

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MONIQUE MEYENBERG CUNHA

EFEITOS DA GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *Schizolobium amazonicum* E SEUS DERIVADOS QUIMICAMENTE SULFATADOS EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2)

CURITIBA

2013

MONIQUE MEYENBERG CUNHA

EFEITOS DA GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *Schizolobium amazonicum* E SEUS DERIVADOS QUIMICAMENTE SULFATADOS EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências (Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial a obtenção do Título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Guilhermina Rodrigues Noleto.

Co – orientador(as): Prof.^a Dr.^a Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz e Prof.^a Dr.^a Sílvia Maria Suter Correia Cadena

CURITIBA

2013

TERMO DE APROVAÇÃO

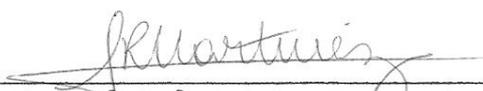
MONIQUE MEYENBERG CUNHA

EFEITOS DA GALACTOMANANA DE SEMENTES DE *Schizolobium amazonicum* E SEUS DERIVADOS QUIMICAMENTE SULFATADOS EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO (HepG2)

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências-Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca Examinadora:



Prof^a. Dr^a. Guilhermina Rodrigues Noletto (Orientadora)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof^a. Dr^a. Glauca Regina Martinez
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Prof^a. Dr^a. Selene Elifio Esposito
Escola de Saúde e Biociências - PUC-PR

Curitiba, 26 de fevereiro de 2013.

Dedico este trabalho as pessoas que são a razão da minha vida:
Meus pais Inara e José pelo amor e dedicação,
Meus irmãos Priscila e Emanuel,
Melissa, minha amada sobrinha e
Ao meu amor Gustavo.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por guiar todos os meus caminhos.

Aos meus Pais, Inara e José, por sempre acreditarem em mim, por todo amor incondicional, pelo apoio durante toda a minha vida e por não medirem esforços em me dar sempre do bom e do melhor. Pai e Mãe essa conquista é nossa!

Aos meus queridos e estimados Irmãos, Priscila e Emanuel, pois sem eles a vida seria completamente sem graça. Amo vocês!

A minha amada sobrinha Melissa, por tornar a minha vida mais alegre.

Ao meu Querido Noivo Gustavo, que sempre acreditou, me apoiou, entendeu todas as minhas ausências nos finais de semana de estudos e experimentos e por toda a dedicação que ele tem por mim. Muito obrigada. Eu amo você!

A toda a minha Família: minhas Avós queridas, Cecília e Leonilda, Tias e Primos!

À professora Dra. Guilhermina Rodrigues Noletto, pela orientação, dedicação, atenção e carinho.

À professora Dra. Carmen L. Oliveira Petkovicz, por me ensinar a trabalhar com os polissacarídeos e dar todas as dicas e conversas.

À professora Dra. Silvia Cadena, pela coorientação deste Trabalho e de sempre dar aquele “bom dia” especial.

À minha Amiga Irmã Thayne, pela sua amizade, amor, carinho e, principalmente, por sempre estar ao meu lado há mais de vinte anos de amizade.

Às minhas Queridas Amigas Carla, Paola, Luciana, Denise, Carina, Carimê e Carol Sales por entenderem a minha ausência, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Química de Carboidratos Vegetais, especialmente à Marília e ao João, por toda a ajuda nos experimentos, pelas conversas, risadas e em destaque à nossa amizade.

Ao Gustavo Jabor, pela ajuda nos experimentos e por me fazer acreditar em mim. Muito obrigada!

À Patrícia Peres, pela contribuição nos experimentos de dosagem de Glutational!

Aos colegas da Turma de Mestrado 2011-2013.

Aos irmãos que o Mestrado me deu: Juliana, Leandro, Maria Carolina e Lyvia! Sem vocês, o mestrado não seria tão divertido!

Ao Arquimedes, pelas análises de RMN.

Ao Diego pelas conversas, dicas e por toda a ajuda.

À Técnica Grazielli do Departamento de Química desta Universidade, pela ajuda com os experimentos de FTIR.

À Eliz e Rosane, pelas análises de HPSEC e GLC.

Às professoras do Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular, Maria Eliane Merlin, Gláucia Regina Martinez, Sheila B. Winnishofer por toda a dedicação e paciência.

Aos colegas do Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular: Ana Luiza, Anna Paula, Stephane, Carina, Thiago, Cristiane, Camila, Andréia, Elizabeth, Caroline, Juliana Amorim, Carolina Lane, Fernanda e Franciane por todo o apoio e por tornarem o ambiente de trabalho mais harmonioso.

À Amanda por ter paciência em explicar quando tinha dúvidas e por principalmente estar sempre disposta a ajudar.

À minha Querida Mãe Científica, Professora Dra. Fabíola R. S. Hancke, por ter me incentivado na minha vida acadêmica e por todo o apoio. Sem todo esse apoio, com certeza não estaria aqui.

Aos amigos da turma de Especialização em Biotecnologia da PUC-PR: Maria Fernanda, Caroline, Letícia e Fábio, pelas conversas animadas, pelos almoços de sábado e principalmente pela parceria.

E, por fim, porém, não menos importante a Pós Graduação em Ciências-Bioquímica e as Agências Financiadoras, CAPES-REUNI, Fundação Araucária e CNPq.

“A curiosidade é mais importante que o conhecimento”
Albert Einstein

RESUMO

Polissacarídeos das mais diversas fontes vêm sendo estudados quanto suas aplicações biológicas. Dentre esses polissacarídeos, destacam-se as galactomananas de fontes vegetais, que podem ser obtidas em forma pura e com um alto rendimento. Sementes de *Schizolobium amazonicum*, uma árvore brasileira nativa, contém galactomananas. O objetivo deste trabalho foi extrair e sulfatar quimicamente a galactomanana de *S. amazonicum* e avaliar as potenciais propriedades citotóxicas do polissacarídeo nativo e modificado em células do hepatocarcinoma humano (HepG2). Por extração aquosa do endosperma das sementes de *S. amazonicum* foi isolada uma galactomanana de relação Man:Gal 3,2:1 (SN) e massa molar $4,34 \times 10^5$ g/mol, determinada por espalhamento de luz. Análises de RMN ^{13}C e HPSEC demonstraram que o polissacarídeo estava livre de contaminantes e apresentava a estrutura clássica de galactomananas. A fração SN foi submetida à sulfatação utilizando ácido clorossulfônico, resultando nas frações S1 e S2, as quais apresentaram grau de sulfatação (DS) de 0,4 e 0,6, respectivamente. A sulfatação foi confirmada pela presença de bandas típicas no espectro de FT-IR e as análises de HPSEC indicaram que o processo de sulfatação também promoveu degradação da galactomanana. As análises de RMN ^{13}C indicaram que a sulfatação ocorreu preferencialmente nas hidroxilas dos carbonos 6 da galactose e manose não substituídas. No ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT, após 72 horas de tratamento das células HepG2, a galactomanana na sua forma nativa (SN) diminuiu a viabilidade celular cerca de 30%, 35% e 50% nas concentrações de 50, 100 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente. A galactomanana sulfatada com DS 0,4 (S1) nas concentrações de 100 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ promoveu um decréscimo na viabilidade dessas células em ~25% e 30%, respectivamente. No entanto, a galactomanana com D.S. de 0,6 não exerceu efeito na viabilidade celular. Pelo método do cristal violeta, nas mesmas condições de tratamento, SN, S1 e S2, não interferiram na viabilidade dessas células. Ao avaliar o mecanismo de citotoxicidade por citometria de fluxo observou-se que a galactomanana nativa na concentração de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ também não promoveu a parada do ciclo celular e não foi capaz de induzir a morte celular das células HepG2, em 72 horas de tratamento. Galactomananas nativa e sulfatada (S1) promoveram diminuição no consumo de oxigênio nas células HepG2 não permeabilizadas, após 72 horas de tratamento, nos quatro estados avaliados da respiração celular. No estado basal, na maior dose avaliada (250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) SN e S1 exerceram uma inibição de ~80% em relação ao controle. No estado leak, os dois polímeros (SN e S1) exerceram uma diminuição no consumo de O_2 em ~50% em todas as concentrações avaliadas e no estado desacoplado da respiração a diminuição do consumo de oxigênio foi ~90% para ambas as concentrações avaliadas. Tanto a galactomanana nativa quanto a sulfatada (S1) causaram um aumento na produção de lactato de aproximadamente 15% e conseqüentemente uma diminuição nos níveis de piruvato. Os efeitos apresentados pela galactomanana na sua forma nativa e sulfatada sobre o metabolismo mitocondrial a produção de lactato e piruvato nas células HepG2 sugerem que esses polímeros são modificadores de resposta biológica.

Palavras – chave: galactomananas, sulfatação, células HepG2, citotoxicidade

ABSTRACT

Due to their low toxicity, polysaccharides from different sources have been studied for their potential biological applications. Among these polysaccharides, there are galactomannans which may be obtained in pure form and in a high yield from seeds of some leguminous species, such as *Schizolobium amazonicum*, a Brazilian native tree. The aim of this study was to extract and sulfate galactomannan from *S. amazonicum* and evaluate the potential cytotoxic properties of native and modified polysaccharide in human hepatocarcinoma cells (HepG2). Aqueous extraction of the seeds endosperm from *S. amazonicum* furnished a galactomannan with Man: Gal 3.2:1 (SN) and molar mass of 4.34×10^5 g/mol, determined by light scattering. ^{13}C NMR analysis and HPSEC demonstrated that the polysaccharide was free from contaminants and had the classical structure of galactomannans. The SN fraction was subjected to sulfation using chlorosulfonic acid, resulting in fractions S1 and S2, which showed the degree of sulfation (DS) of 0.4 and 0.6, respectively. The sulfation was confirmed by the presence of characteristic bands in the spectrum of FT-IR and HPSEC analyzes indicated that the process of sulfation also promoted degradation of the galactomannan. ^{13}C NMR analyzes indicated that sulfation of the hydroxyl occurred preferentially at C-6 of unsubstituted mannose and galactose units. The cytotoxicity against HepG2 cells was determined by the MTT method, after 72 hours of treatment the galactomannan in native form (SN) decreased cell viability 30%, 35% and 50% at concentrations of 50, 100 and 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectively. The sulfated galactomannan with 0.4 DS (S1) at concentrations 100 and 250 $\mu\text{.mL}^{-1}$ caused a decrease in the viability of these cells by $\sim 25\%$ and 30% respectively. However, the galactomannan with DS 0.6 had no effect on cell viability. By the method of crystal violet under the same treatment conditions, SN, S1 and S2, did not affect the viability of these cells. Flow cytometry showed that the native galactomannan at concentration of 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ also did not promote cell cycle arrest and was not able to induce cell death of HepG2 cells at 72 hours treatment. Native and sulfated galactomannans (S1) led to a decrease in oxygen consumption in non-permeabilized HepG2 cells after 72 hours of treatment. At the basal state, the highest dose evaluated (250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) S1 and SN exerted an inhibition of $\sim 80\%$ compared to control. At the Leak state, the two polymers (SN and S1) brought a decrease in O_2 consumption in $\sim 50\%$ at all concentrations evaluated in the uncoupled state the consumption was $\sim 90\%$ for both concentrations evaluated. Both the native and sulfated galactomannan (S1) caused an increase in lactate production by approximately 15% and consequently a decrease in the levels of pyruvate. The effect produced by the native galactomannan and the sulfated form on the mitochondrial metabolism of lactate and pyruvate production in HepG2 cells suggests that these polymers are biological response modifiers.

