIMENTOS DE ESTERILIZAÇÃO	34
3.14.2 SOLUÇÕES	35
3.14.2.1 SOLUÇÃO DE BICARBONATO DE SÓDIO	35
3.15.2.2 SOLUÇÃO DE SALINA TAMPONADA (PBS)	35
3.15.2.3 SOLUÇÃO DE TRIPSINA-VERSENO (STV)	35
3.15.2.4 MEIO DE CULTURA	35
3.15.3 TESTES DE ESTERILIDADE	36
3.15.4 PROCEDIMENTOS DE CULTIVO CELULAR	36
3.15.5 MANUTENÇÃO DA LINHAGEM	36
3.15.6 DESCONGELAMENTO DA LINHAGEM	36
3.15.7 REPIQUES (SUB-CULTURAS)	37
3.15.8 CONTAGEM DE CÉLULAS	37
3.15.9 VIABILIDADE CELULAR	37
3.15.9.1 TESTE DO AZUL DE TRIPAN	37
3.15.9.2 TESTE DO MTT	37
3.15 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE CÉLULAS HeLa.	38
3.16 PROCESSAMENTO DE CÉLULAS HeLa PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ÓPTICA.	38
3.17 ANÁLISE QUANTITATIVA DA POPULAÇÃO CELULAR ASSOCIADA COM A DIVISÃO CELULAR	38
3.18 PROCESSAMENTO DE CÉLULAS HeLa PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.	39
3.19 ENSAIO DE ADESÃO DE CÉLULAS HeLa SOBRE MOLÉCULAS DE MATRIZ EXTRACELULAR	39
3.21 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA GALACTANAS SULFATADAS, ALGINATOS E FUCANAS BRUTAS DE ALGAS MARINHAS SOBRE CÉLULAS HeLa	42
4.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS DA ALGA PARDA <i>Sargassum stenophyllum</i>.	59

4.2.1	EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DA ALGA PARDA <i>S. stenophyllum</i> E PRECIPITAÇÃO POR CETAVLON	59
4.2.2	HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FRAÇÃO FP DE <i>s. stenophyllum</i>	59
4.2.3.	ANÁLISES QUÍMICAS E ESPECTROSCÓPICAS DA FRAÇÃO FD2 E DOS CORRESPONDENTES POLÍMEROS MODIFICADOS	64
4.3	EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>Sargassum stenophyllum</i> SOBRE CÉLULAS HeLa	71
4.4	EFEITO DAS FRAÇÕES DE HETEROFUCANAS DA ALGA <i>Sargassum stenophyllum</i> SOBRE A DIVISÃO CELULAR	91
4.5	COMPARAÇÃO HISTOQUÍMICA DA MONOCAMADA DE CÉLULAS HeLa NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE FUCANAS. EVIDENCIAÇÃO DE GRUPOS SULFATO E CARBOXÍLICOS	96
4.6	EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE <i>Sargassum stenophyllum</i> SOBRE A ADESÃO DE CÉLULAS HeLa	104
5.	DISCUSSÃO FINAL	112
6.	CONCLUSÕES	115
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
9.	TRABALHO PUBLICADO	136
10.	RESUMOS EM CONGRESSOS	136

LISTA DE TABELAS

TABELA I – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS GALACTANAS, ALGINATOS E FUCANAS BRUTAS.....	44
TABELA II - AVALIAÇÃO DE ALGUNS PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DE CÉLULAS HeLa CRESCIDAS NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE DAS GALACTANAS, ALGINATOS E FUCANAS BRUTAS.....	47
TABELA III - RENDIMENTOS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES DA ALGA <i>S. stenophyllum</i>	62
TABELA IV - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA ALGA <i>S. stenophyllum</i>	62
TABELA V – ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO FD2-c	68
TABELA VI – AÇÃO DAS FUCANAS PURIFICADAS E DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE PARCIAL SOBRE CÉLULAS HeLa.....	74

LISTA DE FIGURAS

ESQUEMA 1 – ESQUEMA DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO DAS FUCANAS DE <i>Sargassum stenophyllum</i>	28
ESQUEMA 2 – PURIFICAÇÃO DAS FUCANAS DE <i>S. stenophyllum</i>	28
ESQUEMA 3 – HIDRÓLISE PARCIAL E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>S. stenophyllum</i>	29
Figura 1 - Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescidas na ausência de polissacarídeo (controle) observadas por M. O.	46
Figura 2 – Fotomicrografia ultraestrutural da monocamada de células HeLa na ausência de polissacarídeos (controle) observada por M.E.V.	47
Figura 3 – Fotomicrografia ultraestrutural da monocamada de células HeLa crescida por 48 horas na ausência de polissacarídeos (controle) observada por M.E.T.	48
Figura 4 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração BHW de <i>B. montagnei</i> . M.O.	50
Figura 5 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração B4 de <i>B. montagnei</i> . M.O.	50
Figura 6 - Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração PC75 de <i>Porphyra columbina</i> . M.O.	51
Figura 7 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença dos poliuronídeos de <i>Laminaria brasiliensis</i> e <i>Sargassum stenophyllum</i> . M.O.	53
Figura 8 - Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FS de <i>Sargassum stenophyllum</i> . M.O.	54
Figura 9 – Curva dose-resposta da viabilidade de células HeLa crescidas na presença da fração FS extraída da alga parda <i>Sargassum stenophyllum</i>	56
Figura 10 - Fotomicrografia da monocamada celular crescida na presença da fração FP de <i>Sargassum stenophyllum</i> sobre as células HeLa. M.O.	58
Figura 11 – Perfil eletroforético das frações FB, FP e FD2 de <i>Sargassum stenophyllum</i>	63
Figura 12 – Espectro de FT-IR na forma sólida da fração FD2, isolada de <i>S. stenophyllum</i>	69
Figura 13 – Espectro de FT-IR na forma sólida da fração FD2-s, obtida de <i>S. stenophyllum</i>	69

Figura 14 – ESPECTROS DE R.M.N.- ¹³ C E DEPT DA FRAÇÃO FD2	70
Figura 15 – ESPECTROS DE R.M.N.- ¹³ C E DEPT DA FRAÇÃO FD2-s	70
Figura 16 - Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescidas na ausência de polissacarídeo e observadas por M. O.....	75
Figura 17 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração F-3B de <i>S. stenophyllum</i> . M.O.	76
Figura 18 – Fotomicrografia da monocamada celular crescida na presença da fração F-5B de <i>S. stenophyllum</i> . M.O.	76
Figura 19 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FD2 de <i>Sargassum stenophyllum</i> . M.O.....	78
Figura 20 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FD2 de <i>Sargassum stenophyllum</i> . M.O.....	79
Figura 21 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FD2-c de <i>Sargassum stenophyllum</i> . M.O.	79
Figura 22 – Fotomicrografia ultraestrutural de células HeLa tratadas com a fração FD2-c de <i>Sargassum stenophyllum</i> . M.E.V.	80
Figura 23 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FD2-s de <i>S. stenophyllum</i> . M.O.	81
Figura 24 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FD2-s de <i>Sargassum stenophyllum</i> . M.O.	81
Figura 25 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FD2-s de <i>Sargassum stenophyllum</i> . M.O.	82
Figura 26 – Fotomicrografia ultraestrutural de células HeLa tratadas com a fração FD2-s de <i>S. stenophyllum</i> . M.E.V.	83
Figura 27 – Fotomicrografia ultraestrutural da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FD2-s. M.E.T.....	84
Figura 28 – Fotomicrografia ultraestrutural da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FD2-s. M.E.T.....	84
Figura 29 – Fotomicrografia ultraestrutural da monocamada de células HeLa crescida por 48 horas na presença da fração FD2-s na concentração de 80 µg mL ⁻¹ observada por M.E.T.....	85
Figura 30 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FD2-cs de <i>Sargassum stenophyllum</i> . M.O.	86

Figura 31 – Curva dose-resposta sobre a viabilidade de células HeLa crescidas na presença das frações F-3B e F-5B extraídas da alga <i>S. stenophyllum</i>	89
Figura 32 – Curva dose-resposta sobre a viabilidade de células HeLa crescidas na presença das frações parcialmente hidrolisadas da alga <i>S. stenophyllum</i>	90
Figura 33 – Avaliação da percentagem de mitoses de células HeLa na presença e ausência de polissacarídeos sulfatados da alga <i>Sargassum stenophyllum</i>	94
Figura 34 – Avaliação da percentagem de mitoses de células HeLa na presença e ausência de polissacarídeos com diferentes teores de sulfato e ácidos urônicos da alga <i>Sargassum stenophyllum</i>	95
Figura 35 – Fotomicrografia da monocamada controle de células HeLa observada por M. O.....	98
Figura 36– Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração F-3B de <i>S. stenophyllum</i> . M.O.	99
Figura 37– Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração F-5B de <i>S. stenophyllum</i> . M.O.	100
Figura 38 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FD2-s de <i>S. stenophyllum</i> . M.O.	101
Figura 39 – Fotomicrografia da monocamada controle de células HeLa observada por M. O.....	102
Figura 40 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FD2-s de <i>S. stenophyllum</i> . M.O.	103
Figura 41 - Efeito das frações de fucanas nativas e polissacarídeos sulfatados e derivatizados da alga <i>Sargassum stenophyllum</i> na adesão de células HeLa sobre matriz de laminina-1.	106
Figura 42- Efeito das frações de fucanas nativas e polissacarídeos sulfatados e derivatizados da alga <i>Sargassum stenophyllum</i> na adesão de células HeLa sobre matriz de fibronectina de plasma humano.	108
Figura 43- Efeito das frações de fucanas nativas e polissacarídeos sulfatados e derivatizados da alga <i>Sargassum stenophyllum</i> na adesão de células HeLa sobre matriz de vitronectina de plasma humano.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	(delta), deslocamento químico
BHW	fração bruta da alga vermelha <i>Bostrychia montagnei</i>
BM-L	Blocos M (Ác. Manurônico) de <i>Laminaria brasiliensis</i>
BG-L	Blocos G (Ác. Gulurônico) de <i>L. brasiliensis</i>
BG-S	Blocos G (Ác. Gulurônico) de <i>Sargassum stenophyllum</i>
B4	galactana sulfatada purificada <i>B. montagnei</i>
BSA	soro albumina bovina
cels mL ⁻¹	células por mililitro
Cetavlon	sal de amina quaternária
CG-EM	Cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massa
CMC	1-ciclohexil-3-(2-morfolino-etil)carbodiimida metho- <i>p</i> -toluenosulfonado
D ₂ O	água deuterada
DEAE	Dietil-aminoetil
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	dimetil sulfóxido
DS	grau de substituição
IL	interleucina
FB	Fucana bruta, extraída em solução aquosa à temperatura ambiente da alga parda <i>Sargassum stenophyllum</i>
FP	<i>Pool</i> de fucanas purificadas a partir da fração FB por complexação com base quaternária Cetavlon
FD	Fração obtida por hidrólise ácida parcial a partir da fração FP
FD1	Fração obtida de FD por cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephacel) e eluída com água destilada
FD2	Fração obtida da fração FD por cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephacel) e eluída com 0,5 M de cloreto de sódio
FD2-c	Fração FD2 submetida a carboxi-redução
FD2-s	Fração FD2 submetida a sulfatação química
FD2-cs	Fração FD2 submetida a carboxi-redução e sulfatação química sequenciais
FD3	Fração obtida da fração FD por cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephacel) e eluída com 1 M de cloreto de sódio

FP	Fucana sulfatada precipitada de <i>S. stenophyllum</i>
FS	Fucanas sulfatadas solúveis de <i>S. stenophyllum</i>
GLC	cromatografia líquido-gasosa
Glc pA	ácido glucurônico
Gluc pA	ácido gulurônico
g mol ⁻¹	gramas por mol
GPC	cromatografia de gel permeação
mg kg ⁻¹	miligramas por kilograma
mg kg ⁻¹ dia ⁻¹	miligramas por kilograma por dia
m/v	massa por volume
MES	(ácido 2-[N-morfolino]etanosulfúrico)
M. E. T.	microscopia eletrônica de transmissão
M. E. V.	microscopia eletrônica de varredura
M.O.	microscopia ótica
mol L ⁻¹	mol por litro
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2-)-2,5-difeniltetrazolio (azul de tetrazoil)
PBS	Solução de salina tamponada (pH 7,4)
PC75	Porfirana purificada da alga vermelha <i>Porphyra columbina</i>
ppm	partes por milhão
RMN- ¹³ C	espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono treze
rpm	rotações por minuto
S1	fração sobrenadante do tratamento por Cetavlon da fração FB
SFB	soro fetal bovino
STV	solução tripsina-versene
TES	(ácido N-tris[hidroximetil]metil-2-aminoetanosulfúrico)
TFA	ácido trifluoracético
UV	ultravioleta

RESUMO

As fucanas de *Sargassum stenophyllum* foram obtidas por extração aquosa à temperatura ambiente, e purificadas por precipitação com cetavlon e posterior descomplexação com 4 mol L⁻¹ de NaCl. Esta fração (FP, relação sulfato/açúcar total de 0,3), foi submetida à hidrólise ácida parcial (0,05 mol L⁻¹ H₂SO₄, 100°C, 45 min.) e os produtos fracionados por cromatografia de troca iônica. As frações eluídas com 0,5 mol L⁻¹ (FD2) e 1,0 mol L⁻¹ NaCl (FD3), apresentaram rendimentos de 63 e 12,6%, respectivamente. A fração FD2, relação sulfato/açúcar total de 0,18, é constituída por fucose (15,5 mol%), galactose (40,4 mol%), manose (19 mol%), xilose (13,2% mol%), glucose (11,9 mol%). A presença de ácido glucurônico (11,7%) foi confirmada após carboxiredução de FD2 e utilizando derivado de carbodiimida. FD2 foi modificado por sulfatação química (FD2-s), apresentando relação molar sulfato/açúcar total de 0,51, carboxi-redução (FD2-c), e também pelos dois procedimentos, resultando a fração FD2-cs. Os resultados de análises de metilação, FTIR e RMN-¹³C indicam que FD2 apresenta uma cadeia principal constituída por manose 2-*O*-substituída (98,3 ppm) ramificada em C-3 e C-4. Galactose está principalmente 4-*O*-substituída (77,2 ppm) e 3-*O*-substituída (80,9 – 80,1 ppm) ramificada em C-6. As unidades de galactose correspondem, no polímero nativo (F3B) a pontos de ramificação por unidades de fucose, as quais no polímero parcialmente defucosilado (FD2) estão principalmente 3-*O*-substituídas (sulfatadas em C-4) e 2-*O*- e 4-*O*-substituídas. Glucose e ácido glucurônico são principalmente 4-*O*-substituídos e ramificados em C-3, tanto em F3B como em FD2.

A avaliação da citotoxicidade, alteração da capacidade mitótica, além da interação com moléculas de matriz extracelular das células HeLa, foi realizada com fucanas nativas de *S. stenophyllum*, e também com polissacarídeos lineares, previamente isolados e caracterizados, como galactanas sulfatadas (de *Bostrychia montagnei* e *Porphyra columbina*) e alginatos (de *Laminaria brasiliensis* e *S. stenophyllum*). Desses polímeros, apenas as fucanas ocasionaram alteração da morfologia e diminuição significativa da monocamada de células HeLa. Fucanas nativas (F-3B, F-5B) e modificadas por hidrólise parcial, seguida de sulfatação química (FD2-s) alteraram significativamente a morfologia, proliferação destas células. Entretanto as frações com menor densidade de carga, FD2 e FD2-c alteraram pouco ou não causaram modificações nestes parâmetros. A interferência desses polímeros na adesão de células HeLa sobre substratos de moléculas de matriz extracelular específicas foi verificada. Na presença de laminina-1, e das frações F-5B, FD2-s e F-3B ocasionaram inibição de 92%, 86,4% e 80%, respectivamente. As frações FD2-cs e FD2 causaram menor grau de inibição (65% e 60,5%, respectivamente). Com a matriz de fibronectina, somente as frações F-3B e F-5B (80 µg mL⁻¹) promoveram inibição de 25 e 15%, respectivamente. Com a matriz de vitronectina ocorreu inibição de 30% com as frações F-3B e F-5B (80 µg mL⁻¹) e também com a fração FD2 (28%), FD2-s (34,5%) e FD2-cs (30%), respectivamente. Ressalta-se que a fração FD2-c (fração menos carregada negativamente) promoveu diminuição da adesão de células HeLa à laminina-1 em 25%, porém aumentou a adesão celular com matriz de fibronectina em 60%, na concentração de 160 µg mL⁻¹. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a presença de cadeias laterais, ácidos urônicos, mas principalmente o alto grau de cargas negativas do polímero (grupos sulfato e carboxílicos), bem como a distribuição de cargas da molécula são essenciais para que ocorra citotoxicidade, alterações na divisão celular, alterações morfológicas e interferência na adesão das células HeLa.

ABSTRACT

A fucan sulfate obtained from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*, by aqueous extraction at room temperature, was submitted by Cetavlon 10% precipitation, followed by decomplexation with 4 mol L⁻¹ NaCl. This fraction (FP, total carbohydrate/sulfate 0.3) was submitted to partial acid hydrolysis (0.05 mol L⁻¹ H₂SO₄, 100°C, 45 min.) and the products fractionated by anion exchange chromatography. Stepwise elution with 0.5 mol L⁻¹ (FD2) and 1.0 mol L⁻¹ NaCl (FD3), shown 63% and 12.6% yield, respectively. The FD2 fraction, shown total carbohydrate/sulfate 0.18, contained by Fuc (15.5 mol%), Gal (40.5 mol%), Man (19.0 mol%), Xyl (13.2 mol%), Glc (11.9 mol%) and GlcA (11.7%). FD2 was submitted to several chemical treatment, how sulfation, resulting in fraction FD2-s, which had ratio of total carbohydrate/sulfate of 0.51, and on carboxy-reduction (NaBH₄), gave fraction FD2-c, or both treatments, gave fraction FD2-cs. The results of methylation, FTIR and RMN-¹³C analysis of FD2 fraction, suggest the backbone is formed by mannose 2-*O*-substituted (98.3 ppm) with ramification in C-3 and C-4. Galactose is mainly 4-*O*-substituted (77.2 ppm) and 3-*O*-substituted (80.9 – 80.1 ppm) with ramification in C-6. Glucose and glucuronic acid are mainly 4-*O*-substituted with ramification in C-3 (F3B and FD2).

The cytotoxic effect, mitotic alterations, and extracellular matrix interactions were performed on HeLa cell cultures, with linear polysaccharides, previously characterized, such as sulfated galactans (from *Bostrychia montagnei* and *Porphyra columbina*) and alginates (from *Laminaria brasiliensis* and *S. stenophyllum*) and native fucans from *Sargassum stenophyllum*. Only fucans modified HeLa cell morphology, and lowered significantly the cell number. Considering these results, native fucans (F-3B and F-5B) and derived polysaccharides (FD2, FD2-s, FD2-c and FD2-cs) from *S. stenophyllum* were chosen for specific evaluations. Fractions F-3B, F-5B and FD2-s gave rise to significant modifications of morphology, cellular proliferation, among other effects. Fractions showing low charge density, FD2 and FD2-c did not modified these parameters. Effects on adhesion properties were evaluated using the polysaccharides under study and specific extracellular matrix components such as. Fractions F3-B, F5-B, FD2-s, FD2-cs and FD2, at 160 µg mL⁻¹ were able to inhibit 80%, 92%, 86%, 65% and 60.5%, respectively, the interaction of the cells with laminin-1. With fibronectin matrix, only fractions F-3B and F-5B (80 µg mL⁻¹) promoted inhibition of 25 and 15%, respectively. With the vitronectin matrix, 30% inhibition occurred with fractions F-3B and F-5B, at 80 µg mL⁻¹, and low significant inhibition with FD2 (28%), FD2-s (34.5%) and FD2-cs (30%) at the same concentration. Fraction FD2-c decrease cellular adhesion with laminin-1 at 25% but increased (60%) with fibronectin matrix, at the 160 µg mL⁻¹. The results obtained showed that the presence of branches, degree of negative charges (sulfate and/or carboxylic groups), and charge distribution in the molecule are essential for cytotoxicity, mitotic and morphological alterations, and interference of HeLa cell adhesion.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DOS POLISSACARÍDEOS DE ALGAS MARINHAS

As algas marinhas constituem uma das principais fontes de polissacarídeos na natureza. Entre as famílias de algas mais estudadas estão as Phaeophytas, Rhodophytas e Chlorophytas. As algas podem apresentar tipos característicos de polissacarídeos, os quais estão confinados a determinadas famílias, por exemplo: a presença de galactanas em Rhodophytas; os ácidos algínicos (β -D-ManpA e α -L-GulpA), as fucanas (heteropolissacarídeos sulfatados contendo fucose), e a laminarana que estão presentes em algas pardas (Phaeophytas); além do amido presente em Chlorophytas (DUARTE, 1990).

Alguns fatores podem influenciar a composição química desses polímeros e promover variações estruturais, como a sazonalidade, o habitat, a profundidade de imersão (luminosidade), a fase de desenvolvimento celular e a espécie (interespecífica) (DUARTE, 1990).

Nas algas, os polissacarídeos participam da estrutura da parede celular, que é semelhante àquela das plantas superiores, sendo constituída por duas fases: uma cristalina, o esqueleto, que se encontra embebido em outra fase, a matriz. A predominância desta última em relação à primeira diferencia as algas das plantas superiores. Na matriz, os polímeros polianiônicos são predominantes em relação aos neutros, incluindo a presença de polissacarídeos sulfatados, que parecem ter papel fundamental na regulação osmótica ou iônica, importante na adaptação das algas ao meio marinho (KLOAREG; QUATRANO, 1988). Estruturalmente, as paredes celulares da maioria das algas vermelhas, por exemplo, incluem um componente interno rígido formado por microfibrilas (esqueleto), que pode ser celulose ou outro polissacarídeo com estrutura equivalente e uma matriz mucilaginosa, constituída por galactanas sulfatadas, tais como ágar ou carragenana. Estas algas ainda biossintetizam carboidratos de baixa massa molar e/ou polióis, os quais também apresentam função de osmorregulação (KARSTEN *et al.* 1993).

1.2 ASPECTOS GERAIS DOS POLISSACARÍDEOS DE RHODOPHYTAS (ALGAS VERMELHAS)

Enquanto que alguns polissacarídeos biossintetizados pelas algas estão totais ou parcialmente relacionados com aqueles das plantas terrestres, as galactanas sulfatadas, isoladas de Rodophytas, como ágares e carragenanas, não apresentam nenhuma similaridade com os polímeros destas plantas (USOV, 1992).

As galactanas são os principais constituintes polissacarídicos da matriz das algas vermelhas. Esses polissacarídeos apresentam uma estrutura principal comum, constituída por uma cadeia linear alternada de unidades (1→3)-β-D-galactopiranosose (unidade A), alternadas por unidades (1→4)-α-galactopiranosose (unidade B) (PAINTER, 1982). As unidades podem estar parciais ou totalmente na forma de 3,6-anidrogalactose. De acordo com sua estereoquímica –L ou –D, as galactanas podem ser subclassificadas: galactanas tipo ágar, onde unidade B pertence a série L- e galactanas tipo carragenana, onde as unidades B pertencem a série D- (PAINTER, 1982). Existem ainda galactanas cuja unidade 4-O-substituída pode ser tanto da série D- como L-, sendo denominadas galactanas híbridas (MILLER *et al.* 1997). Esta estrutura das galactanas pode ainda apresentar-se modificada por diferentes tipos de substituintes, tais como O-sulfato, O-metil, O-glicosil e acetal de ácido pirúvico (USOV, 1992).

Em relação aos grupamentos substituintes, algumas generalizações podem ser feitas:

(1) as carragenanas geralmente não apresentam grupamentos metil, com exceção das *beta*-carragenanas, mas são altamente substituídas por grupamentos sulfato, em determinadas posições, sendo que a exata posição destas substituições permite definir o tipo de carragenana (MILLER; BLUNT, 2000).

(2) Os ágares geralmente são menos sulfatados que as carragenanas, porém altamente metilados, com possibilidade de substituintes como ácido pirúvico e unidades de xilose (DUCKWORTH; YAPHE, 1971).

Embora as galactanas apresentem uma estrutura básica comum, ou seja, β-galactose-3-O-substituída e α-galactose-4-O-substituída, o grau e o tipo de substituição dá origem a diferentes galactanas sulfatadas, as quais apresentam distintas propriedades físico-químicas.

As galactanas tipo ágar apresentam substituição por grupamentos O-metil principalmente em C-6 da unidade A e C-2 da unidade B (2-O-metil-3,6-anidrogactose e 2-O-metilgalactose) (USOV, 1998).

A capacidade de formar gel em baixa concentração confere às galactanas tipo ágar uma grande importância industrial e alimentícia (PEARSON, 1995). O grau de substituição e o tipo de substituintes das galactanas tipo ágar têm correlação direta com a propriedade geleificante. Deste modo, a agarose é o componente do ágar com maior poder de geleificação, mas polissacarídeos semelhantes com maiores teores de grupamentos sulfato apresentam uma drástica diminuição da força do gel (WHYTE *et al.* 1981).

Os primeiros estudos sobre as galactanas da Ordem Ceramiales foram realizados por BOWLER e TURVEY (1968). Esses autores isolaram da Rhodomelaceae *Laurencia pinnatifida* um polissacarídeo sulfatado (39% de sulfato) constituído por D-galactose (28%) 6-O-metil-D-galactose (18%), L-galactose (9%), 2-O-metil-L-galactose (7%), 3,6-anidrogactose e 2-O-metil-3,6-anidrogactose (38%). Os grupamentos sulfato estavam localizados principalmente em C-6 das unidades de L-galactose e de 2-O-metil-L-galactose, além da unidade D-galactose apresentar-se sulfatada em C-2. A existência de D- e L-galactose metiladas já era conhecida em polissacarídeos de algas, porém esta foi a primeira vez que se identificou a unidade 6-O-metil-D-galactose sulfatada.

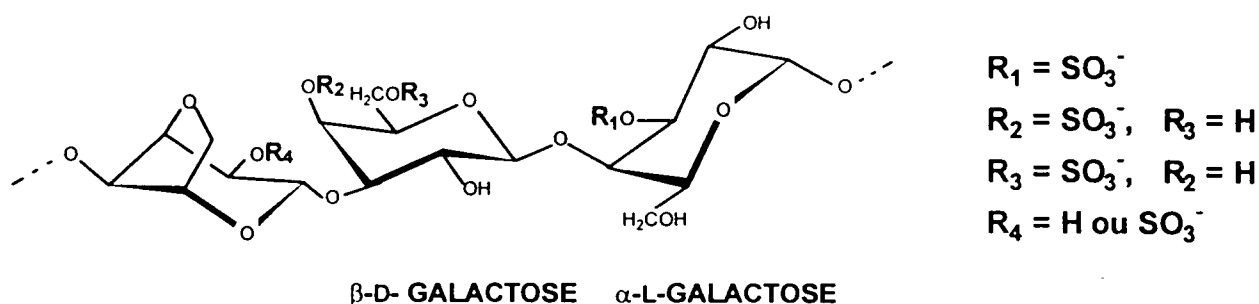
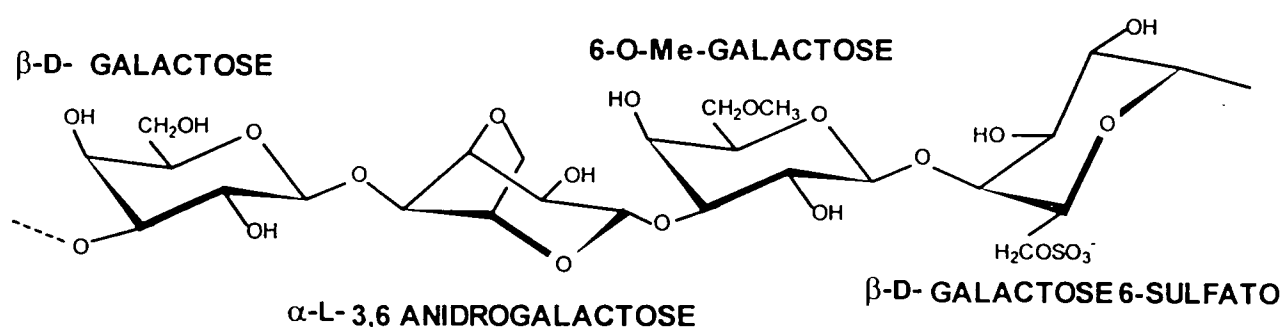
Utilizando Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN-¹³C), MILLER e FURNEAUX (1997) determinaram a estrutura de agaróides obtidos de diferentes espécies de algas pertencentes a ordem Ceramiales. Os autores demonstraram que, em *Euptilota formosissima* e *Streblocladia glomerulata* a totalidade das unidades A estão substituídas por grupamentos metil e sulfato em C-6 e C-2, respectivamente. Um padrão diferente foi observado nos polímeros isolados de *Polysiphonia abscissoides*, onde 70% das unidades estavam sulfatadas e 11% metiladas. Estas espécies de Ceramiales apresentavam o polissacarídeo nativo com 12% (*E. formosissima*) e 19% (*S. glomerulata*) das unidades 4-O-substituídas como unidade precursora de 3,6-anidro-L-galactose, ou seja, L-galactose 6-sulfato.

A alga vermelha *Bostrychia montagnei*, pertencente à ordem Ceramiales, biossintetiza um complexo sistema de galactanas sulfatadas do tipo agaróide. Após extração seqüencial com água à temperatura ambiente e a 65°C, foram obtidas as frações brutas BCW e BHW, respectivamente. Esta última (17% de grupos sulfato) apresenta galactose (60,8%), xilose (6,4%), 6-O-metil galactose (7,8%), 2-O-metil galactose (2,1%),

2-O-metil,3,6 anidrogactose (6,5%), glucose (1,0%), além de 3,6-anidrogactose (15,4%). BCW foi submetida a cromatografia de troca iônica originando seis frações (B1 – B6) (TULIO, 1998; NOSEDA *et al.* 1999). A gactana B4 (24% de grupos sulfato) é constituída principalmente por gactose (77,7%), 3,6-anidrogactose (11,3%), 6-O-metil gactose (8,1%) e xilose (2,9%). A fração B4 nativa, apresenta os grupos metil localizados em C-6 das unidades β -D-gactose (8,4 – 9,0 mol%), em C-2 das unidades de α -L-3,6-anidrogactose (7,9%), havendo indicação da presença de gactose 3- e 4-O sulfato. A determinação da estrutura química fina das gactanas B1, B4 – B6 isoladas de *B. montagnei* foi posteriormente realizada (DUARTE *et al.* 2001 b). Os autores confirmaram que, além de grupos O-metil, parte das unidades β -D-gactose estão substituídas por éster O-sulfato em C-6 (14 mol%) e em C-4 (17 %), enquanto que as unidades de α -L-gactose estão em parte substituídas em C-3 (12 %) por grupos sulfato. A presença de grupos sulfato em C-4 (nas unidades A), e em C-3 (nas unidades B), distingue esta gactana das demais gactanas do tipo agarana, sendo portanto uma molécula de interesse para a avaliação de seus efeitos biológicos.

As algas vermelhas do gênero *Porphyra* sp. também biossintetizam gactanas sulfatadas do tipo agarana, especialmente denominadas de porfiranas. Polissacarídeos de *Porphyra columbina*, obtidos após extração aquosa à temperatura ambiente, seguida de fracionamento com etanol 75%, forneceram a fração PC75 (15,6% de grupos sulfato), a qual é constituída por gactose sulfatada (22,7%) 3,6-anidrogactose (22,7%) e 6-O-metilgactose (38,7%). Os autores demonstraram que os grupos sulfato estão localizados em C-6 das unidades de α -L-gactose (unidade B). Alta percentagem de grupos O-metil e sulfato em C-6 das unidades A e B, respectivamente caracterizam esta porfirana (VIANA 1999; NOSEDA *et al.* 2000).

As frações B4 e PC75 são portanto, gactanas tipo agarana, com unidades repetitivas semelhantes, mas diferenciadas pelo posicionamento dos substituintes, podendo ambas servirem de modelo para estudos comparativos de atividade biológica.

Fração B4 de *Bostrychia montagnei*Fração PC75 de *Porphyra columbina*

1.3 ASPECTOS GERAIS DOS POLISSACARÍDEOS DE PHAEOPHYTAS (ALGAS PARDAS)

Quantidades variáveis de ácido alginico são sintetizadas pelas algas pardas. Com grande capacidade geleificante e viscosante, este tipo de polissacarídeo é de interesse industrial (McNEELY *et al.* 1973) e medicinal (READ *et al.* 2000; SUZUKI *et al.* 2000; BECKER *et al.*, 2001). O alginato de *Laminaria brasiliensis* é um polímero linear 4-O-substituído, constituído de unidades de ácido manurônico (M) e ácido gulurônico (G), com relação molar M/G de 1,2:1, determinada após carboxi-redução e análise por RMN- ^{13}C do correspondente polímero reduzido. Ao longo da cadeia polissacarídica são distribuídos blocos M (9%), blocos G (26%) e regiões híbridas, constituídas por unidades M e G (65%) (DUARTE *et al.* 1991; NOSEDA *et al.* 1997).

Os blocos M (BM-L) e blocos G (BG-L), obtidos de *L. brasiliensis*, com alto grau de homogeneidade, apresentam um grau de polimerização (DP) de 20 (DUARTE *et*

al. 1991). O alginato de *Sargassum stenophyllum* embora apresentando uma relação M/G (1:1), semelhante ao de *L. brasiliensis*, constituído por blocos M (5,7%), blocos G (28,3%) e regiões MG (66%), apresenta blocos G (BG-S) (homogêneos) maiores que os blocos G de *L. brasiliensis*, com grau de polimerização de 64 (NOSEDA *et al.* 1997).

Outro tipo de polissacarídeo, encontrado em algas pardas são as fucanas. Esses são polímeros sulfatados isolados de algas pardas (Phaeophyta) e de alguns invertebrados marinhos, as quais podem ser constituídas unicamente por unidades de fucose (homofucanas) ou apresentar além de fucose, variadas percentagens de açúcares neutros, como galactose, manose, xilose e glucose, além de ácido urônico. Esta classe de fucanas é denominada heterofucana (KLOAREG; QUATRANO, 1988). Embora a presença de fucanas em algas marinhas seja conhecida desde a década de 50 (COCHIE; PERCIVAL, 1950), foi apenas na década de 90 que estas moléculas sulfatadas passaram a ser investigadas em mais detalhes, devido a suas inúmeras propriedades biológicas, como por exemplo, atividade anticoagulante (NISHINO; NAGUNO, 1991), antitumoral (ELLOUALI *et al.* 1993; ITOH *et al.* 1993), antiadesiva (SOEDA *et al.* 1994 a e b) e antiproliferativa (RIOU *et al.* 1996), entre outras.

Apesar dos vários estudos estruturais de fucanas isoladas de algas marinhas, a estrutura fina de muitos desses polímeros sulfatados ainda não foi elucidada. A grande complexidade estrutural destas moléculas ramificadas deve-se a falta de regularidade da sequência monossacarídica, além do fato de que a estrutura química varia de acordo com a espécie, estação do ano e, até mesmo a parte da alga utilizada para a extração. Além do mais, uma mesma espécie pode biossintetizar fucanas com um vasto espectro estrutural, desde aquelas com baixo teor de fucose e sulfato, mas ricas em ácidos urônicos, até com alta percentagem de fucose, altamente sulfatadas, mas com baixas porcentagens de ácidos urônicos e monossacarídeos neutros. *Sargassum stenophyllum* biossintetiza, entre outras fucanas, duas frações distintas F-3B e F-5B (DUARTE *et al.* 2001 a). F-3B possui 18 mg% de grupos sulfato, e é constituída principalmente por fucose (44,2%) e percentagens significativas de manose (20,1%) e galactose (19,0%) e baixas percentagens de glucose (5,6%), além de ácido glucurônico (12,6%). De modo distinto F-5B apresenta-se mais sulfatada (30,8%) e com baixos teores de ácido urônico (2,1%), sendo fucose (58,4%) e galactose (34,1%) os monossacarídeos majoritários. Xilose (2,9%), manose (2,3%) e glucose (2,4%), também estão presentes. Os resultados das análises de metilação e de ressonância magnética de carbono-13 dos correspondentes polímeros nativos, ou parcialmente dessulfatados e defucosilados permitiram determinar que F-5B

apresenta uma cadeia principal formada principalmente por galactose (1→6) O-substituída com menores percentagens de galactose (1→4), (1→3) e (1→2) O-substituídas, além de unidades de manose (1→4)-O-substituída. As “cadeias de fucanas”, correspondem a seqüências de fucose, que se apresentam (1→3) substituídas, com menores quantidades de fucose 4- e 2-O substituídas. Ramificações ocorrem em C-4 das unidades de fucose 2-O substituídas e, possivelmente, em C-2 e C-3 das unidades de galactose 6-O substituídas. Grupos sulfato estão principalmente localizados nas unidades de fucose, nos carbonos 2 e 4, além de C-2 das unidades de fucose 3-O substituída. Unidades de galactose 6-O-substituídas, dissulfatadas em C-2/C-3 e C-3/C-4, também estão presentes em menor proporção. As análises da fração F-3B demonstraram que esta é uma molécula mais ramificada que a fração F-5B. A cadeia principal é formada por unidades de manose (1→2) O-substituída juntamente com unidades de galactose (1→6), (1→4) e (1→3)-substituídas. Os principais pontos de ramificação ocorrem em C-3 e C-4 das unidades de galactose da cadeia principal e em C-3 de unidades de ácido α -D-glucurônico e/ou α -D-glucose 4-O-substituídas, as quais estão presentes no “domínio de fucanas”. Este é constituído por unidades de fucose, glucose e ácido glucurônico 4-O-substituídas além de unidades de fucose O-substituídas nas posições (1→3) e (1→2). Xilose está presente como unidades terminais em C-3 das unidades de fucose. F-3B apresenta grupos sulfato em C-3 das unidades de fucose 4-O-substituídas e em C-3 e C-6 de unidades de manose (1→2) substituída. Deste modo as fucanas F-3B e F-5B de *S. stenophyllum* apresentam grande complexidade estrutural quando comparadas às heterofucanas relatadas na literatura.

Ressalta-se que devido ao interesse no estudo das propriedades biológicas apresentadas pelas fucanas, muitas das moléculas investigadas são selecionadas devido ao seu alto teor de fucose e/ou atividade anticoagulante. Deste modo estas fucanas usualmente não representam a totalidade dos polímeros biossintetizados pelas algas marinhas. Embora em geral muitas das fucanas relatadas na literatura, apresentam as unidades de fucose (1→3) O-substituídas formando a cadeia principal com ramificações de fucose (1→2) O-substituída e grupos sulfato em C-4, esta estrutura básica está modificada em diferentes graus, e depende da fucana analisada.

Isolou-se de *Cladosiphon okamuranus* (NAGAOKA *et al.* 1999) um polissacarídeo contendo fucose, ácido glucurônico e sulfato (6,1:1,0:2,9). Esta fucana apresenta unidades de fucose 3-O-substituídas. Parte das unidades de fucose (50%) estão

sulfatadas em C-4, enquanto que ~15% estão O-acetiladas; ácido glucurônico também está substituindo (em C-2) unidades de fucose, as quais não se apresentam sulfatadas. Por outro lado, embora a estrutura inicialmente proposta para a fucana sulfatada de *Fucus vesiculosus* tenha sido de um polissacarídeo formado principalmente por unidades de fucose 2-O substituída e sulfatada em C-4 (CONCHIE; PERCIVAL, 1950), apenas na década de 90 a estrutura desta fucana foi revisada (PATANKAR *et al.* 1993). Esses autores concluem que a cadeia principal é constituída por unidades de fucose (1→3) O-substituídas com algumas ramificações em C-2 ou C-4. Grupos sulfato estão localizados em C-4 das unidades de fucose. A estrutura química da fucana de *F. vesiculosus* é semelhante à de *C. okamuranus*, sendo esta última mais sulfatada e apresentando ácido glucurônico. A fucana de *Chorda filum*, também apresenta unidades de fucose 3-O substituída. Esta homofucana apresenta uma estrutura repetitiva formada por um hexassacarídeo constituído por unidades de fucose 3-O substituída, havendo uma ramificação em C-2 por uma única unidade de fucose. Sulfatação ocorre principalmente em C-4 e também em C-2 (CHIZHOV *et al.* 1999). Algumas unidades (1→3) substituídas apresentam O-acetiladas em C-2, assim como na fucana de *C. okamuranus*. Devido à estrutura repetitiva, os sinais obtidos nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C da fucana de *C. filum* foram completamente assinalados, fato este comparável apenas a fucana de *C. cladosiphon*, a qual contém um heptassacarídeo repetitivo (NAGAOKA *et al.* 1999). Deve-se salientar novamente, que a grande dificuldade no estudo de fucanas é que a maioria destas moléculas apresentam-se com alta heterogeneidade química, ramificação, grupos sulfato em diferentes posições, bem como monossacarídeos neutros distintos e variáveis percentagem de ácidos urônicos. Em consequência os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) são complexos, com sinais de difícil resolução (PEREIRA *et al.* 1999). De fato, para esses polissacarídeos, os espectros de RMN têm valor limitado (MULLOY *et al.* 2000). A dessulfatação ou degradação parcial desses polímeros pode facilitar a interpretação destas análises espectroscópicas. Fucanas de *Eclonia kurome* também apresentam unidades de fucose (1→3) O-substituída com grupos sulfato em C-4 ramificadas por cadeias de fucose (1→2) O-substituída. Estas fucanas apresentam baixas percentagens de galactose, embora em vários tipos de ligações glicosídicas (NISHINO *et al.* 1989; NISHINO *et al.* 1991 a).

Além de fucose, algumas fucanas apresentam considerável percentagem de galactose, como a encontrada em *Ascophyllum nodosum*, da qual foram isoladas várias

frações contendo fucose (MEDCALF *et al.* 1978). Uma destas frações (homogênea por critérios eletroforéticos) continha apenas fucose e galactose, como açúcares neutros (relação 1,1:1), além de ácido glucurônico (8%) e sulfato (15%). Os resultados de metilação e oxidação com metaperiodato de sódio sugerem que as unidades de galactose estão 4-O substituídas com ramificação em C-2 por unidades de fucose (1→4) O-substituídas, as quais podem estar dissulfatadas (C-2 e C-3) ou monossulfatadas (C-2 ou C-3) e ácido glucurônico está presente como unidade terminal. De modo distinto, a fucana isolada de *Spatoglossum schrederi* (LEITE *et al.* 1998), apresenta cadeia principal formada por ácido urônico em ligação β -(1→3), com ramificação em C-4 de unidades de fucose (1→3) O-substituída, sendo classificada como uma xilofucoglucuronana. Este polissacarídeo apresenta sulfatação em C-4 das unidades de fucose. Em *S. schrederi*, o ácido glucurônico está em ligação glicosídica do tipo (1→3), diferindo portanto dos polímeros isolados de *S. linifolium* (ABDEL-FATTAH *et al.* 1974) e *S. stenophyllum* onde a ligação é do tipo (1→4). Além de ácido glucurônico, a cadeia principal da fucana de *S. linifolium* é constituída por manose e galactose, com cadeias laterais parcialmente sulfatadas formadas por galactose, xilose e fucose. Esses resultados exemplificam um dos aspectos da diversidade estrutural desses polímeros, onde o ácido glucurônico pode ser um dos constituintes da cadeia principal ou fazer parte de cadeias laterais (LEITE *et al.* 1998; DUARTE *et al.* 2001b).

Polissacarídeos sulfatados contendo fucose tem sido isolados não apenas de algas pardas marinhas, mas também de alguns invertebrados marinhos. De *Ludwigothurea grisea* (pepino do mar, Equinoderma), foi isolado um polissacarídeo constituído cuja cadeia principal é semelhante àquelas de condroitin sulfato de mamíferos: $[4\text{-}\beta\text{-D-GlcA-(1}\rightarrow\text{3)-}\beta\text{-D-GalNAc-1}]_n$ mas estando as unidades de ácido glucurônico substituída em C-3 por ramificações de α -L-fucose. Estas unidades estão majoritariamente sulfatadas em C-4, embora unidades 2,4 e 3,4-di-O sulfatadas também estejam presentes (VIEIRA *et al.* 1991; MOURÃO *et al.* 1996). As ramificações de fucose são essenciais para a expressão da atividade anticoagulante, bem como a presença de grupos sulfato, enquanto que para o correspondente polímero carboxi-reduzido, não apresentou esta atividade. De outra espécie de pepino do mar, *Stichopus japonicus* (KARIYA *et al.* 1990; 1997), foi isolado um condroitin sulfato, constituído por ácido glucurônico, N-acetilgalactosamina, fucose e sulfato. Tanto as unidades de ácido glucurônico (em C-3), como as de N-acetilgalactosamina, (em C-4 e/ou C-6), apresentam-se ramificadas por unidades de

fucose (2 unidades em cada ramificação), as quais estão altamente substituídas por grupos sulfato, (fucose mono-, di- e trissulfatadas).

No entanto, ressalta-se que estudos mais detalhados em fucanas de algas marinhas, especialmente em produtos parcialmente degradados e purificados, poderão ser úteis para evidenciar este monossacarídeo, o qual pode estar presente em baixa percentagem no polímero de origem. Ressalta-se que as fucanas F-3B e F-5B da alga *S. stenophyllum* apresentam ácido glucurônico 4-O substituído, ramificado em C-3 por unidades de fucose sulfatada (DUARTE *et al.* 2001 a). Deste modo, pode-se destacar que existe uma analogia estrutural entre condroitin sulfato fucosilado de invertebrados marinhos, heparina e dermatan sulfato de mamíferos e as fucanas sulfatadas, F-3B e F-5B, de *S. stenophyllum*. Esses resultados abrem perspectivas interessantes para a investigação de possível atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados isolados de algas marinhas.

1.4 EVIDÊNCIAS DA AÇÃO BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS

Carboidratos exercem importantes funções na matriz extracelular (SCHUPPAN *et al.* 1992), nos processos de reconhecimento e na adesão celular (DURAND, 1992; PARDI *et al.* 1992; HOGG; LANDIS, 1993; MACKAY; IMHOF, 1993; KUNOU *et al.* 1993; SHIBATA *et al.* 1999). Além disso, alguns polissacarídeos podem estar envolvidos na ação estimulatória do sistema imune (SUZUKI *et al.* 1985; ARINAGA *et al.* 1992; JOHNSON *et al.* 1992; ROSS; VETVICKA, 1993), na inibição de metástases tumorais (PARISH *et al.* 1987; COOMBE *et al.* 1987; PARISH; SNOWDEN, 1988; MISHIMA *et al.* 1998), inibição do crescimento vascular (LOGEART *et al.* 1997; SOEDA *et al.* 1997), ação antiviral (FELDMAN *et al.* 1999; TULIO, 1998; NOSEDA *et al.* 1999; MAJCZAK, 1999; CACERES *et al.* 2000), anticoagulante (NISHINO; NAGUMO, 1992; CHEVOLOT *et al.* 1999; CACERES *et al.* 2000; MULLOY *et al.* 2000), além de interações com alguns fatores de crescimento de fibroblastos (HOFFMAN, 1993).

A atividade antitumoral tem sido documentada em polissacarídeos isolados das mais diversas fontes, tais como: bactérias (HELLERQVIST *et al.* 1993), fungos (MIZUNO *et al.* 1995), algas marinhas (NODA *et al.* 1990; ZHUANG *et al.* 1995), líquens (PEREIRA *et al.* 1994) e plantas superiores (PIENTA *et al.* 1995). Mesmo variando amplamente quanto a sua composição química, algumas correlações podem ser feitas entre a estrutura e atividade antitumoral. Algumas evidências sugerem, por exemplo, que a

atividade antitumoral de polissacarídeos depende de sua massa molar (DING *et al.* 1998; YADOMAE, 2000). Frações com alta massa molar (100.000 – 200.000 g mol⁻¹) têm se mostrado ativas, enquanto que frações de mesma origem, com menor massa molar (5.000 – 10.000 g mol⁻¹) não mostram atividade (FABRE *et al.* 1984; KOJIMA *et al.* 1986; BLASCHEK *et al.* 1992).