Key-words: galactomannans, sulfation, HepG2 cells, citotoxicity

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA DE UMA GALACTOMANANA DE RAZÃO DE 3:1 (MANOSE: GALACTOSE)	24
FIGURA 2 - ESQUEMA DOS FATORES DE RISCO PARA O HEPATOCARCINOMA	31
FIGURA 3 - OS MECANISMOS MOLECULARES QUE PODEM DAR ORIGEM AO EFEITO WARBURG	36
FIGURA 4 - ALVOS QUE SÃO VISADOS NO METABOLISMO DO TUMOR	37
FIGURA 5 - ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	40
FIGURA 6 - ASPECTOS GERAIS E SEMENTES DE <i>Schizolobium amazonicum</i>	53
FIGURA 7 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC UTILIZANDO O ESPALHAMENTO DE LUZ MULTIANGULOS (MALLS) E DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) DO POLÍMERO SN	55
FIGURA 8 - ESPECTROS DE INFRAVERMELHO (FTIR) DAS GALACTOMANANAS SN (A), S1 (B) E S2 (C) EM PASTILHAS DE KBr	59
FIGURA 9 - ESPECTROS DO RMN ¹³ C DOS POLÍMEROS SN (A), S1 (B) E S2 (C) DE <i>S. amazonicum</i>	61
FIGURA 10 - PERFIL DE ELUIÇÃO HPSEC-MALLS/RI DA GALACTOMANANA OBTIDA PELA REAÇÃO DE SULFATAÇÃO E RESSULFATAÇÃO DE S1 E S2 RESPECTIVAMENTE	62
FIGURA 11 - EFEITO DE SN, S1 E S2 SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS HepG265	
FIGURA 12 - EFEITO DOS POLÍMEROS SN, S1 E S2 NA VIABILIDADE CELULAR EM 72 HORAS DE TRATAMENTO NAS CÉLULAS HepG2, PELO MÉTODO DO CRISTAL VIOLETA	68
FIGURA 13 - ANÁLISE DO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS HepG2	70
FIGURA 14 - ANÁLISE DE MORTE CELULAR DAS CÉLULAS HepG2 TRATADAS COM SN, AAS E CISPLATINA	72
FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO QUANTITATIVA DA ANÁLISE DE MORTE DAS CÉLULAS HepG2 TRATADAS COM SN, AAS E CISPLATINA.	74
FIGURA 16 - TRAÇADO REPRESENTATIVO DA ANÁLISE DO CONSUMO DE OXIGÊNIO PELAS CÉLULAS HepG2 TRATADAS SOMENTE COM O MEIO (DMEM).	77

FIGURA 17 - EFEITO DE SN E S1 SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO DAS CÉLULAS HepG2 _____	79
FIGURA 18 - EFEITOS DE SN E S1 NA PRODUÇÃO DE LACTATO E PIRUVATO POR CÉLULAS HepG2 _____	81
FIGURA 19 - REDUÇÃO REVERSÍVEL DO PIRUVATO A LACTATO _____	82

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN ^{13}C PARA O POLÍMERO SN _____ 55

TABELA 2 - DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SULFATAÇÃO (DS) E PORCENTAGEM DE ENXOFRE (%S) DAS FRAÇÕES SN, S1 E S2 OBTIDAS DAS SEMENTES DE *S. amazonicum* _____ 58

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ACS	– American Cancer Society
ATP	– Adenosina Trifosfato
CD83	– Glicoproteína membro da família Ig
CD206	– Receptor de manose C do tipo 1
DMEM	– Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	– Dimetil sulfóxido
EDTA	– Ácido etilenodiaminotetracético
EROs	– Espécies Reativas de Oxigênio
FCCP	– Carbonil cianeto p-trifluormetoxifenilhidrazona
FT-IR	– Fourier Transform Infrared spectroscopy
FITC	– Isotiocianato de fluoresceína
GLC	– Cromatografia de gás líquido
HEPES	– N- (2-hidroxiethyl) piperazina N' (ácido 2-etano sulfônico)
HPSEC-	– Cromatografia de exclusão estérica acoplada a detectores de
MALLS/RI	espalhamento de luz laser em multiângulos e índice de refração
HB4C5	– Células do hibridoma humano
HSV-1	– Vírus herpes simplex
IFN- γ	– Interferon gama
HBSS	– Solução salina balanceada de Hanks
IL-1	– Interleucina 1
IL-2	– Interleucina 2
IL-1 β	– Interleucina 1 beta
IL-6	– Interleucina 6
IL-8	– Interleucina 8
IL-10	– Interleucina 10
IL-12	– Interleucina 12
INCA	– Instituto Nacional do Câncer
MRB	– Modificador de Resposta Biológica
MTT	– Brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
NADH	– Nicotinamida Adenina Dinucleótido Hidreto

NAD ⁺	– Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NFκβ	– Fator nuclear Kappa Beta
PI	– Iodeto de Propídio
TNFα	– Fator de Necrose Tumoral alfa
THP-1	– Leucemia aguda humana monocítica
SN	– Galactomanana nativa
S1	– Galactomanana sulfatada 1
S2	– Galactomanana sulfatada 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 POLISSACARÍDEOS VEGETAIS COMO MODIFICADORES DE RESPOSTA BIOLÓGICA	19
2.2 GALACTOMANANAS	23
2.2.1 Atividade biológica das galactomananas nativas e quimicamente modificadas	26
2.3 AÇÃO DE POLISSACARÍDEOS NO HEPATOCARCINOMA HUMANO	30
2.4. ALGUNS ASPECTOS DO METABOLISMO DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS	34
3 OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	40
5 MATERIAL E MÉTODOS	41
5.1 REAGENTES E MATERIAIS	41
5.2 OBTENÇÃO DAS SEMENTES	41
5.3 EXTRAÇÃO DO POLISSACARÍDEO	42
5.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA	42
5.5 SULFATAÇÃO	43
5.6 CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS SULFATADOS	43
5.6.1 Determinação do grau de sulfatação (DS)	43
5.6.2 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)	44
5.6.3 Análise de infravermelho (FT-IR)	44
5.6.4 Determinação da Homogeneidade e Massa Molar	45
5.7 CÉLULAS	45
5.8 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE GALACTOMANANA PARA OS ENSAIOS BIOLÓGICOS	46
5.8.1 Dosagem de carboidratos totais	46
5.9.1 Meio de cultura para as células HepG2	46

5.9.2 Solução de tripsina-EDTA _____	47
5.9.3 Solução salina fosfato tamponada (PBS) _____	47
5.9.4 Solução salina balanceada de Hanks (HBSS) _____	47
5.10 MÉTODOS ANALÍTICOS _____	48
5.10.1 Viabilidade celular pelo método do MTT _____	48
5.10.2 Viabilidade celular pelo método do cristal violeta _____	48
5.10.3 Análise do Ciclo Celular por citometria de fluxo _____	49
5.11 ANÁLISE DO METABOLISMO DAS CÉLULAS HepG2 _____	50
5.11.1 Consumo de oxigênio _____	50
5.11.2 Determinação dos Níveis de Lactato e Piruvato _____	51
5.12 AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE MORTE CELULAR _____	51
5.12.1 Marcações com Anexina V e Iodeto de propídio _____	51
5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA _____	52
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	53
6.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO POLISSACARÍDEO DO ENDOSPERMA DE SEMENTES DE <i>Schizolobium amazonicum</i> _____	53
6.2 SULFATAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS SULFATADOS _____	56
6.3 ENSAIOS EM CULTURA DE CÉLULAS HepG2 _____	63
6.3.1 Efeitos dos polissacarídeos SN, S1 e S2 sobre a viabilidade de células HepG2 ____	63
6.4 EFEITOS DA GALACTOMANANA NATIVA E SEU DERIVADO SULFATADO SOBRE ALGUNS PARÂMETROS DO METABOLISMO DAS CÉLULAS HepG2 _____	75
7. CONCLUSÕES _____	83
REFERÊNCIAS _____	84

1 INTRODUÇÃO

Devido à sua baixa toxicidade, polissacarídeos das mais diversas fontes têm sido estudados quanto as suas aplicações biológicas, dentre os quais estão: os polissacarídeos de líquens (CARNEIRO-LEÃO, 1997; NOLETO *et al.*, 2002; MARTINICHEN, 2005;), bactérias (HELLERQVIST *et al.*, 1993; SURANA; KASPER, 2012), algas marinhas (STEVAN, 2001; TALARICO *et al.*, 2004; MAO *et al.*, 2009; WIJESEKARA; PANGESTUTIA; KIMA, 2011), fungos (MIZUNO *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2003) e plantas superiores (SILVEIRA, 2010; AMARAL, 2011; FARIAS, 2012; ZONG; CAO; WANG; 2012). Dentre estes, nos últimos anos, os polissacarídeos de origem vegetal emergiram como uma importante classe de produtos naturais bioativos (VON POSER, 2001).

Entre os polissacarídeos de origem vegetal destacam-se as galactomananas. Estes polissacarídeos podem ser obtidos de sementes em uma forma pura e com elevados rendimentos. Estudos têm demonstrado que galactomananas podem apresentar atividade imunomoduladora (NOLETO *et al.*, 2002; DUNCAN *et al.*, 2002; LEUNG *et al.*, 2004; SANTANDER *et al.*, 2011), antiviral (BABA *et al.*, 1988; ONO *et al.*, 2003; GEMIN, 2008), atividade leishmanicida (NOLETO *et al.*, 2002; AMARAL, 2011) e atividade antineoplásica (INGOLFSDOTTIR *et al.*, 1994; GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2007b).

Em doenças neoplásicas, diferentes polissacarídeos vêm sendo muito estudados, por serem menos tóxicos para as células normais. A quimioterapia e a radioterapia são tratamentos considerados muito agressivos, visto que, estes, acarretam uma série de efeitos colaterais. Visando melhorar a terapia do câncer, tratamentos com polissacarídeos de diferentes fontes têm sido propostos por diferentes autores (HAN *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2006; KWON *et al.*, 2006; KOYANAGI *et al.*, 2006; YIN *et al.*, 2010; ZENG *et al.*, 2012; LIANG *et al.*, 2012).

Mesmo variando amplamente quanto a sua composição química, algumas correlações podem ser feitas entre as características estruturais e a atividade biológica de polissacarídeos. Entre as características reconhecidas pela sua relação com alguns tipos de atividade biológica destaca-se a presença de grupos sulfato (MARTINICHEN *et al.*, 2005; GEMIN, 2008; KARMAKAR *et al.*, 2010; WIJESINGHE *et al.*, 2011; TELLES *et al.*, 2011).

Os polissacarídeos sulfatados podem ser de origem natural, semi-sintética ou sintética (HUANG *et al.*, 2003). Esses polissacarídeos possuem uma ampla atividade biológica, mostrando-se mais eficazes do que os polissacarídeos nativos, não sulfatados.

Tendo em vista o interesse no descobrimento de compostos com atividade antitumoral e o expressivo efeito antitumoral observado para polissacarídeos, bem como a escassez de estudos relacionados à galactomanana de *Schizolobium amazonicum* e seu derivado quimicamente sulfatado frente a células tumorais o presente trabalho propõe avaliar a atividade antitumoral da galactomanana de *S. amazonicum* e seu derivado quimicamente sulfatado em células de hepatocarcinoma humano (células HepG2).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 POLISSACARÍDEOS VEGETAIS COMO MODIFICADORES DE RESPOSTA BIOLÓGICA

Ao longo dos anos tem sido demonstrado que os polissacarídeos apresentam um amplo espectro de efeitos biológicos como antibióticos, antioxidantes, antimutagênicos, anticoagulantes, antiviral, imunomoduladores e anticancer (DAMONTE *et al.*, 2004; CHRESTANI *et al.*, 2009; ZONG; CAO; WANG, 2012). Essa diversidade de efeitos possibilitou caracterizar estas moléculas como modificadores de resposta biológica (MRB) (OLDHAM *et al.*, 1983; BOHN; BeMILLER, 1995; CALABRESI *et al.*, 1995; LEUNG *et al.*, 2006). As atividades de imunoestimulação são os alvos da maioria dos estudos com polissacarídeos, pois podem resultar em diversos efeitos benéficos ao organismo. Neste aspecto, os macrófagos são células importantes para a ação de diversos polissacarídeos, pois possuem um papel central na resposta imunológica do hospedeiro (SCHEPETKIN; QUINN, 2005) e quando ativados desencadeiam diversos mecanismos de defesa como citotoxicidade microbiana e tumoricida (LEUNG *et al.*, 2006).

Em relação a atividade antitumoral diversos estudos sugerem que os polissacarídeos podem inibir o crescimento do tumor por meio dos seguintes mecanismos: 1) prevenção da tumorigênese pela ingestão oral de preparações ativas; 2) atividade citotóxica direta, como a indução da morte celular por apoptose; 3) imunoestimulação em combinação com quimioterapia e 4) inibição de metástase (ZONG; CAO; WANG, 2012). Alguns polissacarídeos moduladores de funções dos macrófagos têm sido utilizados como adjuvantes no tratamento de diversos tipos de cânceres (FOON, 1989; MATSUNAGA *et al.*, 1992; CHEN *et al.*, 2010; ROSÁRIO *et al.*, 2011).

As β -glucanas de diferentes fontes são os polissacarídeos mais estudados como MRB (BOHN; BeMILLER, 1995; TZIANABOS, 2000; CHEN *et al.*, 2010; CHLUBNOVÁ *et al.*, 2011). Estas substâncias, altamente conservadas, representam componentes estruturais da parede celular de fungos (SYNYTSYA; NOVÁK, 2013), leveduras, plantas superiores e algas marinhas (BLASCHEK *et al.*, 1992; CHEN *et al.*, 2011). Os efeitos das glucanas já foram comprovados em algumas doenças, como por exemplo, as neoplásicas

(CHEN *et al.*, 2010). O papel significativo de glucanas no tratamento do câncer, atividade imunomoduladora e recuperação de danos na medula óssea já foram estabelecidos (VETVICKA, 2011).

Além das β -glucanas, outras classes de polissacarídeos como mananas, arabinogalactanas, xiloglucanas, pectinas e polissacarídeos sulfatados têm sido estudados visando aplicações terapêuticas (WANG *et al.*, 1992; NOLETO *et al.*, 2004; LEUNG *et al.*, 2004; MORETÃO *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2006, AMORIM, 2012).

Manana de levedura (MPOLY) a partir de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ aumentou a produção de óxido nítrico de macrófagos peritoneais em 55% e inibiu a produção de ânion superóxido na presença de éster de forbol. O complexo deste polímero com íon vandilo não interferiu na produção de óxido nítrico, porém mostrou-se extremamente citotóxico para os macrófagos peritoneais de camundongos (NOLETO *et al.*, 2004).

Mananas acetiladas contendo unidades de galactose provenientes de *Aloe vera* L. induziram o recrutamento de células T e atividade estimulatória de macrófagos em camundongos evidenciada pelo aumento da produção de NO•. A ativação de macrófagos por polissacarídeos extraídos da *Aloe vera* L., pode restaurar ou mesmo aumentar o reconhecimento do antígeno pelo anticorpo (LEUNG *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2006).

Wang *et al.* (1992) avaliaram a atividade antitumoral de polissacarídeos isolados de uma planta medicinal *Acanthopanax giraldii* frente ao Sarcoma 180 em camundongos. O polissacarídeo foi administrado via endovenosa nos camundongos em uma concentração de 5 e 25 mg/Kg e demonstrou ser eficaz no tratamento antitumoral prolongando a sobrevivência dos animais devido à capacidade de aumentar a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongos.

Um heteropolissacarídeo ácido, contendo arabinose e galactose em sua estrutura (ARAGAL) foi capaz de ativar macrófagos peritoneais de camundongos *in vitro* (MORETÃO, 2003). Macrófagos obtidos de animais tratados com ARAGAL também apresentaram características morfológicas de macrófagos ativados. E ainda, 25 mg.mL^{-1} de ARAGAL promoveu atividade máxima da capacidade fagocítica e aumentou a produção de ânion superóxido em aproximadamente 70%. Em outro estudo ARAGAL na concentração de 200 mg/kg aumentou em 88% a capacidade elicitora de células para a cavidade peritoneal e aumentou os níveis de TNF- α de macrófagos peritoneais de animais

tratados com o polímero, o que pode ter sido importante para a atividade antitumoral contra o Sarcoma 180 (MORETÃO *et al.*, 2004).

Quatro frações polissacarídicas constituídas de unidades de D-rhamnose, D-arabinose, D-glucose e D-galactose isoladas de *Ornithogalum caudatum*, foram avaliadas quanto à atividade antitumoral de Sarcoma 180 (CHEN *et al.*, 2010). As frações nas concentrações de 0,01 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram administradas pela via intraperitoneal em camundongos com o tumor estabelecido. Os autores sugerem que a atividade antitumoral pode ser decorrente da ativação da resposta imune do hospedeiro, evidenciada pelo estímulo de células T e produção de citocinas (TNF- α e IFN- γ).

As xiloglucanas nativas e modificadas têm sido alvo de vários estudos visando avaliar suas atividades biomoduladoras. Xiloglucanas de tamarindo (*Tamarindus indica*), modificadas a diferentes graus de sulfatação, exibiram atividade antiviral contra o vírus da rubéola (MASTROMARINO *et al.*, 1997) e aumento da capacidade fagocítica em macrófagos humanos (PAULY *et al.*, 1999). Xiloglucana de *Tropaeolum majus* apresentou atividade antimutagênica em estudo em que a mutagênese foi induzida pelo composto nitroaromático 1-nitropireno (HENSEL; MEIER, 1999). Rosário *et al.* (2008) demonstraram que xiloglucanas extraídas de *Copaifera langsdorffii*, *Hymenaea courbaril* e *Mucuna sloanei* apresentaram atividade elicitora de células para a cavidade peritoneal de camundongos, além de estimular a produção de óxido nítrico pelos macrófagos. Em outro estudo, xiloglucanas nativas e modificadas por intermédio da remoção de resíduos de fucose foram avaliadas em macrófagos peritoneais de camundongos (ROSÁRIO *et al.*, 2011). Os autores observaram que os polissacarídeos estimularam a produção das citocinas interleucina 1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) por macrófagos em diferentes graus de intensidade.

Xiloglucanas de reserva extraídas de sementes de *Hymenaea courbaril* (Jatobá) (SILVEIRA, 2010), promoveram um aumento na proliferação das células HeLa de maneira dose-dependente, onde observou-se uma variação de ~65% a 156% em relação ao controle, o qual foi considerado 100%, em um tempo de 24 horas de tratamento. Em 48 horas de tratamento, observou-se um aumento na proliferação de ~19% a 38% em relação ao controle. Além disso, a xiloglucana aumentou a capacidade fagocítica de macrófagos RAW 264.7 em até 106% em uma concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Em relação às pectinas efeitos importantes sobre a modulação de funções de macrófagos tem sido observados. Amorim (2012) avaliou os efeitos de uma pectina naturalmente acetilada isolada de *Theobroma cacao* L. denominada OP, sua forma parcialmente desacetilada (PDOP) e uma pectina com família de homogalacturonanas (PG), foram avaliadas quanto ao seu potencial de modular algumas funções de macrófagos. Os resultados mais importantes foram para o polímero PDOP ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) que aumentou a produção de óxido nítrico em 250% em 48 horas e de TNF- α em 87% após 6 horas de tratamento na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Na mesma concentração ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Neste estudo foi verificado que a intensidade de efeitos está diretamente relacionada com as características estruturais dos polímeros, uma vez que a desatilação da pectina favoreceu melhor efeito na ativação dos macrófagos.

Kangussu-Marcolino (2010) avaliou *in vitro* a atividade leishmanicida sobre as formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* de polissacarídeos sulfatados obtidos de macroalgas marinhas. O Go3 (heteroraminana sulfatada), Iota-Gy (galactana kappa-iota-nu-carragenana) e EHW-I (galactana iota-nu-carragenana). O polissacarídeo Go3 apresentou atividade a partir da concentração $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ chegando a 55% de inibição em $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Iota-Gy iniciou sua atividade já em $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e atingiu 50% de inibição em $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. EHW-I exibiu o efeito leishmanicida mais intenso em todas as concentrações, atingindo 98% de inibição em $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Aumento na produção de óxido nítrico e capacidade sequestradora de anion superóxido também foram observados.

Amaral (2011) avaliou os efeitos de diferentes polissacarídeos de fontes vegetais e complexados com metal oxovanádio (IV/V) sobre a ativação de macrófagos e atividade leishmanicida. Os resultados obtidos neste estudo indicam que os polissacarídeos nativos (galactomananas) são moduladores de funções dos macrófagos, via produção de interleucinas (IL1 β , IL-6, IL-10) e os polissacarídeos complexados potencializaram a atividade leishmanicida contra as formas amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*.

Outra classe que desperta interesse a respeito de suas atividades biológicas, tanto das formas nativas como modificadas são as galactomananas. Por ser objeto de estudo deste trabalho os efeitos de galactomananas nativas e modificadas como modificadoras de resposta biológica será apresentada no item 2.2.1.

Todavia, o estudo envolvendo polissacarídeos de fontes vegetais poderá proporcionar uma oportunidade para o descobrimento de novos agentes terapêuticos e de adjuvantes que exibam propriedades imunomoduladoras (TZIANABOS, 2000; SCHEPETKIN; QUINN, 2005).