Alguns dados sugerem ainda que estruturas de (1→3)-β-D-glucanas altamente ordenadas (hélices triplas) e de alta massa molar sejam responsáveis pela atividade imunomoduladora desses polissacarídeos (HAMURO *et al.* 1971, OHNO *et al.* 1987, KOJIMA *et al.* 1986, MAEDA *et al.* 1988; DEMLEITNER *et al.* 1992) e também pela estimulação da atividade de citocinas (FALCH *et al.* 2000). Outros dados indicam, que a distribuição das unidades glicosídicas ao longo da cadeia principal determinariam tal atividade (MISAKI *et al.* 1993). Segundo SAITÔ *et al.* (1977; 1991) a formação de hélices triplas e sua estabilização podem ser decorrentes da massa molar elevada (> 90.000 g mol⁻¹) e dos pontos de ramificação. Por outro lado, BLASCHEK *et al.* (1992) observaram que o grau de ramificação do polissacarídeo (DB) pode ser responsável pela ação antitumoral, mostrando que (1→3)-β-glucanas, com massa molar menor que 20.000 g mol⁻¹, podem apresentar potente ação antitumoral, se o DB for menor que 0,25.

Outro aspecto significativo na análise entre estrutura química e atividade biológica é a importância de grupamentos substituintes. MIZUNO e colaboradores (1992), em análises dos polissacarídeos isolados do fungo *Polyporus confluens* observaram que esses, constituídos de unidades de β-D-glucopiranosil (1→3)-O substituídas, com pontos de ramificação em C-6 por unidades únicas de β-D-glucose, podem apresentar atividade antitumoral variando na faixa de 10 a 100%. Este percentual de atividade depende da estrutura química fina e conformação desses homopolímeros. Por outro lado, a derivatização de (1→3)-β-D-glucanas por sulfonilação (DEMLEITNER *et al.*, 1992), sulfatação (SUZUKI *et al.* 1991, WILLIAMS *et al.* 1992), fosforilação (DI LUZIO *et al.* 1979) ou carboximetilação (SASAKI *et al.* 1979) manteve ou aumentou sua atividade antitumoral. ZHANG *et al.* (2000) em estudos com α-(1→3)-D-glucanas de *Ganoderma lucidum* mostrou que a sulfatação deste polissacarídeo deu origem a uma molécula com atividade antitumoral muito superior à molécula original.

Em estudos realizados com glucanas do líquen *Ramalina celastri*, (CARNEIRO LEÃO *et al.* 1997; CARNEIRO LEÃO 1998) encontrou-se atividade antitumoral frente ao Sarcoma 180. Quando esta β-D-glucana foi submetida a processo de

sulfatação química a atividade foi mais eficiente, porém com o processo de carboximetilação a glucana não apresentou atividade antitumoral. A autora mostrou também que esta glucana, que apresenta cadeia principal de α -(1→6)-Glc_p com cadeias laterais compostas por β -D-Galp-(1→4) e α -D-Man_p-(1→2) promove alteração de alguns parâmetros bioquímicos sanguíneos em camundongos tratados com este polímero, nos quais ocorreu diminuição na taxa de creatinina (48%), proteína total (20%) e albumina (24%), as taxas de colesterol e globulinas foram similares ao controle (CARNEIRO LEÃO, 1998).

Alguns autores avaliando também a atividade antitumoral de uma (1→3)- β -D-glucana, com substituição em O-6 por unidades glicosídicas frente ao Sarcoma 180, mostraram uma regressão de 100%, ao se empregar a dose de 10 mg kg⁻¹ (DEMLEITNER *et al.* 1992; KRAUS; FRANZ, 1992). Experimentos semelhantes conduzidos com liquenana, uma β -glucana linear com ligações glicosídicas (1→3) (33%) e (1→4) (66%), não induziram tal ação. Este último fato demonstra a importância da ligação (1→3) para a maior expressão da atividade antitumoral de β -D-glucanas (BOHN; BEMILLER, 1995).

O PSK ("Krestatin"), um polissacarídeo ligado a proteína, extraído do *Coriolus versicolor*, é constituído por glucose (74,6%), galactose (2,7%), manose (15,5%), xilose (4,8%) e fucose (2,4%), com massa molar aproximada de 94.000 g mol⁻¹. Esta (1→4)- β -D-glucana ramificada em C-3 e C-6, apresenta atividade antineoplásica contra vários tumores experimentais em camundongos, como o Sarcoma 180, o carcinoma de Ehrlich, o adenocarcinoma 755 e as leucemias P388 e L1210, entre outros (MIZUTANI; YOSHIDA, 1991; KOBAYASHI *et al.* 1992; MORINO *et al.* 1997). O PSK na vigência de infecções induz o aumento da atividade quimiostática e citocítica de macrófagos, evitando a redução de atividade das células NK (*natural killer*) e dos neutrófilos, além de melhorar a resposta imune mediada por células (OOI; LIU, 2000). Pode ainda aumentar a produção de citocinas, como interferon- α (IFN- α) e interleucina-2 (IL-2) (TSUKAGOSHI *et al.* 1984). O PSK promove ainda aumento *in vitro* na citotoxicidade de linfócitos contra células tumorais (KOBAYASHI *et al.* 1992; VANKY *et al.* 1992), sendo com isto classificado como um modificador de resposta biológica (MATSUNAGA *et al.* 1992).

1.5 AÇÃO BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS DE ALGAS MARINHAS EM CÉLULAS ANIMAIS

O efeito antineoplásico de polissacarídeos sulfatados tais como heparina

(JOLLES; GREENEING, 1960), laminarana sulfatada (JOLLES *et al.* 1963) e dextrana sulfato (SUEMASU; ISHIKAWA, 1970; SUEMASU *et al.* 1971; GOTO *et al.* 1972; GOTO *et al.* 1977) foi documentado a partir do início da década de 60. A atividade antitumoral de extratos aquosos de algas marinhas é conhecida desde a primeira metade da década de 70 (NAKAZAWA *et al.* 1974). Em 1976, ITO e SUGIURA descreveram que a fração polissacarídica sulfatada isolada de *Sargassum thunbergii*, apresentava ação antitumoral, quando analisada em células de carcinoma de Ehrlich. A partir de 1987, PARISH e colaboradores (PARISH *et al.* 1987; COMBE *et al.* 1987; PARISH; SNOWDEN, 1988) mostraram que polissacarídeos sulfatados isolados de macroalgas marinhas inibiam metástases tumorais em ratos. Neste aspecto, pode-se citar os estudos de YAMAMOTO *et al.* (1984), com uma fucana parcialmente purificada (SKCF), isolada da alga parda *Sargassum kjellmanianum* que inibiu em 74,3% o crescimento do Sarcoma 180 em camundongos. Quando o teor de grupamentos O-sulfato da fração SKCF foi aumentado por sulfatação química, atividade contra células leucêmicas L1210 também foi observada (JOLLES *et al.* 1963; FUJIHARA *et al.* 1984).

NODA *et al.* (1990) em estudos com algas marinhas, nos quais utilizaram apenas a alga seca e moída, sob administração oral ($1600 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ durante 28 dias), observaram significativa atividade antitumoral em carcinoma de Ehrlich com quatro espécies de algas pardas: *Scytosiphon lomentaria* (69,8% de inibição), *Lessonia nigrescens* (60%), *Laminaria japonica* (57,6%), *Sargassum ringgoldianum* (46,5%); duas espécies de algas vermelhas: *Porphyra yezoensis* (53,2%), *Euchema gelatinae* (52,1%) e uma espécie de alga verde: *Enteromorpha prolifera* (51,7%). Fucanas isoladas de *Undaria pinnatifida* e de *Sargassum ringgoltifida*, e ainda *i*-carragenana, *k*-carragenana, λ -carragenana comerciais além de uma porfirana isolada de *Porphyra yezoensis* (SU; HASSID, 1962) também apresentaram uma significativa atividade antitumoral em células de Fibrosarcoma Meth A quando administradas por via intraperitoneal na dose de 40 mg kg^{-1} por 7 dias (NODA *et al.* 1990).

A atividade biológica de galactanas de algas vermelhas tem sido investigada em menor proporção. FERNANDEZ *et al.* (1989), isolaram da alga vermelha *Gracilaria domingensis*, um polissacarídeo tipo ágar o qual proporcionou inibição no crescimento de células do carcinoma de Ehrlich, forma ascítica. A atividade antitumoral desta galactana sulfatada, constituída de unidades alternadas de β -D-galactose 6-sulfato, 3-O substituída e 3,6-anidro α -L-galactose, 4-O substituída, foi de 90% na dose de

60 mg kg⁻¹. Pode-se citar ainda a presença de atividade anticoagulante (CACERES *et al.* 2000) e atividade antiviral (TULIO, 1998; NOSEDA *et al.* 1999; CACERES *et al.* 2000; DUARTE *et al.* 2001b).

FUJIHARA *et al.* (1984) testaram a atividade de um alginato purificado de *Sargassum fulvellum*, que apresentava uma relação molar de ácido β -D-manurônico/ácido α -L-gulurônico (M/G) elevada (2,78:1) e massa molar de 33.400. O poliuronídeo inibiu o crescimento do Sarcoma 180 em 84,1%. A atividade antineoplásica foi correlacionada com o caráter aniônico do polímero e com a presença de ligações β -glicosídicas. Além disso, outros tipos de alginatos e também fucanas de outras fontes, como: *Sargassum kjellmanianum*, *Laminaria angustata*, *L. japonica*, *Eclonia cava*, *E. bicyclis*, apresentaram atividade antitumoral contra Sarcoma 180 e leucemia L-1210 em camundongos (YAMAMOTO *et al.* 1984).

ZHUANG *et al.* (1995) isolaram de *Sargassum thunbergii* trinta e uma frações polissacarídicas, ácidas e neutras. Dentre as fucanas isoladas e purificadas, apenas duas apresentaram atividade antitumoral contra carcinoma de Ehrlich, aumentando o tempo de sobrevivência dos animais, em relação ao grupo controle, em 3,5 e 2,2 vezes. Embora purificadas, tais fucanas não foram submetidas à análise estrutural fina, o que possivelmente auxiliaria na interpretação dos resultados, desde que as duas frações apresentem composição muito semelhante.

PARISH e colaboradores (PARISH *et al.* 1987; COOMBE *et al.* 1987; PARISH; SNOWDEN, 1988) demonstraram que polissacarídeos sulfatados ocasionavam a inibição de heparanases originadas das células tumorais. Com o polissacarídeo espirulan (CA-SP), extraído da alga *Spirulina platensis*, o qual é constituído principalmente por ramnose (MISHIMA *et al.* 1998), foi observada significativa inibição da degradação do heparan sulfato por heparanase purificada. A xilofucoglucuronana de *Spatoglossum schrederi* (LEITE *et al.* 1998) promoveu estimulação da síntese de heparan sulfato e inibição da adesão celular sobre algumas moléculas de matriz extracelular (LEITE *et al.* 1998; ROCHA *et al.* 2001). Esses diferentes efeitos ocorrem provavelmente por mecanismos distintos, sendo portanto necessários estudos futuros para a elucidação dos mecanismos de ação desta xilofucoglucuronana, bem como de outras fucanas cuja atividade biológica tenha sido de interesse.

Os polissacarídeos de algas marinhas têm demonstrado também ação sobre a adesão celular (NOSEDA *et al.* 1994 a). Este fato pode ser extremamente benéfico

nos tratamentos de neoplasia, como a prevenção de metástases (LIU *et al.* 2000), pois estas ocorrem principalmente por interação entre a célula tumoral e a matriz extracelular. Portanto, estudos utilizando polissacarídeos obtidos de algas marinhas, mostram ser um campo promissor de pesquisa visando a correlação entre estrutura e atividade biológica em células tumorais e na matriz extracelular. Assim, uma breve revisão sobre os componentes envolvidos na interação célula-matriz extracelular será apresentada a seguir, para melhor fundamentar esta Introdução.

1.6 ESTRUTURA E FUNÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR EM CÉLULAS ANIMAIS.

A adesão das células eucarióticas à matriz extracelular coordena importantes fenômenos fisiológicos, como: migração, proliferação e diferenciação (TETI, 1992; ERICKSON; COUCHMAN, 2000). Os processos de regeneração tecidual, resposta imune, diferenciação embrionária, coagulação sangüínea, e crescimento do tecido nervoso, entre outros fenômenos, também ocorrem com a participação de moléculas de matriz extracelular (YURCHENCO *et al.* 1990). Por outro lado, a adesão aberrante à matriz extracelular também pode participar na etiologia e patogênese de grande número de doenças humanas, incluindo artrites e câncer (PIENTA *et al.* 1989; ZETTER, 1990).

Consistente com esta multiplicidade de funções, a matriz extracelular apresenta grande diversidade de composição, sendo encontradas nesta estrutura moléculas como: colágeno, fibronectina (Fn), fibrinogênio, laminina (Ln), osteopondina, tenascina, trombospondina, vitronectina (Vn), proteoglicana, entre outras (YURCHENCO *et al.* 1990). As duas maiores classes de macromoléculas são as glicosaminoglicanas, usualmente ligados covalentemente com proteínas (em forma de proteoglicanas), e as proteínas fibrosas de dois tipos funcionais, estruturais (colágenos e elastina) e adesiva (fibronectinas, lamininas, vitronectina, etc.) (TETI, 1992). Os efeitos associados com a adesão célula-matriz extracelular representam reconhecimento dos receptores com ligantes específicos (BUCK; HORWITZ, 1987; JULIANO, 1987), os quais participam na regulação da adesão celular, migração, crescimento e sobrevivência celular, através de complexos eventos de sinalização (HOWE *et al.* 1998).

Sendo assim, é necessário um bom entendimento da interação das células com moléculas de matriz para uma melhor compreensão dos eventos de adesão celular, e dada a relevância, uma breve revisão se faz oportuna para o entendimento do presente

trabalho.

Os estudos de caracterização dos fenômenos de interação mútua, receptores - proteínas ligantes associadas com processos de adesão, se iniciaram a partir do isolamento de um heterodímero da superfície de plaquetas humanas o qual era associado não covalentemente, e estequiometricamente na razão 1:1; este heterodímero era formado por duas glicoproteínas, denominadas GpIIb, GpIIIa (JENNINGS; CHRISTOPHERSON, 1982). Posteriormente, foram identificadas nas plaquetas humanas, receptores para Fator de von Willebrand (RUGGERI *et al.* 1982), receptores de fibrinogênio (BENNETT *et al.* 1983), fibronectina (GARDNER; HYNES, 1985) e vitronectina (PYTELA *et al.* 1986). Estudos com leucócitos mostraram que a adesão envolvendo estas células se caracterizava por um novo grupo de glicoproteínas chamadas LFA-1, MAC-1 e p150,95 (SANCHES-MADRID *et al.* 1983; SPRINGER *et al.* 1985), que participam de importantes fenômenos celulares. LFA está envolvida na interação entre neutrófilos (LFA-1) durante as respostas imunológicas celulares (POHLMAN *et al.* 1986; HASKARD *et al.* 1986; SPRINGER *et al.* 1987), e também na adesão de leucócitos ao endotélio, importante mecanismo que precede a migração dos leucócitos ao espaço extravascular (HARLAN *et al.* 1985); MAC-1 é encontrada principalmente na superfície de macrófagos, monócitos e granulócitos e p150,95, presentes na maioria dos leucócitos, estão envolvidas na adesão destas células ao endotélio (POHLMAN *et al.* 1986; SPRINGER *et al.* 1987).

Além destas, pode-se citar as proteínas VLA, associadas a interações celulares nas respostas imunes, originariamente detectadas em leucócitos, são também expressas em células musculares, renais, tumorais, mielóides, neuronais e fibroblastos, estando associadas, com fenômenos de adesão celular em todos os tecidos onde estão presentes.

Em meados da década de oitenta, novos heterodímeros foram caracterizados, associados a várias proteínas de matriz extracelular, como uma proteína de 140 kDa, extraída de membranas de MG-63, uma linhagem de células de osteossarcoma humano, caracterizada como um hipotético receptor para fibronectina (PYTELA *et al.* 1985). Receptores para vitronectina (PYTELA *et al.* 1985), laminina (HORWITZ *et al.* 1985), trombospondina (LAWLER *et al.* 1988), tenascina (BOURDON; RUOSLAHTI, 1989) e outro receptor para fibronectina (VOGEL *et al.* 1990) também foram caracterizados, mostrando que existe uma heterogeneidade de ligantes na superfície de células e tecidos, associados com diferentes proteínas de matriz extracelular.

Em meados de 1986, esses receptores para moléculas de matriz extracelular

(GpIIb, GpIIIa, Fator de von Willebrand, LFA-1, MAC-1, p150,95 e VLA) foram classificados como integrinas, descritas como sendo proteínas integrais transmembrânicas, com domínios intracelulares e extracelulares, que promovem a ligação de proteínas da matriz extracelular com o citoesqueleto (TAMKUN *et al.* 1986).

Os heterodímeros protéicos, cuja função está associada com a interação célula-célula, e célula-matriz extracelular, ou seja, as VLA(s), MAC-1, LFA-1, p150,95 e integrinas, quando caracterizados molecularmente mostraram homologias estruturais, que permitiram agrupá-los na super família das integrinas (RUOSLAHTI; GIANCOTTI, 1989). Esses complexos protéicos são glicoproteínas com duas subunidades, alfa e beta as quais podem ser separadas eletroforicamente em condições não redutoras em frações de 95 – 130 kDa (beta, 7 tipos diferentes), e frações de 130 – 210 kDa (alfa, 12 tipos diferentes). As subunidades beta têm como característica um domínio rico em derivados de cisteína (KISHIMOTO *et al.* 1987). A associação entre as duas subunidades é não covalente, e dependente de cátion bivalente (GINSBERG *et al.* 1988). Ambas as subunidades formam um heterodímero transmembrânico, com um pequeno domínio C-terminal intracitoplasmático, e um grande domínio N-terminal extracelular (RUOSLAHTI; GIANCOTTI, 1989; HYNES, 1987). Os domínios transmembrânicos das cadeias beta interagem com componentes do citoesqueleto, especificamente com a talina (ALBELDA *et al.* 1989), e a fibulina (ARGRAVES *et al.* 1989). Outra característica é o reconhecimento das proteínas de matriz extracelular que possuem o peptídeo Arg-Gly-Asp ou RGD, pelas integrinas (RUOSLAHTI; PIERSCHBATER, 1987; TETI, 1992). Alguns exemplos de interações RGD dependentes são: fibronectinas (PYTELA *et al.* 1985), vitronectinas (PYTELA *et al.* 1985), trombospondinas (LAWLER *et al.* 1988), tenascinas (BOURDON *et al.* 1989). No entanto, outros peptídeos ligantes devem estar envolvidos na interação integrina-moléculas de matriz, sendo o exemplo mais crítico as lamininas, na qual a interação não parece ser RGD dependente, apesar desta molécula interagir com vários membros da família das integrinas.

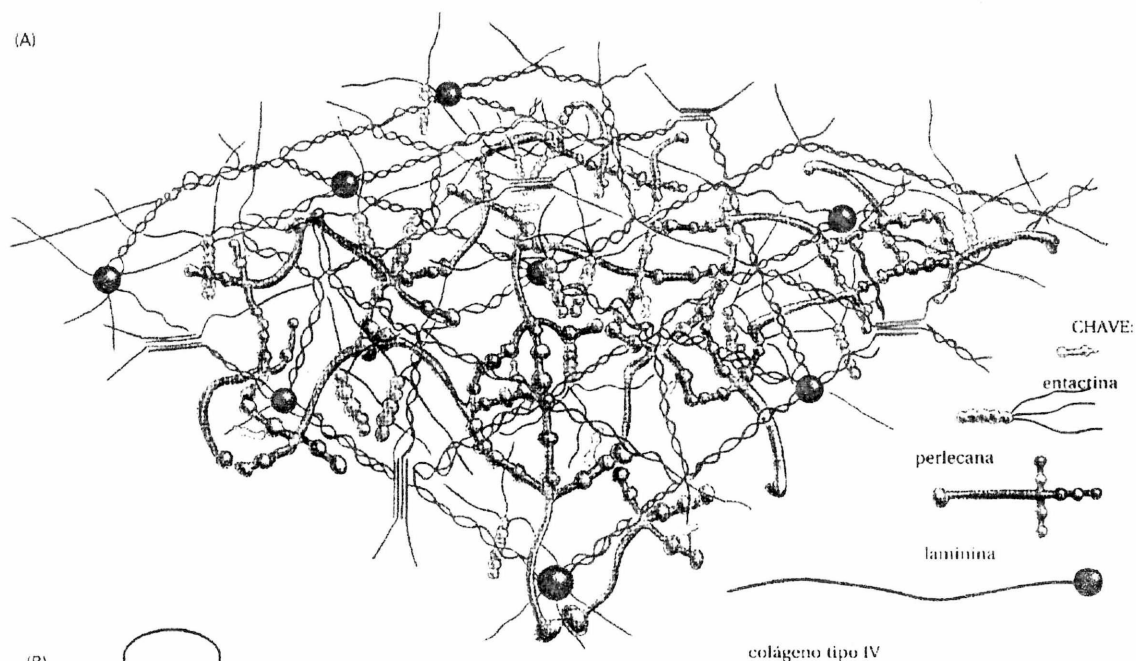
As interações de componentes da matriz extracelular com integrinas influenciam a expressão de genes, proliferação, apoptose, adesão e mobilidade celular (GOLDFINGER *et al.* 2000), além da migração, crescimento e sobrevivência das células (HOWE *et al.* 1998). Durante o desenvolvimento, remodelação tecidual, e tumorigênese, os componentes da matriz extracelular são modificados por digestão enzimática com subsequente efeito na ligação e sinalização das integrinas e modificação na resposta celular (GOLDFINGER *et al.* 2000). Células de linhagens tumorais expressam uma

variedade de integrinas em sua superfície (VARNER; CHERESH, 1996; BEM-ZE'EV, 1997), o que facilitaria a metástase, a qual ocorre por interação das integrinas com diferentes moléculas de matriz extracelular, bem como com moléculas da membrana basal.

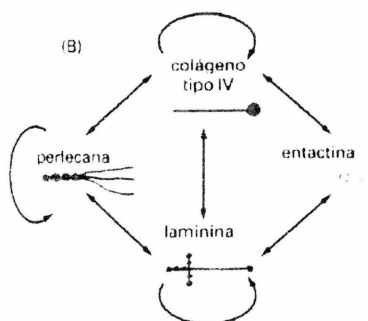
A membrana basal, presente na interface epitélio-mesenquimal da maioria dos tecidos, corresponde a uma fina camada altamente especializada de matriz extracelular. Existem evidências de que os componentes da membrana basal analisados individualmente apresentam efeitos regulatórios em importantes eventos celulares como crescimento, diferenciação, e migração, ou seja influenciam o desenvolvimento bem como o reparo do tecido (COUCHMAN; WOODS, 1993; AUMAILLEY; GAYRAUD, 1998; ERICKSON; COUCHMAN, 2000). Embora a composição possa ser variável de tecido para tecido (AUMAILLEY; SMITH, 1998), todas as membranas basais contêm laminina, entactina-1/nidogênio-1, colágeno tipo IV, e heparan sulfato. Algumas destas proteínas tem também sido localizadas em outros tipos de matriz extracelulares (ERICKSON; COUCHMAN, 2000), perlecan está presente também em cartilagem, e alguns componentes são localizados em vários tecidos embrionários e reticulares, bem como em linfonodos (FITCH; LIENMAYES, 1994; TIMPL; BROWN, 1996; FRENCH *et al.* 1999)

Um significativo número de interações contribui para a organização supramolecular de membranas basais. O modelo mais aceito de membrana basal propõe duas redes, uma consistindo de colágeno tipo IV e a segunda constituída de múltiplas lamininas, interconectadas por entactina-1 (YURCHENCO; O'REAR, 1994; TIMPL; BROWN, 1996). Estudos *in vitro* indicam que perlecan interage com outros três componentes, através do seu core protéico, no caso da entactina-1 e colágeno tipo IV, ou cadeias de heparan sulfato, como é o caso da laminina-1 (BATTAGLIA *et al.* 1992; REINHARDT *et al.* 1993). Além disto, esta complexidade forma uma barreira natural contra a invasão de células, principalmente tumorais, que precisam interagir com os componentes da matriz para promover o processo de invasão e metástase.

(A)



(B)



Um modelo corrente da estrutura molecular da lâmina basal.

A lâmina basal (A) é formada por interações específicas entre as proteínas de colágeno tipo IV, laminina, e entactina, mais a proteoglicana perlecana (B). As flechas em (B) conectam moléculas que podem ligar-se diretamente.

(Baseado em P.D. Yurchenco e J.C. Schittny, *FASEB J.* 4:1577-1590, 1990.)

———— JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O interesse quanto aos efeitos de polissacarídeos na adesão celular e suas interferências na matriz extracelular é relativamente recente. Fucanas nativas e/ou modificadas pela introdução de grupos amina interferem na adesão de células de carcinoma murino de Lewis (3LL) à laminina (SOEDA *et al.* 1994a), sendo a adesão celular no polipeptídeo $\beta 1$ da laminina (YIGSR) favorecida com baixas concentrações da fucana modificada, enquanto que altas concentrações deste polímero causaram inibição. Os mesmos autores (SOEDA *et al.* 1994 b), em outro estudo, mostraram que a sulfatação da fucana nativa diminui a adesão destas células na laminina, e que o pré-tratamento das células 3 LL com as fucanas nativas e supersulfatadas, reduziram muito o potencial adesivo a laminina.

De modo análogo, a adesão de hepatócitos em matrizes de fibronectina ou poliestireno também sofre a interferência de polímeros sulfatados (KUNOU *et al.* 1993). A interação célula-célula e célula-matriz extracelular são importantes particularmente nas patologias tumorais com a ocorrência de metástases, as quais dependem da interação de células neoplásicas com a matriz extracelular dos tecidos adjacentes ao tumor (DERYUGINA; BOURDON, 1996; CHINTALA *et al.* 1996; GOLDBRUNNER *et al.* 1996; ENAM *et al.* 1998; MOSS *et al.* 2000). Considerando que no processo de metástase há a invasão da lâmina basal, se existirem moléculas, como alguns carboidratos, que diminuam a interação moléculas da matriz extracelular-célula, principalmente as lamininas (KRAMER *et al.* 1989; BECK *et al.* 1990), ou mesmo a interação envolvendo os receptores de membrana, como as integrinas (GOLDBRUNNER *et al.* 1996; TONN *et al.* 1998; KREIDBERG, 2000), ou que possam impedir a passagem destas células para o sistema circulatório, um valioso agente auxiliar na terapia contra o câncer estaria disponível (LIU *et al.* 2000). Por esses motivos, estudos destas interferências ocasionadas por polissacarídeos, são relevantes.

O objetivo geral deste trabalho foi o de contribuir para o conhecimento de efeitos biológicos, em células HeLa, de polissacarídeos isolados de algas marinhas, sendo desenvolvidos os seguintes objetivos específicos:

1. Determinar os efeitos *in vitro* da ação de galactanas sulfatadas, alginatos e fucanas, as quais apresentam diferentes tipos e posicionamento de grupos ácidos, usando como modelo células da linhagem tumoral HeLa;
2. Purificar a fucana da alga *Sargassum stenophyllum*;
3. Modificar quimicamente a fucana de *S. stenophyllum*, por hidrólise ácida, seguida de sulfatação e carboxi-redução;
4. Caracterizar por métodos químicos e/ou espectroscópicos o produto de hidrólise ácida parcial e após modificação química;
5. Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* de fucanas nativas e do produto de hidrólise ácida parcial de *S. stenophyllum*, antes e após modificação, utilizando como modelo células HeLa, caracterizando as alterações morfológicas (estruturais e ultraestruturais) induzidas pelo tratamento destas células com o(s) polissacarídeo(s);
6. Avaliar a influência das fucanas nativas e do produto de hidrólise ácida parcial (nativo e modificado), na divisão de células HeLa;
7. Avaliar a influência das fucanas nativas e do produto de hidrólise ácida parcial (nativo e modificado), na adesão das células HeLa sobre moléculas de matriz extracelular utilizadas como suporte: laminina-1, fibronectina de plasma humano, vitronectina de placenta humana;
8. Correlacionar as atividades biológicas sobre células HeLa com a estrutura química dos polímeros isolados de macroalgas marinhas.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Os reagentes soroalbumina bovina, Hepes, NAD^+ , NADH, EDTA, EGTA, azul de Tripan, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2-)-2,5-difenilmetiltetrazolio (MTT) e vermelho de fenol, foram adquiridos da Sigma Chemical Co.

A tripsina (1:250) foi fornecida pela Difco.

O meio essencial mínimo de Eagle foi adquirido dos Laboratórios Flow.

O soro Fetal Bovino estéril livre de vírus e micoplasma foram fornecidos por Laborclin.

O cristal Violeta foi adquirido da Carlos Erba Co.

Laminina-1, fibronectina e vitronectina foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga, do Departamento de Biologia Celular, desta Universidade.

Os demais reagentes a serem utilizados foram de grau analítico adquiridos da MERCK do Brasil.

3.2 ALGAS

As algas utilizadas neste trabalho foram coletadas em diferentes locais do litoral brasileiro e argentino.

Laminaria brasiliensis, Ordem *Laminariales*, foi coletada no litoral do Espírito Santo, Brasil (DUARTE *et al.* 1991);

Bostrychia montagnei, Ordem *Ceramiales*, foi coletada no estado do Paraná, Brasil (NOSEDA *et al.* 1999);

Porphyra columbina, Ordem *Bangiales*, foi coletada em Comodoro Rivadavia na Província de Chubut, Argentina (NOSEDA *et al.* 2000);

Sargassum stenophyllum, Ordem *Fucales*, foi coletada no município de Bombinhas, no estado de Santa Catarina, Brasil, no mês de dezembro.

Depois da coleta os espécimes foram limpos manualmente, lavados em água corrente, secos ao sol e moídos.

3.3 CÉLULAS

As células utilizadas neste trabalho foram da linhagem HeLa, de característica epitelial, derivadas de carcinoma de colo uterino humano. As células procedentes da American Type Culture Collection foram repassadas para o Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica da UFPR, pela seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

3.4 MÉTODOS GERAIS

- A) As pesagens foram realizadas em balanças analíticas Mettler Toledo, modelo AB204, e Sauter, modelo KGD-7470.
- B) As evaporações foram realizadas em evaporador rotatório, a vácuo (pressão reduzida), FISATOM 803, em banho-maria com temperatura inferior a 40 °C.
- C) As medições de pH foram realizadas em potenciômetro Micronal, modelo B374.
- D) Para as determinações espectrofotométricas foram utilizados os aparelhos da marca TECNAL (modelo DME-21) e HITACHI (modelo U-2001).
- E) As centrifugações foram feitas em centrífuga Beckman, modelo GS-15.
- F) As diálises foram feitas em tubos de celulose benzoilados (limite de exclusão molecular de 5.000)
- G) As liofilizações de soluções ocorreram em aparelhos Cryoliser (New Brunswick Scientific Co. Inc.) e Edwards.

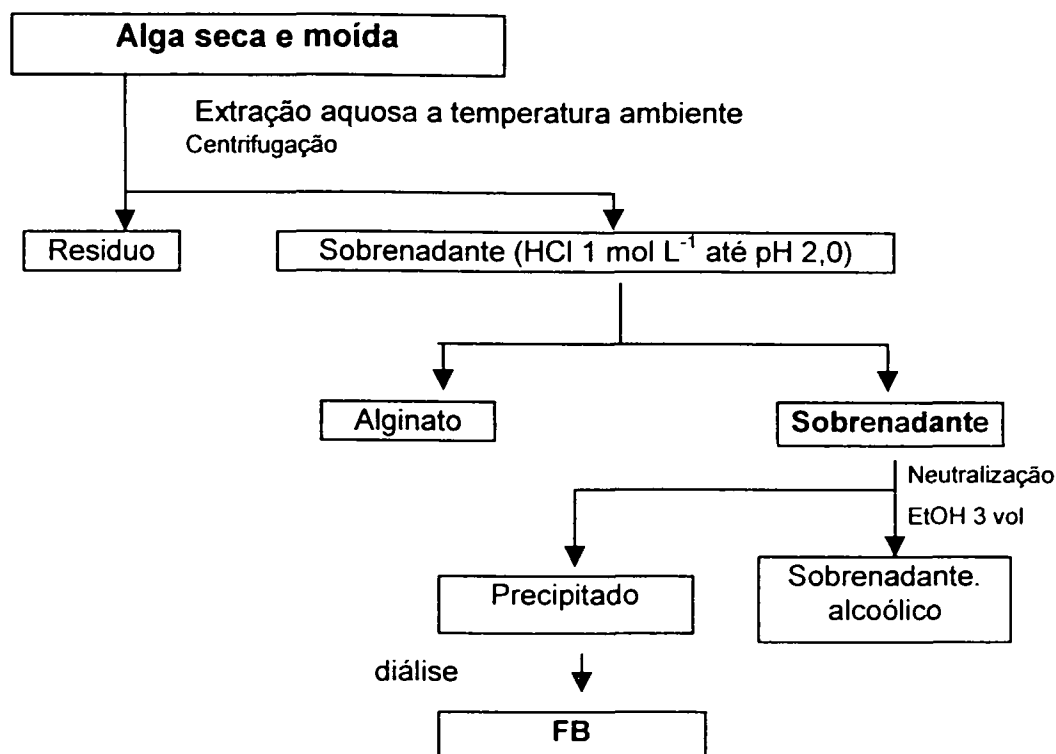
3.5 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FUCANAS ISOLADAS DA ALGA PARDA *Sargassum stenophyllum*

A alga seca e moída foi submetida a extração aquosa à temperatura ambiente, sob agitação mecânica vigorosa por 24 horas. Após centrifugação, a 10.000 r.p.m. por 30 min. a 4°C, o extrato aquoso foi tratado com HCl 1 mol L⁻¹, até pH 2,0, ocorrendo a precipitação do ácido algínico contaminante. Após centrifugação, nas mesmas condições, o sobrenadante foi neutralizado (pH 7,0), precipitado com três volumes de etanol, originando o que se denominou de sobrenadante alcoólico. O precipitado foi sequencialmente dialisado contra água destilada e liofilizado, obtendo-se a fração denominada de fucanas brutas (FB), conforme Esquema 1. Esta fração foi fracionada por tratamento com base quaternária (Cetavlon 10%, pH 7,0) e centrifugada. O precipitado foi descomplexado com NaCl 4 mol L⁻¹. Após centrifugação, o sobrenadante foi tratado com etanol (3 volumes), sendo o precipitado dialisado e liofilizado obtendo-se a fração FP (Esquema 2).

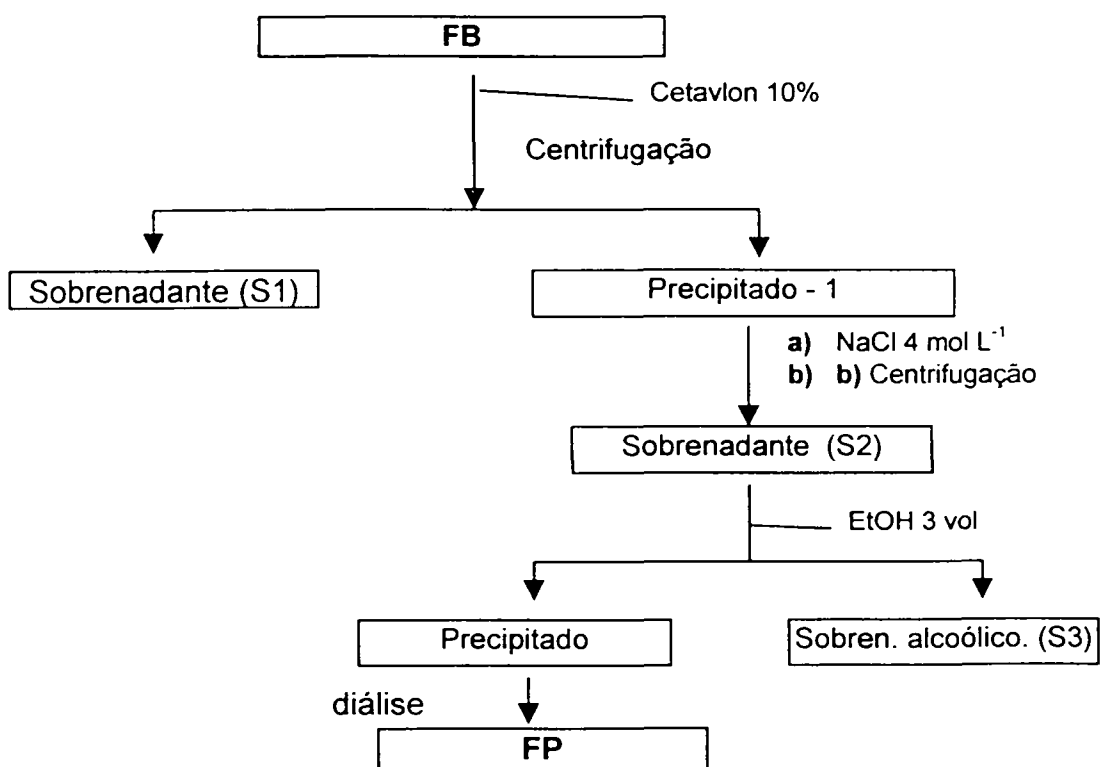
3.6 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FRAÇÃO FP.

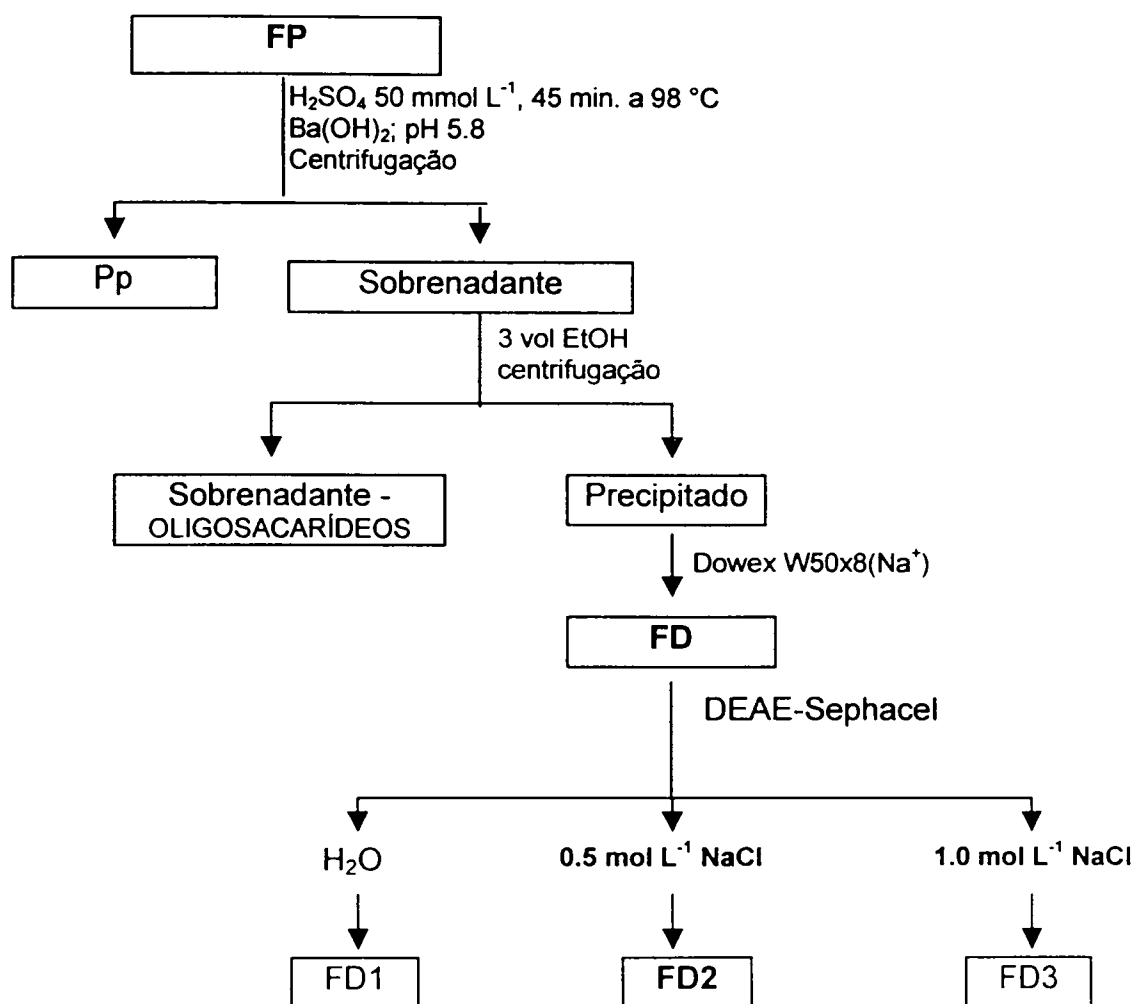
A fração FP foi submetida à hidrólise ácida parcial, com H₂SO₄ 50 mmol L⁻¹, por 45 minutos à 100 °C. Após elevação do pH até 5,8 com hidróxido de bário, a solução foi centrifugada. O sobrenadante foi tratado com 3 volumes de etanol, e após centrifugação, o precipitado obtido foi suspenso em água destilada e tratado com a resina Dowex W50 x 8 (forma sódio) para retirada do bário residual (fração FD). A purificação da fração FD foi realizada por cromatografia de troca iônica com DEAE-Sephacel (forma cloreto). A eluição foi inicialmente realizada com água destilada. A monitoração da eluição foi realizada pela detecção de açúcar total (DUBOIS *et al.* 1956). Após obtenção da fração solúvel em água (FD1), a coluna foi eluída com NaCl 0,5 mol L⁻¹ (FD2) e 1 mol L⁻¹ (FD3), como demonstrado no Esquema 3.

ESQUEMA 1 – ESQUEMA DE EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO DAS FUCANAS DE *Sargassum stenophyllum*



ESQUEMA 2 – PURIFICAÇÃO DAS FUCANAS DE *S. stenophyllum*



ESQUEMA 3 – HIDRÓLISE PARCIAL E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *S. stenophyllum*

3.7 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO FD2

3.7.1 CARBOXI-REDUÇÃO

A fração FD2 foi submetida a carboxi-redução, de acordo com o método de TAYLOR e CONRAD (1972), para reduzir os grupos carboxílicos dos ácidos urônicos. A fração FD2 foi solubilizada em solução tampão MES (pH 4,74) e tratada com derivado de carbodiimida (CMC). A adição foi feita em pequenas porções, e a solução foi mantida por 30 minutos sob agitação. Após a adição de solução tampão TES até pH 7,0, foi realizada redução do éster, formado na etapa anterior, com NaBH₄ (FD2-c). Após repouso (12 h à ~30°C), o excesso de boridreto de sódio foi destruído pela adição de HCl 2N, até pH 5,0. Após diálise seqüencial (água destilada, etilenoglicol 10%, água destilada) a fração carboxi-reduzida FD2-c foi liofilizada e reservada para análises posteriores.

Paralelamente, FD2 foi carboxi-reduzida como descrito anteriormente, utilizando NaBD₄.

3.7.2 SULFATAÇÃO

As frações FD2 e FD2-c provenientes da alga parda *S. stenophyllum* foram submetidas à sulfatação pelo método de O'NEIL (1955). Para tal, as duas frações (500 mg cada) foram dissolvidas no solvente dimetilformamida (5 a 10 mL) adicionado de piridina (2,5 mL) sob agitação, com o devido cuidado de não hidratar o sistema, através de vedação e troca de pipetas utilizadas. A relação de massa entre o ácido clorossulfônico (agente sulfatante) e piridina de 1:7, e entre o ácido clorossulfônico e o polissacarídeo de 6:1, foi mantida. A agitação foi processada até todo o material estar completamente dissolvido. Após completa dissolução, a mistura reacional foi colocada sob banho de gelo e adicionou-se ácido clorossulfônico gota a gota, evitando a entrada de umidade no meio reacional. A agitação e o banho de gelo foram mantidos por mais de 2 horas. Decorrido este tempo, o sistema foi mantido a 4 °C por 24 horas. O bloqueio da reação foi realizado através de adição de água em quantidade igual ao volume do meio reacional e neutralização com solução de bicarbonato de sódio a 10%, até liberação completa do CO₂ formado. A solução obtida foi dialisada exaustivamente contra água corrente por aproximadamente 6 dias e, posteriormente liofilizada, obtendo-se assim o sal sódico do derivado sulfatado.

As frações derivatizadas por este método foram denominadas FD2-s e FD2-cs, respectivamente.

3.8 MÉTODOS GERAIS

3.8.1 HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DOS POLISSACARÍDEOS E REDUÇÃO DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE

As frações FD2-c e FD2-s foram hidrolisadas com ácido trifluoracético (TFA) 1 mol L^{-1} , por 3 horas, a 100°C . Após remoção do ácido por co-distilação com água destilada, os monossacarídeos foram reduzidos à álcool (NaBH_4 , 12 h., a temperatura ambiente). O excesso de boroidreto de sódio foi destruído com ácido acético 1 mol L^{-1} (pH 5,0). A remoção do ácido bórico, em forma de borato de metila foi realizada por co-distilações com metanol, à pressão reduzida.

3.8.2 ACETILAÇÃO

A acetilação das frações foi realizada com anidrido acético por 90 min., a 120°C . Este reagente foi removido por co-distilação com tolueno, e os acetatos de alditóis foram quantificados por GLC.

3.8.3 DOSAGEM DE AÇÚCARES TOTAIS

Os açúcares totais foram dosados pelo método do fenol-sulfúrico, como descrito por DUBOIS *et al.* (1956), utilizando-se como padrão D-galactose ou L-fucose.

3.8.4 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO URÔNICO

Para a dosagem de ácido urônico utilizou-se o método do *m*-hidroxibifenil descrito por BLUMENKRANTZ e ASBOE-HANSEN (1973). Na técnica, utilizou-se 0,2 mL de amostra, e 1,2 mL de solução de tetraborato de sódio ($0,0125 \text{ mol L}^{-1}$) em ácido sulfúrico concentrado, aquecendo-se por 5 min, a 100°C . Posteriormente adicionou-se 40 μL de *m*-hidroxibifenil (0,15% m/v em NaOH 0,5% m/v). O cromógeno formado foi lido em 520 nm. Para cada concentração de amostra testada, foram desenvolvidos ensaios brancos adicionando-se ao sistema 40 μL de NaOH 0,5% m/v, em vez da solução de *m*-hidroxibifenil. As absorbâncias desses brancos foram subtraídas da absorbância total da amostra. A linearidade deste método é de 0,5 a 20 μg de ácido urônico. A percentagem de ácido urônico foi calculada a partir de uma curva de calibração, utilizando concentrações de 1 a 20 μg de ácido D-glucurônico (Na).

3.8.5 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA

A dosagem de proteína foi realizada pelo método de LOWRY *et al.* (1951), utilizando-se como padrão solução de soroalbumina bovina a 40 mg%. As leituras foram realizadas a 700 nm.

3.8.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SULFATO

A quantificação dos grupos sulfato foi determinada pelo método gelatina-bário (DODGSON; PRICE, 1962)

3.9 METILAÇÃO

A fração FD2-c foi metilada de acordo com o método de CIUCANU e KEREK (1984). Previamente, FD2-c foi tratada com boroidreto de sódio (NaBH_4), e percolada em coluna contendo resina DOWEX W50 x 8, a qual foi previamente tratada com solução de trietilamina 5%. Após eluição com água destilada o polissacarídeo na forma de sal de trietilamônio, foi liofilizado. Solubilizou-se FD2-c em DMSO, adicionou-se NaOH pulverizado e iodometano (ICH_3). Este processo foi realizado por três vezes, sendo então o polissacarídeo dialisado e liofilizado, o que foi denominado de 1ª etapa de metilação. FD2-c foi submetido a uma 2ª etapa de metilação e hidrolisado (ácido fórmico 45%, por 16 h. a 100 °C). Os produtos de hidrólise total foram analisados na forma de acetato de alditóis (GLC e/ou GC-MS).