2.2 GALACTOMANANAS

As galactomananas de fontes vegetais são polissacarídeos hidrossolúveis compostos por uma cadeia principal de unidades D- manopiranosose unidas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4), com ramificações laterais de unidades de D- galactopiranosose unidas por ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 6) (FIGURA 1) (DEA; MORRISON, 1975; GANTER, 1991; GANTER *et al.*, 1994; PETKOWICZ *et al.*, 1998; SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005; VENDRUSCULO *et al.*, 2008;).

A principal fonte de galactomananas em espécies vegetais é o endosperma de sementes, onde atuam como polissacarídeo estrutural e de reserva. A maioria das sementes que armazenam galactomananas pertence à família Leguminosae, porém também podem ser encontradas em sementes de famílias como Annonaceae, Compositae, Palmae, Tiliaceae, Lagoniaceae e Umbeliferae (DEA; MORRISON, 1975; BUCKERIDGE *et al.*, 1992; REID; EDWARDS, 1995; SCHERBUKHIN; ANULOV, 1999).

A presença de galactomanana no endosperma permite que este atue em diferentes funções fisiológicas, como fonte de reserva de energia para a germinação das sementes e retenção de água pela solvatação, prevenindo que as sementes fiquem secas, evitando a desnaturação de proteínas, em especial as enzimas que são essenciais para a germinação das sementes (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005).

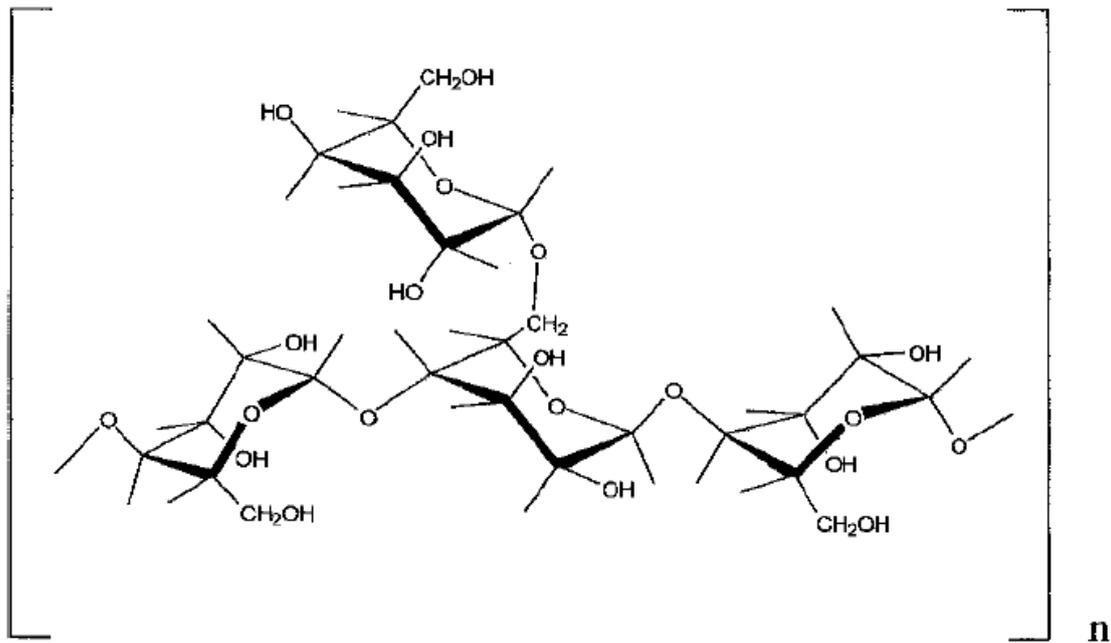


FIGURA 1 - ESTRUTURA DE UMA GALACTOMANANA DE RAZÃO DE 3:1 (MANOSE: GALACTOSE)
 FONTE: MERCE *et al* (2001).

O grau de ramificação por galactose costuma ser descrito pela relação Man:Gal e pode variar de acordo com as espécies vegetais e metodologia empregada para a extração (BUCKERIDGE *et al.*, 1992; GANTER *et al.*, 1994). As três subfamílias de Leguminosae (Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae) são distinguidas pela razão Man:Gal em suas sementes (BUCKERIDGE; DIETRICH; LIMA, 2000).

Em geral, o grau de substituição ou ramificação das galactomananas de sementes varia de 20 a 100% (GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2007a). A massa molar, o conteúdo e a distribuição das unidades de galactose afetam as propriedades para aplicações das galactomananas (KOOIMAN, 1971; GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2007a).

Dependendo do grau de ramificação com galactose, as galactomananas podem ser facilmente extraídas com água quente durante algumas horas e, em seguida, precipitada com etanol ou metanol, sendo os solventes mais comumente usados. Após a resuspensão em água, e após secagem, normalmente um material de aspecto de algodão macio e branco é obtido (BUCKERIDGE; DIETRICH; LIMA 2000).

As galactomananas são utilizadas em aplicações diversas como nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (SITTIKIYOTHIN; TORRES; GONÇALVES, 2005).

Na indústria alimentícia, as aplicações das galactomananas são em produtos lácteos, produtos em pó, pães, produtos dietéticos, formulações de leite infantis, temperos, molhos e sopas (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005; CERQUEIRA *et al.*, 2011).

O uso de galactomananas em filmes poderia ser uma ótima contribuição ao meio ambiente (CERQUEIRA *et al.*, 2009; CERQUEIRA *et al.*, 2011), uma vez que a embalagem com base em materiais sintéticos convencionais conduz a graves problemas ambientais.

Na indústria farmacêutica, as galactomananas podem ser empregadas como aditivos para modificar a viscosidade do produto final devido suas propriedades reológicas e sua solubilidade, que depende do grau de substituição. Por não serem absorvidas pelo organismo humano, sua adição a alimentos dietéticos é muito promissora. Com a adição de gomas guar em alimentos ricos em carboidratos, a quantidade de glucose e insulina após as refeições, pode ser reduzida substancialmente no sangue (ROBINSON *et al.*, 1982; ELLIS *et al.*, 1991).

As galactomananas isoladas não formam géis, mas podem interagir sinergicamente com outros polissacarídeos que também não gelificam resultando na formação de géis, como por exemplo, o sistema galactomanana-xantana e galactomanana-carragenana. Essas interações têm sido amplamente estudadas e tem sido aplicada para produzir novos tipos de produtos alimentares para melhorar o processamento e qualidade desses produtos (BRESOLIN *et al.*, 1998; CUI *et al.*, 2006).

Comercialmente, as galactomananas disponíveis são obtidas de sementes de guar (*Cyamopsis tetragonolobus* L.) com Man:Gal 1,5:1; alfarroba (*Ceratonía siliqua*) com Man:Gal 3,5:1 e tara (*Caesalpinia spinosa* L.) com Man:Gal 3,0:1. A goma guar é usada na alimentação humana e do gado desde tempos antigos, especialmente na Índia e no Paquistão. Desde 1950, as sementes da planta de onde se extrai o guar têm sido processadas em goma guar e usadas como aditivo alimentar, como espessante ou como fibra alimentar (ROBINSON *et al.*, 1982; YOON *et al.*, 2008).

A goma alfarroba *Ceratonía siliqua* é conhecida por ser a fonte pioneira das galactomananas. Originária no Sul da Europa e mais tarde introduzida nos Estados Unidos, Austrália e outras partes do mundo, a goma alfarroba foi utilizada durante muito tempo na alimentação, na indústria farmacêutica e têxtil. Antes da segunda guerra mundial, a goma alfarroba foi monopolizada por alguns países do leste da Europa.

Durante a guerra a produção de goma de alfarroba foi reduzida devido às dificuldades de fornecimento de sementes para outros países. Após a segunda guerra mundial, a goma alfarroba foi parcialmente substituída pela goma guar (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005).

O Brasil dispõe de uma grande diversidade de espécies vegetais cujas sementes armazenam galactomananas (GANTER *et al.*, 1994; CERQUEIRA *et al.*, 2009). Uma vez que, para a extração do polissacarídeo, faz-se o uso dos frutos, as sementes podem ser consideradas uma fonte renovável, o que não levaria a destruição da árvore. Estudos realizados visando à extração desses polissacarídeos demonstraram que o rendimento pode ser superior a 30% da massa seca das sementes (GANTER *et al.*, 1991; PETKOWICZ *et al.*, 1998; CERQUEIRA *et al.*, 2009).

Ganter e colaboradores (1994) caracterizaram algumas galactomananas de sementes de leguminosas nativas como *Mimosa scabrella*, *Stryphnodendron barbatiman*, *Schizolobium parahybum* e *Schizolobium amazonicum*. Essas galactomananas possuem razão molar Man:Gal de 1,1:1, 1,5:1, 3,0:1 e 3,0:1, respectivamente. A partir dos oligossacarídeos obtidos por hidrólise ácida parcial das galactomananas os autores determinaram a distribuição das ramificações do polímero original.

Ramesh, Yamaki e Tsushida (2001) isolaram galactomananas de *Trigonella foenum-graecum* através de extrações sequenciais com água em diferentes temperaturas e álcali, resultando frações com razões de Man:Gal distintas, como 1,04:1 e 1,12:1. As duas frações quando hidrolisadas indicaram que a substituição em galactose pode influenciar a diminuição da quebra do polissacarídeo. Além das diversas aplicações citadas, diversos efeitos biológicos já foram descritos para as galactomananas.

2.2.1 Atividade biológica das galactomananas nativas e quimicamente modificadas

As principais atividades biológicas já descritas para galactomananas nativas e/ou modificadas incluem: atividade antitumoral (INGOLFSDOTTIR *et al.*, 1994; SHI *et al.*, 2007), imunomoduladora (DUNCAN *et al.*, 2002; GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2007a), leishmanicida (NOLETO *et al.*, 2002) antiviral (GEMIN, 2008; ONO *et al.*, 2003), antitrombótica e anticoagulante (PIRES *et al.*, 2001; MARTINICHEN *et al.*, 2005) efeitos

citotóxicos contra células HeLa (NOLETO *et al.*, 2009) e HepG2 (GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2007b).

Galactomananas de fontes não vegetais, também estão são alvos de estudos visando suas aplicações biológicas. Galactomananas de alta massa molar isolada do cogumelo *Morshela esculenta* foram avaliadas quanto à citotoxicidade em células THP-1. Os resultados obtidos indicaram que em baixa concentração ($3 \mu\text{g.mL}^{-1}$), as frações de galactomananas foram capazes de aumentar o fator de transcrição como NF- $\kappa\beta$, o qual é responsável em controlar a expressão de múltiplos genes na ativação de monócitos e macrófagos. Os genes que são regulados pelo o aumento da expressão de NF- $\kappa\beta$ incluem as citocinas pro-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão, receptores e inibidores de apoptose (DUNCAN *et al.*, 2002).

Santander (2011) demonstram que a galactomanana purificada de *Caesalpinia spinosa* induz a maturação fenotípica de MDDCs (monócitos humanos) com aumento na expressão de CD83, DC86E e CD206, além de aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias, influenciando na atividade imunomoduladora.