3.10 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.10.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA (GLC)

As análises por cromatografia foram realizadas em Cromatógrafo HEWLETT PACKARD 5890, com detector de ionização de chama (300°C) e injetor (250°C), utilizando nitrogênio como gás de arraste e coluna capilar de sílica fundida (30m X 0,25 mm d.i.), revestida com DB-225 (0,25µm). As análises cromatográficas para acetatos de alditóis foram realizadas à 220°C, e as amostras de acetatos de alditóis parcialmente metilados foram realizadas à 210°C.

As injeções das amostras nas colunas foram feitas mantendo-se a temperatura inicial em 50°C, seguido de aumento em gradiente de temperatura programado a 40°C por minuto, até 230°C, mantendo-se constante a partir deste valor.

Utilizou-se hélio como gás de arraste, com fluxo de 1 mL min⁻¹. As áreas dos sinais de interesse foram determinadas por integração em *software*. Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons a 70 meV, repetidamente a cada 1/8 de segundo, de m/e (relação massa/carga) 90 a 220. Este método foi utilizado para quantificação de acetatos de alditóis (SLONEKER, 1972), sendo identificados por meio dos seus tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons (JANSSON *et al.* 1976), comparados com padrões.

3.11 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

3.11.1 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO 13 (RMN -¹³C)

Os espectros de RMN -¹³C e DEPT foram obtidos pelo uso do espectrômetro Brucker, modelo Avance - DRX - 400, incorporado a transformada de Fourier. As amostras foram solubilizadas em água deuterada e analisadas em tubos de 10 mm de diâmetro. As análises foram realizadas a 50° C e os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm. utilizando como padrão interno a acetona (δ = 32,5).

3.11.2 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DE INFRAVERMELHO (FT-IR)

Os espectros de FT-IR foram obtidos pelo uso de espectrofotômetro SHIMADZU, modelo FT-IR 8300, incorporado a Transformada de Fourier. As amostras (2mg) foram homogeneizadas com brometo de potássio (KBr) e analisadas sob a forma de pastilhas. As análises foram realizadas à temperatura ambiente, sendo utilizado no preparo de cada pastilha aproximadamente 200 mg de KBr.

As análises de FT-IR foram realizadas no Departamento de Farmácia – Laboratório de Controle de Qualidade e Química Farmacêutica – UFPR.

3.12 MÉTODOS ELETROFORÉTICOS

Para a eletroforese das frações de *Sargassum stenophyllum* utilizou-se gel de poliacrilamida a 12% em sistema de eletroforese vertical. A solução tampão utilizada foi 1,2-diaminoetano 0,05 mol L⁻¹, pH 9,0 (3h, a 5°C) (DIETRICH; DIETRICH, 1976). A fixação das amostras no gel foi realizada com solução Cetavlon 0,1%. A revelação foi realizada

com solução de azul de toluidina em ácido acético/etanol/H₂O (0,1:5:5, v/v). A posterior descoloração foi feita com solução ácido acético/etanol/H₂O (0,1:5:5, v/v).

3.13 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DOS POLISSACARÍDEOS DE *Porphyra columbina*, *Bostrychia montagnei*, *Laminaria brasiliensis* E *Sargassum stenophyllum* EM CÉLULAS HeLa.

Para a avaliação dos efeitos biológicos dos polissacarídeos de *Porphyra columbina*, *Bostrychia montagnei*, *Laminaria brasiliensis* e *Sargassum stenophyllum* em células animais, utilizou-se células da linhagem HeLa, mantida no Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica da UFPR.

Os polissacarídeos utilizados neste trabalho foram:

- (1) galactanas sulfatadas do tipo porfirana isolada de *Porphyra columbina* (PC75) (NOSEDA *et al.* 2000) e galactanas tipo agaróide obtidas de *Bostrychia montagnei* (BHW e B4) (TULIO, 1998; NOSEDA *et al.* 1999);
- (2) Alginato de sódio e seus produtos de hidrólise parcial (blocos M e G) isolados de *Laminaria brasiliensis* e blocos G de *Sargassum stenophyllum* (DUARTE *et al.* 1991; NOSEDA *et al.* 1997);
- (3) Fucanas de *S. stenophyllum* purificadas por tratamento com Cetavlon: frações FS e FP as quais não foram submetidas a fracionamento cromatográfico, correspondendo portanto a um *pool* de fucanas.

Inicialmente foi realizada a avaliação da atividade citotóxica de cada um desses polímeros citados acima. Após a análise dos resultados, prosseguiu-se o trabalho com fucanas de *S. stenophyllum*, especificamente, as frações FD2 nativa e FD2 modificada quimicamente, como descrito nos itens 3.7.1 e 3.7.2 de Material e Métodos. Com fins comparativos, foram utilizadas as fucanas F-3B e F-5B obtidas da mesma alga (DUARTE *et al.* 2001a), cujas características químicas estão mostradas na Introdução.

3.14 CULTIVO CELULAR

3.14.1 PROCEDIMENTOS DE ESTERILIZAÇÃO

As pipetas, água, soluções salinas, aparelhos de filtração e peças acessórias como roscas e rolhas, foram esterilizadas em autoclave FANEN à temperatura de 120°C e 1 atm. de pressão por 30 min. Posteriormente, esse material foi seco em estufa Pasteur (FANEN) a 50°C. Garrafas de Roux, e demais vidrarias foram esterilizadas a seco em

estufa Pasteur a 180°C, por 5 horas.

A esterilização das soluções termolábeis, tais como meio de cultura e de tripsina, foi realizada por filtração, sob pressão, em aparelho de Sartorius, utilizando-se membranas de acetato-nitrato de celulose, com poros de 0,22 μm , da marca Zeiss ou Millipore. Todo procedimento de filtração foi realizado em câmara de fluxo laminar vertical (VECO).

3.14.2 SOLUÇÕES

Todas as soluções utilizadas para o cultivo celular foram preparadas com água obtida em aparelho Milli-Q da Millipore, ou em água bidestilada recém preparada e obtida em Aparelho Coming Glass Work, mod. AG 10a.

3.14.2.1 SOLUÇÃO DE BICARBONATO DE SÓDIO

A solução de bicarbonato de sódio a 7,5% (m/v) foi distribuída em alíquotas de 10 mL e esterilizada em autoclave a 120°C e 1 atm. A solução estéril foi armazenada à temperatura ambiente e usada para ajustar o pH do meio de crescimento celular.

3.15.2.2 SOLUÇÃO DE SALINA TAMPONADA (PBS)

A solução estoque de salina tamponada composta por 40,5 mmol L⁻¹ de Na₂HPO₄, 680 mmol L⁻¹ de NaCl e 7,3 mmol L⁻¹ de KH₂PO₄, pH 7,4, foi esterilizada a 120°C e 1 atm., por 30 minutos e armazenada a 4°C. No momento do uso foi diluída cinco vezes com água bidestilada igualmente estéril.

3.15.2.3 SOLUÇÃO DE TRIPSINA-VERSENO (STV)

A solução de Tripsina-Verseno foi constituída de 137 mmol L⁻¹ de NaCl, 5,4 mmol L⁻¹ de KCl 5 mmol L⁻¹ de glucose, 0,42 mmol L⁻¹ de Na₂HPO₄, 0,44 mmol L⁻¹ de KH₂PO₄, 2,3 mmol L⁻¹ de NaHCO₃, 0,53 mmol L⁻¹ de EDTA, 50 mg% de Tripsina (1:250) e 2 mg% de vermelho de fenol, sendo o pH ajustado para 7,4. Quando destinada ao repique, esta solução foi esterilizada por filtração e armazenada a -20°C.

3.15.2.4 MEIO DE CULTURA

Para o crescimento celular foi utilizado o meio essencial mínimo de Eagle (MEM) (PAUL, 1973). Após a adequada reconstituição em água, o meio foi esterilizado por filtração e mantido a 4°C. Para o crescimento celular, o meio de Eagle foi enriquecido com

soro fetal bovino estéril (10% (v/v), e o pH foi ajustado para 7,4 com quantidades adequadas de solução de bicarbonato de sódio estéril.

3.15.3 TESTES DE ESTERILIDADE

Para verificação da eficácia dos procedimentos de esterilização, alíquotas de cada solução filtrada foram colocadas em estufa a 37°C, por no mínimo 15 dias antes do uso. Quando necessários testes adicionais de esterilidade foram realizados com a semeadura de alíquotas das soluções filtradas em meio de Sabouraud-dextrose ou ágar sangue. Controles para contaminação por micoplasma foram realizados pelo Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR).

3.15.4 PROCEDIMENTOS DE CULTIVO CELULAR

Neste trabalho foram utilizadas as técnicas de cultivo celular em monocamadas. Todas as operações envolvendo o cultivo celular foram desenvolvidas em capela de fluxo laminar do tipo vertical equipada com filtro HEPA ("high efficiency particulate air").

3.15.5 MANUTENÇÃO DA LINHAGEM

A linhagem de células HeLa foi mantida congelada à temperatura de -196°C, em meio essencial mínimo de Eagle (PAUL, 1973), pH 7,4, contendo DMSO (10% v/v) e soro fetal bovino (10% v/v).

As células foram congeladas na concentração de 2×10^6 cels mL⁻¹, acondicionadas em tubos plásticos, tipo Eppendorf, estéreis.

3.15.6 DESCONGELAMENTO DA LINHAGEM

As células até então conservadas em N₂ líquido, foram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37°C e cuidadosamente colocadas em meio de crescimento, pré-aquecido a 37°C. Após 12 horas a 37°C, as células não viáveis (que não aderiram à superfície de crescimento), foram removidas através de troca de meio.

A adesividade e crescimento celular foram observados com o auxílio de microscópio óptico invertido (Olympus MO21).

3.15.7 REPIQUES (SUB-CULTURAS)

Para o repique das culturas confluentes foram utilizados procedimentos de descolamento da monocamada, utilizando-se solução de tripsina-verseno, e o crescimento celular ocorreu em estufa à 37°C por 72 horas. O crescimento foi acompanhado por observações periódicas em microscópio invertido, até a confluência da monocamada controle.

3.15.8 CONTAGEM DE CÉLULAS

A suspensão de células foi diluída 50 vezes em PBS e contadas em câmara de Neubauer através de Microscopia ótica, utilizando microscópio Olympus modelo KWS.

3.15.9 VIABILIDADE CELULAR

3.15.9.1 TESTE DO AZUL DE TRIPAN

A viabilidade celular foi realizada segundo a técnica do corante vital azul de Tripán (PHILLIPS, 1973).

Foram utilizadas câmaras de Neubauer e microscópio óptico (Olympus modelo KWS) para realização das contagens. A solução de Azul de Tripán foi preparada a 0,4% (m/v) em PBS. Para cada mL da suspensão celular utilizou-se 0,1 mL da solução do corante. A percentagem de células viáveis foi calculada através da seguinte relação:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{nº de células não coradas}}{\text{nº de células totais}} \times 100$$

Foram utilizadas somente as suspensões celulares com viabilidade acima de 95%.

3.15.9.2 TESTE DO MTT

Células HeLa foram previamente plaqueadas em placas de múltiplos poços (96 poços), na concentração de $7,2 \times 10^4$ cels mL⁻¹ e colocadas em estufa por 24 horas. Após este período, o meio de cultura foi retirado e adicionado novo meio de cultura, contendo ou não os diferentes polissacarídeos. As culturas permaneceram em atmosfera de 5% de CO₂ à 37 °C por 2 horas. Passado este tempo, o meio foi retirado e adicionado 20 µL da solução de MTT (5 mg mL⁻¹) e 200 µL de meio, permanecendo a cultura nas

mesmas condições anteriores, por 3 horas. Após este tempo, o meio foi novamente aspirado e acrescentou-se 200 μL de DMSO. A leitura foi realizada a 550 nm em leitor de microplacas BENCHMARK (REILLY *et al.* 1998)

3.15 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE CÉLULAS HeLa.

Os ensaios de citotoxicidade foram desenvolvidos em placas de múltiplos poços (CORNING) contendo lamínulas de vidro ou mesmo em garrafas de vidro. Células HeLa (5×10^5 cels mL^{-1}) foram crescidas, utilizando-se meio de cultura preparado como no item 3.14.2.4, na presença e ausência de polissacarídeo (controle), em concentrações que variaram entre 2,5 a 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por 48 horas, quando o crescimento foi interrompido. As células foram então processadas para análise em microscopia óptica e/ou microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

3.16 PROCESSAMENTO DE CÉLULAS HeLa PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ÓPTICA.

As lamínulas obtidas conforme descrito no item 3.16, foram fixadas com solução de Bouin durante 5 min. à temperatura ambiente e rotineiramente coradas com Eosina-Azul de metileno segundo Leishman ou Hematoxilina-Eosina. Alternativamente, colorações com Azul de Alcian (pH 1.0 ou 2.5) (PALLADINI; LAURO, 1968; CULLING *et al.* 1985) e Hematoxilina foram desenvolvidas. A montagem da lâmina foi realizada com resina Entelan.

3.17 ANÁLISE QUANTITATIVA DA POPULAÇÃO CELULAR ASSOCIADA COM A DIVISÃO CELULAR

A *fração de crescimento celular*, foi definida como *percentagem de mitoses*, (P_M), ocorrendo ao final de 48 horas de crescimento, na ausência e presença dos polissacarídeos, de acordo com a equação

$$P_M = N_C/N.100$$

Onde N_C é o número de células em divisão, N é o número total de células na população, e P_M é a percentagem de mitoses. (AHERNE *et al.* 1977)

3.18 PROCESSAMENTO DE CÉLULAS HeLa PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.

Células HeLa foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5% (v/v), em solução tampão cacodilato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2, durante 18 horas à 4°C. Foi realizada uma etapa de pós-fixação em tetróxido de ósmio 1%, em solução tampão cacodilato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2, durante 15 min., à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, e realizado ponto crítico e metalização (BUCHI; DE SOUZA, 1992). A observação das análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão, foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR e das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizada no LAC (convênio COPEL/UFPR).

3.19 ENSAIO DE ADESÃO DE CÉLULAS HeLa SOBRE MOLÉCULAS DE MATRIZ EXTRACELULAR

Os ensaios de adesão sobre moléculas da matriz extracelular foram realizados em placas multipóços (96 poços), nas quais adicionou-se moléculas de matriz: laminina-1 (LN-1_ de EHS ($10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), fibronectina de plasma humano ($10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) ou Vitronectina de plasma humano ($20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), por um período de 10 a 12 horas, em câmara úmida. Após este tempo, a placa foi lavada com PBS. Posteriormente adicionando-se PBS contendo BSA a 1% e incubou-se em atmosfera de 5% de CO_2 , a 37 °C, por 1 hora. Após esse tempo, as células ($1 \times 10^5 \text{ cels mL}^{-1}$) foram semeadas na ausência ou presença dos polissacarídeos, em concentrações que variaram de 2,5 a $160 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, prosseguindo-se a incubação em estufa de CO_2 por mais 2 horas. Terminado o período de incubação, o meio de cultura foi retirado, e a preparação foi lavada com PBS por 3 vezes. Adicionou-se, por 5 min. a solução de cristal violeta (5% em etanol 2%), lavou-se exaustivamente com PBS. O corante foi extraído com solução citrato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em etanol 50%. A detecção foi realizada por espectrofotometria de luz a 550 nm, em leitor de microplacas BENCHMARK.

3.21 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão ($M \pm dp$), submetidos à análise multifatorial de variância e ao teste de Tukey, considerando-se estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância $p < 0.05$ (VIEIRA, 1981). Letras iguais nos pares de comparação (*a* ou *b*) indicam $p > 0.05$; letras diferentes (*a* e *b*) indicam $p \leq 0.05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA GALACTANAS SULFATADAS, ALGINATOS E FUCANAS BRUTAS DE ALGAS MARINHAS SOBRE CÉLULAS HeLa

O presente trabalho de tese foi iniciado com a avaliação da atividade citotóxica sobre células HeLa, utilizando tipos estruturais distintos de polissacarídeos isolados de algas marinhas, visando selecionar polissacarídeos que ocasionassem efeitos significativos sobre estas células. A Tabela I apresenta a composição química das amostras utilizadas nos experimentos iniciais, que eram constituídas de galactanas sulfatadas, alginatos e heterofucanas.

Os parâmetros morfológicos característicos para células HeLa podem ser observados nas Figuras 1 (A e B), 2 (A - D) e 3 (A e B). Estas células apresentam característica epitelial, citoplasma basófilo, núcleos grandes e bem definidos e a presença de muitos nucléolos, sugestivo de intensa atividade metabólica. Os elementos celulares apresentam-se justapostos, formando uma monocamada contínua. Por Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V.), a morfologia celular característica de células epiteliais também pode ser constatada. Estas células apresentam muitas microvilosidades, como demonstrado nas Figuras 2 (A) e 2 (C,D). Observa-se ainda a cromatina nuclear desespiralizada (Figura 3 A), bem como o Complexo de Golgi, característico, bem preservado, indicando que a preparação foi realizada com sucesso (Figura 3 B). Considerando que células HeLa são de linhagem tumoral, a eventual presença de núcleos atípicos, assim como uma pequena quantidade de células condensadas podem ocorrer.

Os efeitos da fração BHW ($80 \mu\text{g mL}^{-1}$), que se constitui em uma fração bruta, estão mostrados na Figura 4. Verifica-se que a monocamada apresenta-se muito semelhante ao controle. Algumas células apresentaram discreta alteração de morfologia, em relação ao controle, como por exemplo, a aparência de fibroblastos (Tabela II). A fração B4, na concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$, embora ocasionasse a presença de núcleos atípicos e *blebs*, além de grande quantidade de material acidófilo no citoplasma, quando comparado ao controle, permitiu a formação de monocamadas confluentes, e manteve a capacidade de efetuar mitoses (Figura 5). Esses resultados indicam que estas galactanas, apesar de apresentarem alta concentração de sulfato, não interferem de forma significativa na atividade celular. E, embora a composição monossacarídica e/ou a conformação da

molécula possam estar envolvidos na discreta alteração morfológica observada, inclusive causando algum sofrimento celular, evidenciado pela presença de *blebs*, esses polissacarídeos, como demonstrado pelas preparações, não causaram morte celular.

TABELA I – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS GALACTANAS, ALGINATOS E FUCANAS BRUTAS.

	Sulfato (a)	Ác. Urônicos ^(b)	Fuc	Xil	Gal	6-O- metil- Gal	2-O- metil- Gal	3,6- anidro- Gal	Man	Glu
	mg%		mol%							
BHW	17,0	-	-	7,7	79,6	6,9	1,1	15,6	1,0	3,7
B4	24,0	-	-	2,9	77,7	8,1	-	11,3	-	-
PC75	15,6	-	-	-	38,6	38,7	-	22,7	-	-
Alginato	-	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-
BM-L	-	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-
BG-L	-	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-
BG-S	-	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-
FS	19	3,5	67,8	16,1	13,6	-	-	-	1,2	tr.
FP	16,0	6,3	40,5	10,8	31,5	-	-	-	10,5	6,7

Alginato → Alginato de *Laminaria brasiliensis* (DUARTE *et al.* 1991; NOSEDA *et al.* 1997),
 BM-L → Blocos M (ác. manurônico) de *L. brasiliensis* (DUARTE *et al.* 1991; NOSEDA *et al.* 1997),
 BG-L → Blocos G (ác. gulurônico) de *L. brasiliensis* (DUARTE *et al.* 1991; NOSEDA *et al.* 1997),
 BG-S → Blocos G de *Sargassum stenophyllum* (DUARTE *et al.* 1991; NOSEDA *et al.* 1997),
 BHW → fração bruta de *Bostrychia montagnei* (NOSEDA *et al.* 1999),
 B4 → galactana sulfatada purificada *B. montagnei* (NOSEDA *et al.* 1999),
 PC 75 → Porfíra purificada de *Porphyra columbina* (VIANA, 1999; NOSEDA *et al.* 2000),
 FS → fração bruta de fucanas sulfatadas de *S. stenophyllum* (DUARTE *et al.* 2001 a),
 FP → fucanas parcialmente purificadas de *S. stenophyllum*; obtida neste trabalho, fluxograma p. 28

(a) Determinado pelo método de DOGSON; PRICE (1962); (b) BLUMENKRANTZ; ASBOE-HANSEN (1973). tr. – traços

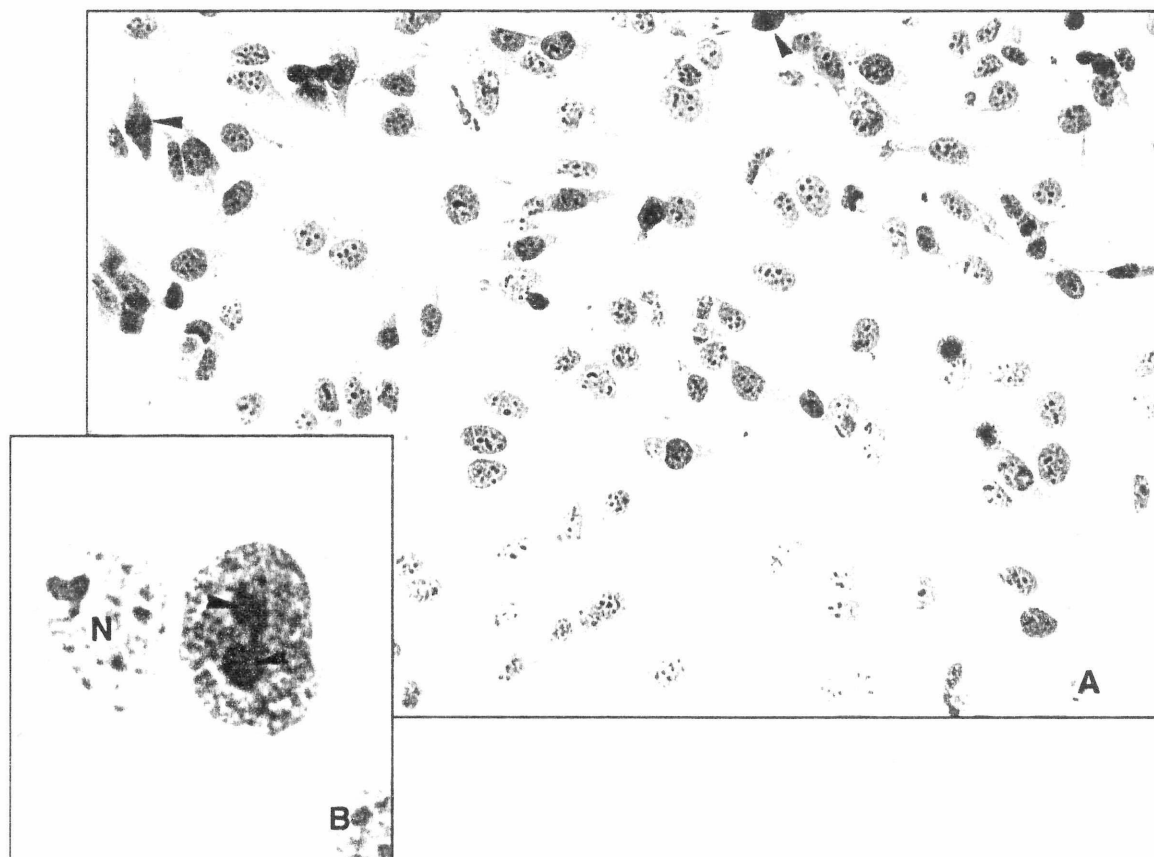
TABELA II - AVALIAÇÃO DE ALGUNS PARÂMETROS MORFOLÓGICOS DE CÉLULAS HeLa CRESCIDAS NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE DAS GALACTANAS, ALGINATOS E FUCANAS BRUTAS.

	Controle (sem polissacarídeo)	Polissacarídeos								
		Alginato	BM-L	BG-L	BG-S	BHW	B4	PC 75	FS	FP
Concentração máx. utilizada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	-	160 ^(b)	40	40	40	80	80	80	40 ^c	80
Coloração	H. E.	H. E.	Leish.	Leish.	Leish.	H. E.	H. E.	H. E.	H. E.	H. E.
Parâmetros morfológicos										
Monocamada confluyente	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim ^(a)	Sim ^(a)	Não	Não
Mitoses atípicas	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Núcleos atípicos	-	+	+	++	+	+	+	++	+++	-
Aparência de fibroblastos	+	+	-	+	+	++	+	+	+++	+++
Diminuição no n° de céls.	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim
<i>Clusters</i>	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não
<i>Blebs</i>	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
Presença de material acidófilo	+	+++	++	+++	+	+	+++	++	+	-

Alginato → Alginato de *Laminaria brasiliensis*, BM-L → Blocos M (ác. manurônico) de *L. brasiliensis*, BG-L → Blocos G (ác. gulurônico) de *L. brasiliensis*, BG-S → Blocos G (ác. gulurônico) de *Sargassum stenophyllum*, BHW → fração bruta de *Bostrychia montagnei*, B4 → galactana sulfatada purificada *B. montagnei*, PC 75 → Porfirana purificada de *Porphyra columbina*, FS → fração bruta de fucanas sulfatadas de *S. stenophyllum*, FP → fucanas parcialmente purificadas de *S. stenophyllum*

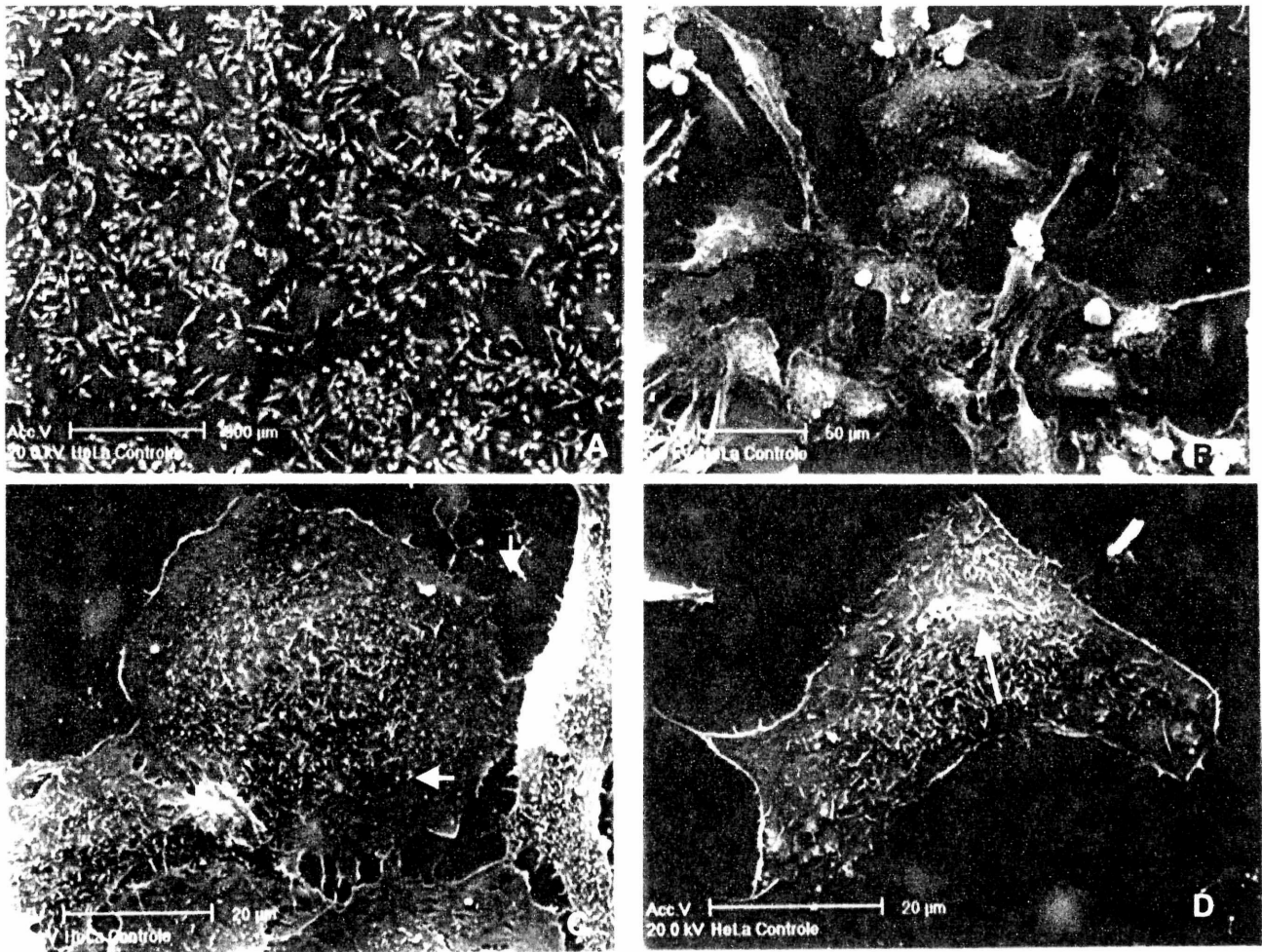
(a) - monocamada confluyente, porém com grandes espaços onde ocorreu descolamento celular; (b) - presença de células multinucleadas; (c) a concentração de 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ promoveu descolamento total das células; + - quantidade relativa na monocamada.

Figura 1 - Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescidas na ausência de polissacarídeo (controle) observadas por M. O.



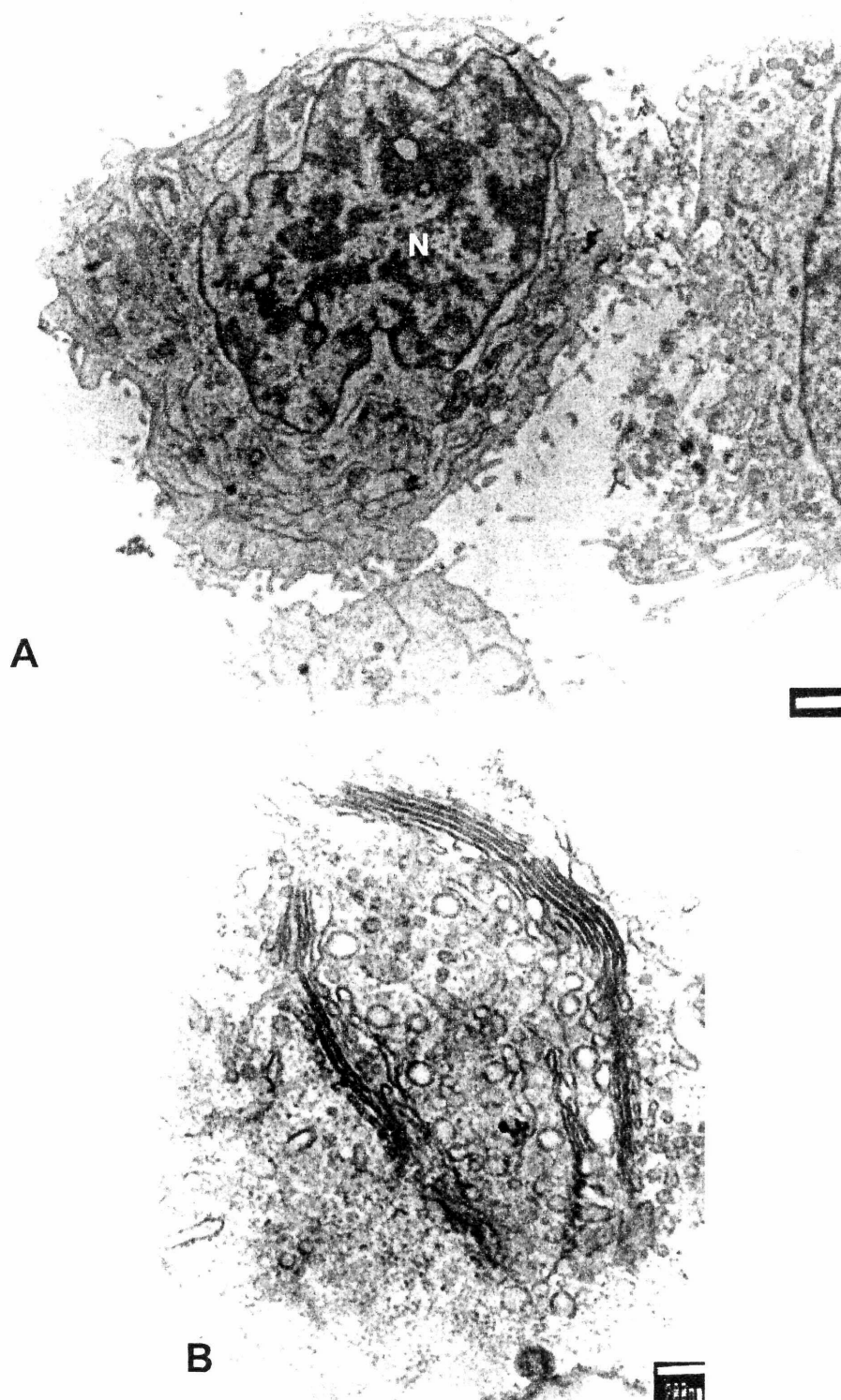
As células foram crescidas na ausência de polissacarídeos, por 48 horas a 37°C; A, Ampliação original 200x. B, Ampliação original 1000x. N, núcleo; ponta de seta, nucléolos;

Figura 2 – Fotomicrografia ultraestrutural da monocamada de células HeLa na ausência de polissacarídeos (controle) observada por M.E.V.



As células foram crescidas na ausência de polissacarídeos, por 48 horas a 37°C, a preparação para análise em M.E.V. foi realizada como descrito em Material e Métodos. A, corresponde à visão geral da monocamada; B, onde a barra corresponde a 50 µm; C, as setas correspondem a interação célula-célula; D, a seta corresponde às microvilosidades

Figura 3 – Fotomicrografia ultraestrutural da monocamada de células HeLa crescida por 48 horas na ausência de polissacarídeos (controle) observada por M.E.T.



As células foram crescidas na ausência de polissacarídeos, por 48 horas a 37°C, a preparação para análise em M.E.T. foi realizada como descrito em Material e Métodos. A, corresponde à vista geral da célula HeLa; N, Núcleo; B, detalhe do Complexo de Golgi e Retículo Endoplasmático

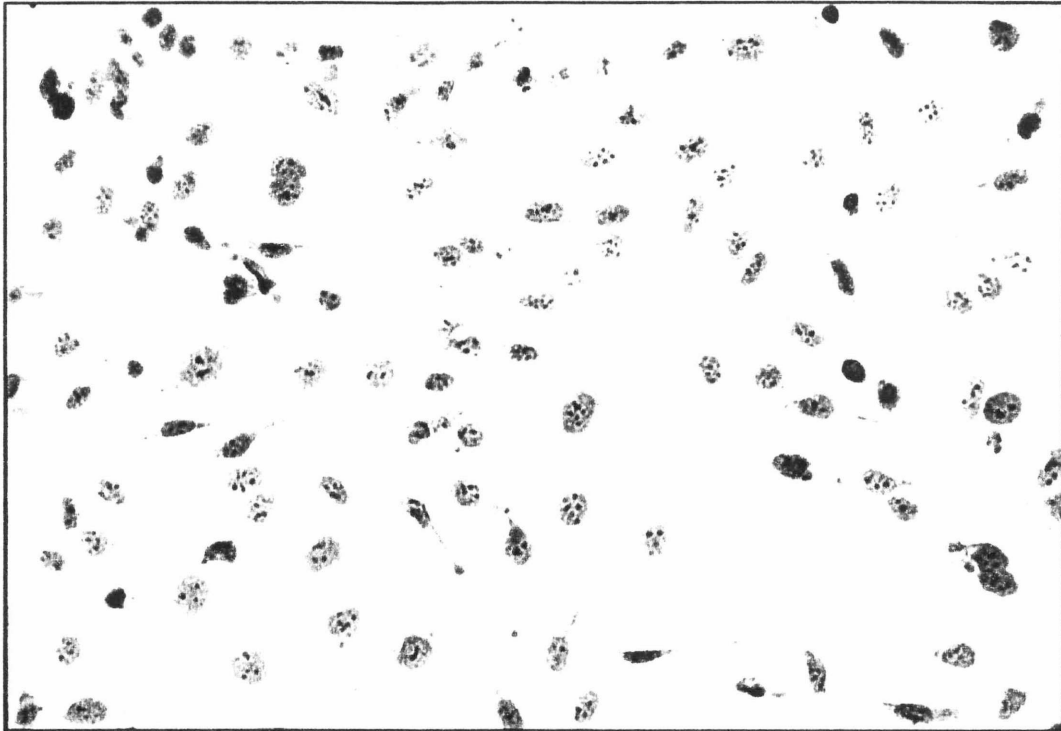
O efeito da galactana tipo porfirana PC75 foi analisado em células HeLa, em concentrações que variaram de 2,5 a 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A Figura 6 demonstra os efeitos deste polímero na sua maior dose. Várias alterações na monocamada celular foram observadas, destacando-se a presença de mitoses atípicas, núcleos atípicos e *blebs* (Tabela II); em algumas regiões da lamínula ocorreu descolamento total de células.

Embora as galactanas B4 e PC75 apresentem a mesma estrutura geral, formada por β -D-galactopiranosose 3-O-substituída (unidade A) e α -L-galactopiranosose 4-O-substituída (unidade B), estas se diferenciam significativamente em termos de grupos substituintes (Tabela I). Enquanto que na galactana PC75 os grupos sulfato estão esterificando o carbono-6 da maioria das unidades B, na galactana B4 esses grupos esterificam parte das unidades A em C-6 e C-4, além da presença de grupos sulfato em C-3 de parte das unidades B. Estas galactanas não induzem alterações morfológicas significativas sobre células HeLa, como foi demonstrado anteriormente, mesmo sendo polissacarídeos sulfatados com diferentes tipos e localização de substituição. Sendo assim outros fatores além da presença deste substituinte, devem ser necessários para que ocorram modificações nessas células. Deste modo, considerando as ações das galactanas sulfatadas tipo agarana e porfirana, foi selecionada uma outra classe de polissacarídeos em que a carga ácida é fornecida pela presença de ácidos urônicos. O poliuronídeo testado foi o ácido algínico de *Laminaria brasiliensis*, o qual apresenta uma relação molar ácido manurônico/ ácido gulurônico (M/G) de 1,2:1.

Culturas de células crescidas na presença deste polissacarídeo apresentaram-se muito similares ao controle, embora algumas células se apresentassem alongadas, assemelhando-se a fibroblastos. Uma quantidade considerável de células multinucleadas foi observada, sugerindo a ocorrência de mitoses incompletas, como demonstrado na Figura 7 A.

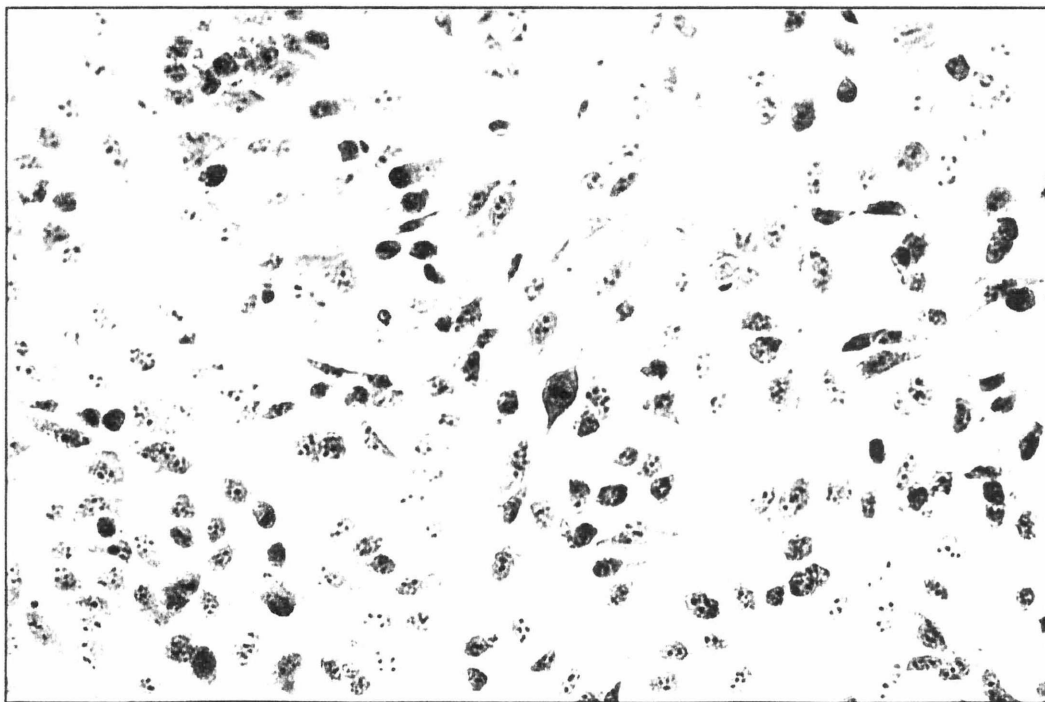
Com a finalidade de avaliar se o tamanho da molécula ou o tipo de ácido urônico influenciou nos parâmetros morfológicos de células HeLa, produtos de hidrólise ácida parcial foram testados, isto é os blocos M e G de *L. brasiliensis* e os blocos G de *Sargassum stenophyllum*. Blocos G formados apenas por ácido gulurônico, de ambas as algas, ocasionaram alteração na forma da célula, as quais adquiriram morfologia semelhante a fibroblastos, alteração esta também observada com o alginato de *L. brasiliensis*, mas não com os blocos M.

Figura 4 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração BHW de *B. montagnei*. M.O.



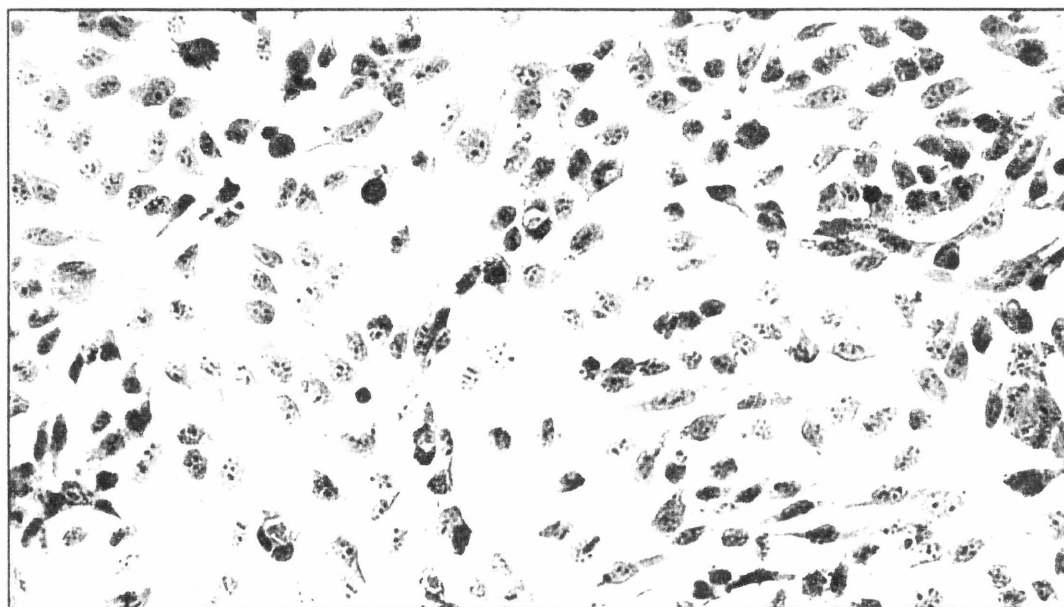
As células HeLa foram crescidas na presença da fração BHW na concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$, por 48 horas a 37°C . Ampliação original 200X

Figura 5 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração B4 de *B. montagnei*. M.O.



As células HeLa foram crescidas na presença da fração B4 na concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$, por 48 horas a 37°C . Ampliação original 200X

Figura 6 - Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração PC75 de *Porphyra columbina*. M.O.



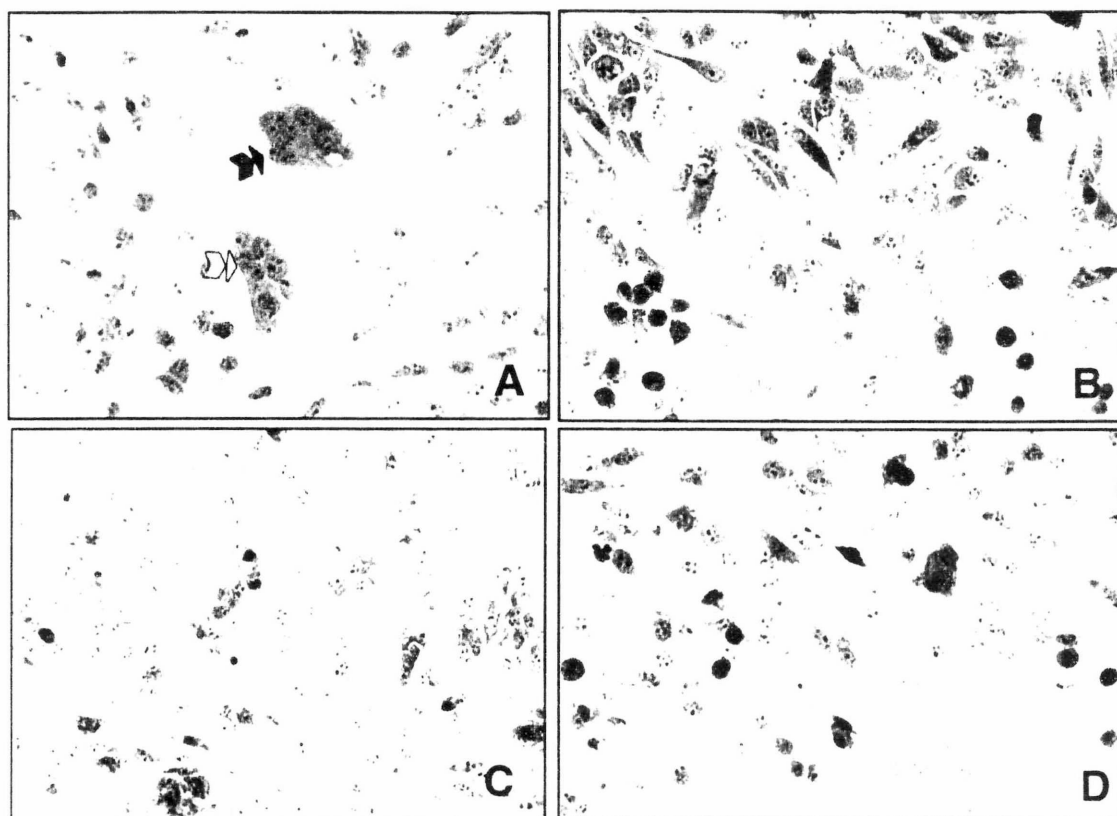
As células HeLa foram crescidas na presença da fração PC75 na concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$, por 48 horas a 37°C . Ampliação original 200X

Tal fato pode ser justificado pelo tipo de conformação adotada pelo ácido gulurônico, de 1C_4 , enquanto o ácido manurônico assume a conformação 4C_1 . O tamanho dos blocos G também pode ter influência no comportamento das células na cultura, levando às alterações observadas, como os núcleos atípicos, material acidófilo no citoplasma e *blebs*. Tal justificativa pode ser reforçada pelos dados demonstrado na Tabela II e Figuras 7 B, C e D onde o bloco G proveniente do polímero de *S. stenophyllum*, formado por 64 unidades de ácido gulurônico, não induziu nas células as alterações enumeradas anteriormente. A redução do tamanho deste tipo de bloco ($\sim 1/3$, 20 unidades de ácido gulurônico em *L. brasiliensis*) ocasiona mudanças nesses parâmetros morfológicos avaliados. A presença de células multinucleadas foi observada apenas no poliuronídeo. Esses resultados indicam que a massa molar, bem como a conformação, devem ser fatores que diferenciam a ação desses poli- e oligouronídeos.