Galactomananas extraídas de *Trigonella foenum-graecum* foram capazes de promover a atividade fagocítica em macrófagos peritoneais e, além disso, promoveram o crescimento de células HB4C5, que são células responsáveis pela produção de anticorpos monoclonais contra o câncer de pulmão (RAMESH *et al.*, 2002).

Noletto *et al.* (2002) avaliando o efeito imunomodulador de galactomananas do líquen *Ramalina celastri* (GMPOLY) em macrófagos peritoneais de camundongos, observaram que a produção de NO[•] aumentou 40% em relação ao controle, demonstrando que esta galactomanana exerce um importante efeito na modulação dos macrófagos.

Grande atenção tem sido dada para os derivados quimicamente modificados, com destaque para a sulfatação e a complexação com metais. Neste aspecto, NOLETO *et al.* (2002), complexaram uma galactomanana (GMPOLY) do líquen *Ramalina celastri* com o íon vanadilo e, os complexos obtidos exibiram atividade leishmanicida (~98%) para a forma amastigota de *Leishmania (L.) amazonensis* em concentração ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) 100 vezes menor a do polímero não complexado.

Em outro estudo, duas frações de galactomananas (GALMAN-A e GALMAN-B) isoladas de *Mimosa scabrella* foram complexadas com oxovanádio (IV/V) e os complexos

foram denominados GALMAN-A:VO²⁺/VO³⁺ e GALMAN-B:VO²⁺/VO³⁺, respectivamente. Em células HeLa, GALMAN-B:VO²⁺/VO³⁺ diminuiu a viabilidade celular em 60% na concentração de 50 µg.mL⁻¹ e ambos os complexos inibiram a proliferação celular em 60% com 5 µg.mL⁻¹. Os complexos exibiram estes efeitos com concentrações 10 vezes menor a do polímero não complexado (NOLETO *et al.*, 2009)

A presença e quantidade de grupos sulfato em determinados polissacarídeos podem ser o responsável pelo efeito biológico diferenciado dessas moléculas. Polissacarídeos naturalmente sulfatados podem ser obtidos de fontes como as algas marinhas (ALBAN *et al.*, 2002; MESTECHKINA *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 2008; YE *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2011; WIJESINGHE *et al.*, 2011), para os quais diversos efeitos biológicos já foram descritos, como: antitumoral e antioxidante (COOMBE *et al.*, 1987; CHEN; ZHANG, XIE, 2005; DIAS *et al.*, 2008; YE *et al.*, 2008; DALONSO, 2010), atividade imunomoduladora (BAE *et al.*, 2005; WIJESEKARA *et al.*, 2011), antiviral (GEMIN, 2008; ONO *et al.*, 2008) e anticoagulante (CARLUCCI *et al.*, 1997; FARIAS *et al.*, 2000; TALARICO *et al.*, 2004; MARTINICHEN *et al.*, 2005).

Considerando a importância de grupos sulfatos para potencializar o possível efeito biológico, galactomananas de diferentes fontes tem sido alvo da sulfatação química e então avaliadas quanto suas aplicações biológicas (PIRES *et al.*, 2001; GAMAL-ELDEN *et al.*, 2007b; GEMIN, 2008; CHRESTANI *et al.*, 2009). A principal característica da sulfatação é a modificação da estrutura molecular, tendo assim uma grande influência nas atividades biológicas (ALBAN *et al.*, 2002; MESTECHKINA *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2011; WIJESINGHE, 2011).

Os efeitos anticoagulantes são alvos de ativação de polissacarídeos sulfatados. Galactomananas isoladas do endosperma da semente de *Senna macranthera* e *Cyamopsis tetragonoloba* (goma guar), sulfatadas quimicamente, mostraram uma elevada atividade anticoagulante. Os autores atribuíram o efeito ao alto grau de substituição e elevada massa molar dos polímeros modificados (PIRES, 2011; MESTECHKINA *et al.*, 2008). Galactomananas de sementes de *Senna macranthera* sulfatadas quimicamente pelo método do trióxido de enxofre e piridina e obtendo DS 1,4, apresentaram atividade anticoagulante *in vitro* mais evidente do que a heparina, este efeito foi devido o polímero ter apresentando um alto grau de substituição (PIRES *et al.*, 2001).

A sulfatação de galactomananas aumenta a intensidade de efeito citotóxico em células tumorais (HepG2) quando comparada ao respectivo polímero não sulfatado. Gamal-Eldeen e colaboradores (2007b) modificaram quimicamente uma galactomanana de *Leucaena leucocephala* pelo método do ácido clorosulfônico e avaliaram a atividade de ambos os polissacarídeos (sulfatados e não sulfatados) em células HepG2, os resultados obtidos por esses autores demonstraram que a galactomanana sulfatada na maior concentração avaliada ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$) obteve uma maior (~40%) atividade antitumoral quando comparada com o polímero não sulfatado.

Em relação a atividade anti-viral as galactomananas de sementes de *Mimosa scabrella* de (Man:Gal 1:1), e *Leucaena leucocephala* (Man:Gal 4:1), modificadas através da sulfatação química, apresentando graus de sulfatação (DS) de 0,62 e 0,50, respectivamente exibiram atividade anti-viral contra os vírus da febre amarela e vírus da dengue. A atividade anti-viral de ambos os polímeros foi atribuída à carga negativa do grupo sulfato introduzido nos polissacarídeos (ONO *et al.*, 2003). Em outros estudos também visando à atividade anti-viral, galactomananas de goma guar (nativa e sulfatada quimicamente) foram avaliadas frente à atividade anti-viral do vírus herpes simplex tipo I (HSV-1), os autores observaram um elevado efeito anti-viral, quando as galactomananas apresentavam uma maior quantidade de grupos sulfatos em sua estrutura (GEMIN, 2008). Em outro estudo, galactomananas sulfatadas de *Mimosa scabrella* também foram avaliadas quanto sua atividade anti-viral do vírus HSV-I e também SiRV-A/SA11 (rotavírus). Os autores (CHRESTANI *et al.*, 2009) sulfataram o polissacarídeo segundo o método de O'Neill (1955), onde a fração obtida foi denominada BRS. BRS demonstrou ser mais tóxico para HSV-I do que nos vírus SiRV-A/SA11. Os autores propuseram que BRS possui uma maior seletividade contra um vírus que possua um envoltório de heparan sulfato na superfície celular como HSV-1, por exemplo.

Diversos estudos têm demonstrado que os efeitos de polissacarídeos como MRB estão diretamente relacionados com sua estrutura molecular incluindo o tipo de unidade monomérica, ligação glicosídica da cadeia principal, os tipos e graus de ramificações e ainda, flexibilidade e configuração das cadeias (WANG *et al.*, 2010). O resultado de combinações desses fatores é devido a uma grande diversidade estrutural que reflete em diferenças na conformação da estrutura dos polissacarídeos, que estão sujeitos a alterações ao realizar uma modificação química. As modificações químicas desses

polissacarídeos podem proporcionar mudanças conformacionais que favoreçam ou não a atividade biológica.

Apesar da existência de diversos estudos relacionados às galactomananas de *S. amazonicum* (GANTER *et al.*, 1992; PETKOWICZ *et al.*, 1998; BENTO *et al.*, 2013), nenhum trabalho foi encontrado na literatura sobre a atividade biológica da galactomanana de *S. amazonicum*, nativa ou quimicamente sulfatada. O alto rendimento e a facilidade de obtenção da galactomanana de *S. amazonicum* na forma pura motivaram o interesse pelo estudo deste polissacarídeo em modelo de células tumorais. Diversos estudos em diferentes linhagens celulares têm demonstrado atividade antitumoral para várias classes de polissacarídeos (CARNEIRO-LEÃO *et al.*, 1997; CAO *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2011) em especial polissacarídeos sulfatados. Nos últimos anos têm sido avaliados os efeitos de polissacarídeos sulfatados e não sulfatados em células de hepatocarcinoma humano.

2.3 AÇÃO DE POLISSACARÍDEOS NO HEPATOCARCINOMA HUMANO

O hepatocarcinoma é um dos cânceres mais prevalentes no mundo. Em 1999, chegou a ser o quarto câncer mais comum. Nos Estados Unidos, na África Subsaariana e em partes da Ásia, é um dos quatro principais tumores malignos em adultos, além de ser um dos tumores cuja incidência mais vem aumentando, principalmente com o aumento da idade dos pacientes. A maioria dos tumores é detectado em estágios intermediários ou avançados, devido ao curto tempo de evolução do hepatocarcinoma. O tempo de duplicação do volume de massa do tumor é em torno de quatro meses (DI - BISCEGLIE *et al.*, 1988; THORGEIRSSON; GRISHAM, 2002).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), os tumores malignos de fígado podem ser divididos em dois tipos: câncer primário: originário no próprio órgão, angiossarcoma e hepatoblastoma (atinge recém – nascidos e crianças em seus primeiros anos de vida) e, câncer secundário: originário de outro órgão, podendo atingir o fígado.

Os tumores de origem no fígado, o mais frequente, é o hepatocarcinoma ou carcinoma hepatocelular. Considerado um dos cânceres mais agressivos, este ocorre em mais de 80% dos casos de cânceres no mundo. Em 2008, no Brasil, cerca de 7580 casos

de hepatocarcinoma foram diagnosticados, sendo que, 4267 em homens e 3313 em mulheres (ACS, 2012; INCA, 2012).

Os fatores de risco para este tipo de câncer são: o uso abusivo de esteroides, tabaco e bebidas alcoólicas, diabetes do tipo II, hepatite crônica e obesidade (FIGURA 2). O câncer de fígado é visto com mais frequência em homens do que em mulheres. Mais de 700.000 pessoas são diagnosticadas com esse tipo de câncer todos os anos. Sendo que este é a principal causa de morte por câncer em todo o mundo, respondendo por mais de 600.000 mortes por ano (ACS, 2012). Em muitos casos, pessoas que portam o vírus da Hepatite B possuem uma predisposição maior em adquirir o câncer de fígado, do que pessoas que não são portadoras do vírus. O DNA do vírus da hepatite B é integrado ao genoma do tumor (DI - BISCEGLIE *et al.*, 1988; THORGEIRSSON; GRISHAM, 2002).