A fração FS contendo heterofucanas sulfatadas (19% de grupos sulfato) isolada de *S. stenophyllum* apresenta alto teor de fucose (67,8%), além de outros monossacarídeos neutros: xilose (16,1%), manose (1,2%), galactose (13,6%), glucose (traços), e ácido urônico 3,5% (Tabela I). Esta fração FS foi avaliada quanto a sua citotoxicidade em células HeLa e os resultados estão apresentados nas Figuras 8 (A - D). Verifica-se na Figura 8 A que a concentração de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ causou alteração morfológica das células e, aparentemente, diminuição do número dessas. Esses efeitos foram dose dependente, pois na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ a diminuição do número foi acentuada, resultando em uma cultura não confluenta (Figura 8 C), bem como aumentou a frequência de núcleos atípicos, de aglomerados celulares, e de *blebs* (Figura 8 D). Na concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ ocorreu um descolamento total das células HeLa da preparação. Ressalta-se que as fucanas presentes na fração FS foram responsáveis pelas principais alterações celulares observadas e que esses efeitos ocorreram frente a baixas concentrações das mesmas.

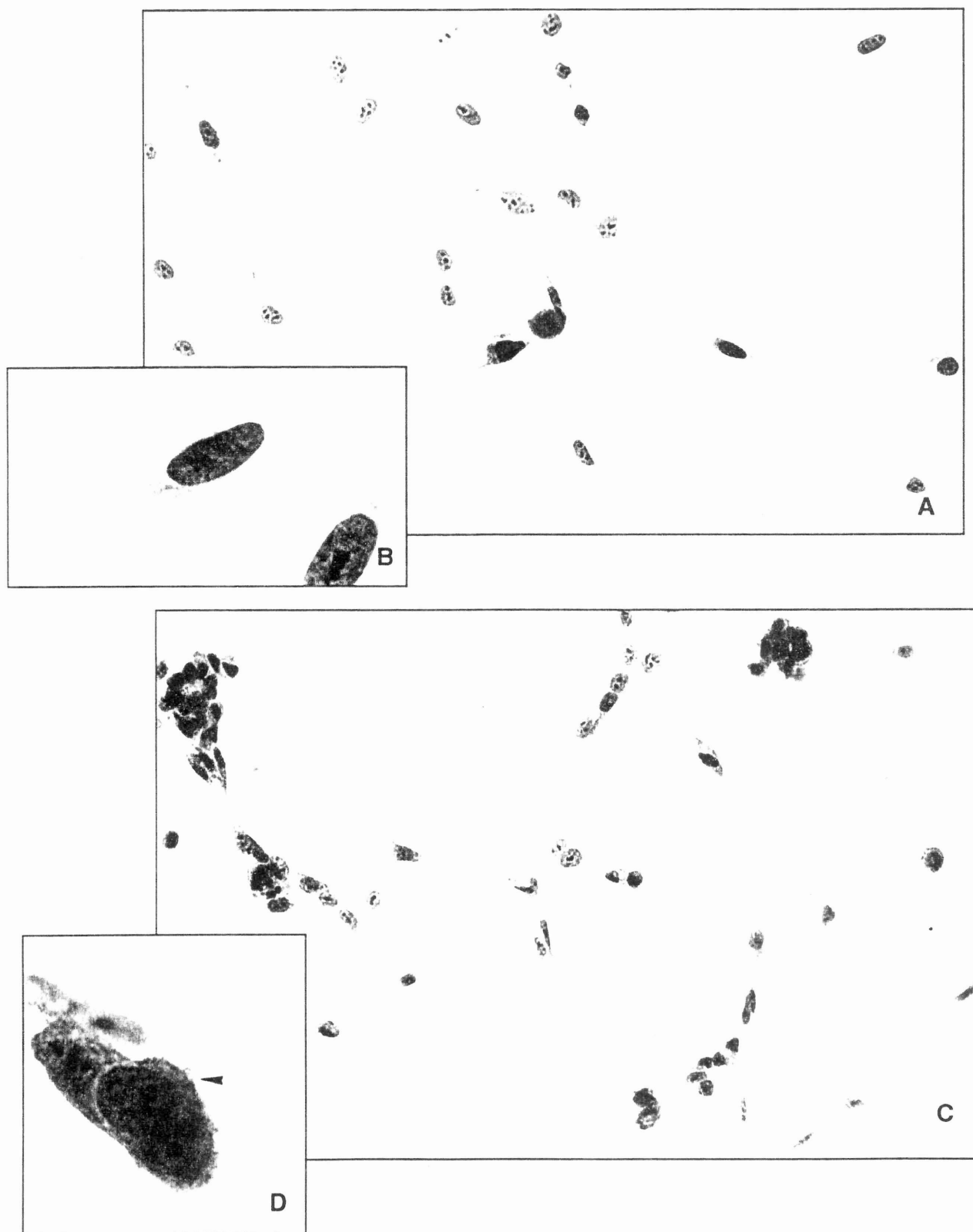
Com a finalidade de verificar a toxicidade da fração FS sobre células HeLa realizou-se experimentos de viabilidade celular, pelo método do Azul de Tripán. O resultado de tais experimentos está demonstrado na Figura 9, que apresenta o perfil de decaimento da viabilidade celular após incubação por 2 horas com este polissacarídeo. Essa incubação diminuiu a viabilidade celular em cerca de 40% na concentração máxima utilizada ($160 \mu\text{g mL}^{-1}$), indicando que a fração FS apresenta uma acentuada citotoxicidade para células HeLa, promovendo alterações de permeabilidade da membrana plasmática após 2 horas de incubação.

Figura 7 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença dos poliuronídeos de *Laminaria brasiliensis* e *Sargassum stenophyllum*. M.O.



As células HeLa foram crescidas por 48 horas a 37°C. A, corresponde ao Alginato (*L. brasiliensis*) na concentração de 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$; B, BM-L, blocos M de *L. brasiliensis* na concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$; C, BG-L, blocos G de *L. brasiliensis*, na concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e D, BG-S, blocos G de *S. stenophyllum*, na concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Ampliação original 200x.

Figura 8 - Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FS de *Sargassum stenophyllum*. M.O.



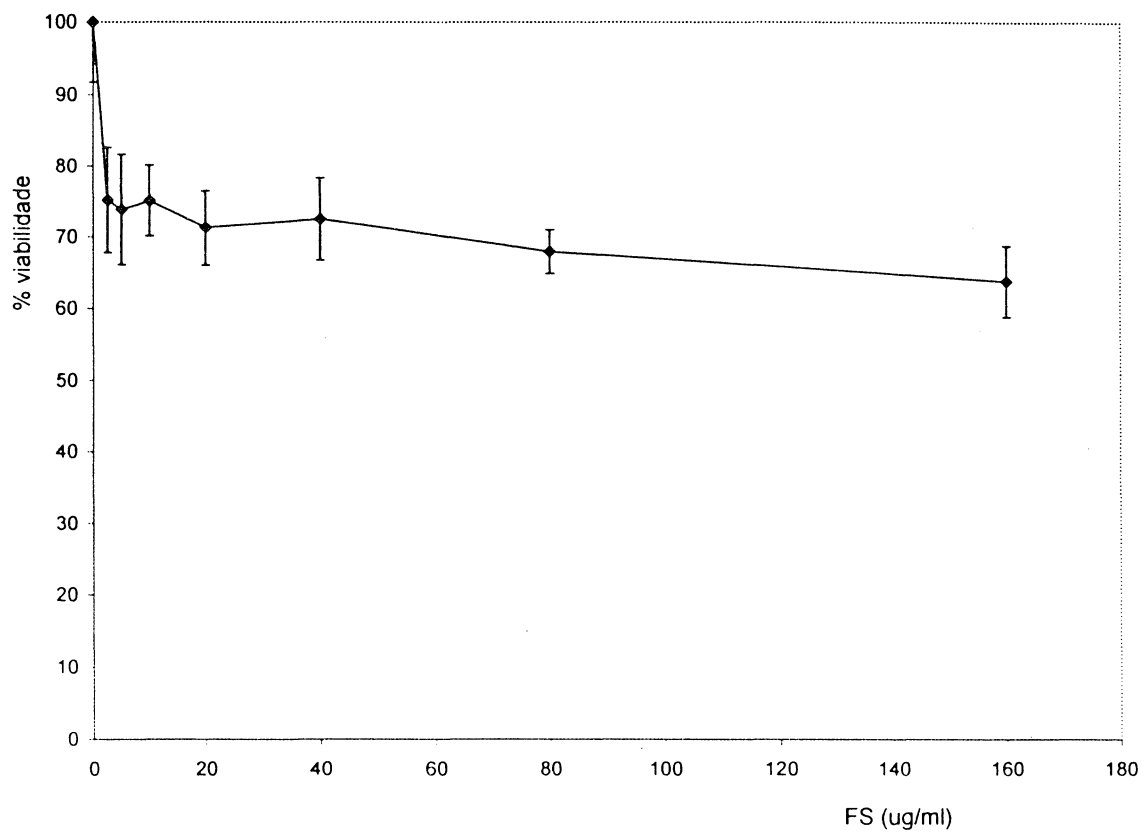
As células HeLa foram crescidas por 48 horas a 37°C. As figuras A e B correspondem à concentração de 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; C e D à concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Ampliação original em A, C 200x.; B, D 1000x.

Entretanto, quando as células foram tratadas com a fração FS e colocadas novamente em cultura, após a retirada do polissacarídeo ocorreu adesão ao vidro e crescimento celular, que foi similar às culturas controle, indicando que as células viáveis que permanecem na preparação após o tratamento com a fração FS, são capazes de formar monocamadas (dados não mostrados). Resultados semelhantes foram descritos também para extratos de fucanas de *Ascophyllum nodosum*, que apresentaram efeitos reversíveis de atividade antiproliferativa em células de carcinoma broncopulmonar humano (RIOU *et al.* 1996). Deve-se salientar que embora as amostras utilizadas nesses experimentos fossem constituídas de polissacarídeos com grau de sulfatação similar entre si (15.6-22.0%), somente as fucanas promoveram acentuadas alterações celulares indicando que a presença de ésteres sulfato não é o único requisito para a manifestação da atividade biológica. Assim, os efeitos dos polissacarídeos sulfatados sobre células HeLa podem ser influenciados pela composição monossacarídica, posição dos grupos O-sulfato, presença de ramificação e tipo de cadeia principal, já que esses fatores podem alterar a conformação molecular e, conseqüentemente, a resposta biológica.

Os resultados obtidos com a fração FS quanto ao extensivo sofrimento celular, e manutenção da capacidade de adesão e proliferação das células HeLa, após a remoção do polissacarídeo, sugerem uma interferência dos polissacarídeos presentes na fração FS, na adesão celular, seja por interação com componentes da matriz extracelular, ou por inibição da síntese desses componentes. Neste aspecto ressalta-se que fucanas de *Ascophyllum nodosum* inibiram a síntese de colágeno em células musculares lisas da aorta de ratos (LOGEART *et al.* 1996), enquanto que a fucana de *S. schröderi*, bem como seus produtos de hidrólise parcial estimularam a síntese de heparan sulfato em células de endotélio de coelho (LEITE *et al.* 1998).

Segundo GRAFFEL *et al.* (1989) a composição química das fucanas pode variar de acordo com o método de extração, levando alguns autores a afirmar que cada nova fucana purificada é um composto único com estrutura única (ROCHA *et al.* 2001). Com a finalidade de avaliar se a modificação do processo de extração/purificação das fucanas de *S. stenophyllum* promoveria a perda de sua atividade biológica, a fração FP, que foi obtida

Figura 9 – Curva dose-resposta da viabilidade de células HeLa crescidas na presença da fração FS extraída da alga parda *Sargassum stenophyllum*.

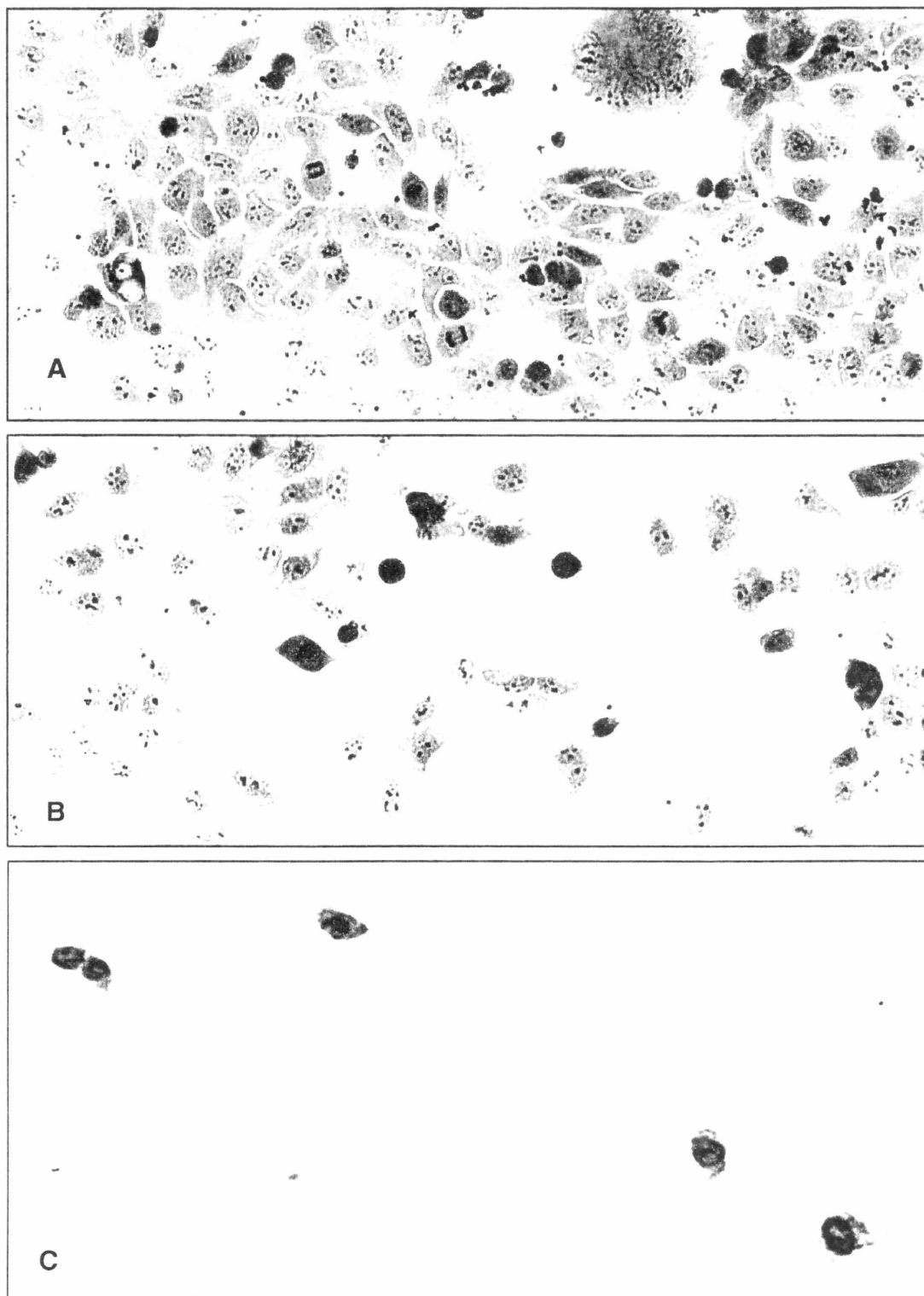


As células HeLa, foram crescidas por 48 horas na ausência (controle, corresponde a 100%) e presença da fração FS. Avaliação feita pelo método do Azul de Tripán como descrito em Materiais e Métodos.

após precipitação ácida do ácido algínico e descomplexação da base quaternária (Cetavlon) com 4 mol L^{-1} de NaCl (Esquema 2, p. 28 - Tabela III, p. 63), foi estudada frente a células HeLa. Essa fração é equivalente à fração FS descrita no experimento anterior. A figura 10 (A – C) demonstra que a ação de FP sobre células HeLa foi dose dependente. A partir da concentração $2,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 10 A), provocou alterações morfológicas das células, que passaram a exibir aparência de fibroblastos. Na concentração de $20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ observou-se uma diminuição acentuada do número de células, tornando a cultura não confluenta (Figura 10 B). Na concentração de $160 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ocorreu morte total das células HeLa da preparação (Figura 10 C). Da mesma forma que a fração FS, FP constitui um *pool* de fucanas e, apesar da modificação no processo de extração, não houve perda dos efeitos biológicos qualitativos e quantitativos causados pelas fucanas de *S. stenophyllum* em células HeLa.

Os resultados dos experimentos de citotoxicidade utilizando tipos estruturais distintos de polissacarídeos, mostraram que apenas os polissacarídeos sulfatados e carboxilados (fucanas) de *S. stenophyllum* ocasionaram diminuição na monocamada, alterações morfológicas, bem como diminuição na viabilidade celular. A modificação significativa das características morfológicas de células HeLa com este tratamento, indica que estes polímeros promovem alterações na adesão destas células, sendo portanto de grande interesse para o estudo detalhado da sua ação sobre esta células. Porém para a compreensão dos efeitos biológicos destes polissacarídeos um estudo das características químicas se faz necessário.

Figura 10 - Fotomicrografia da monocamada celular crescida na presença da fração FP de *Sargassum stenophyllum* sobre as células HeLa. M.O.



As células foram crescidas por 48 horas a 37°C, a figura A corresponde à concentração de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$; B, a concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$; C, corresponde à concentração de $160 \mu\text{g mL}^{-1}$. Ampliação original 200x.

4.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS DA ALGA PARDA *Sargassum stenophyllum*.

4.2.1 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DA ALGA PARDA *S. stenophyllum* E PRECIPITAÇÃO POR CETAVLON

Para a obtenção das fucanas analisadas nos experimentos de citotoxicidade, a alga parda *Sargassum stenophyllum* foi submetida a extração aquosa à temperatura ambiente. O extrato aquoso contendo fucanas e livre de ácido algínico contaminante foi sequencialmente tratado com etanol e dialisado para a obtenção da fração bruta FB (Esquema 1, página 28). Com a finalidade de promover a purificação da fração FB, esta foi tratada com Cetavlon e o precipitado obtido (polissacarídeo - base quaternária) descomplexado com solução de NaCl 4 mol L⁻¹, obtendo-se a fração denominada FP (Esquema 2, página 28 – Tabela III, p. 63)

Como pode ser observado na Tabela IV, o tratamento com Cetavlon, não alterou de forma significativa a composição monossacarídica e o teor de grupos sulfato, de FP em relação a FB, mas uma diminuição da percentagem de proteínas e aumento no teor de ácidos urônicos, como demonstrado na Tabela III.

4.2.2 HIDRÓLISE ÁCIDA PARCIAL DA FRAÇÃO FP DE *S. stenophyllum*

Com a finalidade de caracterizar a natureza dos fatores relacionados com a interação entre fucanas sulfatadas e células HeLa, a fração FP foi submetida a hidrólise ácida parcial, como descrito anteriormente. Paralelamente, os testes de atividade biológica foram desenvolvidos também com as fucanas nativas F-3B e F-5B, previamente isoladas, caracterizadas e purificadas por DUARTE *et al.* (2001 a). Com o produto de hidrólise parcial da fração FP, foram avaliados os efeitos sobre células HeLa:

- (a) da carga negativa conferida pelos grupos sulfato;
- (b) da presença de cadeias ramificadas de fucose sulfatada;
- (c) da carga negativa proveniente de grupos carboxílicos de ácidos urônicos;
- (d) da sulfatação em outras unidades monossacarídicas, que não fucose;
- (e) efeito da redução da massa molar.

A tabela IV apresenta os resultados de composição monossacarídica dos

produtos de hidrólise ácida parcial da fração FP, em que se utilizou H_2SO_4 50 mmol L^{-1} , por 45 minutos à 100 °C. Após esta hidrólise foi obtida a fração FD, com 23% de rendimento em relação a FP. Verifica-se que o processo de hidrólise parcial ocasionou defucosilação de ~75 % e uma dessulfatação de 15%, bem como promoveu um aumento de ~100% no teor de ácido urônico. Esta defucosilação se deve à labilidade da ligação da fucose.

A fração FD foi purificada por cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephacel – forma cloreto) utilizando-se como eluentes água que deu origem a fração FD1; NaCl 0,5, que originou a fração FD2, e 1 mol L^{-1} , que deu origem à fração FD3. As frações FD1 e FD2 apresentaram teor semelhante de fucose, 13 e 15,5%, respectivamente. Porém, as frações se diferenciaram pronunciadamente no teor de grupos sulfato e de ácido urônico, como pode ser observado na Tabela II. A ausência de grupos carregados na fração FD1 correspondeu ao esperado, considerando que esta fração foi eluída da coluna de troca iônica com água.

A fração FD2 alcançou um rendimento de 64%, em relação a fração FD. Devido ao maior rendimento, esta fração foi selecionada para dar sequência ao presente estudo. FD2 apresentou 40% e 50% das unidades de fucose e de grupos O-sulfato, respectivamente, em relação à fração de origem (FP). A análise dos resultados apresentados na Tabela II mostra que a diminuição de grupos sulfato foi compensada pelo aumento (3 vezes) do teor de ácidos urônicos (19% em FD2 e 6,3% em FP). Isto ocorre porque durante o processo de hidrólise parcial de polissacarídeos sulfatados há concorrência de duas reações: a hidrólise de ligações glicosídicas e a hidrólise de éster sulfato (PEAT *et al.* 1959). Deste modo a hidrólise ácida parcial ocasionou a hidrólise preferencial das ligações glicosídicas mais lábeis, como aquelas ligações envolvendo as unidades de fucose, ocorrendo concomitantemente a perda de grupos sulfato (50%). O enriquecimento de FD2 (em relação a FP) em termos de ácidos urônico deve-se a estabilidade relativa desses monossacarídeos em meio ácido. Deste modo, o processo de hidrólise ácida parcial das fucanas de *S. stenophyllum* permitiu o isolamento de um polímero (FD2) onde a carga negativa proveniente de grupos sulfato e de ácidos urônicos foi significativamente alterada quando comparada à das fucanas nativas. Como consequência do processo hidrolítico houve ainda a remoção das cadeias laterais formadas por unidades de fucose sulfatada (DUARTE *et al.* 2001 a). Com a finalidade de avaliar a redução da massa molar da fração FD2, foi realizada a determinação do poder redutor (Tabela III), FD2 apresentando um poder redutor três vezes superior ao de FP, indicando a redução da massa

molar. As Figuras 11 A e B mostram o perfil eletroforético das amostras FB, FP e FD2. Na Figura 11 A pode-se observar que as frações FB e FP permaneceram na origem, assim como um padrão de dextrana sulfato de $500.000 \text{ g mol}^{-1}$. Porém na figura 11B pode-se observar uma banda na região do padrão de dextrana sulfato de $10.000 \text{ g mol}^{-1}$, para a fração FD2. Este resultado pode ser confirmado por análise do poder redutor pelo método de PARK e JOHNSON (1949), mostrando que sua massa molar está em torno de 7.000 g mol^{-1} . Assim, o polímero FD2 nativo e as frações modificadas quimicamente por carboxi-redução e sulfatação foram utilizados para a avaliação dos efeitos de grupos químicos sobre a atividade biológica a ser abordada no presente trabalho.

TABELA III - RENDIMENTOS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES DA ALGA *S. stenophyllum*

Amostras	Rendimento %	Açúcar Total ^(a)	Proteína ^(b)	Sulfato ^(c)	Ác. Urônicos ^(e)	Sulfato/ Açúcar total	Poder redutor (µg%) ^(d)
FB	1,4 ⁽¹⁾	40,9	11,3	18,6	3,8	-	nd
FP	72,7 ⁽²⁾	77,0	4,1	16,0	6,3	0,3	3,4
FD	23,3 ⁽³⁾	58,3	2,0	13,8	12,4	-	10,4
FD1	16,2 ⁽⁴⁾	43,2	0,3	0,0	0,0	-	nd
FD2	63,8 ⁽⁴⁾	71,7	1,0	8,3	19,0	0,18	10,0
FD3	12,6 ⁽⁴⁾	39,7	3,6	11,7	14,7	-	3,6
FD2-c	78,9 ⁽⁵⁾	73,5	nd	8,3	2,3	0,18	10,2
FD2-s	87,5 ⁽⁵⁾	57,1	nd	18,7	17,9	0,51	10,0
FD2-cs	87,5 ⁽⁶⁾	69,8	nd	19,0	2,3		8,1
FS ^(f)	0,4	56,6	2,0	19,0	3,5	0,46	nd
F-3B ^(f)	41,4	78,0	tr.	18,0	12,6	0,41	nd
F-5B ^(f)	50,2	66,0	tr.	30,8	2,1	0,59	nd

(1) % em relação ao material de partida; (2) % em relação à fração FB; (3) % em relação à fração FP;

(4) % em relação à FD; (5) % em relação à FD2; (6) % em relação à FD2-c

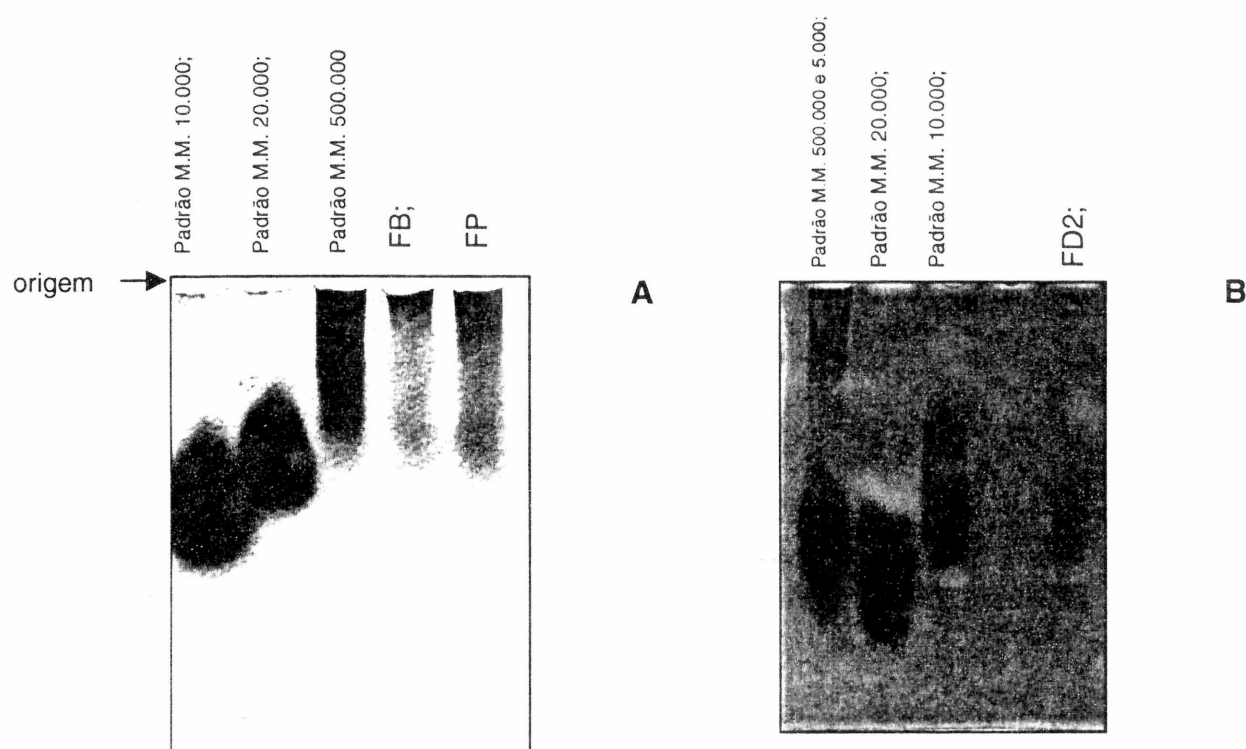
(a) determinado pelos métodos de DUBOIS *et al.* (1956); (b) LOWRY *et al.* (1951); (c), DOGSON; PRICE (1962); (d) PARK; JOHNSON (1949); (e) BLUMENKRANTZ; ASBOE-HANSEN (1973); (f) DUARTE *et al.* (2001a); nd = não determinado; tr. - % menor que 1,5% considerado como traços.

TABELA IV - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DA ALGA *S. stenophyllum*

Amostras	mol%				
	Fucose	Xilose	Manose	Galactose	Glucose
FB	41,5	9,5	10,8	30,5	7,7
FP	40,5	10,8	10,5	31,5	6,7
FD	9,4	12,8	20,2	44,6	13,0
FD1	13,0	6,9	19,8	38,8	21,5
FD2	15,5	13,2	19,0	40,4	11,9
FD2-c	8,0	12,9	23,5	34,7	20,9
FD2-s	10,3	17,7	13,4	46,3	12,6
FD2-cs	8,7	13,0	18,5	36,3	23,5
FS ^(b)	67,8	16,1	tr.	13,6	tr.
F-3B ^(b)	44,2	11,1	20,1	19,0	5,6
F-5B ^(b)	58,4	2,9	2,3	34,1	2,4

(a) determinado por análise em GC-EM na forma de acetato de alditol; (b) DUARTE *et al.* (2001 a)
tr. - % menor que 1,5% considerado como traços.

Figura 11 – Perfil eletroforético das frações FB, FP e FD2 de *Sargassum stenophyllum*



Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, solução tampão 1,2 diaminoetano 50 mmol L^{-1} , pH 9,0. Fixador: Cetavlon 10%. Corante: Azul de toluidina. Padrões utilizados foram Dextrana sulfato de massas molares de 5.000 a 500.000 g mL^{-1} .

4.2.3. ANÁLISES QUÍMICAS E ESPECTROSCÓPICAS DA FRAÇÃO FD2 E DOS CORRESPONDENTES POLÍMEROS MODIFICADOS

A reação de carboxi-redução dos ácidos urônicos foi iniciada pela esterificação dos grupos carboxílicos com derivado de carbodiimida em pH 4,75. Na segunda etapa da reação (pH 7,0) o éster carboxílico, presente na fração FD2, foi separadamente reduzido com: a) NaBD₄ e b) NaBH₄.

A fração FD2 carboxi-reduzida (FD2-c) foi obtida com um rendimento de 79%, havendo 88% de redução dos grupos carboxila, segundo a dosagem de ácido urônico no polímero carboxi-reduzido. A análise da composição monossacarídica do polímero carboxi-reduzido demonstrou um aumento da percentagem de glucose em 9% (Tabela V). Deve ser ressaltado que a dosagem fotolorimétrica de ácidos urônicos pelo método de BLUMENKRANTZ e ASBOE-HANSEN (1973) apresenta interferência dos açúcares neutros. Deste modo o teor de ácidos urônicos dosado em FD2 (19%, Tabela III) pode estar superestimado.

A análise por GC-MS da fração FD2 carboxi-reduzida com NaBD₄ demonstrou que entre as hexoses apenas a glucose apresentou-se deuterada em C-1. A análise de fragmentação do glucitol hexacetato demonstrou a presença dos íons moleculares 217 (proveniente de glucose) e 219 (provenientes de ácidos urônicos) em uma proporção de 43,9 e 56,1%, respectivamente. Deste modo, dos 20,9% de glucose presente na fração FD2-c, 11,7% foram provenientes de ácido glucurônico. Assim a redução dos grupos carboxílicos com o derivado de carbodiimida permitiu a identificação do tipo de ácido urônico bem como a quantificação deste, no polímero original. Além do mais, a carboxi-redução é um processo indicado para a realização da subsequente análise de metilação, bem como permite a obtenção de um polímero que por análise comparativa, com o polissacarídeo original, permite avaliar a influência desses grupos ácidos em testes de atividade biológica, como anticoagulante (CACERES *et al.* 2000; NISHINO; NAGUMO, 1991; NISHINO *et al.* 1991 a; CHEVOLOT *et al.* 1999), antiviral (TULIO, 1998; MAJCZAK, 1999; FELDMAN *et al.* 1999; DUARTE *et al.* 2001 b; CARLUCCI *et al.* 1997), inibição da proliferação de células musculares lisas (VISCHER; BUDDECKE, 1991), entre outras.

Muitas destas atividades biológicas apresentadas por polissacarídeos

sulfatados são, entre outros fatores, relacionadas ao grau de sulfatação da molécula (fucose sulfatada), desde que dessulfatação ocasiona perda total da atividade anticoagulante, por exemplo, enquanto que sulfatação química pode ocasionar potencialização da atividade (NISHINO; NAGUMO, 1992). Deste modo a fração FD2 com baixo teor de grupos O-sulfato (8,3%) foi submetida a sulfatação química (O'NEIL, 1955) para o aumento do teor deste grupo substituinte com a finalidade de verificar se a sulfatação em unidades monossacarídicas diferentes da α -L-fucose poderia ou não ocasionar expressão de efeitos biológicos e se esses eram comparáveis aos das fucanas nativas (F-3B e F-5B) sobre células HeLa. O processo de sulfatação química de FD2 e FD2-c (FD2-s e FD2-cs, respectivamente) ocasionou um acréscimo de ~2,5 vezes no teor de sulfato sem ocasionar alteração significativa na composição monossacarídica das respectivas frações originais (Tabelas III e IV).

A análise dos resultados de FT-IR da fração FD2 e FD2-s (Figuras 12 e 13, respectivamente) são diferentes, principalmente em relação à absorção de grupos sulfato. FD2 apresenta absorção em 842 cm^{-1} , enquanto que FD2-s apresenta absorção em 815 cm^{-1} , relativo a presença de grupo substituinte em carbono primário (ORR, 1954). A presença de grupos sulfato em C-6 de hexoses, pode ser confirmada pela análise comparativa dos espectros de RMN- ^{13}C da fração FD2 e FD2-s (Figura 14 e 15, respectivamente), onde se observa diminuição do sinal em 60,9 (C-6 livre), que inverte, juntamente com os outros dois sinais de C-6 livre (60,0 e 60,6) no experimento de DEPT, Figura 14B. Um aumento de sinal de C-6 sulfatado, que ocorreria em aproximadamente 66 – 69 ppm não foi detectado no espectro de RMN- ^{13}C de FD2-s. Isto pode ser explicado pelo fato de que FD2 não foi supersulfatado, suposição decorrente da existência de vários sinais nesta região e possível sulfatação em C-6, nas diferentes unidades de hexose. De acordo com os resultados de metilação, FD2 apresenta manose, galactose e glucose com C-6 livre, existindo portanto vários sítios de sulfatação química em C-6.

O espectro da fração FD2 apresentou quatro grupos de sinais na região anomérica: (a) em 103,4 – 103,0 ppm, correspondendo ao C-1 de unidades de β -D-galactose, (b) 101,5 e 100,9 ppm, correspondendo ao C-1 de α -D-glucopirranose, α -D-glucurônico e β -D-xilose, (c) 98,3 ppm relativo ao C-1 de β -D-manose 2-substituída, (d) 96,5 ppm (baixa intensidade), C-1 de fucopiranosil 3,4-dissubstituída. Esse espectro da fração

FD2 apresenta ainda dois sinais, relativos ao CH₃ das unidades de fucose, em 15,6 e 16,7 ppm. A região dos carbonos do anel apresenta um grande número de sinais com superposição. No entanto pode-se destacar o sinal em 65,1 ppm (DEPT invertido) correspondente ao C-5 das unidades de xilose e os sinais em 77,7 e 77,2 ppm relativos às unidades 4-O-substituídas (ácido glucurônico e galactose). Sinais em 80,9 e 80,1 ppm indicam a presença de unidades 3-O-substituídas, enquanto que o sinal em 174,8 ppm, confirma a presença de ácido urônico (glucurônico) na molécula. Esses resultados foram confirmados após análise de metilação, como discutido a seguir.

A análise de metilação da fração FD2 obtida da alga *S. stenophyllum* por hidrólise ácida parcial foi conduzida no polímero carboxi-reduzido (FD2-c – Tabela V). Como pode ser observado, mesmo sendo um produto de menor massa molar, em relação às fucanas nativas, o padrão de metilação ainda é muito complexo. No entanto, pode-se ressaltar que as unidades de fucose, embora presentes em baixa percentagem em FD2-c, estão predominantemente 2-, 4- e 3,4-substituídas. A presença de unidades de fucose 3,4-disubstituída é confirmada pela análise de RMN-¹³C, onde o sinal em 96,5 ppm é atribuído a unidades de fucose 3,4-disubstituídas (DUARTE *et al.* 2001 a). No espectro de infravermelho (Figura 12), a absorção em 842 cm⁻¹ correspondente a grupos sulfato em posição axial confirmando a presença de sulfato em C-4. Deste modo em FD2 as unidades de fucose estão principalmente 3-O substituídas, sulfatadas em C-4, e 4-O e 2-O substituídas. A análise de metilação, indica ainda percentagem considerável de manose 2,3-O dissusbtuídas (13,1 mol%) com menores quantidades de manose 2-O substituída, e manose 2,4-O dissusbtuída. De modo semelhante à fucana nativa F-3B de *S. stenophyllum*, FD2 apresenta uma cadeia principal constituída por manose 2-O substituída, com pontos de ramificação em C-3 e C-4. O sinal em 98,3 ppm no espectro de RMN-¹³C de FD2 confirma a presença de manose 2-O substituída (DUARTE *et al.* 2001 a). Na Tabela V pode-se observar a alta percentagem de galactose 4-O-substituída (13,1 mol%) além de galactose 3- e 3,6-O dissusbtuída em porcentagens equivalentes (12,6% no total). Este resultado, juntamente com o fato de que grande parte das unidades de fucose foram removidas do polímero original pelo processo de hidrólise parcial, indica que as unidades de galactose são, provavelmente, ramificadas em diferentes posições, por cadeias laterais constituídas por unidades de fucose na fucana original. A presença de unidades de galactose 4- e 3-O substituída foi confirmada pela análise de RMN-¹³C, com sinais em 77,2 e

80,9 – 80,1 ppm atribuídos ao C-4 e C-3 O-substituído, respectivamente.

Unidades de glucose 3-O- e 3,4-O-dissubstituída nos produtos de hidrólise do polímero permetilado confirmam resultados anteriores obtidos com a fucana F-3B de *S. stenophyllum* onde as unidades de ácido glucurônico e glucose são 4-O substituídas com ramificações em C-3 (DUARTE *et al.* 2001 a). Esses resultados estão parcialmente de acordo com os obtidos para a fucana F-3B de *S. stenophyllum* onde foi realizado um estudo estrutural detalhado (DUARTE *et al.* 2001 a). No entanto, devido a complexidade de FD2, aliado ao fato de que a metilação foi conduzida apenas no polímero nativo carboxi-reduzido (FD2), a obtenção de oligossacarídeos poderia auxiliar a interpretação dos complexos padrões de metilação obtidos para esta fração. Esses resultados são diferentes dos obtidos para a xilofucoglucuronana sulfatada isolada de *S. schröderi*, onde as unidades de ácido glucurônico 3-O substituído constituem a cadeia principal com ramificações em C-4 (LEITE *et al.* 1998).

Fucanas contendo cadeias principais formadas por unidades de ácido β -D-glucurônico com ramificações de fucose, bem como cadeias principais constituídas por ácido D-glucurônico e D-manose também têm sido relatadas para os polissacarídeos de *Ascomyllum nodosum* (MEDCALF *et al.* 1978; RIOU *et al.* 1996) e de *Sargassum linifolium* (ABDEL-FATTAH *et al.* 1974), respectivamente. Ressalta-se que a fucana isolada de *S. schröderi* estimulou a síntese de heparan sulfato produzido por células endoteliais em cultura, na mesma intensidade que a heparina padrão (LEITE *et al.* 1998), e também inibiu a adesão de células de ovário de hamster chinês na matriz de fibronectina, vitronectina ou colágeno tipo I (ROCHA *et al.* 2001). Deste modo, torna-se interessante a análise da influência dos polissacarídeos sulfatados e carboxilados de *S. stenophyllum* sobre a interação de células HeLa com moléculas de matriz extracelular, como mostrado anteriormente.

TABELA V – ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO FD2-c

Unidade Glicosídica	Posição do grupamento O-metil	Posição deduzida da substituição	FD2-c mol%
Fuc	2,4	3	0,8
	2,3	4	3,8
	3,4	2	3,4
	2	3,4	3,5
	3	2,4	0,9
Gal	2,3,4,6	Terminal	2,9
	2,3,6	4	13,1
	2,4,6	3	6,2
	2,4	3,6	6,4
	-	2,3,4,6	3,5
Man	3,4,6	2	3,5
	4,6	2,3	13,1
	3,6	2,4	5,1
	-	2,3,4,6	4,1
Glc	2,3,6	4	10,0
	2,6	3,4	5,2
	4,6	2,3	5,2
	-	2,3,4,6	1,9
Xil	2,3,4	Terminal	7,4

Figura 12 – Espectro de FT-IR na forma sólida da fração FD2, isolada de *S. stenophyllum*.

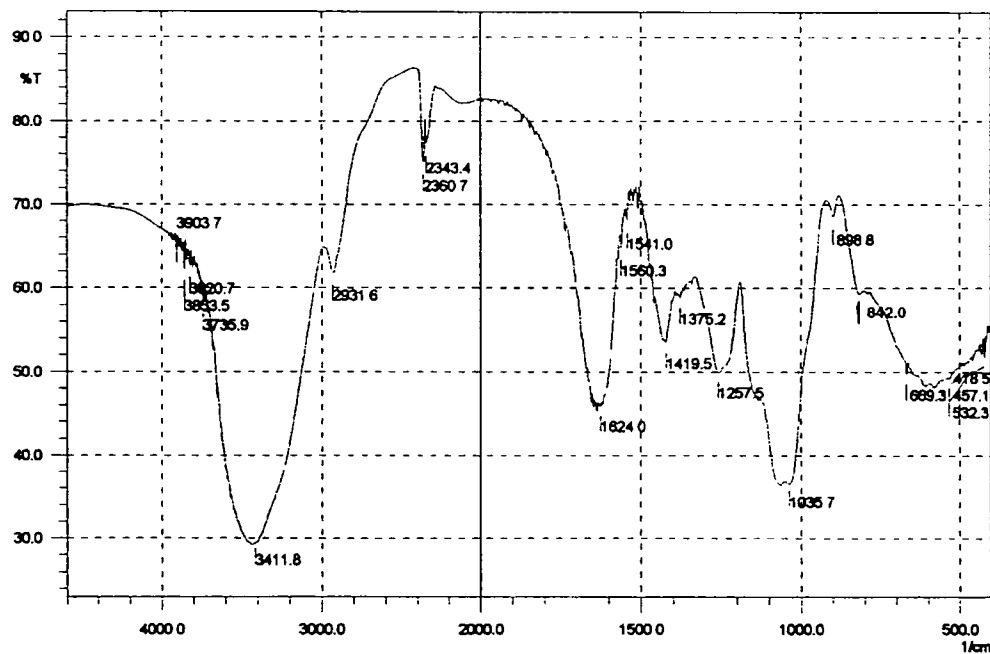


Figura 13 – Espectro de FT-IR na forma sólida da fração FD2-s, obtida de *S. stenophyllum*.

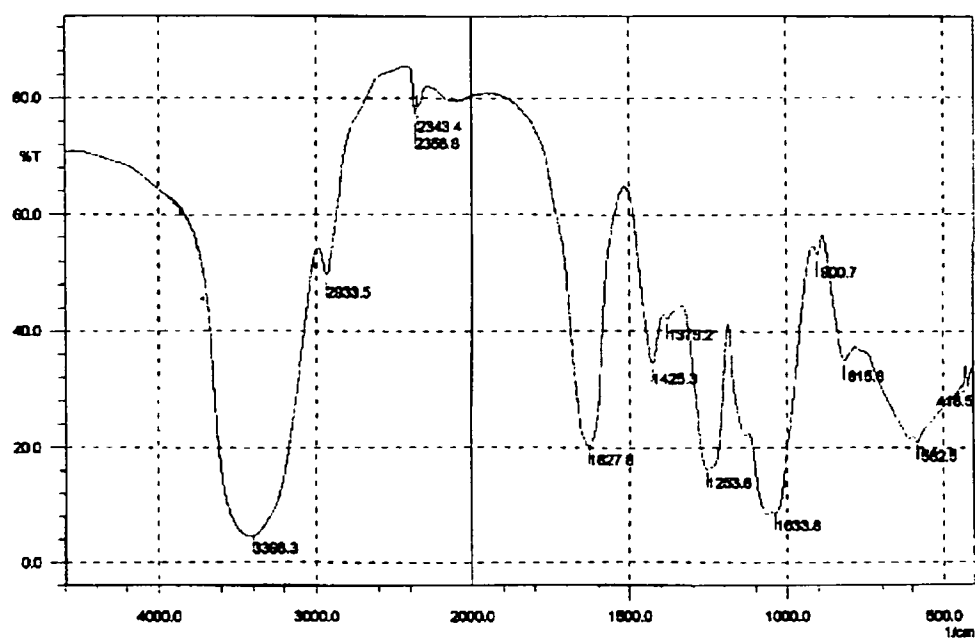
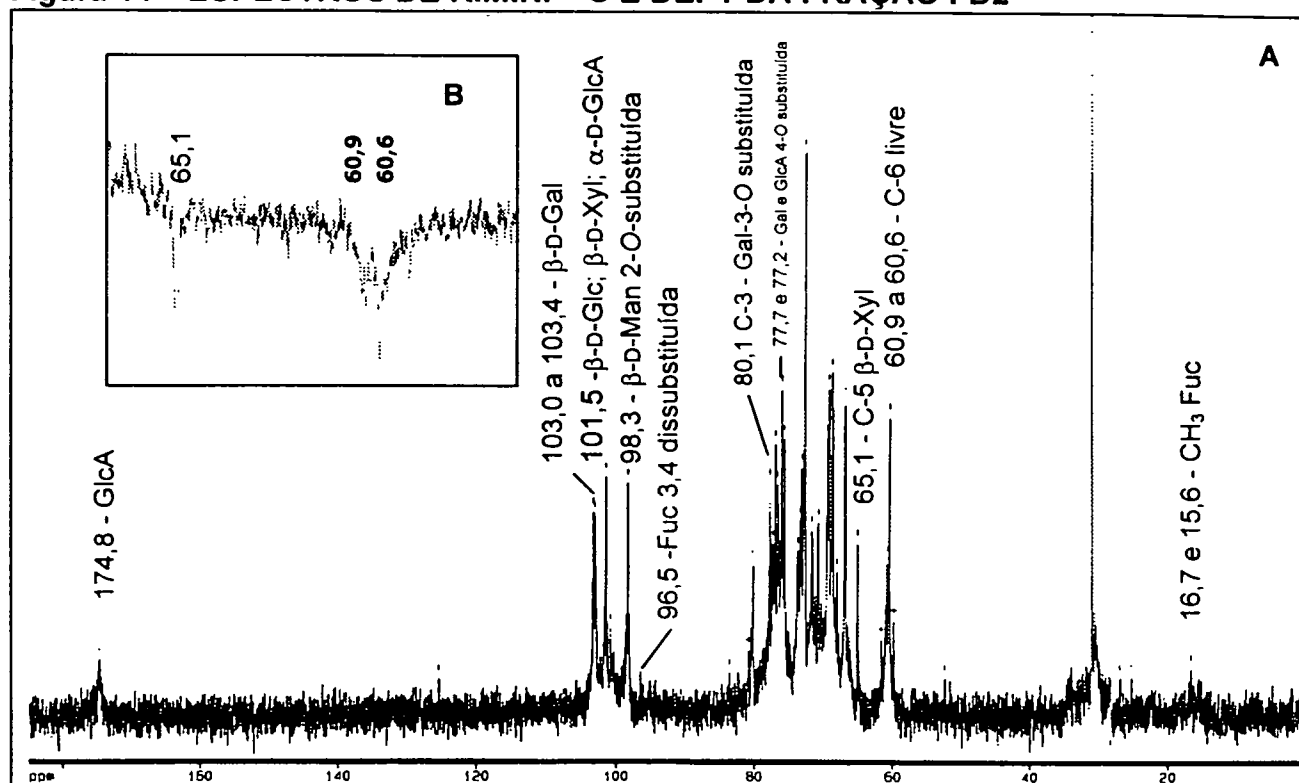
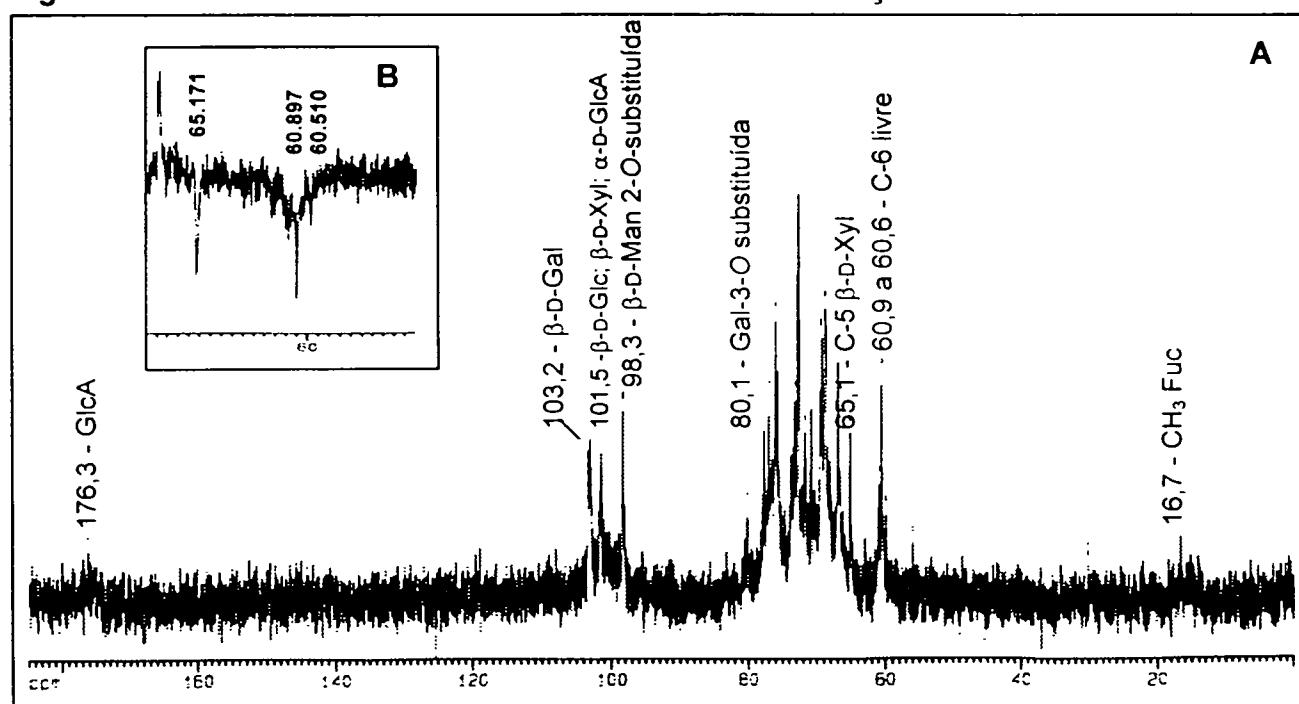


Figura 14 – ESPECTROS DE R.M.N.-¹³C E DEPT DA FRAÇÃO FD2

A – Espectro parcial do R.M.N.-¹³C (100,61 MHz)

B – Espectro Parcial R.M.N.-¹³C de DEPT-135 (100,61 MHz)

Análises realizadas a 50°C, em D₂O, tendo acetona como padrão interno (30,2 ppm).

Figura 15 – ESPECTROS DE R.M.N.-¹³C E DEPT DA FRAÇÃO FD2-s

A – Espectro de R.M.N.-¹³C (100,61 MHz); B – Espectro Parcial R.M.N.-¹³C de DEPT-135 (100,61 MHz)

Análises realizadas a 50°C, em D₂O, tendo acetona como padrão interno (30,2 ppm).

4.3 EFEITOS DOS POLISSACARÍDEOS DE *Sargassum stenophyllum* SOBRE CÉLULAS HeLa

Diante dos resultados discutidos no item 4.1, os estudos referentes às fucanas de *Sargassum stenophyllum* prosseguiram, utilizando frações nativas, com estruturas, teor de grupos sulfato e carboxílicos distintos (F-3B e F-5B), e também a fração FD2, obtida a partir do procedimento de hidrólise ácida parcial, descrito no item 4.2. Foram utilizadas também as frações obtidas a partir da modificação química de FD2, FD2-c (por carboxi-redução), FD2-s (por sulfatação) e FD2-cs (pelos dois métodos seqüenciais), com o objetivo de determinar a interferência do teor de grupos sulfato e carboxílicos, em relação à fração original.

Deste modo, as frações F-3B e F-5B representam extremos estruturais das fucanas. F-3B e F-5B são compostas por fucose, xilose, manose, galactose, glucose na proporção de 49,0; 11,1; 20,1; 19,0; 5,6 e 58,4; 2,9; 2,3; 34,1; 2,4 moles %, respectivamente. Enquanto F-3B é formada por uma cadeia de β -D-manose 2-O substituída, por unidades de fucose (1 \rightarrow 4) O-substituída e sulfatadas em C-2 e/ou C-3, F-5B é constituída por uma cadeia principal de β -D-galactopiranosose principalmente (1 \rightarrow 6) O-substituída, ramificada com unidades de fucose 4-sulfato (1 \rightarrow 3) O-substituída (principalmente). Além desses diferenciais, o teor de sulfato em F-5B é 1,7 vezes superior ao de F-3B, enquanto que o de ácido urônico nesta última é 6 vezes mais elevado que F-5B (DUARTE *et al.* 2001 a). A figura 17 (A, B) demonstra a atividade citotóxica da fração F3-B sobre células HeLa, onde há diminuição do número de células (Figura 17 B), e importantes alterações morfológicas e *blebs* (Tabela VI), em relação ao controle, mostrado nas Figuras 1 a 3 (pág. 46 – 48) e 16 (pág. 75). O tratamento da monocamada de células HeLa com a fração F5-B (Figura 18) levou a uma diminuição do número de células, além de presença de *blebs*, porém as células mantiveram suas características morfológicas. Este fato é bastante interessante tendo em vista o alto teor de grupos sulfato (30,8%) encontrado em F-5B, porém deve-se ressaltar também que o teor de monossacarídeos ácidos (ácidos urônicos) é baixo (2,1%), o que poderia estar influenciando na resposta celular observada.

Embora várias propriedades biológicas de interesse na área biomédica utilizando fucanas isoladas de algas marinhas tenham sido investigadas (ZHUANG *et al.* 1995; BLONDIN *et al.* 1996) estas moléculas apresentam massa molar elevada para sua

utilização como droga farmacológica. Assim, realizou-se o processo de hidrólise ácida parcial, o qual promoveu redução da massa molar. Este procedimento foi escolhido porque endofucosidases não são disponíveis comercialmente. A hidrólise, embora tenha causado alterações estruturais como a dessulfatação e defucosilação da molécula, permitiu a obtenção da fração FD2, de menor massa molar. Esta foi obtida a partir da fração parcialmente purificada por tratamento com Cetavlon, FP, a qual representa, assim como FS, as fucanas solúveis em água. O tratamento das células HeLa com a fração FD2, na concentração de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 19 A), proporcionou uma diminuição acentuada no número de células, e em concentrações superiores ($5 - 40 \mu\text{g mL}^{-1}$) produziram resultados semelhantes. A concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 20) promoveu diminuição do número de células, e conseqüentemente monocamadas não confluentes. O aparecimento de aglomerados celulares (*clusters*) e *blebs*, além de presença de núcleos e mitoses atípicas também foram observações freqüentes (Tabela VI). Como esta fração apresenta baixo teor de grupos sulfato (8,3%) e alto teor de ácidos urônicos (19%), e massa molar reduzida, modificações químicas foram realizadas com a finalidade de verificar se a alteração de cargas poderia alterar a resposta biológica observada nesta fração. A alteração das cargas dos grupos carboxílicos de FD2, ou seja, o correspondente polímero carboxi-reduzido (FD2-c) não ocasionou alterações significativas com exceção da morfologia celular até a concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 21). Porém, ao ser analisada por M.E.V., pode-se observar alterações significativas na morfologia celular quando tratadas com esta fração na concentração de $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 22 A – D).

De modo totalmente distinto da fração FD2-c, a fração FD2-s promoveu efeitos de grande magnitude sobre células HeLa. Deve-se destacar que FD2-s apresenta aproximadamente o dobro do teor de grupos sulfato (localizados em C-6) que FD2 e FD2-c. À concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 23), FD2-s produziu uma grande diminuição na monocamada celular, com modificação também na morfologia da célula. Em concentrações maiores, 20 e $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figuras 24 e 25, respectivamente), a diminuição do número de células foi gradativa, com maior aparecimento de células condensadas, núcleos atípicos, *clusters*, *blebs*, além de modificação na morfologia celular, como demonstrado na Tabela VI. As concentrações de 80 e $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ promoveram descolamento total das células. Quando a monocamada celular foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão,

pode-se verificar uma grande diminuição na área celular; condensação excessiva do núcleo e citoplasma (Figuras 26 e 27); células totalmente destruídas (Figura 28); ausência de microvilosidades; alterações nucleares, como aumento no espaço intermembrana e em diversos locais da célula (Figura 29). Portanto, o efeito observado nesta fração deve-se, provavelmente, não só ao grau de sulfatação mas também às cargas negativas do ácido urônico.

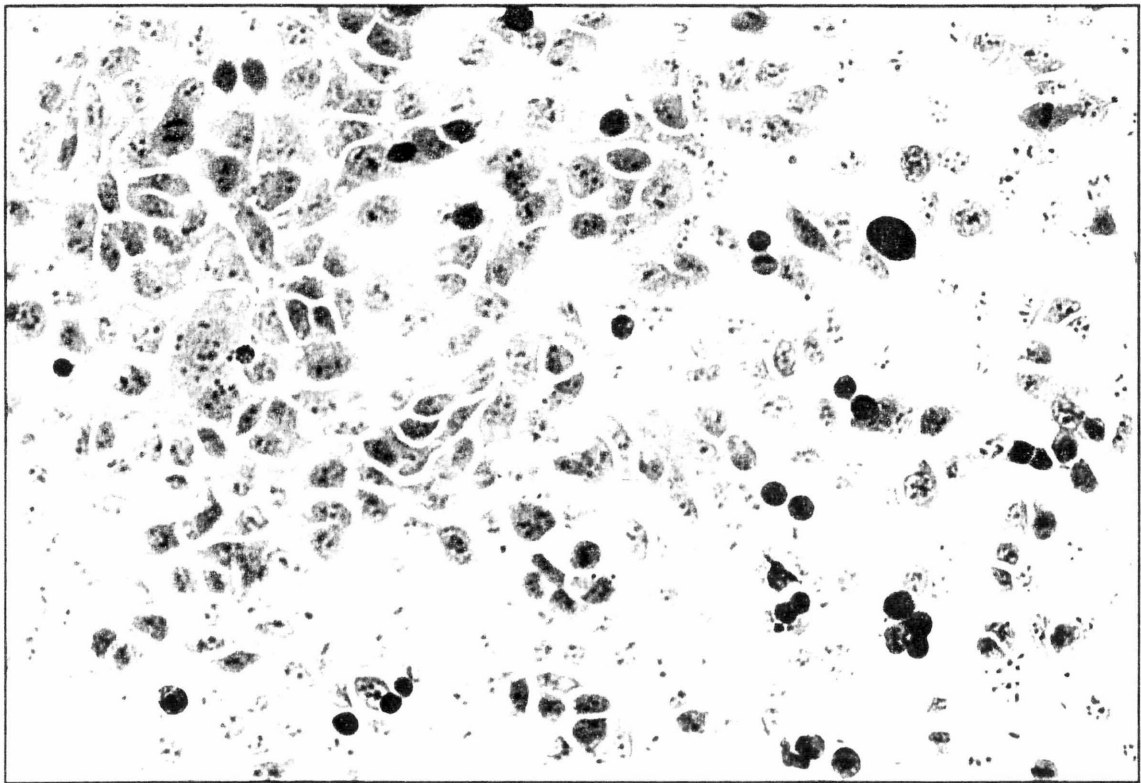
TABELA VI – AÇÃO DAS FUCANAS PURIFICADAS E DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE PARCIAL SOBRE CÉLULAS HeLa.

	Controle	F3-B	F5-B	FP	FD2	FD2-s	FD2-c	FD2-cs
Concentração máx. utilizada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	-	160	160	80 ^(a)	80 ^(a)	40 ^(b)	160	80
Parâmetros morfológicos								
Monocamada confluenta	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não
Mitoses atípicas	-	-	-	-	+	+	-	-
Núcleos atípicos	-	-	-	-	++	++	-	+
Aparência de fibroblastos	+	++	+++	+++	++	+++	+	+++
Diminuição do n° de céls.	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
<i>Clusters</i>	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim
<i>Blebs</i>	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Presença de material acidófilo	+	-	-	-	-	-	-	-

FP, fração precipitada por Cetavlon da alga *S. stenophyllum*; F3-B, fração original da alga *S. stenophyllum*; F5-B, fração original da alga *S. stenophyllum*; FD2, fração derivada de hidrólise ácida parcial e eluída com 0,5 M NaCl em coluna de DEAE–Sephacel; FD2-s, fração derivada da FD2 e sulfatada; FD2-c, fração derivada da FD2 e carboxi-reduzida; FD2-cs, fração derivada da FD2 e carboxi-reduzida e sulfatada;

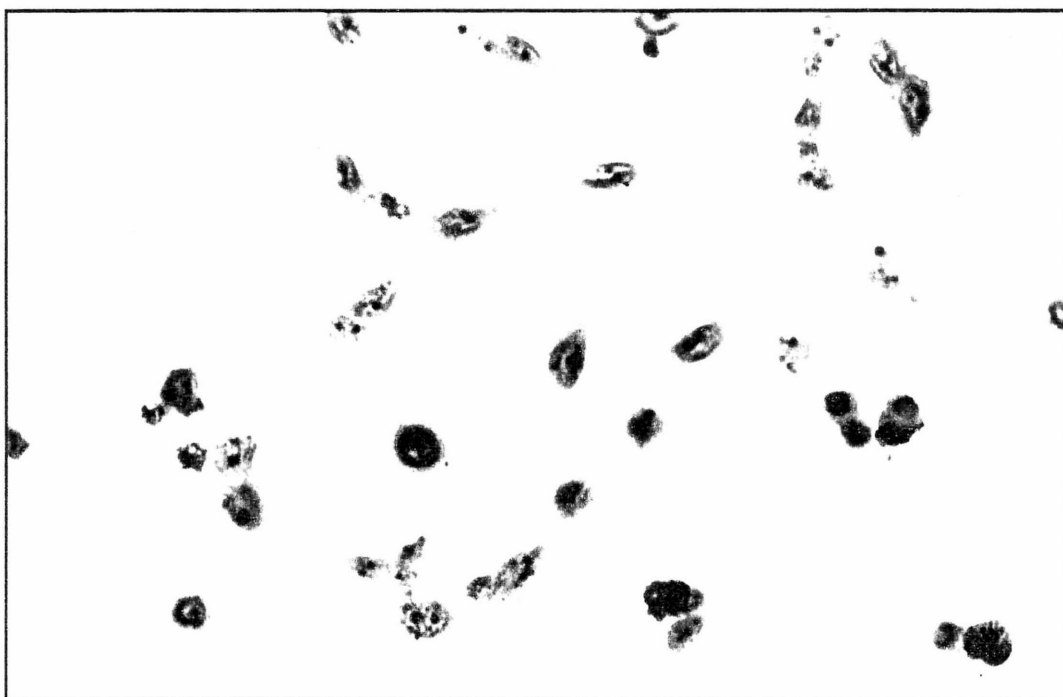
(a) A dose de $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ ocasionou o descolamento total das células; (b) A dose de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ ocasionou o descolamento total das células; + , indica a quantidade relativa na monocamada celular

Figura 16 - Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescidas na ausência de polissacarídeo e observadas por M. O.



As células foram crescidas na ausência de polissacarídeos (controle), por 48 horas a 37°C; Ampliação original 200x.

Figura 17 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração F-3B de *S. stenophyllum*. M.O.



As células HeLa foram crescidas na presença da fração F-3B na concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$, por 48 horas a 37°C . Ampliação original 200X

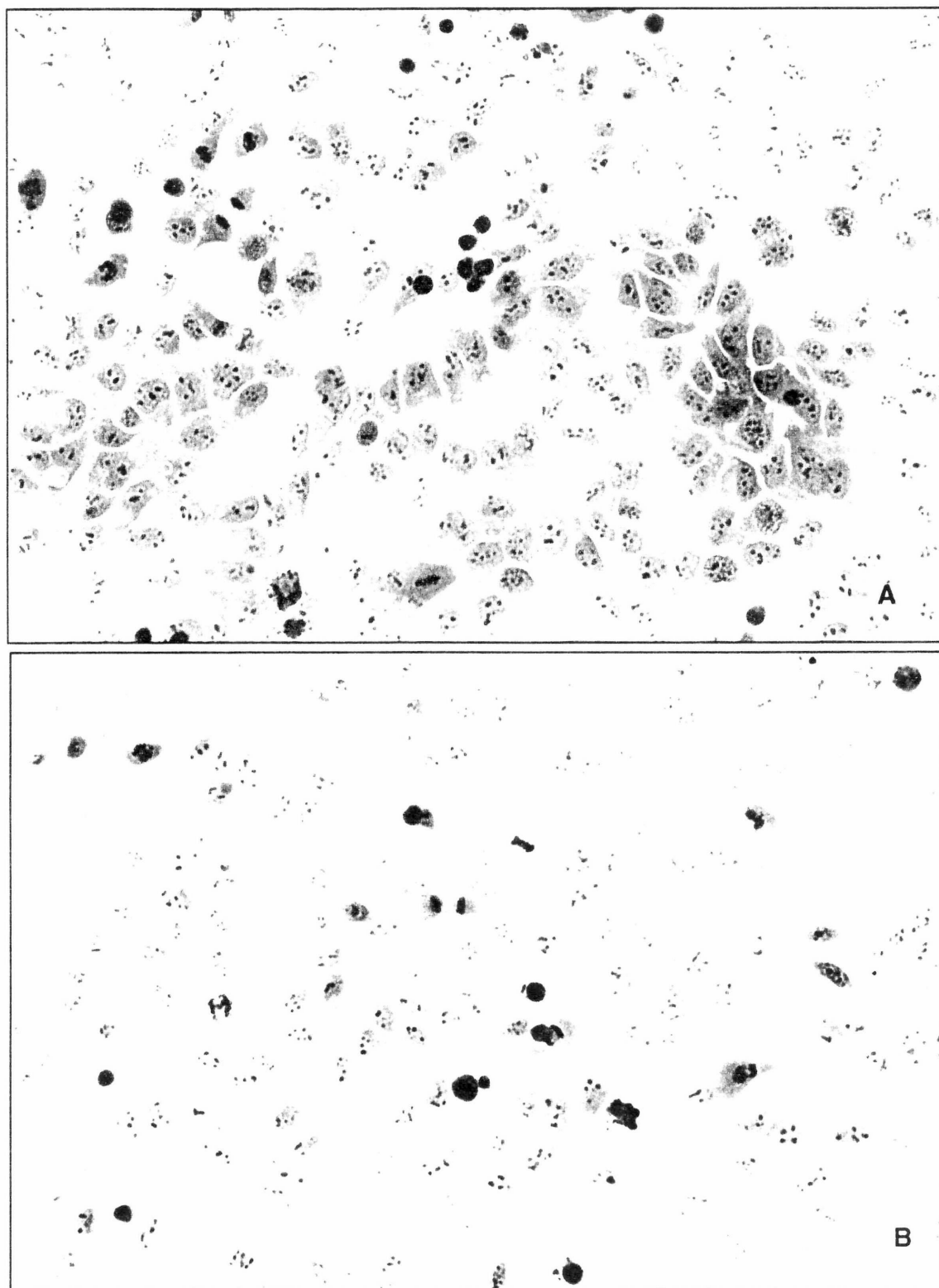
Figura 18 – Fotomicrografia da monocamada celular crescida na presença da fração F-5B de *S. stenophyllum*. M.O.



As células HeLa foram crescidas na presença da fração F-5B na concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$, por 48 horas a 37°C . Ampliação original 200X

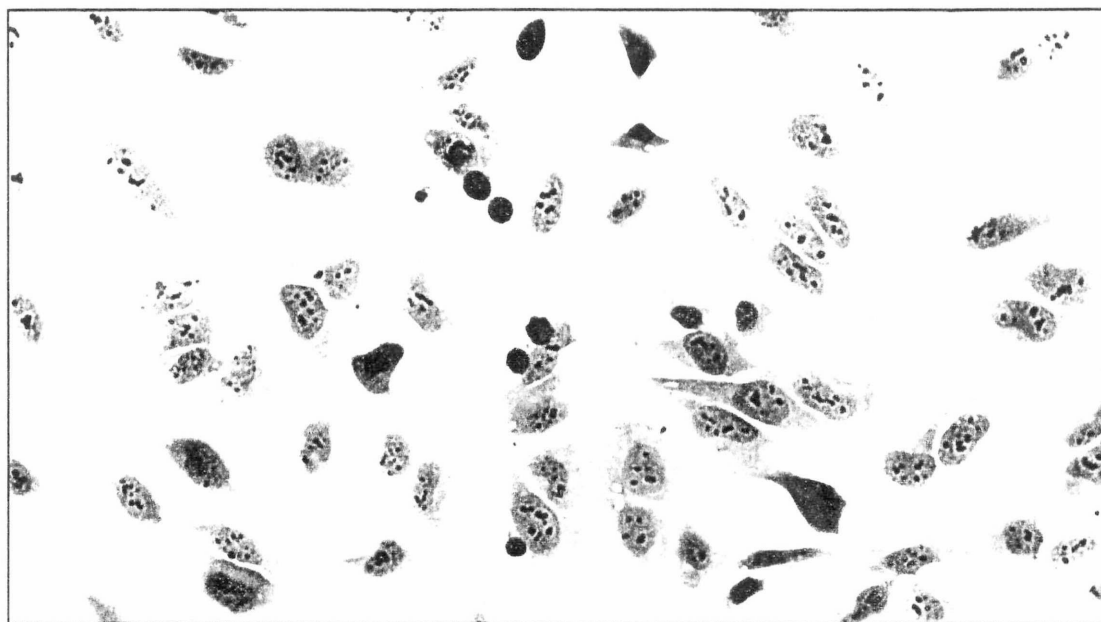
Para se confirmar tal hipótese, foi avaliado o efeito de FD2 carboxi-reduzida e sulfatada (FD2-cs, 2,3% ácidos urônicos e 19% de sulfato) sobre células HeLa, e os resultados estão demonstrados na Figura 30. Assim, o caráter ácido fornecido, tanto pelos grupos sulfato como pelos ácidos urônicos, foram fatores sinérgicos, ocasionando resposta significativa sobre os parâmetros avaliados. Os resultados desta fração indicaram uma diminuição na quantidade de células e de figuras de mitose, presença de células condensadas, pequena quantidade de núcleos atípicos, *clusters*, *blebs* e células com modificação morfológica acentuada (aparência de fibroblasto), como demonstrado na Tabela VI. Portanto, a presença de grupamentos sulfato parece ser o mais importante, o que pode ser evidenciado pelo tratamento das células com a fração FD2-s, a qual apresentou diminuição mais acentuada na adesão de células HeLa. Porém, a presença de ácidos urônicos pode ser também considerada um fator importante, mas não primordial, pois o tratamento da monocamada com a fração FD2-cs, mostrou ser agressivo para células HeLa, provavelmente pela presença de um maior teor de sulfato no polímero, em relação à fração FD2-c.

Figura 19 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FD2 de *Sargassum stenophyllum*. M.O.



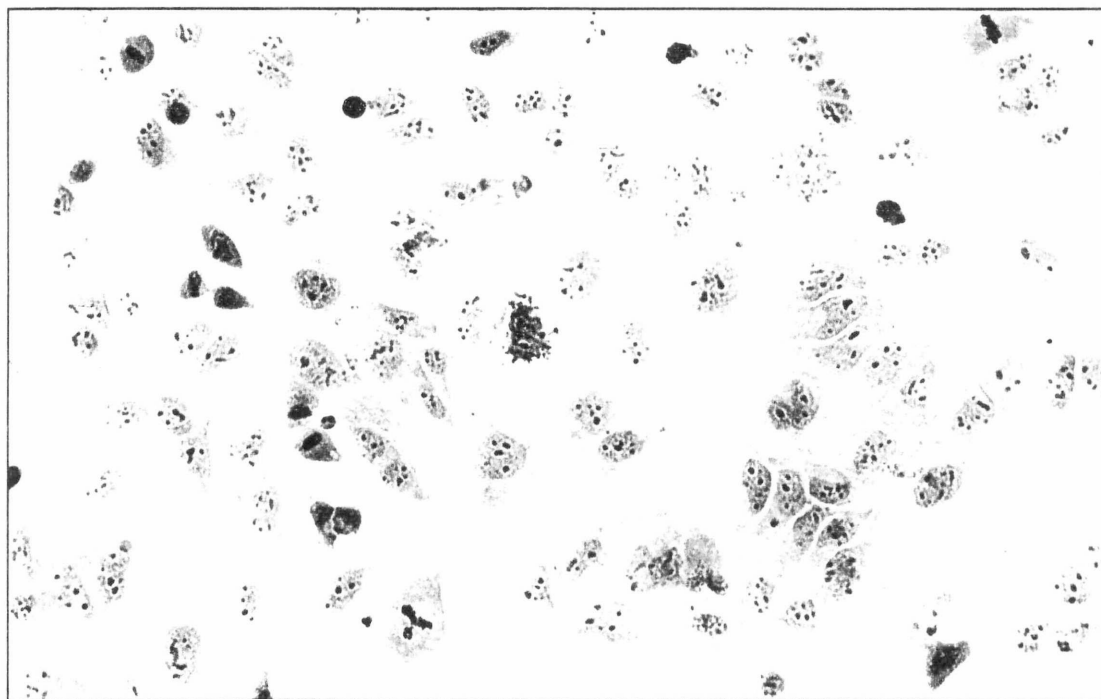
As células foram crescidas na presença da fração FD2 por 48 horas a 37°C; A, na concentração de 2,5 µg mL⁻¹; B, na concentração de 40 µg mL⁻¹. Ampliação original 200x.

Figura 20 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FD2 de *Sargassum stenophyllum*. M.O.



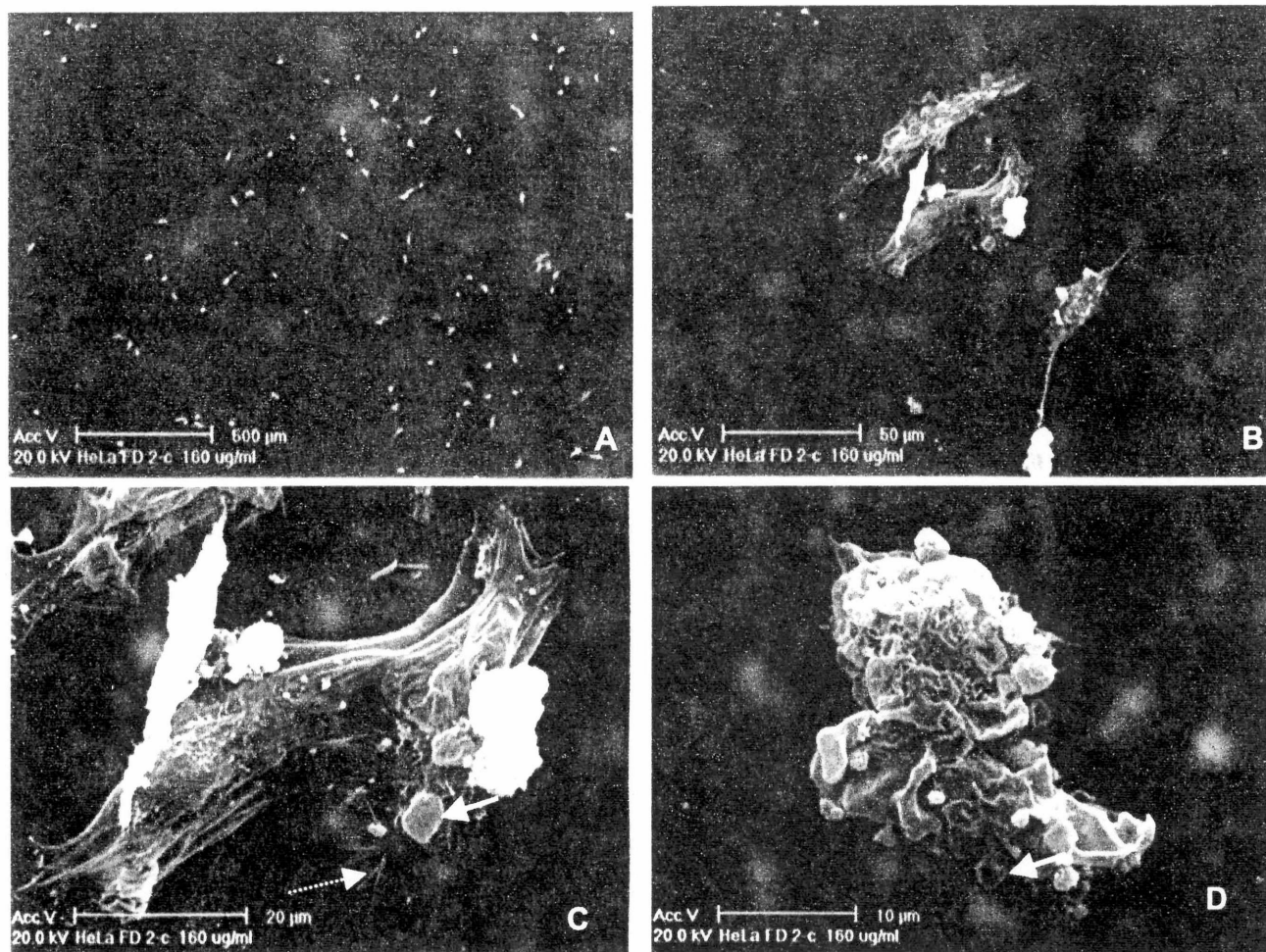
As células HeLa foram crescidas na presença da fração FD2 na concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$, por 48 horas a 37°C . Ampliação original 200X

Figura 21 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FD2-c de *Sargassum stenophyllum*. M.O.



As células HeLa foram crescidas na presença da fração FD2-c na concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$, por 48 horas a 37°C . Ampliação original 200X

Figura 22 – Fotomicrografia ultraestrutural de células HeLa tratadas com a fração FD2-c de *Sargassum stenophyllum*. M.E.V.



As células foram crescidas na presença da fração FD2-c, na concentração de $160 \mu\text{g mL}^{-1}$, por 48 horas a 37°C , a preparação para análise em M.E.V. foi realizada como descrito em Material e Métodos.

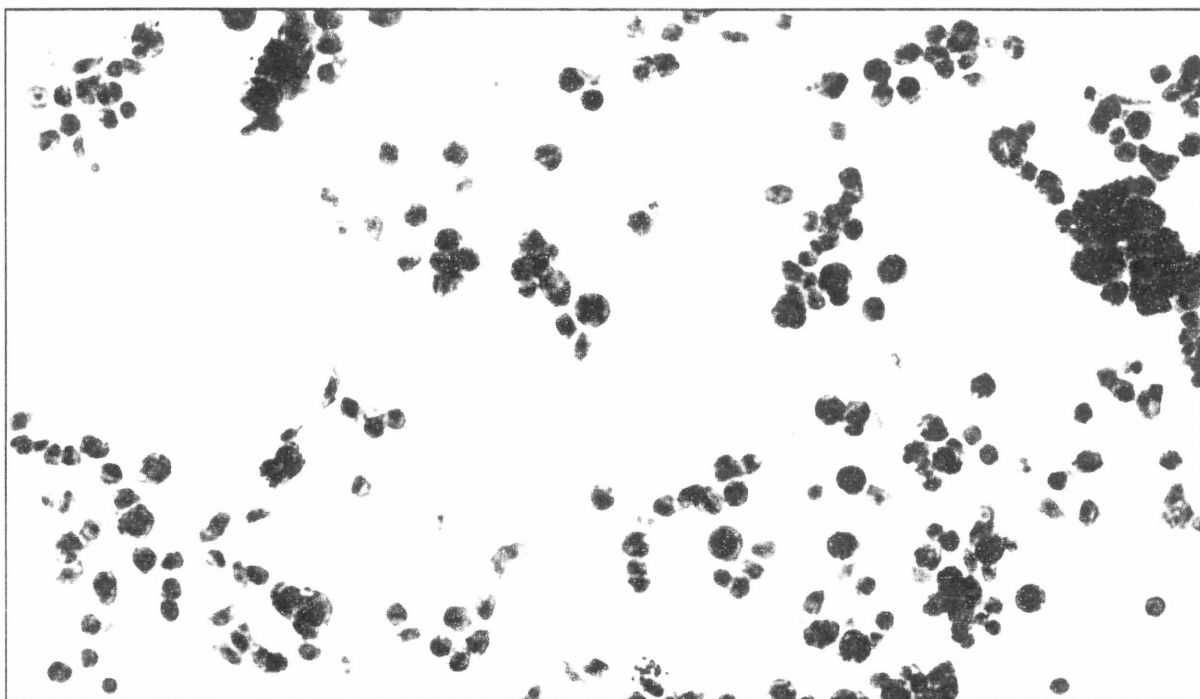
Em A, está demonstrada uma visão geral da monocamada;

Em B, uma visão mais aproximada de uma das células;

Em C, a seta cheia mostra os *blebs*; a seta tracejada mostra os filipódios;

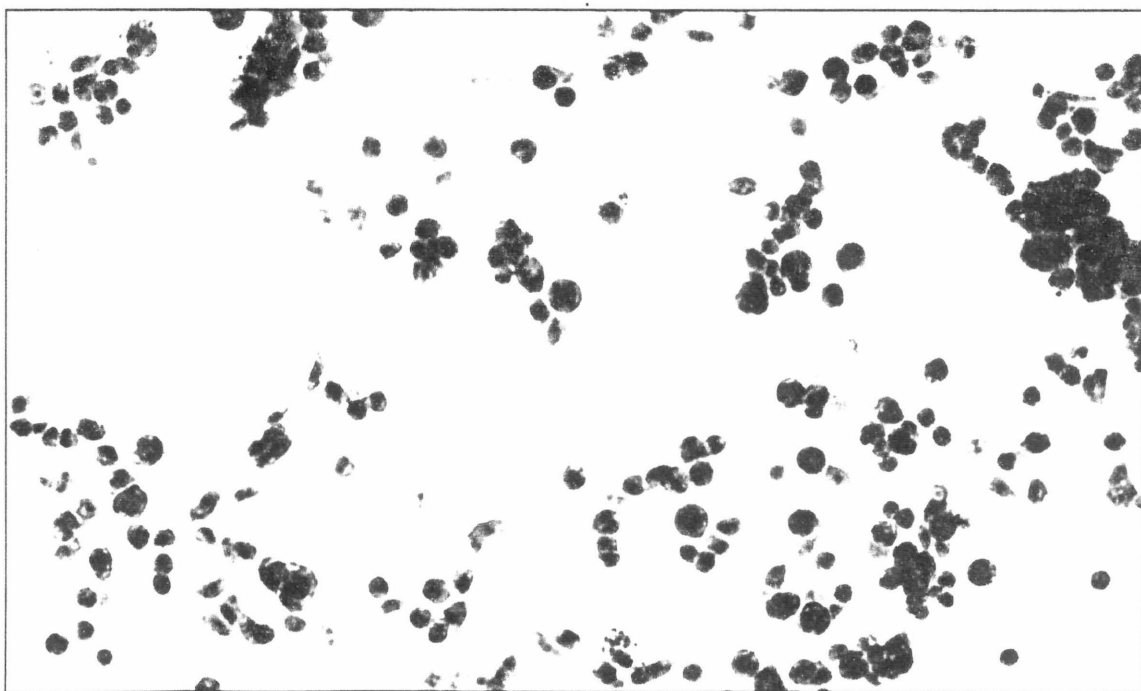
Em D, a seta indica os *blebs*.

Figura 23 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FD2-s de *S. stenophyllum*. M.O.



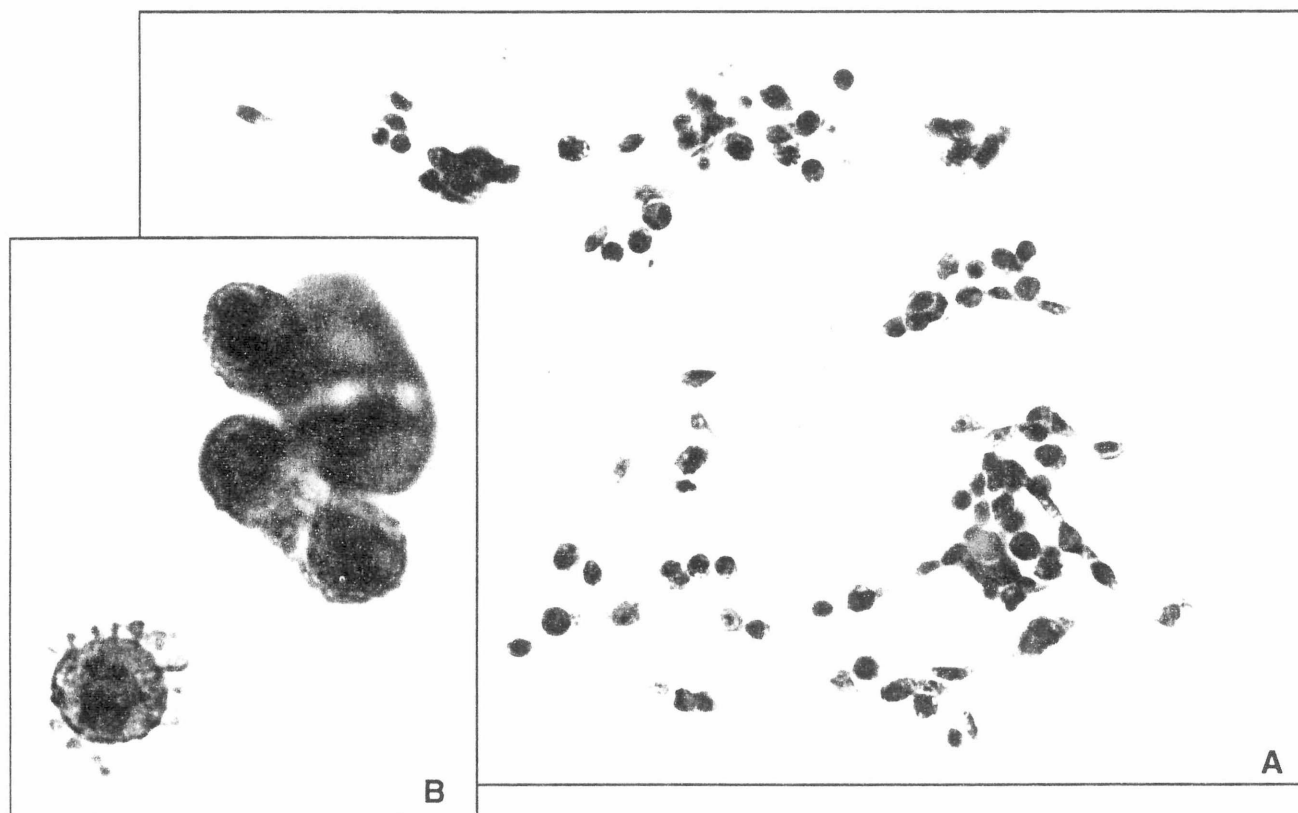
As células HeLa foram crescidas na presença da fração FD2-s na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, por 48 horas a 37°C . Ampliação original 200X

Figura 24 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FD2-s de *Sargassum stenophyllum*. M.O.



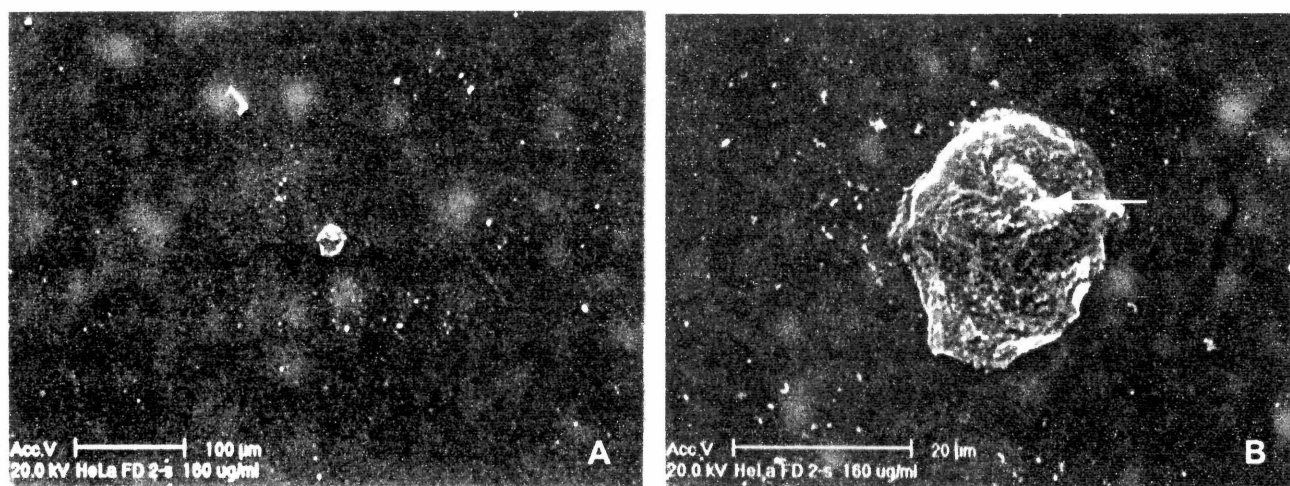
As células HeLa foram crescidas na presença da fração FD2-s na concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, por 48 horas a 37°C . Ampliação original 200X

Figura 25 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FD2-s de *Sargassum stenophyllum*. M.O.



As células HeLa foram crescidas na presença da fração FD2-s na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$, por 48 horas a 37°C . Ampliação original: A, 200X; B, 1000X.

Figura 26 – Fotomicrografia ultraestrutural de células HeLa tratadas com a fração FD2-s de *S. stenophyllum*. M.E.V.

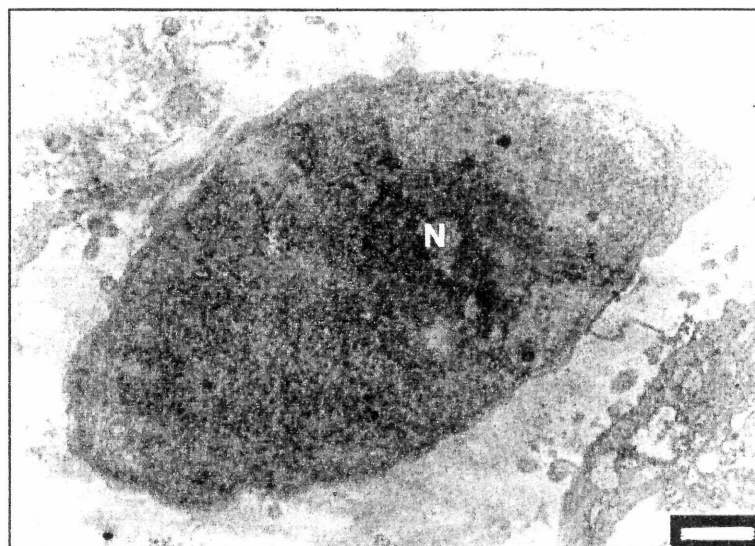


As células foram crescidas na presença da fração FD2-s, na concentração de $160 \mu\text{g mL}^{-1}$, por 48 horas a 37°C , a preparação para análise em M.E.V. foi realizada como descrito em Material e Métodos.

A, corresponde à visão geral da monocamada; a barra corresponde a $100 \mu\text{m}$;

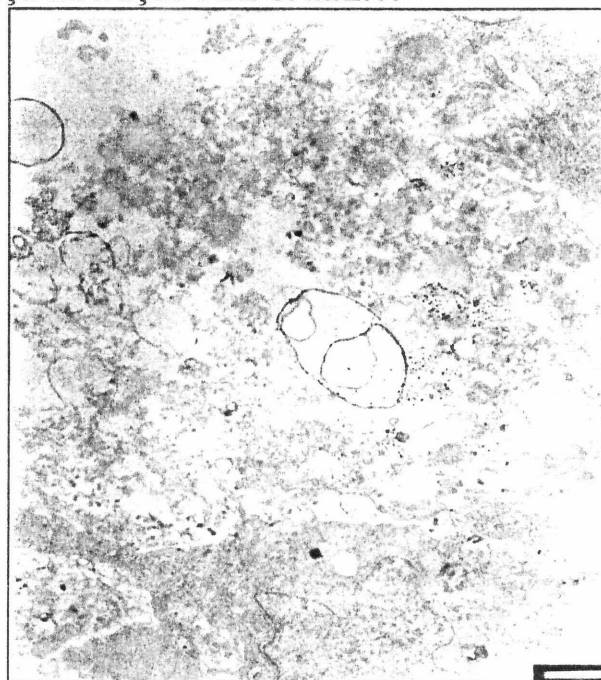
Em B, a barra corresponde a $20 \mu\text{m}$; a seta indica Núcleo

Figura 27 – Fotomicrografia ultraestrutural da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FD2-s. M.E.T.



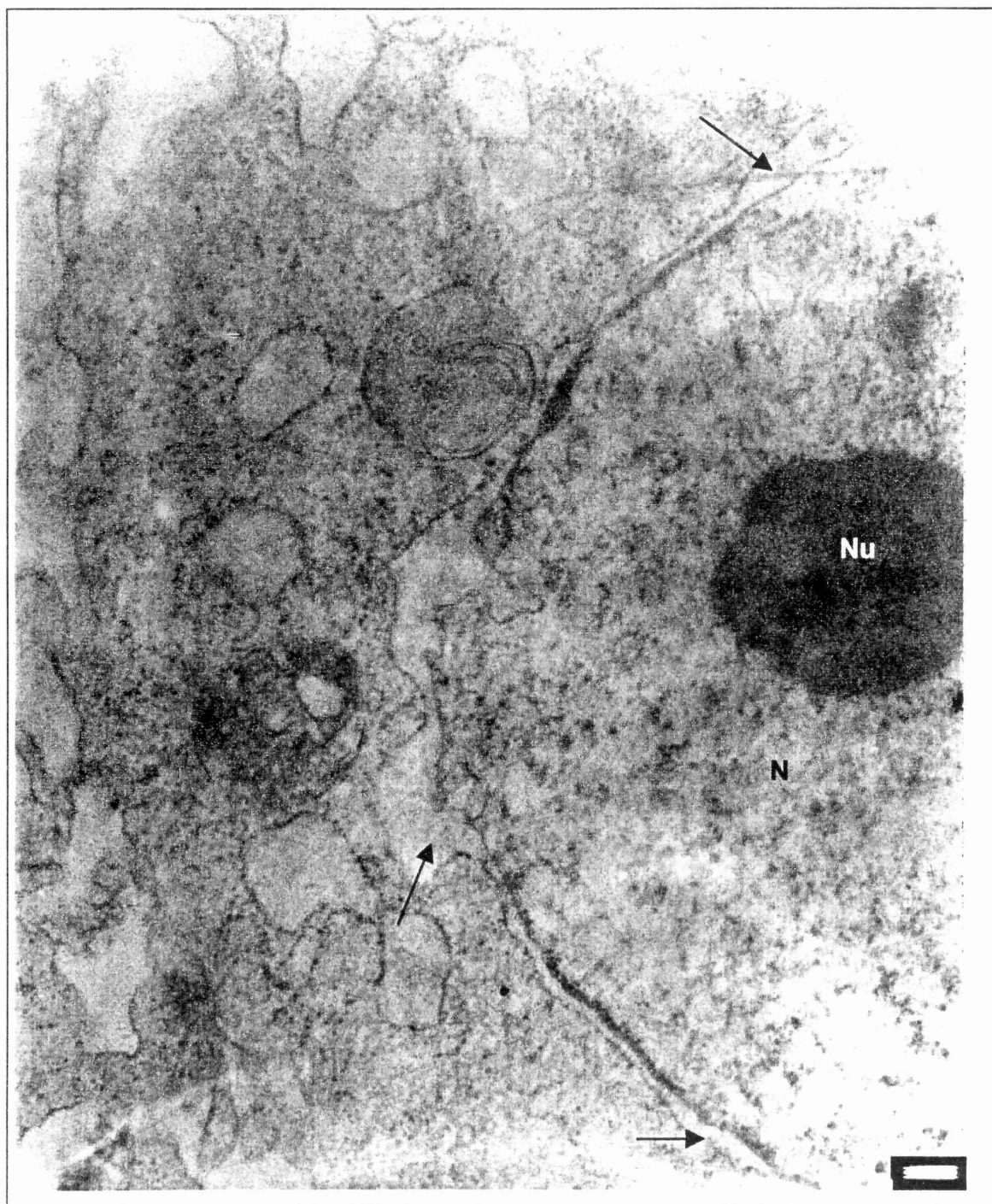
As células foram crescidas na presença da fração FD2-s, na concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$, por 48 horas a 37°C , a preparação para análise em M.E.T. foi realizada como descrito em Material e Métodos. N, indica Núcleo

Figura 28 – Fotomicrografia ultraestrutural da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FD2-s. M.E.T.