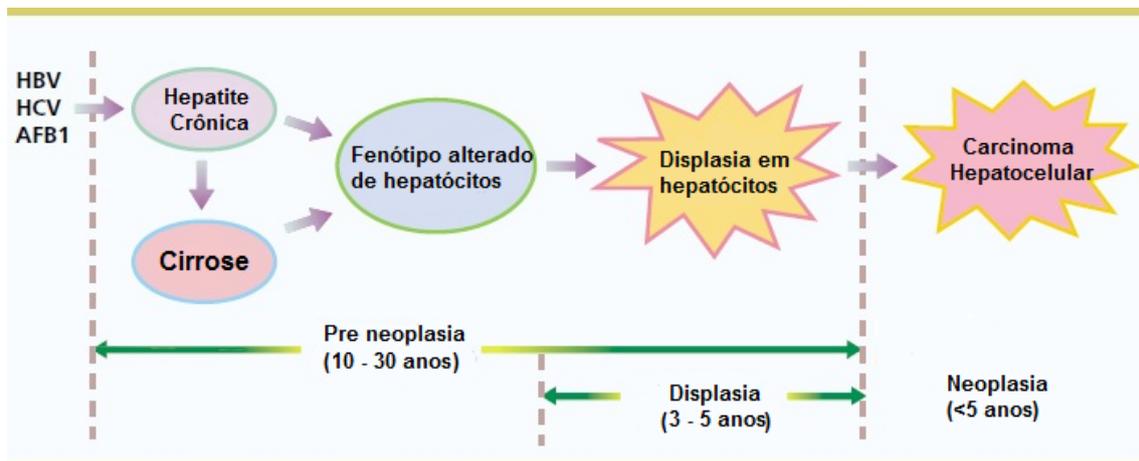


FIGURA 2 - ESQUEMA DOS FATORES DE RISCO PARA O HEPATOCARCINOMA

NOTA: Sequência cronológica de lesões celulares que culminam com o desenvolvimento do hepatocarcinoma humano

FONTE: Adaptado (THORGEIRSSON; GRISHAM, 2002).

Nos últimos anos, o interesse na quimioprevenção do câncer vem aumentando, e antimutagênicos e promotores antitumorais estão sendo cada vez mais procurados. Os métodos atuais de tratamento incluem cirurgia, além de quimioterapia e radioterapia, que são métodos citotóxicos que agredem tanto células tumorais quanto células saudáveis (CALABRESI; CHABNER, 1991). Apesar dos avanços significativos feitos em relação à quimioterapia para o tratamento do carcinoma hepatocelular, as eficácias das drogas são muitas vezes dificultadas por uma série de efeitos colaterais adversos. Assim, torna-se importante explorar uma nova abordagem para o desenvolvimento de uma terapia eficaz contra esta doença (NOWAK; CHOW; FINDLAY, 2004).

As células do hepatocarcinoma humano (células HepG2), tem sido alvo de diversos estudos com polissacarídeos de diferentes fontes (OHYA *et al.*, 2001; TAO; ZHANG; CHEUNG, 2006; GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2007b; YE *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2009; CAO; IKEDA, 2009; CHIA-JUNG *et al.*, 2012). Polissacarídeos sintetizados (contendo galactose em sua estrutura) foram avaliados em células HepG2, pois sabe-se que em células do parênquima do fígado existem receptores de galactose (receptores de asialoglicoproteína), o que poderia influenciar na atividade antitumoral de polissacarídeos que contêm unidades de galactose em sua estrutura. Tal composto conjugado, formado por uma dextrana contendo ramificações de galactose e cisplatina (composto com atividade antineoplásica) foi avaliado em células HepG2. A atividade citotóxica *in vitro* do conjugado obtido foi mais elevada do que o conjugado análogo que não possuía resíduos de galactose em sua estrutura, sugerindo que o polímero complexado com cisplatina e contendo unidades de galactose em sua estrutura possuiu melhores efeitos terapêuticos, o que pode estar relacionado com os receptores de galactose em células do fígado (OHYA *et al.*, 2001).

Cao e Ikeda (2009) modificaram uma xiloglucana comercial de origem vegetal obtendo um polímero sulfatado e outro na forma de éster de selênio. A atividade antitumoral desses polissacarídeos nativo e modificados foi investigada contra células HepG2 *in vitro*. As xiloglucanas sulfatadas-selenizadas na maior concentração avaliada ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) apresentaram maior atividade antitumoral (~35%) quando comparadas com o polímero nativo e seus derivados sulfatados. Os resultados indicaram que, a introdução de grupos sulfato e éster de selênio no polissacarídeo resultou em aumento da atividade antitumoral.

Glucanas de fungos também vem sendo avaliadas (ANGELI *et al.*, 2006; TAO; ZHANG; CHEUNG, 2006) quanto a citotoxicidade em células do hepatocarcinoma humano. Uma β -glucana isolada do cogumelo *Pleurotus tuber-regium* foi submetida à sulfatação química pelo método do ácido clorossulfônico, resultando em diferentes frações sulfatadas (TAO; ZHANG; CHEUNG, 2006). Estas frações foram incubadas com células HepG2 e a citotoxicidade avaliada pelo método do MTT. Os autores observaram uma correlação direta entre a intensidade de efeito antitumoral e a massa molar. As frações de maior massa molar exibiram melhor atividade antitumoral em relação às de baixa massa molar.

Além de estudos realizados com glucanas de fungos, uma glucana isolada de tinta de lula (*Ommastrephes bartrami*) foi avaliada em relação à migração das células do hepatocarcinoma humano (CHEN *et al.*, 2010). O polímero foi então sulfatado pelo complexo trióxido de enxofre e piridina, originando três frações sulfatadas, com diferentes graus de sulfatação, que variavam entre 2,51–2,73. Os resultados indicaram que ocorreu uma supressão da migração das células HepG2 de uma maneira dose-dependente, quando estas foram incubadas com frações sulfatadas e comparadas com as frações nativas. A migração de células tumorais e invasão são necessárias para a ocorrência de metástases.

Derivados sulfatados de *Phellinus ribis* (cogumelo) com variados graus de sulfatação (0.62 – 2.02) que foram submetidos à sulfatação pelo método do ácido clorosulfônico, sem a degradação do polissacarídeo, mostraram efeitos significativos sobre a inibição de células HepG2 *in vitro* em comparação com a fração nativa. A fração com maior grau de sulfatação inibiu o crescimento das células em 25% na maior concentração avaliada (250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (LIU *et al.*, 2009).

Polissacarídeos isolados de diversas plantas medicinais também vêm despertando o interesse de alguns pesquisadores (YEJIN; YANQUN, 2010; CHIA-JUNG *et al.*, 2012). Um extrato etanólico extraído da planta medicinal (*Corchorus olitorius* L.) muito utilizada em países orientais, foi avaliado em células HepG2 (CHIA-JUNG *et al.*, 2012). Os polímeros reduziram significativamente a taxa de proliferação das células HepG2 de maneira dose dependente. Em uma concentração de 12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, o polímero foi capaz de reduzir a viabilidade das células em ~79,2% em um tempo de 24 horas de tratamento. Uma fração bruta de polissacarídeos contendo glucose, manose e galactose, isolada de *Astragalus membranaceus* também foi capaz de reduzir a viabilidade das células HepG2 *in vitro* em ~40% em 24 horas de tratamento, em uma concentração de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (YEJIN; YANQUN, 2010). Entretanto, por tratar-se de uma fração bruta, nenhuma correlação pode ser feita entre a atividade observada e os compostos responsáveis pela ativação.

Hui – Li *et al.* (2013) isolaram e modificaram quimicamente através da reação de sulfatação, polissacarídeos de *Pinus massoniana* uma espécie de pinheiro originário da Ásia. O derivado sulfatado quando incubado com células HepG2 se mostrou mais citotóxico em uma maneira dose-dependente, do que o polissacarídeo não sulfatado. As

células ficaram incubadas em um tempo de 72 horas de tratamento, e a redução da viabilidade foi de ~ 38,21% e 39,16% nas concentrações de 200 e 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

Os alvos celulares envolvidos nos efeitos antitumorais desencadeados por polissacarídeos são diversos e, os mecanismos de tais efeitos ainda não estão estabelecidos. Considerando o efeito direto de polissacarídeos sobre as células tumorais, alguns estudos *in vitro* têm mostrado que a diminuição do crescimento e da progressão celular é devido à indução de morte celular por apoptose e parada do ciclo celular (GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2007b; YEJIN; YANQUN, 2010; ZENG *et al.*, 2012; JING-GUNG *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2013).

Nos últimos anos o metabolismo tumoral tem sido alvo de estudos de diferentes compostos visando descobrir uma atividade antitumoral que seja eficaz e que não acarrete tantos efeitos colaterais (HSU; SABATINI, 2008; TENANT *et al.*, 2010; DIAZ-RUIZ; RIGOLET; DEVIN, 2011). Tendo em vista que no presente estudo será avaliado os efeitos das galactomananas sobre metabolismo das células HepG2, uma revisão sobre alguns aspectos do metabolismo de células tumorais será apresentada.

2.4. ALGUNS ASPECTOS DO METABOLISMO DAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS

O metabolismo celular do câncer foi inicialmente estudado por Otto Warburg em 1923. Em seus estudos Warburg observou que, tumores apresentavam um metabolismo diferenciado quando comparado com células normais. As células cancerígenas realizavam fermentação láctica mesmo na presença de oxigênio chegando a metabolizar glicose aproximadamente 10 vezes mais para lactato do que as células normais, este evento que ficou conhecido como efeito Warburg (FERREIRA, 2010; ZHAO *et al.*, 2011; KOPPENOL; BOUNDS; GANG, 2011).

Atualmente sabe-se que esta maior captação de glicose pelas células tumorais e conseqüentemente aumento do fluxo da via glicolítica, pode ser explicada por um aumento na atividade das enzimas que participam da via. Neste caso, alguns estudos (FERREIRA, 2010; ZHAO *et al.*, 2011; DIAZ-RUIZ; RIGOLET; DEVIN, 2011) mostraram que certas enzimas da glicólise são superexpressas e/ou alteradas em várias linhagens

celulares. Da mesma forma já foi observado que a atividade dessas enzimas é muitas vezes maior do que a atividade dessas em tecidos normais (PELICANO *et al.*, 2006; ZHAO *et al.*, 2011). Além disso, a observação de Warburg em relação às células tumorais está intimamente ligada as alterações do DNA mitocondrial, oncogenes e supressores de tumor (KOPPENOL; BOUNDS; DANG, 2011). Algumas das alterações enzimáticas envolvidas no efeito warburg podem ser melhor visualizadas na figura 3.

Embora a fermentação aeróbica tenha sido aceita como uma marca registrada do metabolismo do câncer, a sua relação com a progressão das células tumorais ainda não bem compreendida. O metabolismo alterado de células tumorais confere uma vantagem seletiva para a sobrevivência e proliferação no microambiente do tumor original (HSU; SABATINI, 2008). Esta capacidade de sobrevivência pode ser, em parte, resultado da diminuição do pH nos tecidos próximos, devido a extrusão de lactato do tumor (FERREIRA, 2010; ZHAO *et al.*, 2011).

Existem algumas linhagens celulares de câncer que possuem mitocôndrias funcionais, e podem alternar entre o metabolismo da glicólise e fosforilação oxidativa de forma reversível, este processo é conhecido como efeito *Crabtree* (HSU; SABATINI, 2008; DIAZ-RUIZ; RIGOLET; DEVIN, 2011; JEZEK *et al.*, 2010). Muitos estudos tem demonstrado que algumas linhagens de glioma, hepatocarcinoma e câncer de mama possuem a função mitocondrial e estas linhagens obtém ATP, não só da via glicolítica, mas também da fosforilação oxidativa (DIAZ-RUIZ; RIGOLET; DEVIN, 2011).