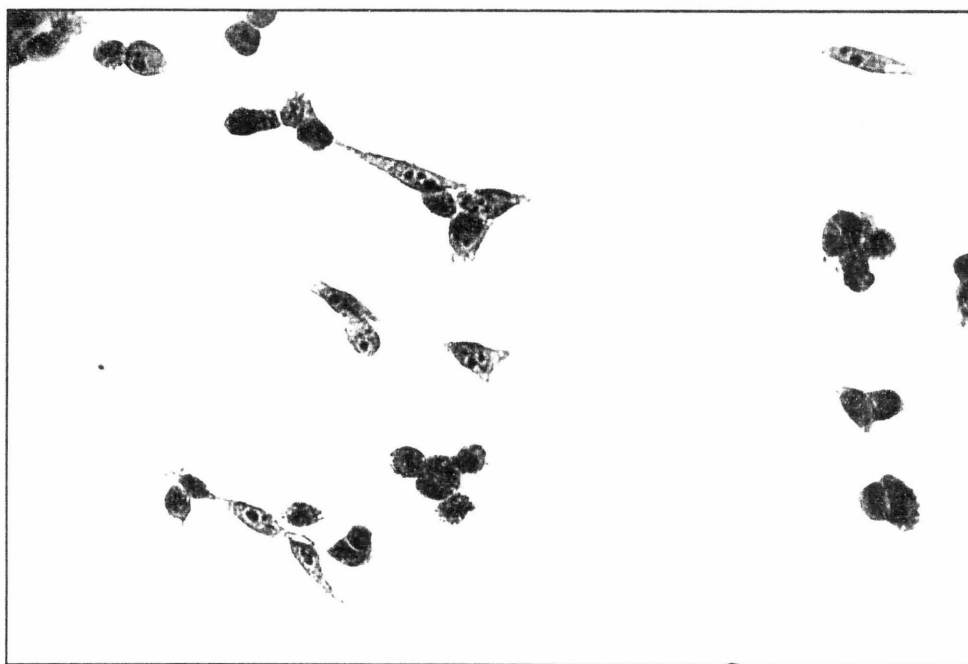
As células foram crescidas na presença da fração FD2-s, na concentração de $160 \mu\text{g mL}^{-1}$, por 48 horas a 37°C , a preparação para análise em M.E.T. foi realizada como descrito em Material e Métodos.

Figura 29 – Fotomicrografia ultraestrutural da monocamada de células HeLa crescida por 48 horas na presença da fração FD2-s na concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ observada por M.E.T.



As células foram crescidas na presença da fração FD2-s, na concentração de $160 \mu\text{g mL}^{-1}$, por 48 horas a 37°C , a preparação para análise em M.E.T. foi realizada como descrito em Material e Métodos. N, corresponde ao Núcleo, Nu ao Nucléolo e a seta, indica o espaço perinuclear

Figura 30 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FD2-cs de *Sargassum stenophyllum*. M.O.



As células HeLa foram crescidas na presença da fração FD2-cs na concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$, por 48 horas a 37°C . Ampliação original 200X.

Ensaio de viabilidade celular foram desenvolvidos, considerando as evidências de citotoxicidade mostrada pelos polímeros em estudos de Microscopia Ótica. A Figura 31 A demonstra a ocorrência de uma pequena diminuição na viabilidade das células HeLa tratados com a fração F-3B a partir da concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (32,9%), permanecendo constante até a mais alta dose utilizada ($80 \mu\text{g mL}^{-1}$). O tratamento das células HeLa com a fração F-5B não causou diferenças na viabilidade, em relação ao controle em todas as concentrações, com 24 horas de incubação.

A figura 31 B demonstra que o aumento do tempo de incubação para 48 horas, leva a uma diminuição significativa da viabilidade celular em todas as concentrações utilizadas para a fração F-3B, porém com a fração F-5B a viabilidade não se alterou em 48 horas. Esses resultados, reforçam a proposição de que a composição monossacarídica de um polímero pode ser um fator importante neste efeito. A predominância de unidades de galactose, manose e principalmente fucose (fração F-5B) parece não influenciar nesta viabilidade. No entanto, a fração F-3B, onde ocorre também a presença de xilose, galactose e principalmente ácidos urônicos, diminui a viabilidade em células HeLa, em relação ao controle. Pode-se sugerir também que a presença apenas de grupos ácidos na molécula não seja o suficiente para desencadear efeitos de morte celular, uma vez que a fração F-5B com uma concentração de aproximadamente 30% de sulfato, não alterou a viabilidade em células HeLa. Quando esses grupos sulfato estão associados à presença de monossacarídeos ácidos (ácidos urônicos), como acontece na fração F-3B, pode ocasionar morte em cerca de 41% das células HeLa em 48 horas de exposição (Figura 31B).

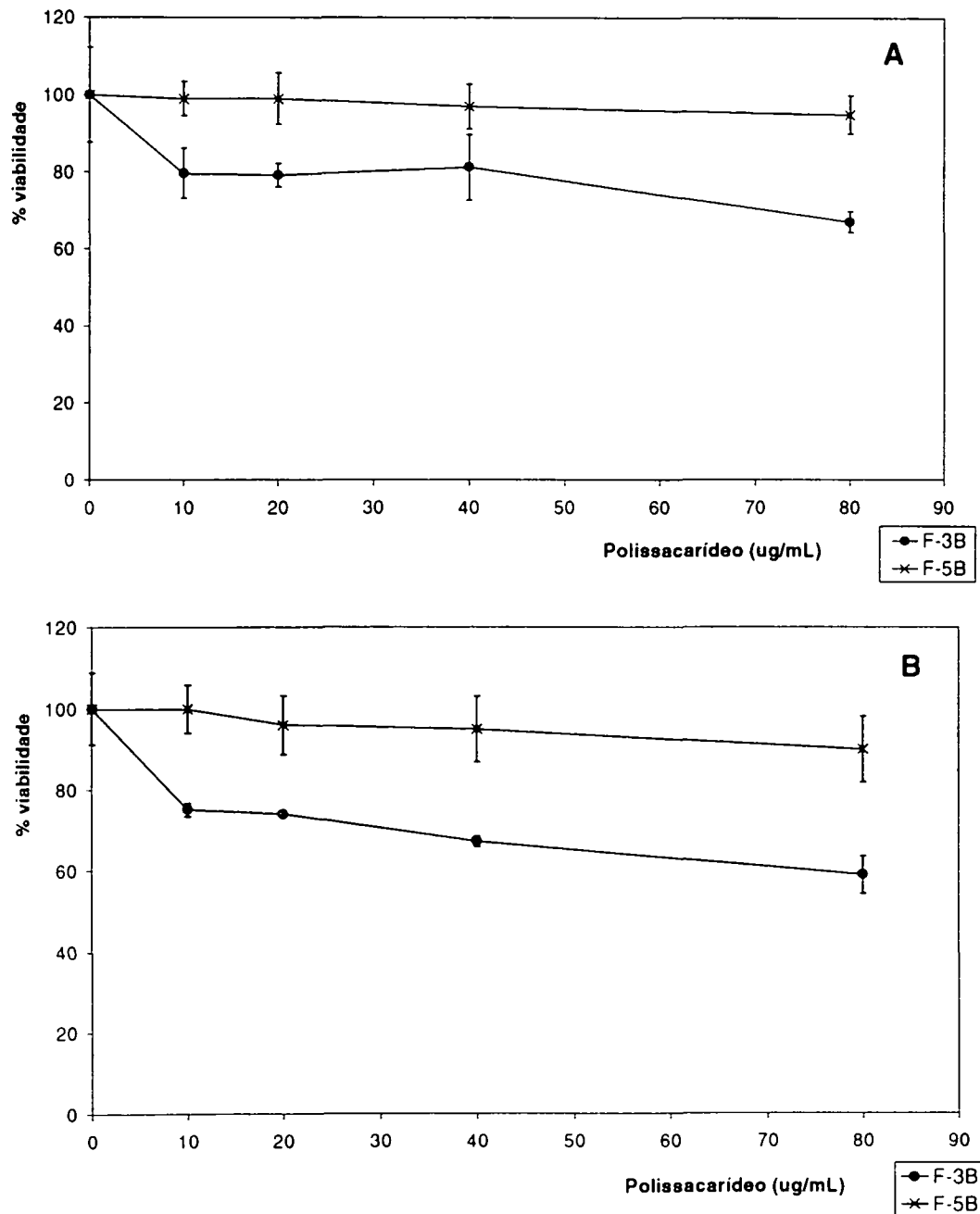
O efeito das frações parcialmente hidrolisadas da alga *S. stenophyllum* sobre a viabilidade de células HeLa, está demonstrada na Figura 32 A e B. Esses experimentos foram desenvolvidos em 24 e 48 horas de incubação. A avaliação da viabilidade das células HeLa em presença da fração FD2 mostrou diminuição pouco significativa (17,4%) a partir da concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, não havendo variação na quantidade de inibição até a dose de $160 \mu\text{g mL}^{-1}$. A fração FD2-s ocasionou uma diminuição na viabilidade, com este tempo de incubação, apenas na concentração de $160 \mu\text{g mL}^{-1}$. As outras frações analisadas (FD2-c e FD2-cs) não apresentaram diferença em relação ao controle com 24 horas de incubação (Figura 32 A).

Quando se aumentou o tempo de incubação para 48 horas, Figura 32 B,

ocorreu uma diminuição significativa da viabilidade celular em todas as concentrações avaliadas das frações FD2 e FD2-s. Porém o tratamento com as frações FD2-c e FD2-cs manteve os mesmos padrões do controle, mostrando que a presença de ácidos urônicos na fração pode afetar este parâmetro, tendo em vista a grande diminuição desses monossacarídeos pelo tratamento de carboxi-redução (frações FD2-c e FD2-cs). Porém somente a presença de cargas negativas provenientes dos grupos sulfato, com base nos resultados obtidos pelo tratamento das células HeLa com a fração FD2-cs, parece não afetar a viabilidade das células HeLa, por este método, o qual é baseado na medida de atividade metabólica das células. A presença dos dois grupamentos ácidos (ácidos urônicos e grupamentos sulfato) levou a uma inibição de cerca de 40% na viabilidade celular, demonstrando que esses dois fatores foram importantes nesse ensaio, como também foram nos ensaios feitos com as frações F-3B e F-5B, isto é, os resultados desses dois experimentos foram complementares.

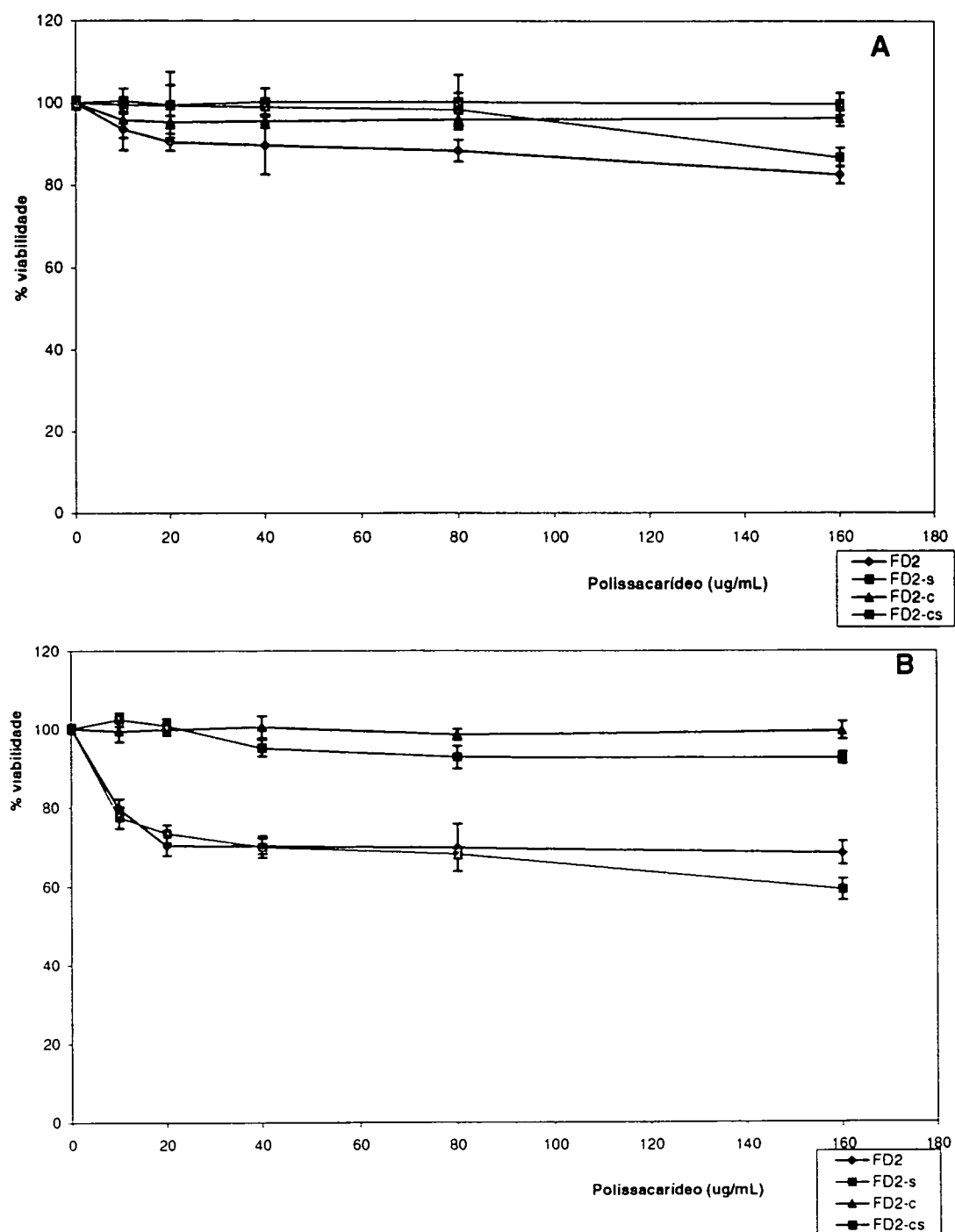
Pode-se observar que moléculas com baixos teores de ácidos urônicos não apresentaram diminuição na viabilidade celular, como pode ser mostrado pelas análises com as frações F-5B, FD2-c e FD2-cs (Figuras 31 e 32). Este fato está coerente com as análises realizadas por ELLOUALI e colaboradores (1993) que, em ensaios de citotoxicidade com a fração F2A da alga *Ascophyllum nodosum*, demonstraram que mesmo a presença de 27,1% de grupos sulfato e 7,8% de ácidos urônicos, além de 36% de unidades de fucose, não causaram citotoxicidade em culturas de células CCL39 (RIOU *et al.* 1996), isto é, teores similares aos dos polissacarídeos de *Sargassum stenophyllum*. O tratamento das células da linhagem de carcinoma broncopulmonar (NSCLC-N6), com a fucana de *A. nodosum* de forma contínua, provocou uma inibição de cerca de 26%, na dose de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em 120 dias de tratamento. Quando o tratamento foi descontínuo, a inibição de 26%, citada anteriormente, não foi encontrada em nenhuma dose avaliada.

Figura 31 – Curva dose-resposta sobre a viabilidade de células HeLa crescidas na presença das frações F-3B e F-5B extraídas da alga *S. stenophyllum*.



As células HeLa, foram crescidas por 24 horas (A) e 48 horas (B) na ausência (controle - corresponde a 100%) e na presença das frações F-3B e F-5B

Figura 32 – Curva dose-resposta sobre a viabilidade de células HeLa crescidas na presença das frações parcialmente hidrolisadas da alga *S. stenophyllum*.



As células HeLa, foram crescidas por 24 horas (A) e 48 horas (B) na ausência (controle) e presença das frações, FD2; FD2-s; FD2-c; FD2-cs .

4.4 EFEITO DAS FRAÇÕES DE HETEROFUCANAS DA ALGA *Sargassum stenophyllum* SOBRE A DIVISÃO CELULAR

A proliferação celular é um processo estritamente regulado por uma série de fatores de crescimento. Tem sido proposto que polissacarídeos aniônicos, como as fucanas, por possuir uma alta densidade de carga negativa podem ligar-se a fatores de crescimento (BOISSON-VIDAL *et al.* 1995), e que essa ligação tem importante função regulatória na proliferação celular. A possibilidade de interferência em elementos de matriz extracelular e, conseqüentemente, na proliferação celular, também tem sido considerada por vários autores (LIU *et al.* 2000; ROCHA *et al.* 2001). Desta forma, para a quantificação das mitoses que ocorrem nas preparações de células HeLa, ao final de 48 horas de crescimento, foram feitos ensaios na presença e ausências de fucanas da alga *Sargassum stenophyllum*, cujos resultados estão demonstrados nas Figuras 33 (A – F).

A figura 33 A demonstra o efeito da fração bruta FP sobre a divisão celular. Doses superiores a $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ afetam a divisão celular, sendo que na dose de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, a percentagem de mitoses foi cerca de 54% inferior ao controle. Esses resultados são consistentes com aqueles demonstrados na figura 15 (A – C), referentes aos parâmetros morfológicos. As figuras 33 B e 33 C apresentam os efeitos das frações F-3B e F-5B respectivamente, sobre a proliferação de células HeLa. Estas frações que contendo fucanas purificadas, com características estruturais distintas, apresentaram efeitos antiproliferativos, que foram dose dependente, a partir de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. A inibição da proliferação celular foi da ordem de 90% para ambas as frações, na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$. BOISSON-VIDAL *et al.* (1995) enfatizaram que o conteúdo de grupos sulfato bem como provavelmente seu posicionamento espacial e massa molar são necessários para a expressão da atividade antiproliferativa de fucanas. Nesse caso, polímeros desprovidos de grupos sulfato e/ou apresentando baixa massa molar seriam desprovidos de efeitos. Com a finalidade de verificar se isto ocorreria com as fucanas de *S. stenophyllum*, a fração FD2, obtida por hidrólise ácida parcial de FP, a qual apresenta baixo teor de grupos sulfato, foi também avaliada quanto a atividade antiproliferativa em células HeLa. Os resultados apresentados na Figura 33 D, demonstram que, de fato, o tratamento hidrolítico imposto a FP, leva à perda

total da atividade. Deve-se enfatizar que FD2 é um polímero completamente distinto da fração que lhe deu origem, considerando que essa última sofreu dessulfatação, defucosilação e desramificação durante o processo de hidrólise química. Considerando tais aspectos, a ressulfatação química da fração FD2, a qual ocorreu preferencialmente em carbono 6 e portanto em uma unidade distinta daquela presente nas fucanas nativas, poderia ser um recurso válido para avaliar a influência desses grupos. Assim, a fração FD2-s, obtida a partir da ressulfatação de FD2, foi estudada e os resultados de atividade antiproliferativa estão apresentados na Figura 33 E. Verifica-se que o material ressulfatado exibe atividade antiproliferativa de magnitude similar às fucanas nativas (F-3B e F-5B). Esta observação fortalece a proposição de que a carga negativa fornecida pelos grupos sulfato é essencial para a expressão dos efeitos antiproliferativos, mesmo em moléculas estruturalmente distintas, seja pela defucosilação ou dessulfatação ou ainda diminuição da massa molar. A Figura 33 F demonstra os efeitos da fração FD2-c. Considerando a anulação das cargas conferidas pelo ácido glucurônico, predomina nesta amostra as cargas negativas provenientes do grupo sulfato (8,3%, Tabela III). Nesse resultado chama a atenção o fato de que, embora um efeito antiproliferativo esteja presente, este não foi dependente da dose, nas condições experimentais. O fato de não ocorrer o bloqueio total das divisões celulares justifica a presença das monocamadas confluentes com 48 horas de incubação, demonstradas na Figura 21, mesmo na presença de altas concentrações da fração FD2-c.

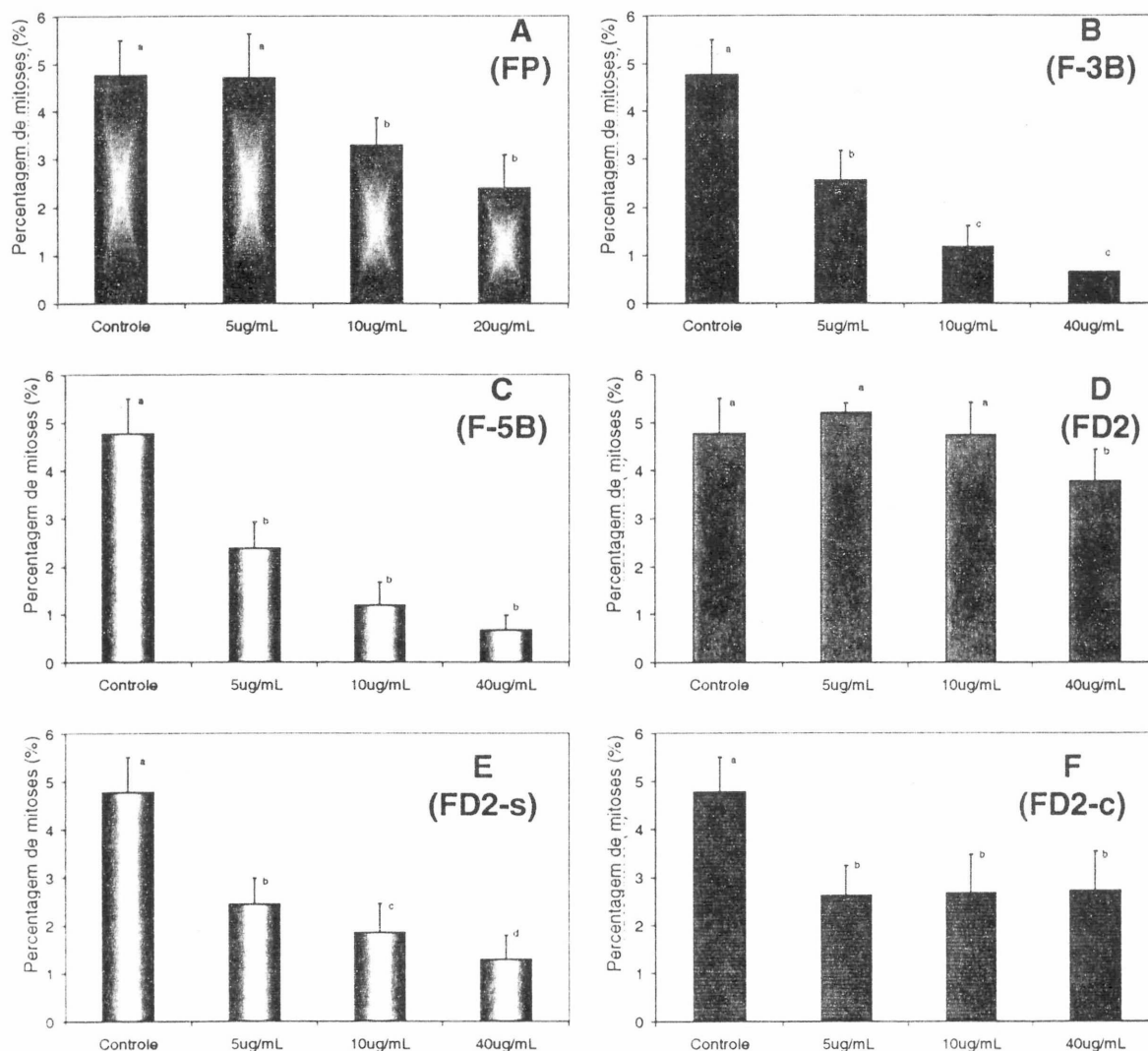
A Figura 34 relaciona a densidade de carga proveniente dos grupos sulfato e carboxílicos das diferentes amostras e a ocorrência de mitoses. Verifica-se que, à medida que o teor de grupos sulfato aumenta (de 8 para 19%), a atividade antimitogênica aumentou cerca de 4 vezes. Amostras com maior teor de grupos sulfato (30,8% fração F-5B) não promoveram acréscimo adicional na atividade antiproliferativa. As frações FD2 e FD2-c, cujos teores de grupos sulfato e ácido glucurônico são 8,3%, 8,3%; 19 E 2,1%, respectivamente, apresentaram efeito com pouca diferença de magnitude, sugerindo que grupos carboxílicos, não potencializam a atividade antimitogênica. Pelos resultados obtidos nesta análise, pode-se sugerir que uma relação sulfato/açúcar total maior ou igual a 0,4 (Tabela I) é importante na atividade antiproliferativa (> 70%), como observado para as frações FD2-s, F-3B e F-5B. Destaca-se ainda que estudos anteriores de DUARTE *et al.* (2001 a) mostraram que as fucanas F-3B e F-5B são desprovidas de atividade anticoagulante, quando comparadas à heparina. Embora experimentos específicos da

avaliação do índice mitótico, como a incorporação de ^3H -timidina não tenham sido realizados, os resultados do presente trabalho sugerem fortemente uma interferência neste parâmetro, tornando estas moléculas atrativas do ponto de vista farmacológico.

Comparativamente, estudos realizados sobre a atividade de fucanas de baixa massa molar sobre linhagem de fibroblastos (CCL 39) demonstrou inibição da proliferação em torno de 80% a uma concentração de $1000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Porém esta inibição não excedeu 50% quando o modelo celular foi células de adenocarcinoma de colo de útero humano e o efeito foi nulo em células de leucemia linfocítica (P388) e em adenocarcinoma mamário humano (MCF7, MCF7ras). Esta ação foi reversível e não foi relatada nenhuma modificação da distribuição celular durante as várias fases do ciclo (ELLOUALI *et al.* 1994). Resultados semelhantes foram encontrados por ROCHA e colaboradores (2001) no estudo da ação de fucanas da alga *Spatoglossum schröderi* sobre células CHO e CHO-745, quando esses polímeros não modificaram a proliferação celular.

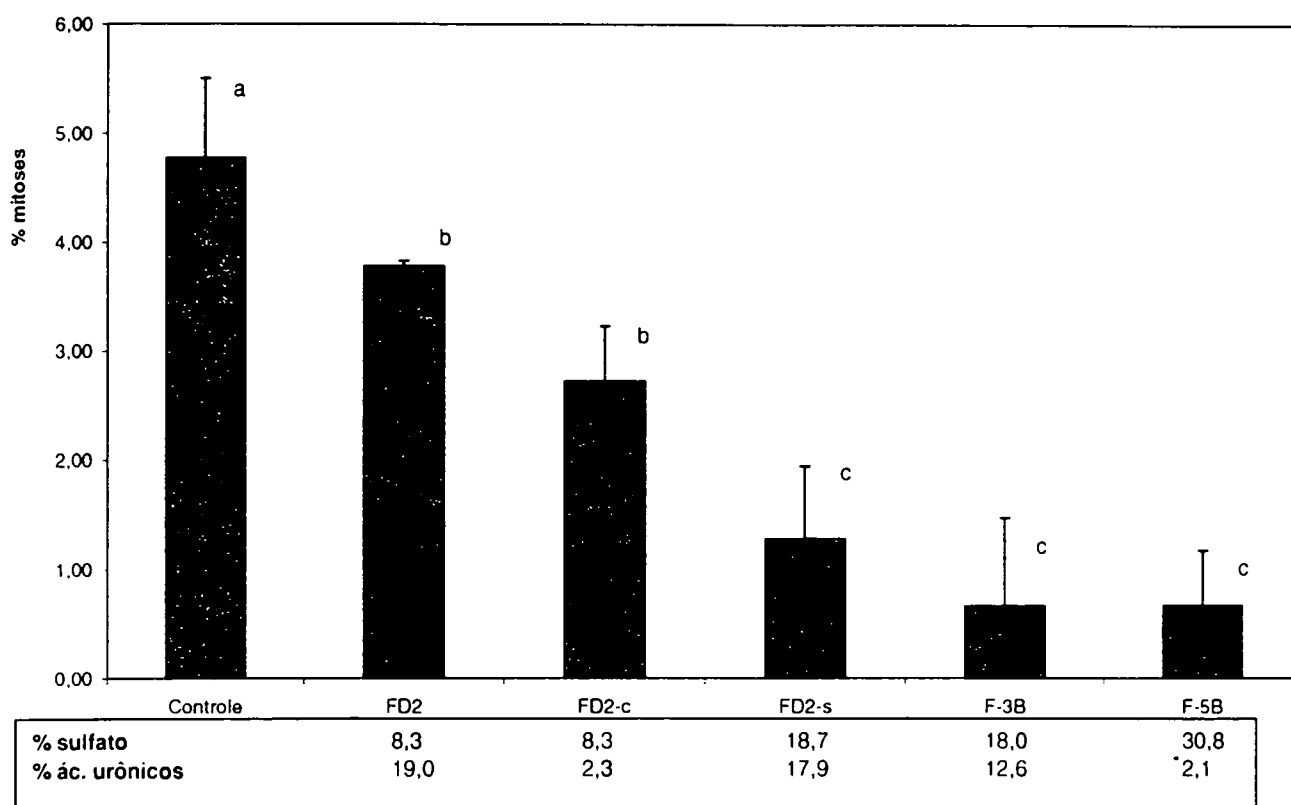
Os resultados obtidos para os polissacarídeos sulfatados, nativos e derivatizados de *S. stenophyllum* indicaram que o efeito antiproliferativo é dependente do nível de sulfatação, dados esses condizentes com os encontrados por outros autores (YAMAMOTO *et al.* 1977; VISCHER; BUDDECKE, 1991; COOK *et al.* 1992). LOGEART e colaboradores (1997), estudando os efeitos das fucanas de *Ascomyllum nodosum* sobre células de músculo liso vascular, demonstraram, que a atividade antiproliferativa apresentada por esses polímeros é tempo e dose dependente, sendo reversível e não tóxica. Com a internalização daquele polímero, as células permanecem na fase G_0/G_1 do ciclo celular. Este fato foi indicado também por RIOU *et al.* (1996), ao estudar fucanas de *A. nodosum* em carcinoma broncopulmonar, demonstrando que ocorre uma preferência das células em se manterem na fase G_1 do ciclo celular, diminuindo a percentagem de mitoses da preparação. Portanto, pode-se sugerir algumas hipóteses para justificar os efeitos antiproliferativos: (1) ação direta dos polissacarídeos no aparelho mitótico, (2) interferências sobre fatores de crescimento, ou (3) interferências nas interações das células HeLa com a matriz extracelular. Para a confirmação de tais hipóteses, serão necessários estudos futuros mais específicos. Porém, presente estudo demonstrou que fucanas de *S. stenophyllum* apresentam efeito antiproliferativo, podendo ser um grande campo para investigações.

Figura 33 – Avaliação da percentagem de mitoses de células HeLa na presença e ausência de polissacarídeos sulfatados da alga *Sargassum stenophyllum*



As células foram crescidas por 48 horas na presença e ausência dos polissacarídeos em concentrações de 5 a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e posteriormente avaliadas quanto à percentagem de mitoses, como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ($M \pm dp$).

Figura 34 – Avaliação da percentagem de mitoses de células HeLa na presença e ausência de polissacarídeos com diferentes teores de sulfato e ácidos urônicos da alga *Sargassum stenophyllum*



As células foram crescidas por 48 horas na presença e ausência dos polissacarídeos na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ e posteriormente avaliadas quanto à percentagem de mitoses, como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ($M \pm dp$).

4.5 COMPARAÇÃO HISTOQUÍMICA DA MONOCAMADA DE CÉLULAS HeLa NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE FUCANAS. EVIDENCIAÇÃO DE GRUPOS SULFATO E CARBOXÍLICOS

Sendo as heterofucanas de *S. stenophyllum* polímeros sulfatados, uma interferência desses na produção e/ou secreção dos elementos sulfatados da matriz extracelular de células HeLa poder ser visualizada com o uso de técnicas histoquímicas especiais, usando a coloração com Azul de Alcian. Em pH 1,0, este corante evidenciou grupos sulfato, enquanto que em pH 2,5, além dos grupos sulfato, os grupos carboxílicos também foram evidenciados (PALLADINI; LAURO, 1968; CULLING *et al.* 1985); a contra-coloração com Hematoxilina de Harris foi realizada para evidenciar o núcleo.

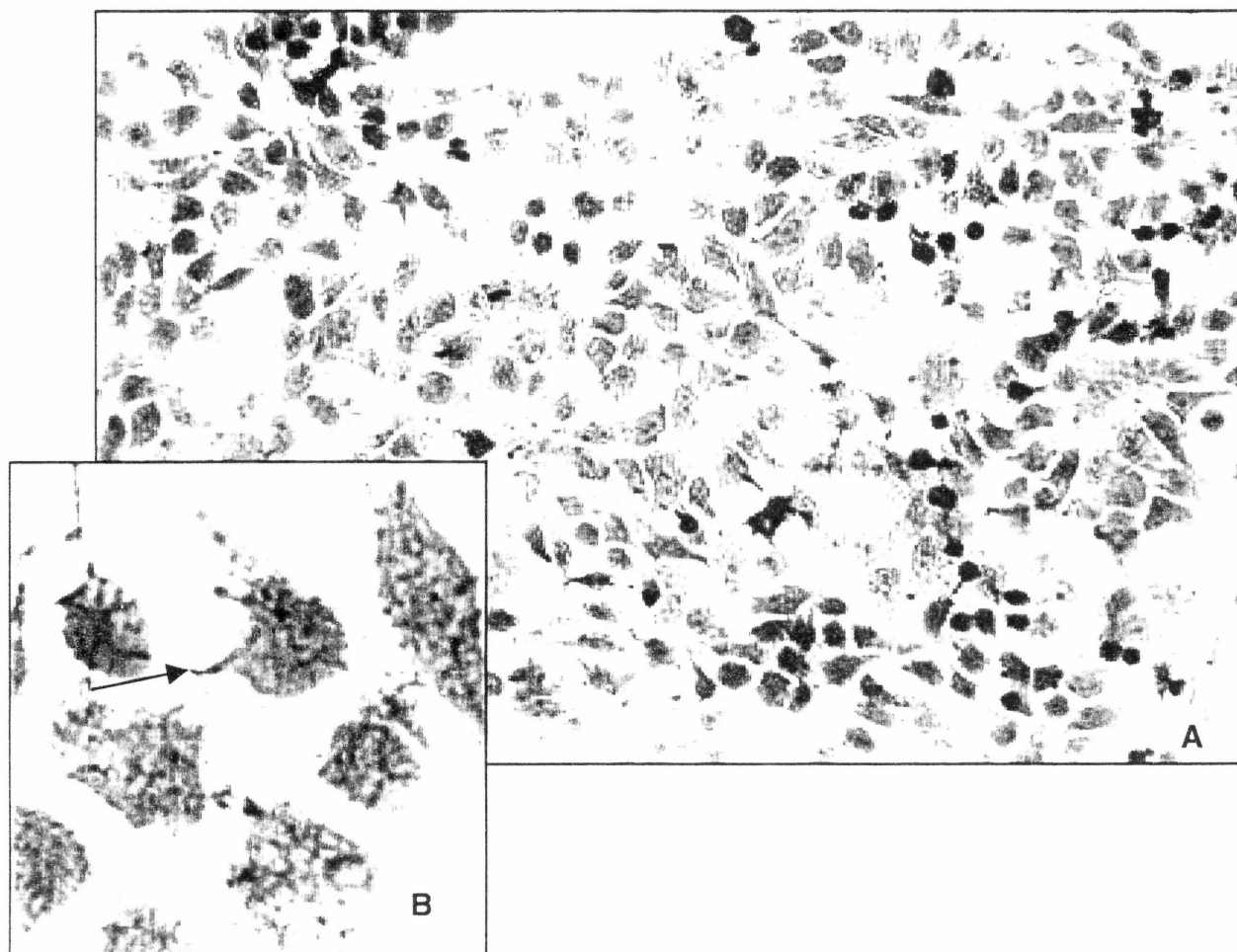
A figura 35 A e B demonstra a monocamada do experimento controle, corada com Azul de Alcian em pH 2,5. Verifica-se a presença característica de células justapostas e, evidenciado pelo Azul de Alcian, uma rede de matriz extracelular, provavelmente de heparan sulfato, promovendo a adesão destas células ao vidro (YAN; FRENKEL, 1994; SCHOR, 1980; RIIKONEN *et al.* 1995; DONAHUE *et al.* 1994). A figura 36 A e B apresenta o resultado de experimentos em que a monocamada foi tratada com fração F-3B e corada nas mesmas condições. Este polímero induziu uma diminuição gradativa da rede de matriz extracelular com o concomitante aparecimento de grânulos intensamente corados no citoplasma da célula. O tratamento da monocamada com a fração F-5B, promoveu diminuição na rede de matriz extracelular (Figura 37), quando comparada com o controle, porém, ainda está presente na preparação.

A figura 38, mostra o resultado do tratamento das células com a fração FD2-s, a coloração com azul de Alcian em pH 2,5 revelou uma diminuição gradativa da rede de matriz extracelular, e os efeitos foram evidentes a partir da concentração de 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (não mostrado) Na concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 38), ocorreu total desaparecimento da rede de matriz exteriorizada pela célula, grânulos corados em azul intenso no citoplasma foram evidenciados e, também, coloração intensa nos *blebs* (Figura 38 B). A coloração com o Azul de Alcian em pH 1,0, revelou para células controle e tratadas com a fração FD2-s, a presença de grânulos de coloração intensa no citoplasma das células HeLa (Figura 40), não foi evidenciando no controle (Figura 39). Esses resultados sugerem que o tratamento com

estas frações polissacarídicas promove diminuição da rede de moléculas de matriz extracelular. Não se pode afirmar, entretanto se esses seriam decorrentes de uma internalização do polissacarídeo adicionado na cultura ou inibição da síntese e/ou secreção de polímeros sulfatados pelas células. Neste aspecto pode-se citar os resultados de LOGEART *et al.* (1997), os quais mostraram que células de músculo liso degradam heparina após internalização, mas não degradam as fucanas. Os autores mostraram que as fucanas de alta massa molar permaneceram intactas nestas células, enquanto que preparações de menor massa molar sofrem apenas degradações parciais. Em contraposição, ELLOUALI e colaboradores (1993), usando fucanas fluorescentes, mostraram efeitos sobre células tumorais, que não eram dependentes da internalização das moléculas pelas células utilizadas. Assim, a aparente retenção de polímeros sulfatados no citoplasma de células HeLa é uma questão que permanece em aberto como justificativa de investigação futura.

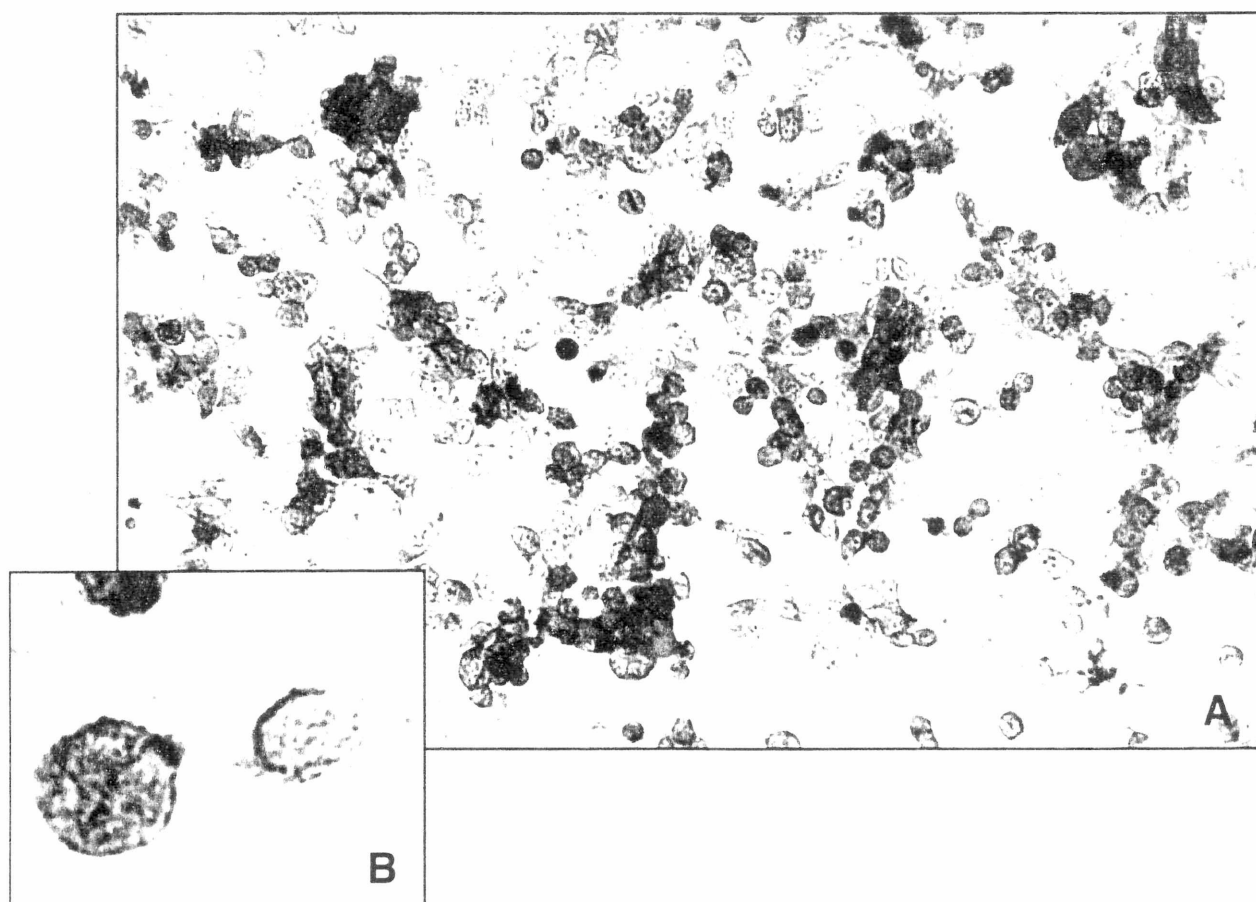
Por outro lado, a interferência de polissacarídeos na síntese de moléculas de matriz extracelular tem sido investigada (LOGEART *et al.* 1996). Esses autores mostraram que alguns tipos de polissacarídeos, como fucanas de *Ascophyllum nodosum* foram capazes de inibir a síntese de colágeno em células musculares lisas da aorta de ratos em cultura. VISCHER e BUDDECKE (1991) evidenciaram que fucanas promoveram substancial alteração na síntese e secreção de fibronectina e trombospondina, onde para a primeira molécula de matriz extracelular foi mostrada diminuição e, para trombospondina, aumento na síntese. Com o objetivo de se auxiliar na compreensão desses resultados, experimentos de adesão celular com moléculas de matriz extracelular específicas como fibronectina, laminina e vitronectina, foram necessários.

Figura 35 – Fotomicrografia da monocamada controle de células HeLa observada por M. O.



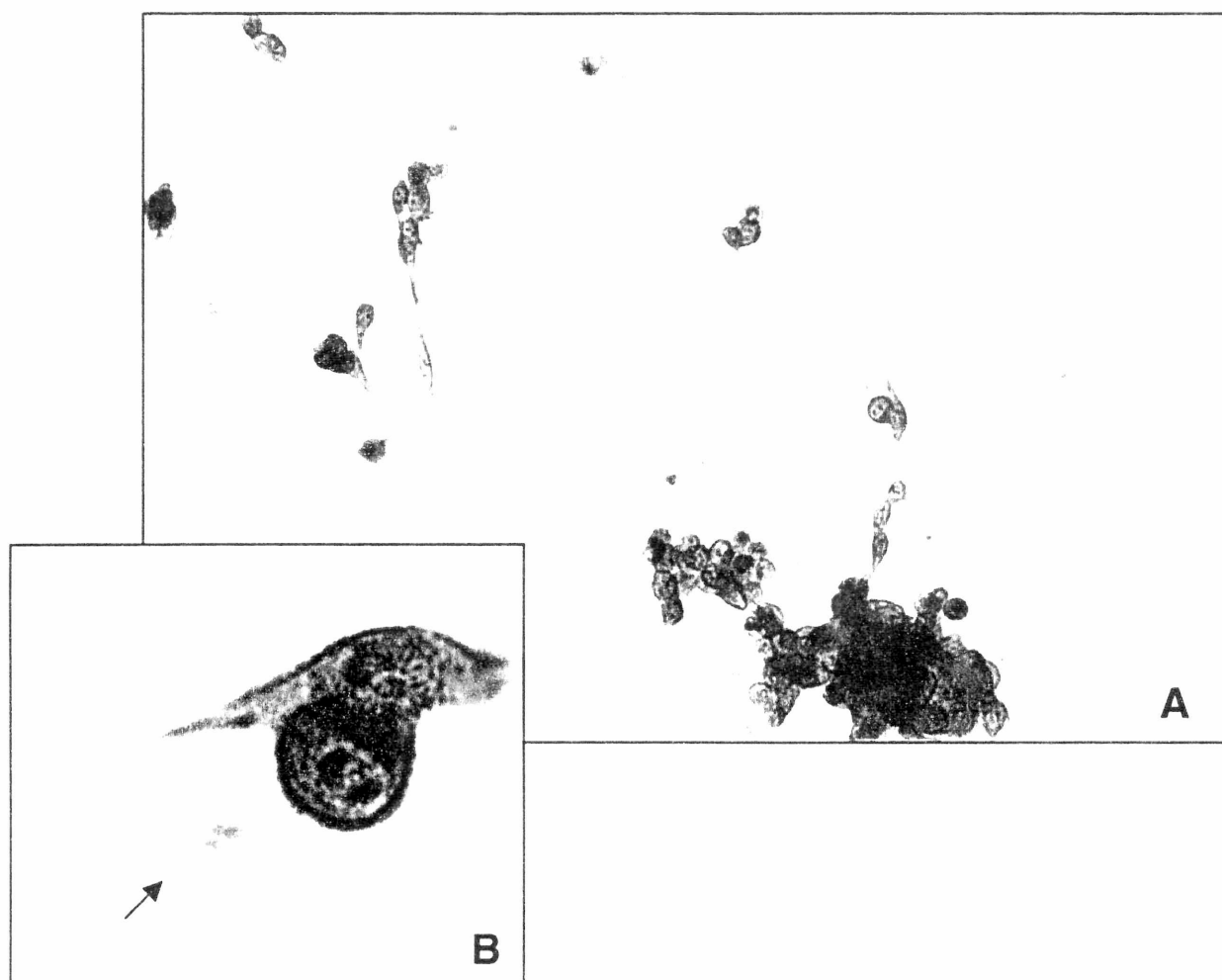
As células foram crescidas por 48 horas na ausência de polissacarídeo e processadas para M.O. A coloração foi realizada com Azul de Alcian (pH 2,5) e Hematoxilina. A coloração azul indica presença de grupos sulfato e/ou carboxílicos. No controle evidencia a matriz extracelular (seta); e a coloração roxa pela coloração com Hematoxilina, evidencia o núcleo. Ampliação original: A, 200x.; B, 1000x.;

Figura 36– Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração F-3B de *S. stenophyllum*. M.O.



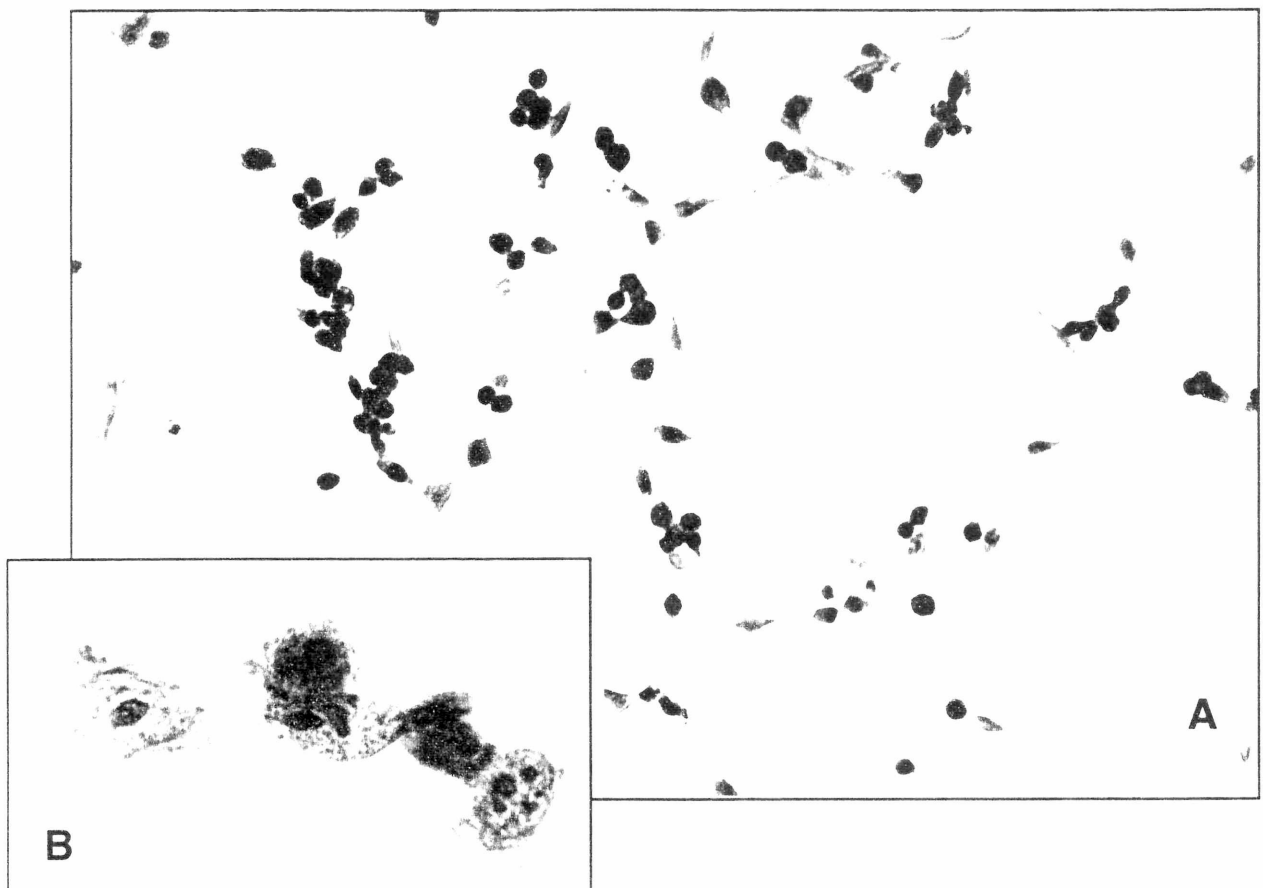
As células foram crescidas por 48 horas na presença da fração F-3B na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$, posteriormente processadas para M.O. A coloração foi realizada com Azul de Alcian (pH 2,5) e Hematoxilina. A coloração azul indica presença de grupos sulfato e/ou carboxílicos e a coloração roxa, evidencia o núcleo. Ampliação original: A, 200x., B, 1000x.

Figura 37– Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração F-5B de *S. stenophyllum*. M.O.



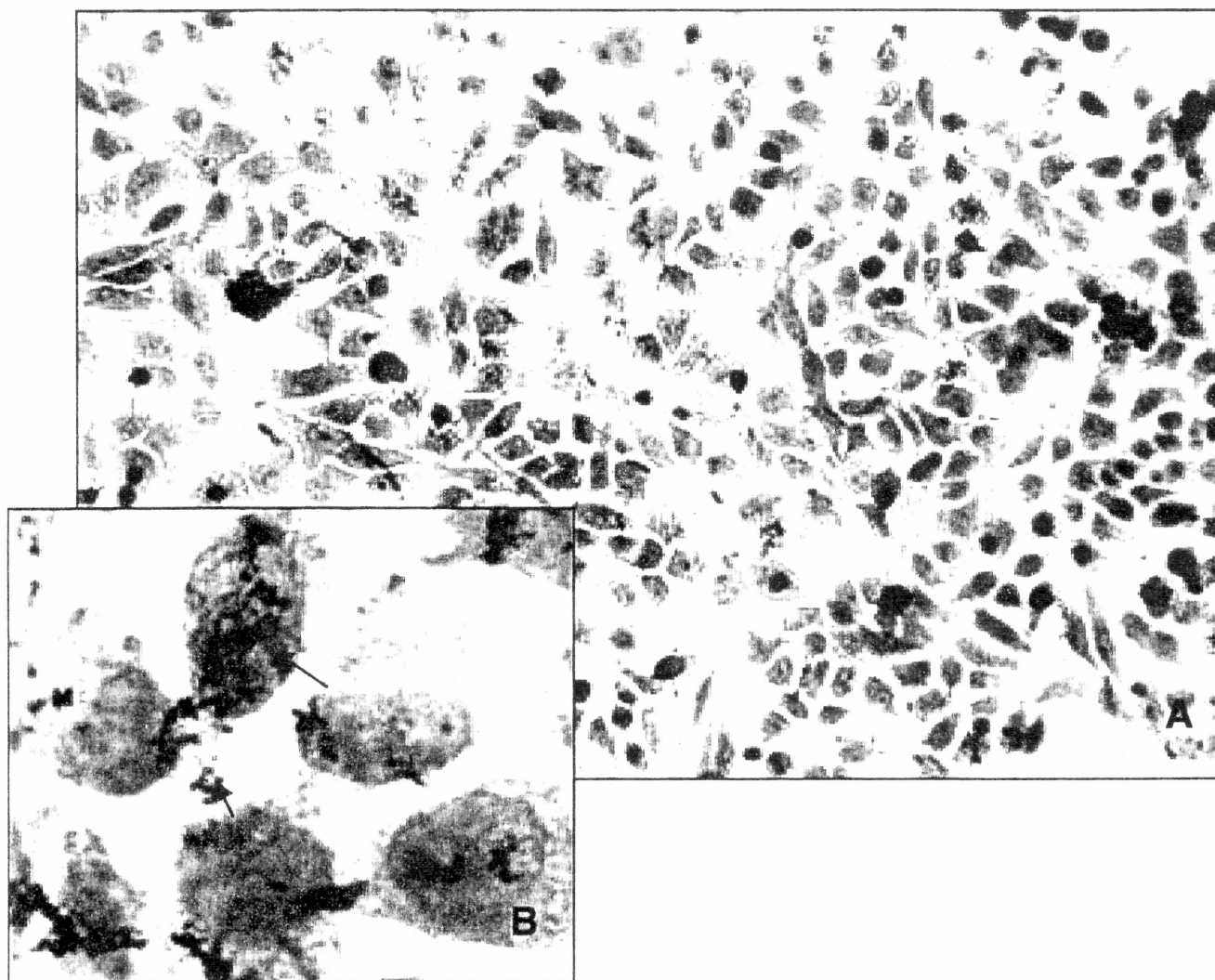
As células foram crescidas por 48 horas na presença da fração F-5B na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ e, posteriormente, processadas para M.O. A coloração foi realizada com Azul de Alcian (pH 2,5) e Hematoxilina. A coloração azul indica a presença de grupos sulfato e/ou carboxílicos e a coloração roxa evidencia o núcleo. A seta indica a rede de matriz extracelular. Ampliação original: A, 200x., B, 1000x.

Figura 38 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FD2-s de *S. stenophyllum*. M.O.



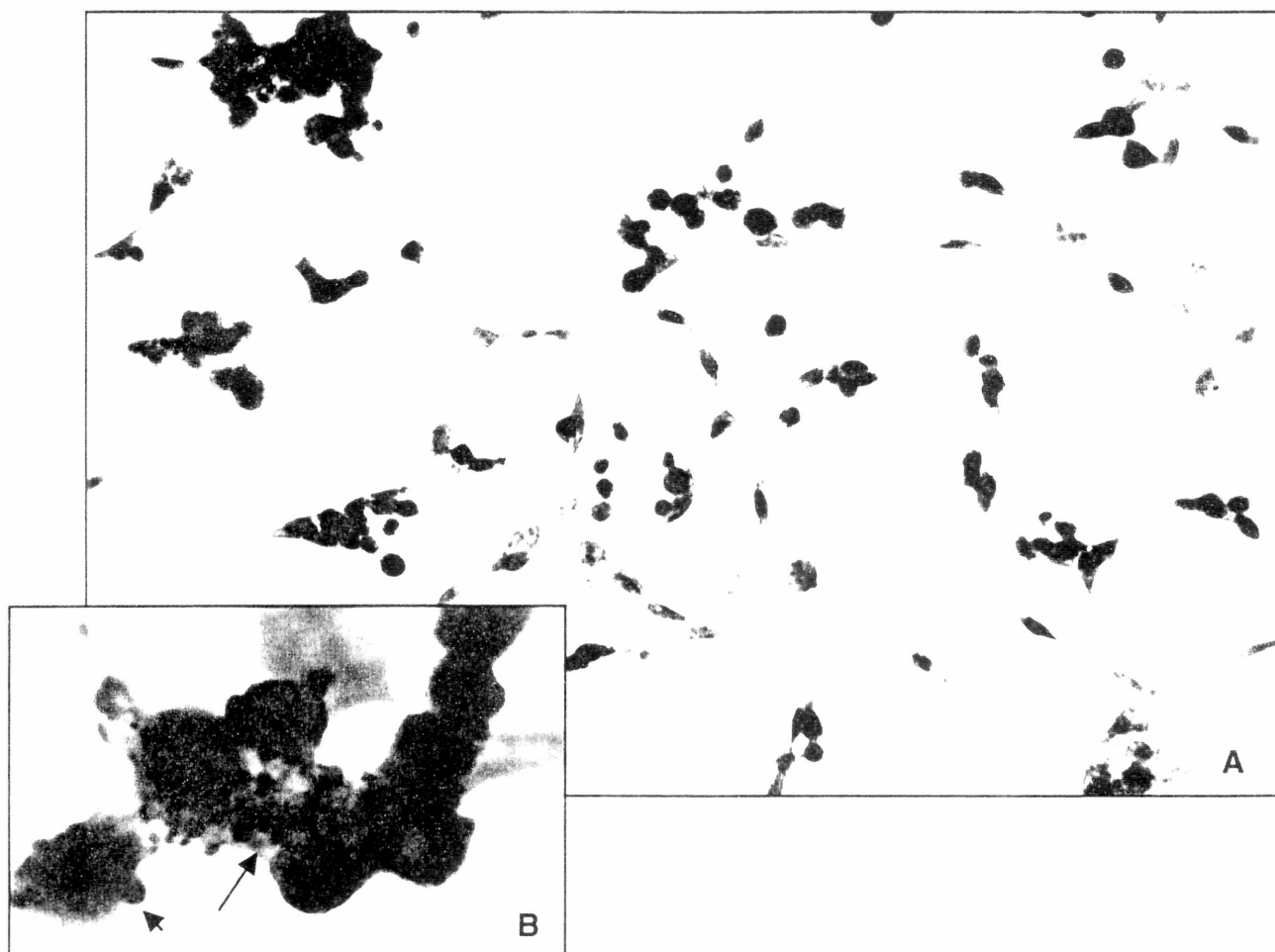
As células foram crescidas por 48 horas na presença da fração FD2-s na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ e posteriormente processadas para M.O. A coloração foi realizada com Azul de Alcian (pH 2,5) e Hematoxilina. A coloração azul indica presença de grupos sulfato e/ou carboxílicos e a coloração roxa evidencia o núcleo. Ampliação original A, 200x., B, 1000x.

Figura 39 – Fotomicrografia da monocamada controle de células HeLa observada por M. O.



As células foram crescidas por 48 horas na ausência de polissacarídeo e posteriormente processada para M.O. A coloração realizada com Azul de Alcian (pH 1,0) e Hematoxilina. A coloração azul indica presença de grupos sulfato, no controle evidencia a matriz extracelular (seta); e a coloração roxa evidencia o núcleo. A seta indica a rede de matriz extracelular. Ampliação original: A – 200x.; B – 1000x.;

Figura 40 – Fotomicrografia da monocamada de células HeLa crescida na presença da fração FD2-s de *S. stenophyllum*. M.O.



As células foram crescidas por 48 horas na presença da fração FD2-s na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ e posteriormente processadas para M.O. A coloração foi realizada com Azul de Alcian (pH 1,0) e Hematoxilina. A coloração azul indica presença de grupos sulfato e/ou carboxílicos e a coloração roxa, evidencia o núcleo. A seta indica os grânulos no citoplasma da célula. Ampliação original A - 200x., B - 1000x.

4.6 EFEITO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE *Sargassum stenophyllum* SOBRE A ADESÃO DE CÉLULAS HeLa

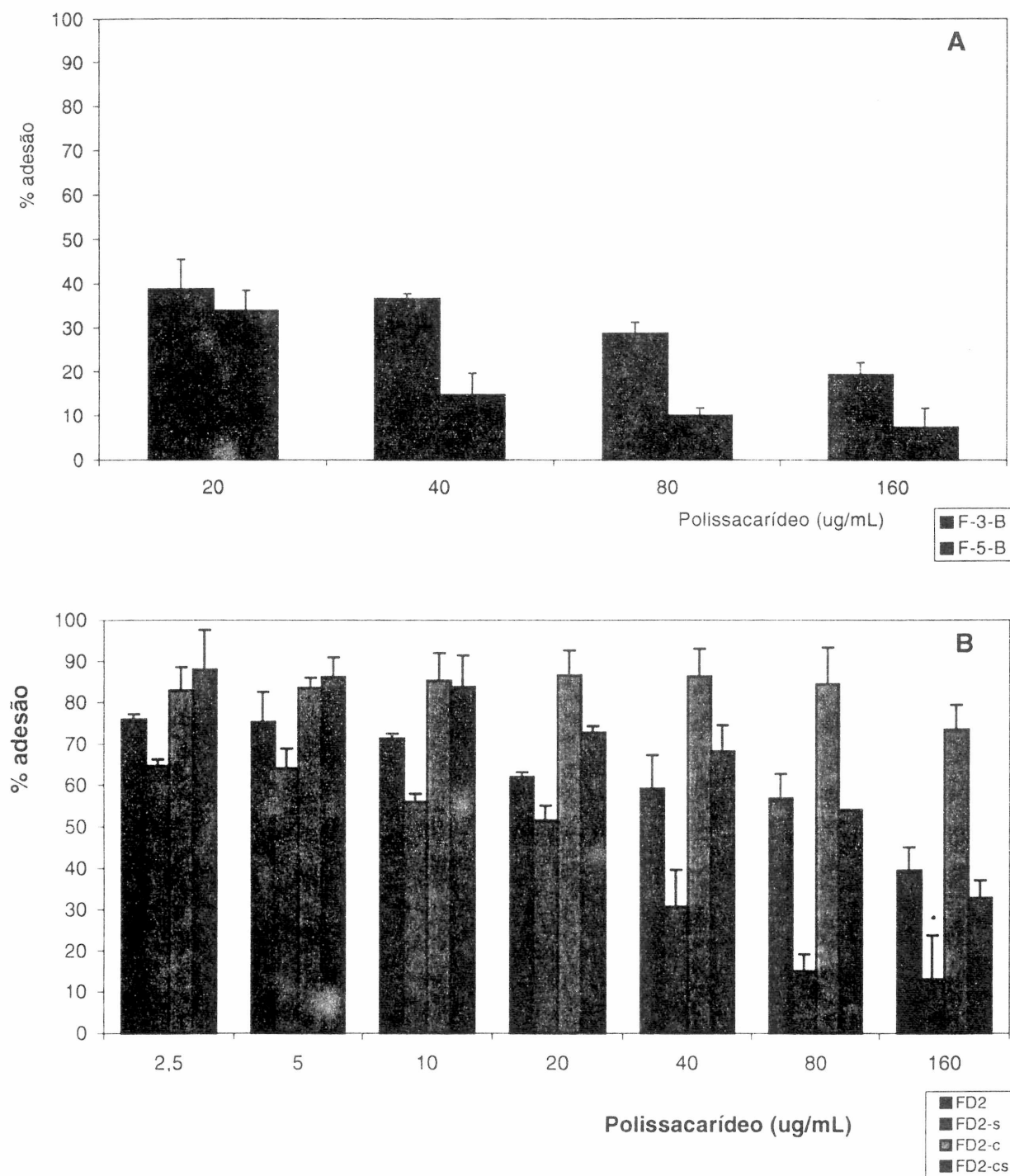
As fucanas sulfatadas de *S. stenophyllum* devido ao seu caráter fortemente ácido, apresentam-se ionizadas em pH acima de 0,5 podendo, portanto, ligar-se a uma variedade de proteínas. *In vitro*, como *in vivo*, as fucanas estarão expostas a um complexo ambiente constituído de proteínas em solução, da superfície celular e da matriz extracelular. Portanto, esses polímeros podem interferir na adesão célula-matriz e/ou na interação célula-célula. As moléculas de matriz extracelular apresentam importantes funções na adesão e migração celular. Dentre as várias moléculas de matriz, o colágeno tipo IV e laminina-1, que são os principais componentes da membrana basal, interferem principalmente na adesão de células epiteliais e metástases; a fibronectina é um importante constituinte do tecido conectivo intersticial e do plasma humano, e a vitronectina é primariamente uma proteína do sistema circulatório, com função de suporte no estroma de muitos tecidos (VACCARI *et al.* 2000). Diferentes mecanismos podem regular a adesão de células a esses substratos e, agentes que afetem a adesão, poderiam modular os processos de invasão e migração celular, dependendo da molécula de matriz extracelular envolvida (VACCARI *et al.* 2000). Considerando os resultados até aqui obtidos, que mostraram influência na proliferação e descolamento das células da superfície de crescimento, uma avaliação quanto a interferência dos polissacarídeos sulfatados de *S. stenophyllum* sobre a interação célula-constituintes da matriz extracelular se fez necessária. As moléculas de matriz utilizadas neste trabalho foram laminina-1, fibronectina e vitronectina.

Os polissacarídeos sulfatados utilizados para os testes de adesão celular em moléculas da matriz extracelular foram às frações nativas F3-B, F5-B, além das amostras obtidas pela hidrólise química parcial da fração FP, isto é, a fração FD2, que foi eluída com $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl da coluna de DEAE-Sephacel. Os polímeros derivatizados por carboxi-redução (FD2-c), e por sulfatação química (FD2-s) ou por ambos os procedimentos (FD2-cs), também foram utilizados. Como já foi mencionado, estas modificações estruturais foram feitas com o objetivo de se estabelecer qual ou quais grupamentos dos polissacarídeos seriam importantes para a adesão das células em constituintes da matriz.

As Figuras 41 A e B demonstram a percentagem de adesão celular quando a laminina-1, na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, foi utilizada como substrato de adesão. Na figura

41 A estão demonstrados os efeitos das frações nativas F-3B e F-5B, em concentrações que variaram de 20 a 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Verifica-se que ambas as frações interferem na adesão das células HeLa sobre a laminina-1. A inibição foi da ordem de 60% na concentração de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para ambas as frações, sendo que na concentração de 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a inibição da adesão foi cerca de 80 e 90%, respectivamente, para as frações F-3B e F-5B. Esses resultados indicam a interferência das cargas negativas dadas pelos grupos sulfato e carboxílicos na interação célula HeLa-laminina. A adesão das células HeLa sobre a matriz de laminina-1 na presença da fração parcialmente hidrolisada (FD2) e posteriormente derivatizada (FD2-s, FD2-c e FD2-cs) está demonstrado na Figura 41 B. Destas frações, apenas a FD2-c que possui menor densidade de carga negativa pois os grupos carboxílicos foram reduzidos, não inibiu de forma significativa a adesão das células à laminina. Vale destacar que as frações F-3B, F-5B e FD2-s, todas contendo sulfato em concentração maior que 15% (Tabela III), impediram a adesão celular na matriz de laminina, na faixa de 80 – 90% à concentração de 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Estas foram as frações que também apresentaram importante efeito antiproliferativo (Figura 33). Esses resultados reforçam a proposição de que a presença de uma maior densidade de carga, seja por grupos sulfato, ou mesmo por grupos carboxílicos interfere na adesão de células HeLa à molécula de laminina-1. Resultados semelhantes têm sido mostrados para fucanas nativas e supersulfatadas, as quais inibiram a adesão de células 3LL sobre a matriz de laminina (LIU *et al.* 2000). É importante citar os resultados obtidos por SOEDA *et al.* (1994 a), os quais demonstraram que a introdução de grupos amônio, os quais são carregados positivamente e, portanto, diminuem a densidade de cargas negativas da fucana super sulfatada, promovem o aumento na adesão de células 3LL sobre a matriz formada pelo peptídeo da cadeia $\beta 1$ da laminina, YIGSR. Embora neste trabalho não tenham sido feitos ensaios específicos para esta região da molécula de laminina, esta possibilidade não pode ser excluída para as fucanas de *S. stenophyllum*. Não se deve descartar a hipótese de que os polissacarídeos possam estar interagindo com as integrinas ligantes de laminina; é amplamente aceito que integrinas alteram a proliferação e migração celular (BELKIN; STEPP, 2000). A interação célula-laminina envolve também proteínas - não-integrinas, como o sindecan, presente em células epiteliais. Os sindecans, pertencentes à família das proteoglicanas de heparan sulfato (BELKIN; STEPP, 2000), estão associados intracelularmente com o citoesqueleto

Figura 41 - Efeito das frações de fucanas nativas e polissacarídeos sulfatados e derivatizados da alga *Sargassum stenophyllum* na adesão de células HeLa sobre matriz de laminina-1.

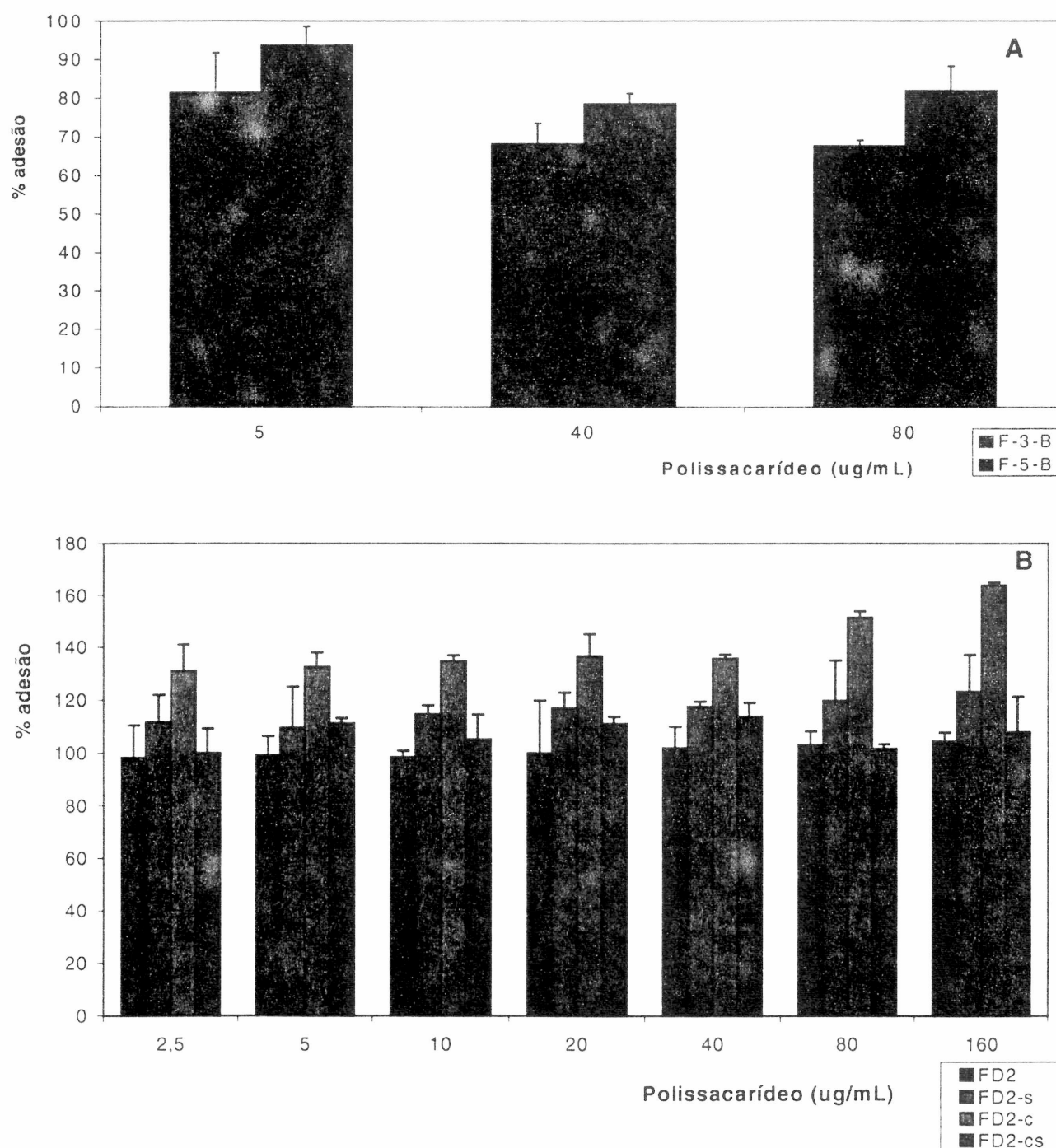


Laminina-1 foi incubada na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, como indicado em Material e Métodos. O experimento controle corresponde a 100%, os polissacarídeos utilizados foram as frações F-3B, F-5B (A), FD2, FD2-s, FD2-c e FD2-cs (B). Os resultados, obtidos após 2 horas de incubação, foram expressos como média \pm desvio padrão ($M \pm dp$).

de actina (TAMKUN *et al.* 1986; COUCHMAN; WOODS, 1999), extracelularmente, o core protéico do sindecan está ligado a uma das várias cadeias laterais de heparan sulfato, a qual está envolvida na interação com moléculas distintas da matriz extracelular (BELKIN; STEPP, 2000). Vale destacar que dentro da família dos sindecans, o sindecan-1 associa-se com os domínios G das cadeias α -1 e α -2 da laminina, fazendo isso via cadeias de heparan sulfato (HOFFMAN *et al.* 1998; KATO *et al.* 1995). Neste caso, considerando o alto grau de sulfatação dos polissacarídeos nativos (F-3B e F-5B) de *S. stenophyllum*, bem como da fração FD2-s, uma interferência desses polímeros na ligação heparan sulfato-laminina, não pode também ser descartada. Moléculas que promovam a diminuição ou mesmo a inibição da interação da laminina com integrinas ou sindecans, podem afetar significativamente a interação da célula com esta molécula de matriz e com isto alterar a morfologia, bem como diminuir a adesão celular, parâmetros que foram alterados nas células HeLa.

As Figuras 42 A e B demonstram a adesão das células HeLa à matriz de fibronectina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), na ausência ou presença de polissacarídeos. A Figura 42 A mostra que o efeito das frações nativas F-3B e F-5B sobre a adesão de células HeLa à matriz de fibronectina foi discreta, sendo da ordem de 30% na dose de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$, para a fração F-3B e de 15% para a fração F-5B. A Figura 42 B mostra que as frações obtidas por hidrólise ácida parcial da fração FP (FD2, FD2-s e FD2-cs) quando colocadas junto com as células HeLa sobre a matriz de fibronectina, não afetam a adesão celular. Chama a atenção nesses resultados o efeito da fração carboxi-reduzida (FD2-c) que estimulou em 60% a adesão celular à fibronectina. Os dados descritos na literatura quanto à interferência de fucanas sulfatadas na interação célula-fibronectina, são controversos. Enquanto SOEDA e colaboradores (1994) mostraram que fucanas nativas e supersulfatadas não interferem na adesão de células 3LL com fibronectina, os resultados obtidos por ROCHA *et al.* (2001) mostraram que o tratamento de células CHO-K1 e CHO-745 com fucanas da alga parda *Spatoglossum schröderi* promovem inibição na adesão sobre matriz de fibronectina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). No caso de células HeLa, um polímero modificado quimicamente com menor densidade de carga (FD2-c) favoreceu a interação célula-fibronectina, enquanto que polímeros com maior densidade de carga exibiram pouco efeito. Considerando as diferenças estruturais entre as fucanas de *S. stenophyllum* e a descrita para *Spatoglossum schröderi* (ROCHA *et al.* 2001), pode-se sugerir que além da densidade de carga, a composição

Figura 42- Efeito das frações de fucanas nativas e polissacarídeos sulfatados e derivatizados da alga *Sargassum stenophyllum* na adesão de células HeLa sobre matriz de fibronectina de plasma humano.



Fibronectina foi incubada na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, como indicado em Material e Métodos. O experimento controle corresponde a 100%, os polissacarídeos utilizados foram as frações F-3B, F-5B (A), FD2, FD2-s, FD2-c e FD2-cs (B). Os resultados, obtidos após 2 horas de incubação, foram expressos como média \pm desvio padrão ($M \pm dp$).

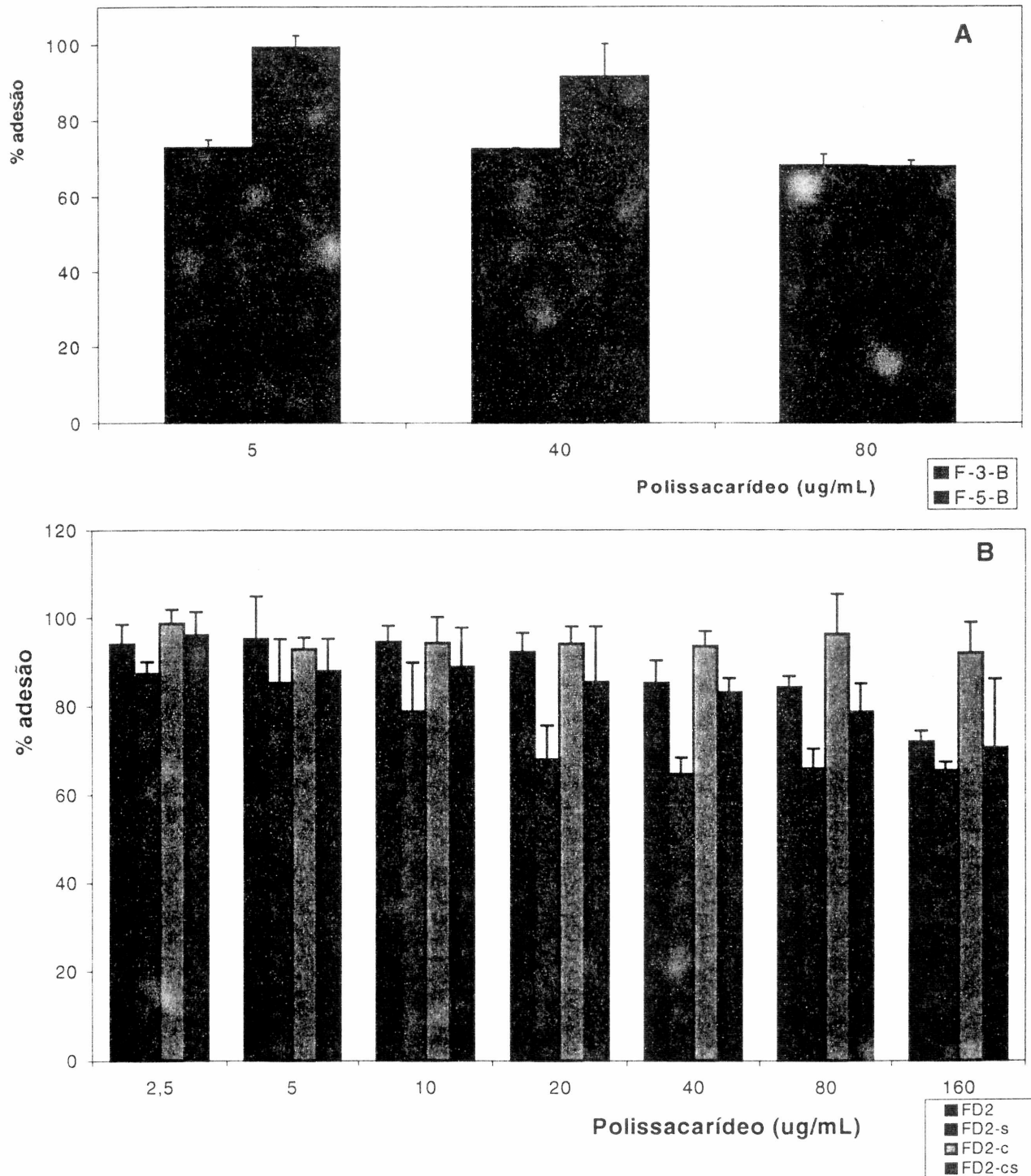
monossacarídica é relevante na expressão dessa atividade

Vitronectina possui funções de regulação da aderência e de migração celular (PREISSNER, 1991). Assim como outras moléculas da matriz extracelular, a vitronectina contém um peptídeo RGD capaz de ligar-se aos receptores heterodiméricos da superfície celular da família das integrinas. Os ensaios de adesão de células HeLa frente a vitronectina ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$), utilizada como molécula de ancoragem, estão demonstrados nas Figuras 43 A e B. As frações F3-B e F-5B (Figura 43 A) apresentaram efeitos discretos, inibindo no efeito máximo de cerca de 25%. A Figura 46 mostra o efeito das frações FD2, FD2-s, FD2-c e FD2-cs. Destas, apenas a fração FD2-s promoveu inibição da adesão celular em torno de 30% em baixas concentrações ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$). FD2-c não interferiu na adesão celular e as frações FD2 e FD2-cs apresentaram efeito inibitório em alta concentração ($160 \mu\text{g mL}^{-1}$). De acordo com ROCHA *et al.* (2001), com o máximo de 3 horas de incubação, a adesão de células CHO-K1 e CHO-745 sobre vitronectina não foi afetada quando em presença da fucana de baixa massa molar isoladas de *Spatoglossum schröderi* na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Com a redução do número de células, os autores observaram um decréscimo de cerca de 30% na adesão das células CHO-K1.

Portanto, as fucanas sulfatadas purificadas de *S. stenophyllum* F-3B e F-5B, bem como a fração de menor massa molar FD2-s, foram efetivas na inibição da adesão celular frente a laminina. Em relação a fibronectina e vitronectina, os efeitos desses polímeros, embora presentes, foram de menor magnitude.

O mecanismo pelo qual as fucanas exercem sua atividade biológica é complexo, porque suas estruturas possibilitam uma multiplicidade de interações (BOISSON-VIDAL *et al.* 1995). Esses autores sugerem que os efeitos biológicos desses polímeros são relacionados à sua conformação estrutural, próxima àquela das glicosaminoglicanas sulfatadas endógenas encontradas nas membranas celulares. A densidade de carga, bem como as composições das cadeias polissacarídicas são essenciais para essas atividades.

Figura 43- Efeito das frações de fucanas nativas e polissacarídeos sulfatados e derivatizados da alga *Sargassum stenophyllum* na adesão de células HeLa sobre matriz de vitronectina de plasma humano.



Vitronectina foi incubada na concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, como indicado em Material e Métodos. O experimento controle corresponde a 100%, os polissacarídeos utilizados foram as frações F-3B, F-5B (A), FD2, FD2-s, FD2-c e FD2-cs (B). Os resultados, obtidos após 2 horas de incubação, foram expressos como média \pm desvio padrão ($M \pm dp$).

DISCUSSÃO FINAL

5. DISCUSSÃO FINAL

A atividade biológica apresentada por polissacarídeos mostra ainda muitas controvérsias. Alguns autores citam como fator mais importante para esta atividade, alguns parâmetros como, a massa molar (DING *et al.* 1998; YADOMAE, 2000), conformação molecular, exemplificada por estruturas altamente ordenadas como as hélices triplas (HAMURO *et al.* 1971, OHNO *et al.* 1987, KOJIMA *et al.* 1986, MAEDA *et al.* 1988), a distribuição das unidades glicosídicas ao longo da cadeia principal (MISAKI *et al.* 1993), o grau de ramificação do polissacarídeo (DB) (BLASCHEK *et al.* 1992), ou ainda a natureza dos grupos substituintes.

Os resultados do presente trabalho permitiram verificar que as agaranas das algas vermelhas *Bostrychia montagnei* e *Porphyra columbina*, apesar de apresentarem uma alta densidade de carga, fornecida pelos grupos sulfato, em torno de 19%, não ocasionaram alterações significativas em células HeLa, ocorrendo poucas alterações na morfologia em culturas que atingiram confluência na monocamada celular. Esta afirmativa é válida, considerando que a alteração na morfologia celular é um forte indicativo de interferências na integração entre célula-matriz extracelular. Para manter a morfologia epitelial característica, as integrinas (receptores de membrana) interagem diretamente com o citoesqueleto (TAMKUN *et al.* 1986; COUCHMAN; WOODS, 1999). Com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se afirmar que esses polímeros lineares sulfatados, ao menos em células HeLa, não interferem na adesão. Da mesma forma a avaliação de polímeros lineares, onde a densidade de carga negativa é fornecida pelos grupos carboxílicos, como os alginatos e blocos M e G de *Laminaria brasiliensis* e blocos G de *Sargassum stenophyllum*, não ocasionaram alterações significativas em células HeLa. Em contraste, fucanas sulfatadas de *S. stenophyllum* com teor de grupos sulfato similar ao das galactanas testadas, apresentaram alterações de morfologia, proliferação e adesão celular em células HeLa. Dessulfatação e defucosilação concomitantemente com a diminuição da massa molar (FD2) ocasionou perda da atividade. Esta diferença pode resultar no distinto teor de grupos sulfato, com a presença de unidades de fucose sulfatadas no polímero nativo e/ou da massa molar; fatores esses que determinam distintas conformações espaciais das moléculas. Grupos sulfato em C-6 (sulfatação química) nas unidades de hexoses constituintes de FD2, restaura

a atividade biológica, indicando que este substituinte é importante para a expressão das atividades em estudo, e que esses grupos em C-6 na molécula FD2 ocasionam uma configuração espacial adequada para expressar efeitos sobre células HeLa, de maneira similar às observadas com as fucanas nativas de *S. stenophyllum*. Esses resultados são coerentes com os encontrados por LIU e colaboradores (2000) que ao estudarem a atividade antiadesiva de fucanas das algas pardas *Ascophyllum nodosum* e *Laminaria brasiliensis*, além de galactanas (carragenanas) das algas vermelhas *Gigartina aciculares*, *Euchema spinosum* e *E. cottonii*, demonstraram que esta atividade depende, principalmente, da estrutura do polissacarídeo, do conteúdo de sulfato, além da massa molar.

Alguns autores têm considerado que a atividade antiadesiva de polissacarídeos é mediada por interações com a proteína adesiva e o substrato que bloqueia a ligação da célula (HAROUN-BOUHEDJA *et al.* 2000). Na presença de frações de fucanas da alga *Sargassum stenophyllum*, com alto teor de sulfato, e diferindo no teor de grupos carboxílicos (F-3B, F-5B e FD2-s), os experimentos de adesão celular mostraram uma diminuição na quantidade de células que permaneceram aderidas sobre a matriz formada por diversas proteínas adesivas como laminina-1 e vitronectina, após o tratamento. Porém somente as fucanas nativas promoveram diminuição na adesão de células HeLa sobre a matriz de fibronectina, indicando que a diferença de conformação, padrão de sulfatação, bem como na massa molar, são fatores importantes a serem considerados.

Tendo em vista a importância farmacológica de moléculas com potente ação citotóxica, antimitótica e/ou antiadesiva, como os polissacarídeos sulfatados de *S. stenophyllum*, alguns estudos complementares seriam necessários, para uma maior compreensão dos mecanismos de ação envolvidos em cada um dos efeitos encontrados. Dentre estas avaliações, a marcação do polissacarídeo, para análises em M.O. e M.E. são necessárias para se verificar a ocorrência de internalização ou mesmo ligação direta desses polímeros com integrinas. A cinética de interação polissacarídeo-moléculas de matriz extracelular, polissacarídeo-integrina, análises de imunofluorescência com estas moléculas poderiam esclarecer pontos importantes verificados na interferência da adesão de células ocasionada por esses polissacarídeos. Porém, não se pode descartar, para uma avaliação mais completa, ensaios *in vitro* utilizando células não transformadas, ou explantes primários de tecido normais, além de ensaios *in vivo*, com diferentes modelos animais.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. A fração FD2 obtida a partir de *Sargassum stenophyllum* por hidrólise ácida parcial é constituída majoritariamente por galactose (40,4 mol%) e manose (19,0 mol%), além de fucose (15,5 mol%), xilose (13,2 mol%), glucose (11,9 mol%) e ácido glucurônico (19%);
2. As análises de FT-IR, RMN-¹³C e metilação indicam que FD2 é constituída por uma cadeia principal de β -D-Manp 2-O substituída, com pontos de ramificação em C-3 e C-4 e β -D-Galp 6-O substituída, com pontos de ramificação em C-3. As unidades de α -L-Fucp estão principalmente 4-, 2- e 3,4-O substituídas, com grupos sulfato em C-4. As unidades de β -D-Glcp estão principalmente 4- e 3-O substituídas;
3. As fucanas nativas da alga *Sargassum stenophyllum* apresentaram grande atividade biológica sobre células HeLa, quando comparadas aos polissacarídeos lineares isolados de *Bostrychia montagnei*, *Porphyra columbina* (galactanas sulfatadas) e de *Laminaria brasiliensis* (alginato e blocos M e G) e *Sargassum stenophyllum* (blocos G);
4. Sulfatação química de FD2 (grupos sulfato preferencialmente em C-6) restaurou a atividade biológica a um nível similar ao das fucanas nativas, indicando que este polímero, de menor massa molar, porém sulfatado quimicamente, apresenta uma conformação adequada para a atividade biológica;
5. A composição monossacarídica, a presença de cadeias laterais, ácidos urônicos, mas principalmente o alto grau de cargas negativas do polímero (grupos sulfato e carboxílicos), bem como a distribuição de cargas da molécula são essenciais para que ocorra citotoxicidade, alterações morfológicas, alterações na divisão celular além de interferência na adesão das células HeLa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATTAH, A. F.; HUSSEIN, M.; MAGDEL, D.; SALEM, H. M. Some structural features of sargassan, a sulphated heteropolysaccharide from *Sargassum linifolium*, **Carbohydr. Res.**, Kidlington, v. 33, p. 19-24, 1974.

AHERNE, W. A.; CAMPLEJOHN, R. S.; WRIGHT, N. A. The dynamics of growth. IN: AHERNE, W. A. An Introduction to cell population kinetics. London, Edward Arnold Ltd. P. 8-26, 1977.

ALBELDA, S.M.; METTE, A. S.; BUCK, C.A. Expression of integrin cell-substratum adhesion receptors by normal and malignant-cells. **Clin. Res.**, v. 37, n. 2, p. A472-A472, 1989.

ARINAGA, S.; KARIMINE, N. TAKAMUKU, K. Enhanced production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by peripheral monocytes after lentinan administration in patients with gastric carcinoma. **Int. J. Immunopharmacol.**, Kidlington, v. 14, p. 43-47, 1992.

ARGRAVES, W. S.; DICKERSON, W. R. B.; RUOSLAHTI, E. Fibulin a novel protein that interacts with fibronectin receptor beta subunit cytoplasmatic domain. **Cell**, Cambridge, v. 58, p. 623-629, 1989.

AUMAILLEY, M.; GAYRAUD, B. Structure and biological activity of the extracellular matrix, **J. Mol. Med.**, Limerick, v. 76, p. 253-265, 1998.

AUMAILLEY, M.; SMYTH, N. The role of laminins in basement membrane function. **J. Anat.**, San Francisco, v. 193, p. 1-21, 1998.

BATTAGLIA, C.; MAYER, U.; AUMAILLEY, M.; TIMPL, R. Basement-membrane heparan sulfate proteoglycan binds to laminin by its heparan sulfate chains to nidogen by sites in the protein core. **Eur. J. Biochem.**, Paris, v. 208, p. 359-366, 1992.

BECK, K.; HUNTER, I.; ENGEL, J. Structure and function of laminin: anatomy of multidomain glycoprotein. **FASEB J.**, Bethesda, v. 4, p. 148-160, 1990.

BECKER, T. A.; KIPKE, D. R.; BRANDON, T. Calcium alginate gel: A biocompatible and mechanically stable polymer for endovascular embolization. **J. Biomed. Mat. Res.**, New York, v. 54, n. 1, p. 76-86, 2001.

BELKIN, A. M.; STEPP, M. A. Integrins as receptor for laminins. **Microsc. Res. Techniq.**, v. 51, n. 2, p. 280-301, 2000.

- BEM-ZE'EV, A. Cytoskeletal and adhesion proteins as tumor suppressors. **Curr. Opinion Cell Biol.**, London, v. 9, p. 99-108, 1997.
- BENNETT, J. S.; HOXIE, J. A.; LETTMAN, S. F.; VILAIRE, G.; CINES, D. B. Inhibition of fibrinogen binding to stimulated human platelets by a monoclonal antibody. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 80, p. 2417-2421, 1983.
- BLASCHEK, W.; KÄSBAUER, J.; KRAUS, J.; FRANZ, G. *Pythium aphanidermatum*: culture, cell wall composition, isolation and structure of antitumor storage a solublized cell-wall (1→3), (1→6)-β-D-glucans. **Carbohydr. Res.**, Kidlington, v. 231, p. 293-307, 1992.
- BLONDIN, C.; CHAUBET, F.; NARDELLA, A.; SINQUIN, C.; JOSEFONVICZ, J. Relationships between chemical characteristics and anticomplementary activity of fucans. **Biomaterials**, v. 17, p. 597-603, 1996.
- BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. **Anal. Biochem.**, Duluth, v. 54, p. 484-489, 1973.
- BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1→3)-β-D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydr. Pol.**, Shannon, v. 28, p. 3-14, 1995.
- BOISSON-VIDAL, C.; HAROUN, F.; ELLOUALI, M.; BLONDIN, C.; FISCHER, A. M.; AGOSTINI, A.; JOZEFONVICZ, J. Biological activities of polysaccharides from marine algae. **Drugs Future**, Barcelona, v. 20, p. 1237-1249, 1995.
- BOURDON, M. A.; RUOSLAHTI, E. Tenacin mediates cell attachment through a RGD dependent receptor, **J. Cell Biol.**, Bethesda, v. 108, p. 1149-1155, 1989.
- BOWLER, D. M.; TURVEY, J. R. Water soluble polysaccharides of red alga *L. pinatifida*. Part I. Constituent units. **J. Chem. Soc.**, p. 983-988, 1968.
- BUCHI, D. F.; SOUZA, W. Internalization of surface components during ingestion of *Sacharomices cerevisiae* by macrophages. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, Bologna, v. 24, p. 135-141, 1992.
- BUCK, C. A.; HORWITZ, A. F. Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. **Annu. Rev. Cell. Biol.**, Palo Alto, v. 3, p. 179-205, 1987.
- CACERES, P. J.; CARLUCCI, M. J.; DAMONTE, E. B.; MATSUHIRO, B.; ZUNIGA, E. A. Carrageenans from chilean samples of *Stenogramme interrupta* (Phyllphoraceae): structural analysis and biological activity. **Phytochemistry**, v. 53, n. 1, p. 81-86, 2000.