O conhecimento mais aprofundado do metaboloma de tumor proporcionou novos alvos moleculares de estudos visando atividade antitumoral. Acredita-se que inibindo alvos importantes no suprimento de nutrientes, como por exemplo, o transportador de glucose e glutamina, assim como inibir enzimas chaves envolvidas na oxidação destes substratos, comprometeria a provisão de ATP e de substratos para sustentar a alta taxa proliferativa das células tumorais, tendo como consequência a morte celular (TENNANT; DÚRAN; GOTILIEB, 2012). A inibição de outros alvos que comprometem a estabilidade metabólica das células tumorais também tem sido explorada, como pode ser visualizado na figura 4. Os primeiros medicamentos (5-fluorouracil, citarabina e metotrexato) anticâncer envolvendo o metabolismo das células cancerígenas foram destinados a inibir a síntese de DNA. Esses medicamentos ficaram conhecidos como antimetabólitos, e têm sido utilizados como agentes quimioterápicos durante muitos anos.

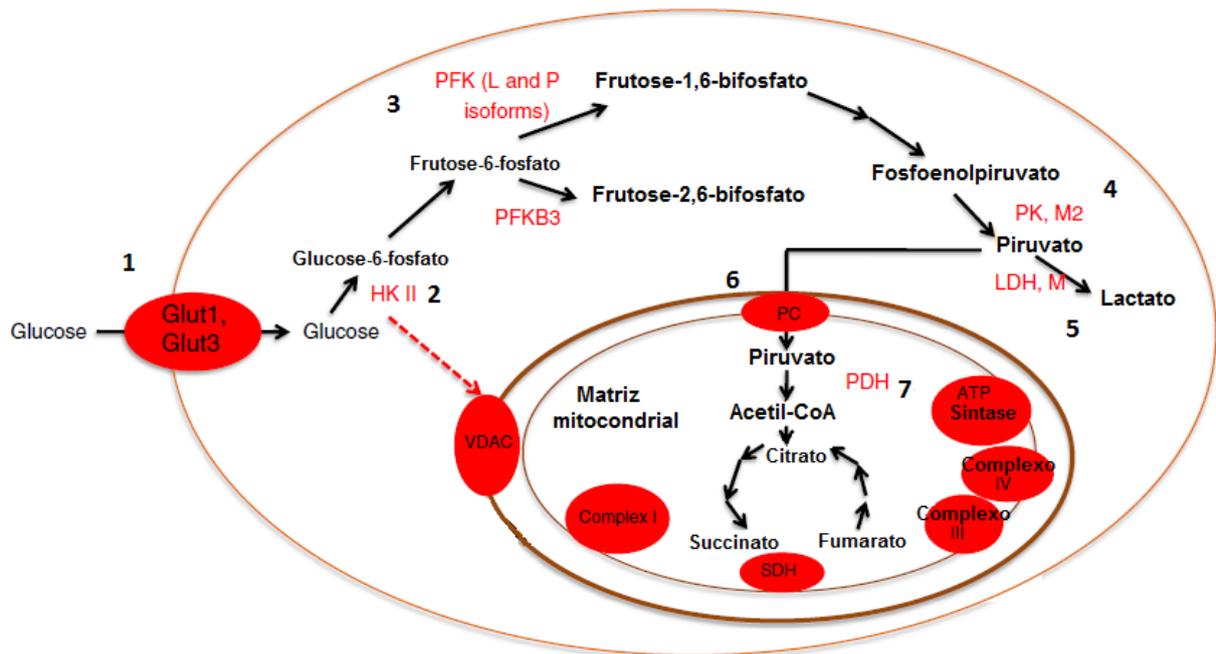


FIGURA 3 - OS MECANISMOS MOLECULARES QUE PODEM DAR ORIGEM AO EFEITO WARBURG

NOTA: Mecanismos propostos para explicar a glicólise aeróbica das células do câncer: 1) Alta afinidade dos transportadores de glucose (GLUT1-GLUT3) na membrana plasmática; 2) HK interage com a mitocôndria; 3) Fosfofrutoquinase (PFK) 4) A isoforma M2 de piruvato quinase (PK) regula o fluxo glicolítico; 5) A isoforma M de lactato desidrogenase (LDH) é abundante; 6) Transporte de piruvato para a matriz mitocondrial por meio de seu transportador específico (PC) é diminuído. Complexo piruvato desidrogenase (PDH) é então inibido. A enzima succinato desidrogenase (SDH) é mutada prejudicando a sua atividade. Os níveis dos complexos respiratórios mitocondriais I, III e IV são reduzidos.

FONTE: DIAZ-RUIZ; RIGOLET; DEVIN, 2011.

O primeiro passo da via glicolítica, a fosforilação da glucose para formação da glucose – 6 – fosfato, é controlada pela hexoquinase II (HK). Como citado, esta é uma das muitas enzimas da via glicolítica que é regulada e também é super expressa em células do câncer. Atualmente existem dois inibidores da hexoquinase, a londamina e a 2-deoxiglucose, os quais estão sendo utilizados em combinação com outros agentes para o tratamento de diferentes tumores sólidos (FERREIRA, 2010; ZHAO *et al.*, 2011; TENNANT; DÚRAN; GOTILIEB, 2012). A radioterapia e a quimioterapia são utilizados em combinação com os inibidores da glicólise como a londamina e 2-deoxiglucose (DE LENA *et al.*, 2001; MASCHEK *et al.*, 2004) os quais estão sendo utilizados em fases II e III de cânceres de ovário, mama, pulmão e glioblastoma.

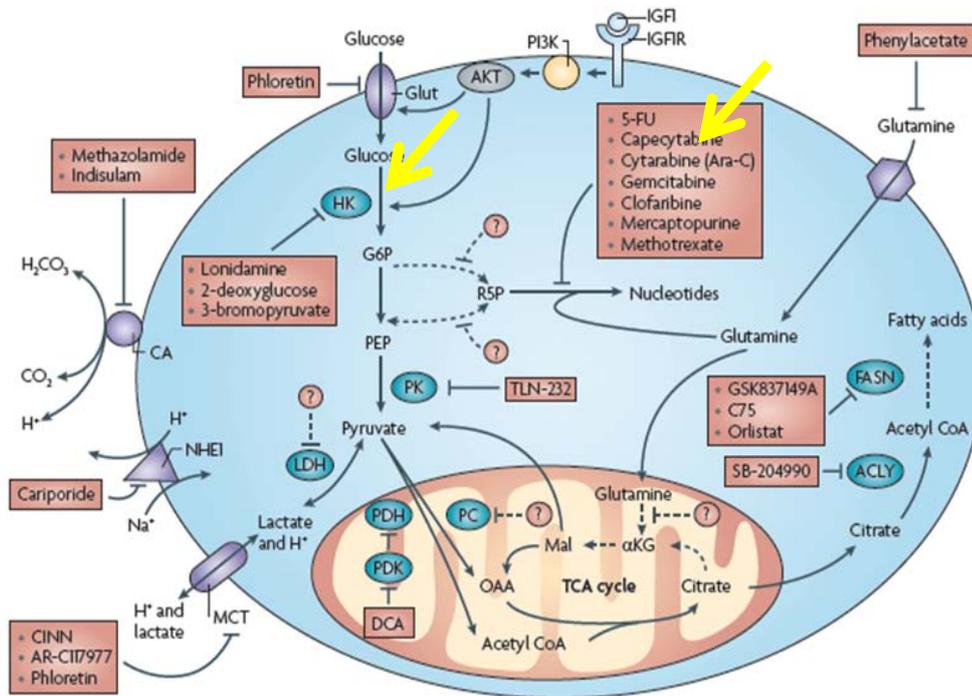


FIGURA 4 - ALVOS QUE SÃO VISADOS NO METABOLISMO DO TUMOR

NOTA: Via metabólica das células do câncer e alguns compostos que são utilizados no tratamento anticâncer. As linhas tracejadas indicam possíveis áreas de inibição para os compostos apropriados que ainda não foram testados. As setas em amarelo indicam os compostos que estão sendo utilizados a fim de inibir a síntese de DNA e inibir a primeira etapa da via glicolítica, a enzima Hexoquinase II.

FONTE: TENNANT; DÚRAN; GOTILIEB, 2012.

Os compostos em estudo visando inibir o metabolismo de células tumorais são na maioria moléculas sintéticas e de baixa massa molar (TENNANT; DÚRAN; GOTILIEB, 2012). O estudo com compostos naturais bioativos e de alta massa molar, como os polissacarídeos ainda não estão disponíveis na literatura.

Recentemente, no Laboratório de Oxidações Biológicas e Cultivo Celular desta Universidade, tem sido avaliado a citotoxicidade de polissacarídeos nativos e quimicamente modificados em diferentes linhagens celulares, tendo como alvo o efeito no metabolismo destas células. Os resultados obtidos de tais estudos mostram que a xiloglucana extraída da semente de *Hymenaea courbaril* (Jatobá) (XGJ), na concentração $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ XGJ diminuiu a velocidade de consumo de O_2 de células HeLa em $\sim 47\%$ e a produção de piruvato em $\sim 20\%$ nos tempos 0 e 30 minutos, assim como aumentou a produção de lactato em $\sim 26\%$ no tempo de 60 minutos. Estas avaliações foram feitas nas células HeLa permeabilizadas com digitonina (SILVIERA, 2010). Farias (2012) avaliou os efeitos de xiloglucanas isoladas de sementes de *Copaifera langsdorffii* (XGC) e seu

complexo com oxovanádio (IV/V) chamado de XGC/ $\text{VO}^{2+/3+}$ sobre células B16F10 intactas. XGC promoveu um aumento na velocidade de consumo de oxigênio pelas células, especialmente na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ao contrário, o complexo XGC/ $\text{VO}^{2+/3+}$ reduziu em cerca de 50% o consumo de oxigênio e diminuiu significativamente a produção de piruvato, sem aumentar a produção de lactato, indicando que ambos os tratamentos interferem no metabolismo de células B16F10.

Tendo em vista os resultados observados para as xiloglucanas e seus complexos com vanádio sobre o metabolismo mitocondrial das células tumorais (HeLa e B16-F10) avaliadas (SILVEIRA, 2010; FARIAS, 2012), e estudos mostrando a relevância de grupos sulfato para intensificar os efeitos antitumorais nas células HepG2 (TAO; ZHANG; CHEUNG, 2006; GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2007b), no presente trabalho foi avaliado a interferência da galactomanana de *S. amazonicum* sobre o consumo de oxigênio e a produção de lactato e piruvato, visando contribuir para o entendimento do mecanismo dos polissacarédeos no metaboloma das células do hepatocarcinoma humano (HepG2).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e sulfatar quimicamente a galactomanana de *S. amazonicum* e avaliar a toxicidade do polissacarídeo nativo e modificado em células HepG2.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair e caracterizar o polissacarídeo de *S. amazonicum*;
- Realizar a sulfatação da galactomanana e caracterizar os derivados sulfatados obtidos;
- Em cultura de células HepG2 avaliar os efeitos da galactomanana nativa e os derivados sulfatados sobre:
 - ✓ A viabilidade e proliferação celular;
 - ✓ Parâmetros do metabolismo celular; respiração e produção de piruvato e lactato;
 - ✓ Os mecanismos de indução de morte celular.