CARLUCCI, M. J.; PUJOL, C. A.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M. D.; MATULEWICZ, M. C.; DAMONTE, E. B.; CERESO, A. S. Anti-herpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlations between structure and biological activity. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 20, p. 97-105, 1997.

CARNEIRO LEÃO, A. M. A.; FREITAS BUCHI, D.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; OLIVEIRA, M. B. M. Citotoxic effect against HeLa cells of polysaccharides from the lichen *Ramalina celastri*. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, Bologna, v. 29, n. 4, p. 1-5, 1997.

CARNEIRO LEÃO, A. M. A. **Atividade antitumoral dos polissacarídeos nativos e quimicamente modificados do líquen *Ramalina celastri***. Curitiba, 1998, 145 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, UFPR

CHEVOLOT, L. FOUCAULT, A.; CHAUBET, F.; KERVAREC, N.; SINQUIN, C.; FISHER, A. M.; BOISSON-VIDAL, C. Further data on the structure of brown seaweed fucans: Relationships with anticoagulant activity. *Carbohydr. Res.*, Kidlington, v. 319, n. 1-4, p. 154-165, 1999.

CHINTALA, S. K.; SAWAYA, R.; GOKASLAN, Z. L.; RAO, J. S. The effect of type III collagen on migration and invasion of human glioblastoma cell lines *in vitro*. *Cancer Lett.*, v. 102, p. 57-63, 1996.

CHIZHOV, A. O.; DELL, A.; MORRIS, H.; HASLAM, S. M.; McDOWELL, R. A.; SHASHKOV, A. S.; NIFANT'EV, N. E.; KHATUNTSEVA, E. A. USOV, A. I. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydr. Res.*, Kidlington, v. 320, p. 108-119, 1999.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.*, Kidlington, v. 131, p. 209-217, 1984.

CONCHIE, J.; PERCIVAL, E. G. V. Fucoidin. Part II. The hydrolysis of a methylated fucoidin prepared from *Fucus vesiculosus*, *J. Chem. Soc.*, p. 827-832, 1950.

COOMBE, D. R.; PARISH, C. R.; RAMSHAW, I. A.; SNOWDEN, J. M. Analysis of the inhibition of tumour metastasis by sulphated polysaccharides. *Int. J. Cancer*, v. 32, p. 82-88, 1987.

COOK, P. W.; MATTOX, P. A.; KEEBLE, W. W.; SHIPLEY, G. D. Inhibition of autonomous human keratinocyte proliferation and amphiregulin mitogenic activity by sulfated polysaccharides. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, v. 28^A, p. 218-222, 1992.

COUCHMAN, J. R.; WOODS, A. Structure and biology of pericellular proteoglycans. In: ROBERTS, D. D.; MECHAN, R. R., eds. *Cell Surface and Extracellular Glycoconjugates*. San Diego, Academic Press, p. 33-82, 1993.

COUCHMAN, J. R.; WOODS, A. Syndecan-4 and integrins: combinatorial signaling in cell adhesion. *J. Cell Sci.*, v. 112, n. 20, p. 3415-3420, 1999.

CULLING, C. F. A.; ALLISON, R. T.; BARR, W. T. Methods for demonstration of acid mucopolisaccharides and glycoproteins (COOH and OSO₃H groups). In: *Cellular Pathology Technique*, Butterworths: London, 1985, p. 232 - 233.

DEMLEITNER, S.; KRAUS, J.; FRANZ, G. Synthesis and anti-tumour activity of derivatives of curdlan and lichenan branched at C-6. *Carbohydr. Res.*, Kidlington, v. 226, p. 239-246, 1992.

DERYUGINA, E. I.; BOURDON, M. A. Tenascin mediates human glioma cell migration and modulates cell migration on fibronectin. *J. Cell Sci.*, v. 109, p. 643-652, 1996.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Eletrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal. Biochem.*, Duluth, v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.

DING, Q.; ZHANG, L. N.; ZENG, F. B. Influence of molecular weight and periodate-modification of beta-D-glucans from *Poria cocos sclerotium* on antitumor activities. *Chinese J. Polymer Sci.*, v. 16, n. 1, p. 62-66, 1998.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the sulphate ester content of sulphated polysaccharides. *Biochem. J.*, v. 84, p. 106-109, 1962.

DONAHUE, J. P.; PATEL, H.; ANDERSON, W. F.; HOWIGER, J. 3-Dimensional structure of the platelet integrin recognition segment of the fibrinogen gamma-chain obtained by carrier protein-driven crystallization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 91, n. 25, p. 12178-12182, 1994.

DUARTE, M. E. R. Heteropolissacarídeos ácidos isolados de *Laminaria brasiliensis* J.&O.: Ácido Algínico e Fucanas. Curitiba, 1990. 202 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, UFPR.

DUARTE, M.E.R., GORIN, P.A.S., DUARTE, J.H. Homogeneous guluronic and mannuronic acids blocks in the alginate of the brown seaweed *Laminara brasiliensis*. *Phytochemistry*. v. 30, n. 5, p. 1707-1708. 1991

DUARTE, M. E. R.; CARDOSO, M. A.; NOSEDA, M. D.; CEREZO, A. S. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydr. Res.*, v. 333, p. 281-293, 2001.

DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, D. G.; NOSEDA, M. D.; TULIO, S.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication *in vitro*. **Phytomed.**, v. 8, n. 1, p. 53-58, 2001 b.

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUCKWORTH, M.; YAPHE, W. The structure of agar. Part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. **Carbohydr. Res.**, Kidlington, v. 16, p. 189-197, 1971.

DURAND, G. Les sélectines et leur rôle dans l'interaction des leucocytes avec les cellules endothéliales. **Médecine/Sciences**, v. 8, p. 1051-1056, 1992.

ELLOUALI, M.; BOISSON-VIDAL, C.; DURAND, P.; JOSEFONVICZ, J. Antitumor activity of low-molecular-weight fucans extracted from brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. **Anticancer Res.** v. 13, n. 6A, p. 2011-2019, 1993.

ELLOUALI, M.; BOISSON-VIDAL, C.; JOSEFONVICZ, J. Antiproliferative effect and interaction of fucans with cells. Colloids and surfaces B: **Biointerfaces**, v. 2, p. 305-314, 1994.

ENAM, S. A.; ROSENBLUM, M. L.; EDVARDSEN, K. Role of extracellular matrix in tumor invasion: migration of glioma cells along fibronectin-positive mesenchymal cell process. **Neurosurgery**, v. 16, p. 107-115, 1998.

ERICKSON, A. C.; COUCHMAN, J. R. Still more complexity in mammalian basement membranes. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 48, n. 10, p. 1291-1306, 2000.

FABRE, I.; BRUNETEAU, M.; RICCI, P.; MICHEL, G. Isolation and structural study on *Phytophthora parasitica* glucans. **Eur. J. Biochem.**, Paris, v. 142, p. 99-103, 1984.

FALCH, B. H.; ESPEVIK, T.; RYAN, L.; STOKKE, B. T. The cytokine stimulating activity of (1→3)-beta-D-glucans is dependent on the triple helix conformation. **Carbohydr. Res.**, Kidlington, v. 329, n. 3, p. 587-596, 2000.

FELDMAN, S. C.; REYNALDI, S. STORTZ, C. A.; CEREZO, A. S.; DAMONTE, E. B. Antiviral properties of fucoidan fractions from *Leathesia difformis*. **Phytomed.**, v. 6, n. 5, p. 335-340, 1999.

FERNANDEZ, M. F. L.; BOULLOSA, R. G.; BOTLLE, J. Factor-XII deficiency associated to a new form of type-I Vonwillebrand disease. **Throm. Haemostasis**, v. 62, n. 1, p. 222, 1989.

FITCH, J. M.; LIENMAYES, C. M. Collagen fibril assembly in the developing avian primary corneal stroma. **Invest. Ophthalm. Vis. Sci.**, v. 35, n. 3, p. 862-869, 1994.

FRENCH, M. M.; SMITH, S. E.; AKANBI, K.; SANFORD, T.; HECHT, J.; FARACH-CARSON, M. C.; CARSON, D. D. Expression of the heparan sulfate proteoglycan, perlecan, during mouse embryogenesis and perlecan chondrogenic activity in vitro. **J. Cell Biol.**, Bethesda, v. 145, n. 5, p. 1103-1115, 1999.

FUJIHARA, M.; IIZIMA, N.; YAMAMOTO, I.; NAGUMO, T. Purification and chemical and physical characterization of an antitumor polysaccharide from the brown seaweed *Sargassum fulvellum*. **Carbohydr. Res.**, Kidlington, v. 125, p.97-106, 1984.

GARDNER, J. M.; HYNES, R. O. Interaction of fibronectin with its receptor on platelets. **Cell**, Cambridge, v. 42, p. 439-448, 1985.

GINSBURG, M. H.; LOFTUS, J. C.; PLOW, E. R. Cytoadhesion, integrins, and platelets. **Throm. Haemostasis**, v. 59, p. 1-6, 1988.

GOLDBRUNNER, R. H.; HAUGLAND, H. K.; KLEIN, C. E.; KERKAU, S.; ROSEN, K.; TONN, J. C. E-cadherin dependent and integrin mediated tumor cell migration of human glioma and melanoma cell lines under serum-free conditions. **Anticancer Res.**, v. 16, p. 3679-3687, 1996.

GOLDFINGER, L. E.; JIANG, L.; HOPKINSON, S. L.; STACK, S.; JONES, J. C. R. Spatial regulation and activity modulation of plasmin by high affinity binding to the G domain of the α_3 subunit of laminin-5. **J. Biol. Chem.**, V. 275, N. 45, P. 34887-34893, 2000.

GOTO, M.; KATAOKA, Y.; SATO, H. Decrease of saturation density in culture tumor cells by dextran sulfate. **Gann**, v. 63, p. 371-374, 1972.

GOTO, K.; KIMURA, T.; GOTO, M.; SATO, H. Isolation of a cell line insensitive to growth-restricting action of dextran sulfate from 3T6 cells. **Gann**, v. 68, p. 227-231, 1977.

GRAUFEL, V.; KLOAREG, B.; MABEU, S.; DURAND, P.; JOSEFONVICZ, J. New natural polysaccharides with potent antithrombotic activity: fucans from brown algae. **Biomaterials**, v. 10, p. 363-369, 1989.

HAMURO, J.; YAMASHITA, Y.; OHSAKA, Y.; MAEDA, Y. Y.; CHIHARAI, G. Carboxymethylpachymaran, a new water soluble polysaccharide with marked antitumor activity. **Nature**, v. 233, n. 5320, p. 486-8, 1971.

HARLAN, J. M. Leukocyte endothelial interactions. **Blood**, v. 65, p. 525, 1985.

HAROUN-BOUHEDJA, F.; ELLOUALI, M.; SINQUIN, C.; BOISSON-VIDAL, C. Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans. **Thrombosis Res.** v. 100, n. 5, p. 453-459, 2000.

HASKARD, D.; CAVENDER, D.; ZIFF, M. Phorbol ester stimulated T lymphocytes show enhanced adhesion to human endothelial cell monolayers. **J. Immun.**, v. 137, p. 1429-1434, 1986.

HELLERQVIST, C. G.; THURMAN, G.B.; PAGE, D. L.; WANG, Y. F.; RUSSELL, B. A.; MONTGOMERY, C. A.; SUNDELL, H. W. Antitumor effects of GBS toxin: A polysaccharide exotoxin from group B beta-hemolytic streptococcus. **J. Cancer Res. Clin. Onc.**, v.120, n.1-2, p. 63-70, 1993.

HOFFMAN, R. Carrageenans inhibit growth-factor binding. **Biochem. J.**, v. 289, p. 331-334, 1993.

HOFFMAN, M. P.; NOMIZU, M.; ROQUE, E.; LEE, S.; JUNG, D. W.; YAMADA, Y. KLEINMAN, H. K. Laminin-1 and laminin-2 G-domain synthetic peptides bind syndecan-1 and are involved in acinar formation of a human submandibular gland cell line. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 28633-28641, 1998.

HOGG, N., LANDIS, R.C., Adhesion molecules in cell interactions. **Current Opinions in Immunology**, v. 5, p. 383-390, 1993.

HORWITZ, A.; DUGAN, K.; GREGGS, R.; DECKER, C.; BUCK, C. The cell substrate attachment (CSAT) antigen has properties of a receptor for laminin and fibronectin. **J. Cell Biol.**, Bethesda, v. 101, p. 2134-2144, 1985.

HOWE, A.; APLIN, A. E.; ALAHARI, S. K.; JULIANO, R. L. Integrin signaling and cell growth control. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 10, p. 220-231, 1998.

HYNES, R. O. Integrins a family of cell surface receptors, **Cell**, Cambridge, v. 48, p. 549-554, 1987.

ITO, H.; SUGIURA, M. Antitumor polysaccharide fraction from *Sargassum thunbergii*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 24, p. 1114-1115, 1976.

ITOH, H.; NODA, H. AMANO, H.; ZHUANG, C.; MIZUNO, T.; ITO, H. Antitumor-activity and immunological properties of marine algal polysaccharides, especially fucoidan, prepared from *Sargassum thunbergii* of Phaeophyceae. **Anticancer Res.**, v. 13, n. 6A, p. 2045-2052, 1993.

JANSSON, P.; KENNE, L.; LIEDRGREN, H.; LINDEBERG, B.; LONNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **Chem. Commun.**, London, v. 8, p. 1-71, 1976.

JENNINGS, J. J.; CHRISTOPHERSON, T. Identification of 2-distinct human cellular-populations by L-fucose binding lectins. **Fed. Proc.**, v. 41, n. 4, p. 1032, 1982.

JOHNSON, H. M., RUSSELL, J. K., PONTZER, C. H. Superantigens in human disease. **Scientific American**, April, p. 42-73, 1992.

JOLLES, B.; GREENING, S. G. Effect of heparin upon tumor growth. **Acta Unio. Int. Cancr.**, v. 16, p. 682-685, 1960.

JOLLES, B.; REMINGTON, M.; ANDREWS, P. S. Effects of sulphated degraded laminarin on experimental tumour growth. **Brit. J. Cancer**, v. 17, n. 1, p. 109-8, 1963

JULIANO, R. L. Membrane receptors for extracellular matrix macromolecules: relationship to cell adhesion and tumor metastasis. **Bioch. Bioph. Acta.**, v. 907, p. 262-278, 1987.

KARIYA, Y.; WATABE, S.; HASHIMOTO, K.; YOSHIDA, K. Occurrence of chondroitin sulfate E in glycosaminoglycan isolated from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus*. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 25, p. 5081-5085, 1990.

KARIYA, Y.; WATABE, S.; KYOGASHIMA, M.; ISHIHARA, M.; ISHII, T. Structure of fucose branches in the glycosaminoglycan from the body wall of the sea cucumber *Stichopus japonicus*. **Carbohydr. Res.**, Kidlington, v. 297, p. 273-279, 1997.

KARSTEN, U.; BARROW, K. D.; KING, R. J. Floridoside, L-Isofloridoside and D-Isofloridoside in the red algae *Porphyra columbina* – Seasonal and osmotic effects. **Plant Physiol.**, v. 103, p. 185-491, 1993.

KATO, M. SAUNDERS, S.; NGUYEN, H.; BERNFIELD, M. Loss of cell surface syndecan-1 causes epithelia to transform into anchorage-independent mesenchyme-like cells. **Mol. Biol. Cell**, v. 6, p. 559-576, 1995.

KISHIMOTO, T. K.; O'CONNOR, K.; LEE, A.; ROBERTS, M. T.; SPRINGER, T. A. Cloning of the beta subunit of the leukocyte adhesion proteins: homology to an extracellular matrix receptor defines a novel supergene family. **Cell**, Cambridge, v. 48, p. 681-690, 1987.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R. S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. **Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Ver.**, v. 26, p. 259-315, 1988.

KOBAYASHI, Y.; YOSHIKAWA, T.; WATANABE, N. Tumor cytostasis mediated by LPS- or PSK-activated human plastic-adherent peripheral blood mononuclear cells. **Cellular Immunology**, v. 144, p. 358-366, 1992.

KOJIMA, T.; TABTA, K.; ITOH, W.; YANAKI, T. Molecular weight dependence of the antitumor activity of schizophyllan. **Agric. Biol. Chem.**, v. 50, p. 231-232, 1986.

KRAMER, R. H.; McDONALD, K. A.; CROWLEY, E.; RAMOS, D. M.; DAMSKY, C. H. Melanoma cell adhesion to basement membrane mediated by integrin related complexes. **Cancer Res.**, v. 49, p. 393-402, 1989.

KRAUS, J.; FRANZ, G. Immunomodulating effects of polysaccharides from medicinal plants. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 319, p. 299-308, 1992.

KREIDBERG, J. A. Functions of $\alpha 3 \beta 1$ integrin. **Curr. Opinion Cell Biol.**, London, v. 12, p. 548-553, 2000.

KUNOU, M.; AKAIKE, T.; HATANAKA, K. Effect of sulfated polysaccharide on hepatocyte adhesion. **J. Biomaterials Science**, v. 5, n. 3, p. 259-262, 1993.

LAWLER, J.; WEINSTEIN, R.; HYNES, R. O. Cell attachment to thrombospondin: The role of Arg-Gly-Asp, calcium, and integrin receptors. **J. Cell Biol.**, Bethesda, v. 109, p. 2455-2462, 1988.

LEITE, E. L.; MEDEIROS, M. G. L.; ROCHA, H. A. O.; FARIAS, G. G. M.; SILVA, L. F.; CHAVANTE, S. F.; ABREU, L. D. Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schroederi*. **Plant science**, v. 132, n. 2, p. 215-228, 1998.

LIU, J. M.; BOUHEDJA, F. H.; VIDAL, C. B. Analysis of the *in vitro* inhibition of mammary adenocarcinoma cell adhesion by sulphated polysaccharides. **Anticancer Res.**, v. 20, p. 3265-3272, 2000.

LOGEART D, LETOURNEUR D., JOZEFONVICZ J., KERN P. Collagen synthesis by vascular smooth muscle cells in the presence of antiproliferative polysaccharides. **J. Biomed. Mat Res.**, v. 30, p. 501-508, 1996.

LOGEART, D.; PRINGERRICHARD, S.; JOZEFONVICZ, J.; LETOURNEUR, D. Fucans, sulfated polysaccharides extracted from brown seaweeds, inhibit vascular smooth muscle cell proliferation. 1. Comparison with heparin for antiproliferative activity, binding and internalization. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 74, n. 4, p. 376-384, 1997.

LOWRY, O. L.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

MACKAY, C. R.; IMHOF, B. A. Cell adhesion in the immune system. **Immunolgy Today**, v. 14, p. 99-102, 1993.

MAEDA, Y. Y.; WATANABE, S. T.; CHIHARA, C.; ROKUTANDA, M. Denaturation and renaturation of a β -1,6:1,3-glucan, lentinan, associated with expretion of T-cell-mediated responses. **Cancer Res.**, v. 48, p. 671-675, 1988.

MAJCZAK, G. A. H. Polissacarídeos Sulfatados de *Sargassum stenophyllum* (Fucales, Phaeophyta) – Caracterização Química e Atividade Biológica. Curitiba, 1999, 108 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, UFPR.

MATSUNAGA, K.; MORITA, I.; IJIMA, H. *et al.* Effects of biological modifiers with different modes of action used separately and together on immune responses in mice with syngenic tumours. **J. Int. Med. Res.**, v. 20, p. 406-421, 1992.

McNEELY, W. H.; PETTIT, D. Algin. In: WISTLER, R. J. Industrial Gums. 2 ed. New York, Acad. New York, 1973. P. 49-81.

MEDCALF, D. G.; SCHNEIDER, T. L.; BARNETT, R. W. Structural features of a novel glucuronogalactofucan from *Ascomyllum nodosum*. **Carbohydr. Res.**, Kidlington, v. 66, P. 167-171, 1978.

MILLER, I. J.; FALSHAW, R.; FURNEAUX, R. H.; HEMMINGSON, J. A variation constituent sugars of the polysaccharides from New Zealand species of *Pachymenia* (Halymeniaceae). **Bot. Mar.**, v. 40, p. 119-127, 1997.

MILLER, I. J.; FURNEAUX, R. H. The strucutral determination of the agaroid polysaccharides from four New Zeland in the order Ceramiales by means of ^{13}C -NMR spectroscopy. **Bot. Mar.**, v. 40, p. 333-339, 1997.

MILLER, I. J.; BLUNT, J. W. New C-13 NMR methods for determining the structure of algal polysaccharides. Part 2. Galactans consisting of mixed diads. **Botanica Marina**, v. 43, n. 3, p. 251-261, 2000.

MISAKI, A.; KISHIDA, E.; KAKUTA, M.; TABATA, K. Antitumor fungal (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans: structural diversity and effects of chemical modification. In: Carbohydrates and Carbohydrate Polimers, ed. YALPANI, M. ATL Press, Mount Prospect, Illinois U.S.A., 1993. pp. 116-129.

MISHIMA, T.; MURATA, J.; TOYOSHIMA, M.; FUJII, H.; NAKAJIMA, M.; KATO, T.; SAIKI, L. Inhibition of tumor invasion and metastasis by calcium spirulan (CA-SP), a novel sulfated polysaccharide derived from a blue-green alga, *Spirulina platensis*. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 16, n. 6, p. 541-550, 1998.

MIZUNO, T.; ANDO, M.; SUGIE, R. *et al.* Antitumor activity of some polysaccharides from an edible mushroom *Ningyotake*, the fruiting body and the cultured micelium of *Polyporous confluens*. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 56, p. 34-41, 1992.

MIZUNO, T.; KINOSHITA, T.; ZHUANG, C. U. N.; ITO, H.; MAYUZUMI, Y. Antitumor-active heteroglycans from niohshimeji mushroom, *Tricholoma giganteum*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 59, n. 4, p. 568-571, 1995.

MIZUTANI, Y.; YOSHIDA, O. Activation by the protein-bound polysaccharide PSK (Krestin) of cytotoxic lymphocytes that act on fresh autologous tumor-cell and T24 human urinary-bladder transitional carcinoma cell-line in patients with urinary-bladder cancer. **J. Urology**, v. 145, n. 5, p. 1082-1087, 1991.

MORINO, M.; TSUZUKI, T.; ISHIKAWA, T.; SHIRAKAMI, T.; YOSHIMURA, M.; KIYOSUKE, Y. I.; MATSUNAGA, K.; YOSHIKUMI, C.; SAIJO, N. Specific regulation of HSPs in human tumor cell lines by PSK. **In Vivo**, v. 11, n. 3, p. 261-264, 1997.

MOSS, M. A.; ZIMMER, S.; ANDERSON, K. W. Role of metastatic potential in the adhesion of human breast cancer cells to endothelial monolayers. **Anticancer Res.**, v. 20, p. 1425-1434, 2000.

MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. S.; PAVÃO, M. S. G.; MULLOY, B.; TOLLEFSEN, D. M.; MOWINCKEL, M. C.; ABIDGAARD, U. Structural and anticoagulant activity of a eucosylated chondroitin sulfate from echinoderm – sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 23973-23984, 1996.

MULLOY, B. MOURÃO, P. A. S.; GRAY, E. Structure/Function studies os anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. **J. Biotechnol.**, v. 77, n. 1, p. 123-135, 2000.

NAGAOKA, M.; SHIBATA, H.; KIMURA-TAKAGI, I.; HASHIMOTO, S.; KIMURA, K.; MAKINO, T.; AIYAMA, R.; UYAMA, S.; YOKOKURA, T. Structural study of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus*. **Glycoconjugate J.**, v. 16, p. 19-26, 1999.

NAKAZAWA, S.; KURODA, H.; ABE, F.; NISHINO, T.; OTSUKI, M.; UMEZAKI, I. Antitumor effect of water-extracts from marine algae (I). **Chemotherapy**, v. 22, p. 1435-1422, 1974.

NISHINO, T.; YOKOYAMA, G.; DOBASHI, K.; FUJIHARA, M.; NAGUMO, T. Isolation, purification and characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides from the brown seaweed *Ecklonia kurome* and their blood-anticoagulant activities. **Carbohydr. Res.**, Kidlington, v. 186, p. 119-129, 1989.

NISHINO, T.; NAGUMO, T. The sulfate-content dependence of the anticoagulant activity of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. **Carbohydr. Res.**, Kidlington, v. 214, p. 193-197, 1991.

NISHINO, T.; NAGUMO, T. Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans. **Carbohydr. Res.**, Kidlington, v. 229, n. 2, p. 355-362, 1992.

NISHINO, T.; NAGUMO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H. Studies on polysaccharides from *Ecklonia kurome*. 2. Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from brown seaweed *Ecklonia kurome*. **Carbohydr. Res.**, Kidlington, v. 211, p. 77-90, 1991 a.

NISHINO, T.; KIYOHARA, G.; DOBASHI, K.; FUJIHARA, M.; NAGUMO, T. An anticoagulant fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. **Phytochem.**, v. 30, p. 535-539, 1991 b.

NODA, H.; AMANO, H.; ARASHIMA, K.; NISIZAWA, K. Antitumor activity of marine algae. **Hydrobiol.**, v. 204/205, p. 577-584, 1990.

NOSEDA, M. D.; TISCHER, C. A.; GORIN, P. A. J.; CEREZO, A. S. & DUARTE, M. E. R. NMR studies of polysaccharides from brown seaweeds. **Anais do VI Encontro de Usuários do Ressonância Magnética Nuclear**, p. 325-330, 1997.

NOSEDA, M. D.; TULIO, S.; DUARTE, M. E. Polysaccharides from the red seaweed *Bostrychia montagnei*: chemical characterization. **J. Apl. Phycology**, v. 11, p. 35-40, 1999.

NOSEDA, M. D., VIANA, A. G., DUARTE, M. E. R.; CEREZO, A. S. Akali modification of carrageenans. Part IV. Porphyrans as model compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 301-305, 2000.

OHNO, N.; SHINOHARA, H.; YADOMAE, T. Conformation of the (1→3)-beta-D-glucan in the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395 assessed by C-13-CP MAS NMR-spectroscopy. **Carbohydr. Res.**, Kidlington, v. 168, n. 1, p. 110-114, 1987.

O'NEIL, A. N. Sulphated derivatives of laminarin. **Can. J. Chem.**, v. 33, p. 1097-1101, 1955.

OOI, V. E. C.; LIU, F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. **Curr. Med. Chem.**, v. 7, n. 7, p.715-729, 2000.

ORR, S. F. D. Infra-red spectroscopic studies of some polysaccharides. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 14, n. 2, p. 173-181, 1954.

PAINTER, T. J. Algal Polysaccharides. In: ASPINALL, G. The polysaccharides, v. 2, p. 195-285, 1982.

PALLADINI, G.; LAURO, G. Observations sur la significativité de la coloration aux alcians pour les mucopolysaccharides. **Histochemie**, v. 16, p. 15-22, 1968.

PARDI, R.; INVERARDI, L.; BENDER, J. R. Regulatory mechanisms in leukocyte adhesion: flexible receptors for sophisticated travelers. **Immunology Today**, v. 13, p. 224-230, 1992.

PARISH, C. R.; SNOWDEN, J. McK. Sulphated polysaccharides having metastatic and/or anti-inflammatory activity. PCT Application No WO 88/05301. 1988.

PARISH, C. R.; COOMBE, D. R.; JAKOBSEN, K. B.; BENNETT, F. A.; UNDERWOOD, P. A. Evidence that sulphated polysaccharides inhibit tumor metastasis by blocking tumor-cell-derived heparanases. **Int. J. Cancer**, v. 40, p. 511-518, 1987.

PARK, J. T.; JOHNSON, M. J. A submicrodetermination of glucose. **J. Biol. Chem.**, v. 181, p. 149-151, 1949.

PATANKAR, M.S.; OEHNINGER, S.; BARNETT, T.; WILLIAMS, R.L.; CLARK, G.F. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological-activities **J. Biol. Chem.** v. 268, n 29, p. 21770-21776, 1993.

PAUL, J. Cell and tissue culture. 4 ed. London : Churchill Livingstone, 1973, p. 430.

PEARSON, L. C. The diversity and evolution of plants. CRC Press, p. 115-141, 1995.

PEAT, S.; TURVEY, J. R.; EVANS, J. M. The structure of floridean starch .1. linkage analysis by partial acid hydrolysis. **J. Chem. Soc.**, v. Nov., p. 3223-3227, 1959.

PEREIRA, E. C.; NASCIMENTO, S. C.; LIMA, R. C.; SILVA, N. H.; OLIVEIRA, A. F. M.; BANDEIRA, E.; BOITARD, M.; BERIEL, H.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity. *Tok. J. Exp. Clin. Med.*, v.19, n. 1-2, p. 47-52, 1994.

PEREIRA, M.S.; MILLOY, B. and MOURAO, P.A.S. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans - Comparison between the regular, repetitive , and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae. *J. Biol. Chem.*, v. 274, n. 12, p. 7656-7667, 1999.

PHILLIPS, H. J. Dye exclusion tests for cell viability. IN: KRUSE, M. K. (ed.) *Tissue culture, methods and applications*, Academic Press: New York, 1973, p. 406-408.

PIENTA, K. J., PARTIN, A. W., COFFEY, D. S. Cancer as a disease of DNA organization and dynamic cell structure. *Cancer Res.*, 49, 2525-2532, 1989.

PIENTA, K. J.; NAIK, H.; AKHTAR, A.; YAMAZAKI, K.; REPLOGLE, T. S.; LEHR, J.; DONAT, T. L.; TAIT, L.; HOGAN, V.; RAZ, A. Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 87, n. 5, p. 348-353, 1995.

POHLMAN, T. H.; STANNESS, K. A.; BEATTY, P. G.; OCHS, H. D.; HARLAN, J. M. An endothelial cell surface factor(s), induced *in vitro* by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor alfa mechanism. *J. Immun.*, v. 136, p. 4548-4553, 1986.

PREISSNER, K. T. Structure and biological role of vitronectin. *Annu. Rev. Cell Biol.*, v. 7, p. 275-310, 1991.

PYTELA, R.; PIERSCHBATER, M. D.; RUOSLAHTI, E. Identification and isolation of a 140 kDa cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell*, Cambridge, v. 40, p. 191-198, 1985.

PYTELA, R.; PIERSCHABACHER, M. D.; GINSBERG, M. H.; PLOW, E. F.; RUOSLAHTI, E. Platelet membrane glycoprotein IIB/IIIA – membre of a family of ARG-GLY-ASP specific adhesion receptors. *Science*, v. 231, n. 4745, p. 1559-1562, 1986.

READ, T. A.; SORENSEN, D. R.; MAHESPARAN, R.; ENGER, P. O.; TIMPL, R.; OLSEN, B. R.; HJELSTUEN, M.; HARALDSETH, O.; BJERKVIG, R. Local anti-angiogenic therapy of gliomas delivered by cells encapsulated in alginate: A promising new therapeutic concept. *Cancer Gene Therapy*, v. 7, n. 12, p. O10, Supl. S DEC, 2000.

REILLY, T. P.; BELLEVEUE, F. H. III; WOSRT, , P.; SVENSSON, H. Comparison of the in vitro cytotoxicity on hidroxilamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochem. Pharm.**, v. 55, p. 803-808, 1998.

REINHARDT, D.; MANN, K.; NISCHT, R.; FOX, J. W.; CHU, M. L.; KREIG, T.; TIMPL, R. Mapping of nidogen binding-sites for collagen type-IV, Heparan sulfate proteoglycan, and zinc. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 15, p. 10881-10887, 1993.

RIIKONEN, T.; VIHINEN, P.; POTILA, M.; RETTIG, W.; HEINO, J. Antibody against human alpha-1-beta-1 integrin inhibits HeLa-cell adhesion to laminin and to type-I, type-IV, and type-V collagens. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v. 209, n. 1, p. 205-212, 1995.

RIOU, D.; COLLIECJOUAULT, S.; DUSEL, D. P.; BOSCH, S.; SIAVOSHIAN, S.; LEBERT, V.; TOMASONI, C.; SINQUIN, C.; DURAND, P.; ROUSSAKIS, C. Antitumor and antiproliferative effects of a fucan extracted from *Ascophyllum nodosum* against a Non-small-cell Bronchopulmonary Carcinoma Line. **Anticancer Res.**, v. 16, n. 3A, p. 1213-1218, 1996.

ROCHA, H. A. O.; FRANCO, C. R. C.; TRINDADE, E. S.; CARVALHO, L. C. M.; VEIGA, S. S.; LEITE, E. L.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. A fucan from the brown seaweed *Spatoglossum schröderi* inhibits Chinese hamster ovary cell adhesion to several extracellular matrix proteins. **Bra. J. Med. Biol. Res.**, v. 24, p. 621-626, 2001.

ROSS, W. D.; VETVICKA, V. CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. **Clin. Exper. Immun.**, v. 92, p. 181-184, 1993.

RUGGERI, Z. M.; BADER, R.; DEMARCO, L. Glanzmanns thrombasthenia deficient binding of von Willebrand factor ro ghrombin-stimulated platelets. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington**, v. 79, p. 6038-6041, 1982.

RUOSLAHTI, E.; GIANCOTTI, G. Integrins and tumor cell dissemination. **Cancer Cells**, v. 1, p. 119-126, 1989.

RUOSLAHTI, E.; PIERSCHBATER, N. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. **Science**, v. 238, p. 491-497, 1987.

SAITÔ, H.; OHKI, T.; TAKASUKA, N.; SASAKI, T. N.M.R. spectral study of a gel-forming (1→3)-β-D-glucan, (lentinan) from *Lentinus edodes*, and its acid-degraded fractions. Structure and dependence of conformation on the molecular weight. **Carbohydr. Res.**, Kidlington, v. 58, p. 293-305, 1977.

SAITÔ, H.; YOSHIOKA, Y.; UEHARA, N.; AKETAGAWA, J.; TANAKA, S.; SHIBATA, Y. Relationship between conformation and biological response for (1→3)- β -D-glucans in the activation of coagulation Factor G from limulus amebocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. **Carbohydr. Res.**, Kidlington, v. 217, p.181-190, 1991.

SANCHES-MADRID, F.; NAGY, J.; ROBBINS, E.; SIMON, P.; SPRINGER, T. A. A human leukocyte differentiation antigen family with distinct alpha subunits and common beta subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1) and the p150,95 molecule. **J. Exp. Med.**, v. 158, p. 1785-1803, 1983.

SASAKI, T.; ABIKO, N.; NITTA, K.; TAKASUKA, N.; SUGINO, Y. Anti-tumor activity of carboxymethylglucans obtained by carboxymethylation of (1→3)-beta-D-glucan from *alcaligenes-faecalis* var *myxogenes* ifo-13140. **Eur. J. Cancer**, v. 15, p. 211-215, 1979.

SCHUPPAN, D., SOMASUNDARAM, R., JUST, M. The extracellular matrix: a major signal transduction network. IN: CLEMENT, B., GUILLOZO, A. (eds.) *Cellular and molecular aspects of cirrhosis*, v. 216, p. 115-133, 1992.

SCHOR, S. L. Cell-proliferation and migration on collagen substrata *in vitro*. **J. Cell Sci.**, v. 41, p. 159-175, 1980.

SHIBATA, H.; KIMURA-TAKAGI, I.; NAGAOKA, M.; HASHIMOTO, S.; SAWADA, H.; UEYAMA, S. YOKOKURA, T. Inhibitory effect of cladosiphon fucoidan on the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric cells. **J. Nutr. Sci. Vit.**, v. 45, n. 3, p. 325-336, 1999.

SLONEKER, J. H. Gas-liquid chromatography of aldktols acetates. **Methods Carbohydr. Chem.**, San Diego, v. 6, p. 20-24, 1972.

SOEDA, S.; ISHIDA, S.; HONDA, O.; SHIMENO, H.; NAGAMATSU, A. Aminated fucoidan promotes the invasion of 3 LL cells through reconstituted basement membrane – its possible mecanism of action. **Cancer Lett.**, v. 85, n. 1, p. 133-138, 1994 (a).

SOEDA, S.; ISHIDA, S.; SHIMENO, H.; NAGAMATSU, A. Inhibitory effect of oversulfated fucoidan on invasion through reconstituted basement membrane by murine Lewis lung-carcinoma. **Jap. J. Cancer Res.**, v. 85, n. 11, p. 1144-1150, 1994 (b).

SOEDA, S.; SHIBATA, Y.; SHIMENO, H. Inhibitory effect of oversulfated fucoidan on tube formation by human vascular endothelial cells. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 20, n. 11, p. 1131-1135, 1997.

SPRINGER, T. A.; TELOW, D. B.; DREYER, W. J. Sequence homology of the LFA-1 and Mac-1 leukocyte adhesion glycoprotein and unexpected relation to leukocyte interferon. **Nature**, v. 314, p. 540-542, 1985.

SPRINGER, T. A.; DUSTIN, M. L.; KISHIMOTO, T. K.; MARTIN, S. D. The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2 and LFA-3 molecules cell adhesion receptors of immune system. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 5, 1987.

SU, J. C.; HASSID, W. Z. Carbohydrates and nucleotides in red alga *Porphyra periorata*. 1. Isolation and identification of carbohydrates. **Biochem.**, v. 1, p. 468 - &, 1962.

SUEMASU, K.; ISHIKAWA, S. Inhibitive effect of heparin and dextran sulfate on experimental pulmonary metastases. **Gann**, v. 61, p. 125-130, 1970.

SUEMASU, K.; WATANABE, K.; ISHIKAWA, S. Contribution of dextran sulfate to inhibition of cancer metastasis. **Gann**, v. 62, p. 331-336, 1971.

SUZUKI, I., ITANI, T., OHNO, N. Effect of a polysaccharide fraction from *Grifola frondosa* on immune response in mice. **J. Pharmacobiodynamics**, v. 8, p. 217-226, 1985.

SUZUKI, T.; OHNO, N.; ADACHI, Y.; CIRELLI, A. F.; COVIAN, J. A.; YADOMAE, T. Preparation and biological activities of derivatives of (1→3)-β-D-glucans. **J. Pharmacobio-Dyn.**, v. 14, p. 256-266, 1991.

SUZUKI, Y.; KATAOKA, K.; KITADA, M.; WU, S.; HASHIMOTO, T.; OHNOSHI, K.; SUZUKI, K.; IDE, C.; ENDO, K.; NISHIMURA, Y.; TANIHARA, M. Spinal cord regeneration through alginate, a polysaccharide from seaweed. **Eur. J. Neurosci.**, v. 12, p. 287, 2000.

TAMKUN, J. W.; DESIMONE, D. W.; FONDA, D.; PATEL, R. S.; BUCK, C.; HORWITZ, A. F.; HYNES, R. O. Structure of integrins, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. **Cell**, Cambridge, v. 46, p. 271-282, 1986.

TAYLOR, R. L.; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxil groups. **Biochemistry**, v. 11: p. 1383-1388, 1972.

TETI, A. Regulation of cellular functions by extracellular-matrix. **J. Am. Soc. Nephrology**, v. 2, n. 10, p. S83-S87, 1992.

TIMPL, R.; BROWN, J. C. Supramolecular assembly of basement membranes, **BIOASSAYS**, V. 18, N. 2, P. 123-132, 1996.

TONN, J. C.; WUNDERLICH, S.; KERKAU, S. KLEIN, C. E.; ROOSEN, K. Invasive behavior of human gliomas is mediated by interindividually different integrin patterns. **Anticancer Res.**, v. 18, p. 2599-2605, 1998.

TSUKAGOSHI, S., HASHIMOTO, Y., FUJII, G. *et al.* Krestin (PSK). **Cancer Treat. Rev.**, v. 11, p. 131-151, 1984.

TULIO, S. **Polissacarídeos sulfatados isolados de *Bostrychia montagnei* (Rhodophyta, Ceramiales)**. Curitiba, 1998, 100 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, UFPR.

USOV, A. I. Sulfated polysaccharides of the red seaweeds. **Food hydrocolloids**, v. 6: p. 9-23, 1992.

USOV, A. I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. **Food Hydrocolloids**, v. 12, n. 3, p. 301-308, 1998.

VACCARI, M.; SILINGARDI, P.; ARGNANI, A.; HORN, W. GIUNGI, M.; MASCOLO, M. G.; GRILLI, S.; COLACCI, A. *In vitro* effects of fenretinide on cell-matrix interactions. **Anticancer Res.**, v. 20, p. 3059-3066, 2000.

VANKY, F., WANG, P., KLEIN, E. The polysaccharide K (PSK) potentiates *in vitro* activation of the cytotoxic function in human blood lymphocytes by autologous tumour cells. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, v. 35, p. 193-198, 1992.

VARNER, J. A.; CHERESH, D. A. Integrins and cancer. **Curr. Opinion Cell Biol.**, London, v. 8, p. 724-730, 1996.

VIANA, A. G. **Estudo dos carboidratos da alga vermelha *Porphyra spiralis* var *amplifolia*** Oliveira Filho e Coll: (Bangiales, Rhodophyta). Curitiba – PR, 1999. 43 p. Monografia – Bacharelado em Ciências Biológicas, UFPR.

VIEIRA, S. Introdução à bioestatística. Rio de Janeiro: Ed. Campus, 1981. P. 141-156.

VIEIRA, R. P.; MULLOY, B.; MOURÃO, P. A. Structure of a fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 13530-13536, 1991.

VISCHER, P.; BUDDECKE, E. Different action of heparin and fucoidan on arterial smooth muscle cell proliferation and thrombospondin and fibronectin metabolism. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 54, p. 407-414, 1991.

VOGEL, B. E.; TABONE, G.; GLANCOTTI, F. G.; GAILIT, J.; RUOSLAHTI, E. A novel fibronectin receptor with an unexpected subunit composition ($\alpha V/\beta 1$). **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 5934-5937, 1990.

WHYTE, J. N. C.; ENGLAR, J. R.; SAUNDERS, R. G.; LINDSAY, J. C. Seasonal-variations in the biomass, quantity and quality of agar, from the reproductive and vegetative stages of *Gracilaria liverrucosa* type. **Bot. Marina**, v. 24, n. 9, p. 493-501, 1981.

WILLIAMS, D. L.; PRETUS, H. A.; McNAMEE, R. B.; JONES, E. L.; ENSLEY, H. E.; BROWDER, I. W. Development of a water-soluble, sulfated (1→3)-β-D-glucan biological response modifier derives from *Saccharomices cerevisiae*. **Carbohydrate Carbohydr. Res.**, Kidlington, v. 235, p. 247-257, 1992.

YADOMAE, T. Structure and biological activities of fungal beta-1,3-glucans. **Yakugaku Zasshi – J. Pharm.b Soc. Japan**, v. 120, n. 5, p. 413-431, 2000.

YAMAMOTO, I.; NAGUMO, T.; FUJIHARA, M.; TAKAHASHI, M.; ANDO, Y.; OKADA, M.; KAWAI, K. Antitumor effect of seaweeds II: Fractionation and partial characterization of the polysaccharide with antitumor activity from *Sargassum fulvellum*. **Japan . Exp. Med.**, v. 47, p. 133-140, 1977.

YAMAMOTO, I.; TAKAHASHI, M.; SUZUKI, T.; SEINO, H.; MORI, H. Antitumor effect of seaweeds. IV. Enhancement of antitumor activity by sulfation of a crude fucoidan fraction from *Sargassum kjellmanianum*. **Japan J. Exp. Med.**, v. 54, n. 4., p. 143-151, 1984.

YAN, L.; FRENKEL, G. D. Effect of selenite on cell-surface fibronectin receptor. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 46, n. 1-2, p. 79-89, 1994.

YURCHENCO, P., SCHITTNY, J. Molecular architecture of basement membranes, **FASEB J.**, Bethesda, v. 4, p. 1577-1590, 1990.

YURCHENCO, P. D.; O'REAR, J. J. Basal lamina assembly. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 6, n. 5, p. 674-681, 1994.

ZHANG, L. N.; ZHANG, M.; ZHOU, Q.; CHEN, J. H.; ZENG, F. B. Solution properties of antitumor sulfated derivative of alpha-(1 → 3)-D-glucan from *Ganoderma lucidum*. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 64, n.10, p. 2172-2178, 2000.

ZETTER, B. R., The basis of site-specific tumor metastasis. **New Eng. J. Med.**, v. 322, p. 605-612, 1990.

ZHUANG, C.; ITOH, H.; MIZUNO, T.; ITO, H. Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, umitoranoo (*Sargassum tunbergü*). **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 59, n. 4, p. 563-567, 1995.

9. TRABALHO PUBLICADO

STEVAN, F. R.; BUCHI, D. F.; NOSEDA, M. D.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M.; DUARTE, M. E. R. Cytotoxicity against HeLa cells of polysaccharides from marine algae. **J. Submicrosc. Cytol. Patol.**, v.33, n. 3, 2001. In press.

10. RESUMOS EM CONGRESSOS

F. R. STEVAN; P. GREBOGE; BUCHI, D. F.; OLIVEIRA, M. B. M.; IACOMINI, M.; DUARTE, M. E. R. Cytotoxicity of Marine Algal Polysaccharides against HeLa cells **XXVII^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**. Caxambu - MG 23 à 27 de maio de 1998.

STEVAN, F. R.; GREBOGE, P.; BUCHI, D. F.; OLIVEIRA, M. B. M.; IACOMINI, M.; DUARTE, M. E. R. FUCOIDANS OF *Sargassum stenophyllum*: CITOTOXICITY AGAINST HeLa CELLS **XXVIII^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**. Caxambu - MG 23 à 27 de maio de 1999.

STEVAN, F. R., GREBOGE, P.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M.; DUARTE, M. E. R. Efeito Citotóxico das Fucanas de *Sargassum stenophyllum* contra Células HeLa **XI Congresso Científico do Hospital de Clínicas e Setor de Ciências da Saúde da UFPR**. Curitiba – PR 14 a 17 de abril de 1999.

STEVAN, F. R., GREBOGE, P.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M.; DUARTE, M. E. R. Estudos da ação de Polissacarídeos de Algas Marinhas contra Células HeLa **XI Congresso Científico do Hospital de Clínicas e Setor de Ciências da Saúde da UFPR**. Curitiba – PR 14 a 17 de abril de 1999.

STEVAN, F. R.; VEIGA, S. S.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M.; DUARTE, M. E. R. BIOLOGICAL EFFECTS AGAINST HeLa CELLS OF FUCOIDANS FRAGMENTS FROM *Sargassum stenophyllum*. **Ficologia 99**. Puerto Monte, Chile, novembro de 1999.

STEVAN, F. R.; VEIGA, S. S.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M.; DUARTE, M. E. R. EFFECTS OF FUCANS FROM *Sargassum stenophyllum* ON HeLa CELLS ADHESION **XXIX^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**. Caxambu - MG 27 à 30 de maio de 2000.

STEVAN, F. R.; VEIGA, S. S.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M.; DUARTE, M. E. R. EFFECTS OF HETEROFUCANS FROM *Sargassum stenophyllum* ON HeLa CELLS **XXX^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**. Caxambu - MG 19 à 22 de maio de 2001.