4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

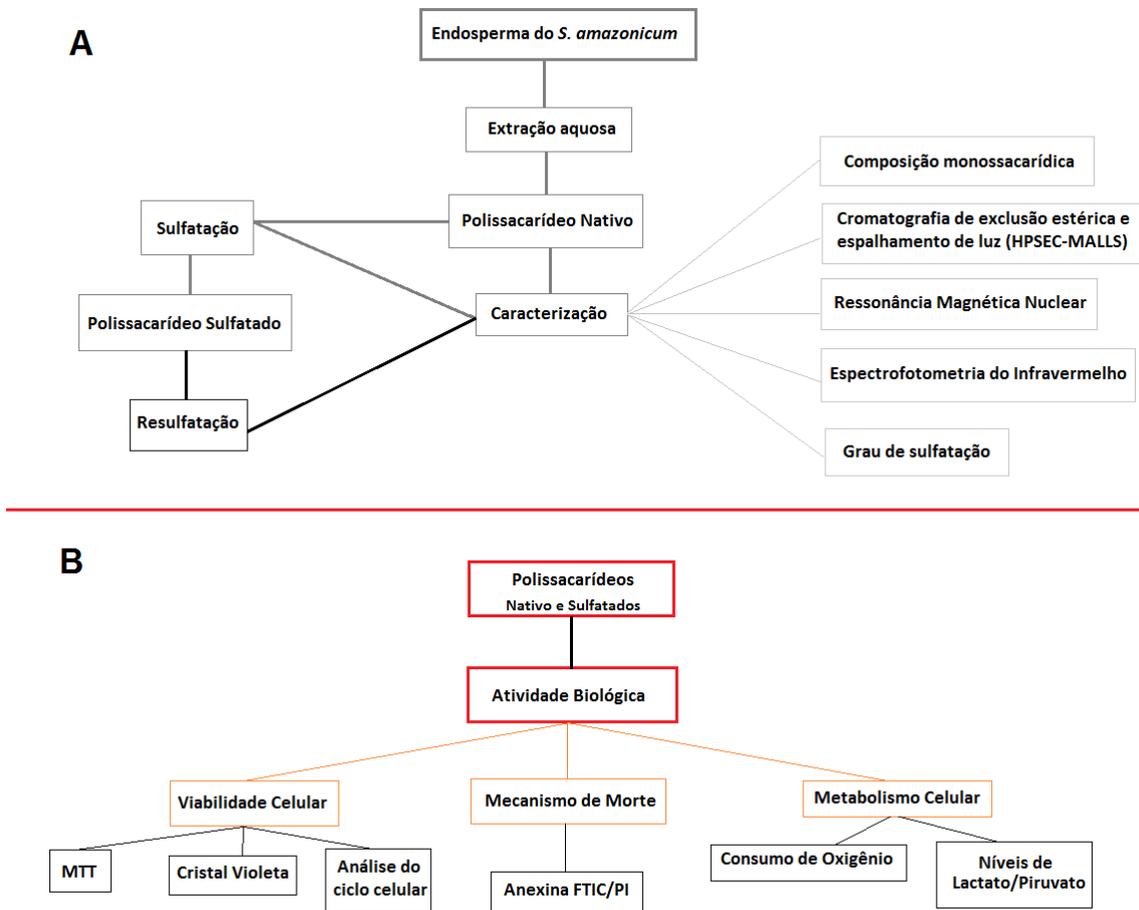


FIGURA 5 - ESTRATEGIA EXPERIMENTAL
 FONTE: O autor (2013).

Nota: O polissacarídeo nativo (SN) foi extraído e em seguida foi sulfatado segundo o método de O'Neill (1955) originando a fração sulfatada denominada S1. O polissacarídeo sulfatado (S1) passou novamente pelo processo de sulfatação química originando a fração S2. A) Extração, sulfatação e caracterização da galactomanana; B) Avaliação dos polissacarídeos em ensaios de citotoxicidade das células HepG2.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 REAGENTES E MATERIAIS

Reagentes adquiridos da Merck do Brasil: Hidróxido de sódio, ácido sulfúrico, ácido clorídrico, dimetilsulfoxido (DMSO), cloreto de bário, formamida, acetona, citrato de sódio, glicina, hidrazina, tris, Complexo Trióxido de enxofre e piridina, Ácido clorossulfônico.

Reagentes adquiridos da Sigma *Chemical Co* (St Louis, MO): Brometo de (3-metil[4-,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT), ácido N-2[-4-hidroietil piperazina N 2-etano sulfônico (HEPES), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), lactato desidrogenase, NADH, NAD⁺.

Reagentes adquiridos da Cultilab® (Campinas, SP): penicilina, estreptomicina, gentamicina, meio Dulbecco MEM (DMEM).

Outros reagentes de marcas diversas: soro fetal bovino (Gibco).

Materiais adquiridos da Millipore®: filtros Millex descartáveis de 0,22µm de poro, membranas de acetato de celulose de 0,22 µm de poro.

Materiais adquiridos da *Corning*: placas de cultura estéreis de 96 poços, de 12 poços, placas de 60 mm e garrafas de cultura estéreis.

Materiais adquiridos da BD®: Seringas de plástico estéreis, agulhas 1,20 X 40 mm estéreis.

Materiais adquiridos da TPP: placas de cultura estéreis multipoços, garrafas de cultura estéreis.

5.2 OBTENÇÃO DAS SEMENTES

As sementes de *Schizolobium amazonicum* foram fornecidas pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa na Agropecuária) – CPATU – Belém, Pará. Um exemplar está depositado, sob o número 158478, no Herbário (IAN).

5.3 EXTRAÇÃO DO POLISSACARÍDEO

As sementes de *S. amazonicum* foram submetidas à fervura em água destilada por aproximadamente 30 minutos, a fim de inativar as enzimas endógenas presentes nas sementes. As sementes permaneceram imersas em água por 48 horas e, após esse período, o endosperma foi separado do tegumento e do embrião e seco em estufa e então submetidos à moagem em moinho Wiley utilizando peneiras de 2 mm. O endosperma moído (50g) foi submetido à extração aquosa durante 16 horas, na temperatura de 25°C. A fração originada foi centrifugada a 8000 rpm por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante precipitado com dois volumes de etanol absoluto. O precipitado foi lavado três vezes com etanol absoluto e seco em estufa a vácuo (25°C).

5.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

Para determinação da composição monossacarídica o polissacarídeo foi hidrolisado com Ácido Trifluoracético 2M, durante 5 horas à 100°C. Ao término da hidrólise o ácido foi removido por evaporação (ADAMS, 1965).

Os produtos da hidrólise foram reduzidos com boroidreto de sódio, em meio aquoso, a 25°C por 16 horas (WOLFROM; THOMPSON, 1963a). As soluções reduzidas foram tratadas com resina catiônica Lewatit S-100 para remoção do cátion sódio e para decompor o excesso de agente redutor. Em seguida, o material foi filtrado, evaporado até *secura* e lavado sucessivamente com metanol para a remoção do ácido bórico remanescente, na forma de borato de trimetila. Os alditóis formados foram acetilados com uma mistura de anidrido acético-piridina (1:1v/v) durante 16 horas a temperatura ambiente (WOLFROM; THOMPSON, 1963b).

O processo foi interrompido com adição de gelo moído e o material acetilado extraído com clorofórmio. A piridina residual presente na fração clorofórmica foi removida por sucessivas lavagens com sulfato de cobre 5% (m/v) e água de forma intercalada. A fase clorofórmica foi transferida a um tubo de hemólise, evaporada a temperatura ambiente e analisada por cromatografia líquido-gasosa.

Para as análises de cromatografia líquido-gasosa (GLC) foi utilizado um cromatógrafo THERMO Trace GC, coluna capilar DB-225, com detector por ionização de chama (FID). A temperatura da coluna foi de 100°C durante a injeção, e então programada para 60°C/min até atingir 230°C (temperatura constante) e a temperatura do injetor foi de 250°C. Nitrogênio foi usado como gás de arraste a 2 ml/min. A quantificação dos picos foi obtida por integrador HP acoplado ao cromatógrafo.

5.5 SULFATAÇÃO

O polissacarídeo foi sulfatado segundo o método de O'Neill (1955). A galactomanana (2 g) foi dissolvida em formamida (100 ml) e piridina (100 ml) sob agitação, tomando o devido cuidado para não hidratar o sistema, através de uma boa vedação do sistema utilizado. Após completa dissolução, a mistura reacional foi colocada sob banho de gelo e adicionado o ácido clorosulfônico gota a gota (25 ml). Após a completa adição do ácido clorosulfônico, a agitação e o banho de gelo foram mantidos por mais 2 horas, decorrido este tempo o sistema foi mantido a 4°C por 12 horas. O bloqueio da reação foi realizado através da adição de gelo no meio reacional e a neutralização foi feita com solução de bicarbonato de sódio a 10%, até a liberação completa de CO₂ formado, logo em seguida foi o pH foi medido. 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 com 25 mols de ácido clorosulfônico/OH livre.

5.6 CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS SULFATADOS

5.6.1 Determinação do grau de sulfatação (DS)

A quantificação dos grupos sulfato foi determinada segundo o método gelatina-bário (DODGSON; PRICE, 1962). Este método envolve hidrólise ácida, seguida pela determinação do sulfato inorgânico liberado, o qual é medido espectrofotometricamente

como sulfato de bário. A gelatina foi usada como um estabilizador da turbidez desenvolvida quando o sulfato da amostra reage com o cloreto de bário formando sulfato de bário, este fica suspenso por mais tempo para que a turbidez seja medida em espectrofotômetro (360 nm). O teor de sulfato foi determinado em relação a uma curva padrão de sulfato de sódio (20 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (DODGSON, 1961; DODGSON; PRICE, 1962).

A partir da fórmula abaixo foi calculado o DS (WHISTLER; SPENCER, 1964):

$$\text{DS} = 162 \times S / 3200 - 102 \times S$$

Onde:

162 representa 1 mol da unidade repetitiva (hexose);

3200 representa a massa atômica do enxofre (32) x 100

102 representa 1 mol do éster substituinte (SO_3Na) – 1

S representa o teor de enxofre dado em porcentagem

5.6.2 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)

As frações foram solubilizadas em óxido de deutério (D_2O) e as análises foram efetuadas em equipamento BRUKER, modelo ADVANCE DRX-400 acoplado a transformador Fourier. A temperatura utilizada foi de 70 °C, usando acetona como padrão interno. Os resultados foram expressos em ppm.

5.6.3 Análise de infravermelho (FT-IR)

Os espectros de FT-IR (infravermelho) foram obtidos em espectrofotômetro BOMEM, Hartmann & Baum (Departamento de Química – UFPR). As amostras (2 mg) foram homogeneizadas com brometo de potássio (150 mg) e então secas em estufa à

vácuo e analisadas sob a forma de pastilhas. As análises foram realizadas em temperatura ambiente.

5.6.4 Determinação da Homogeneidade e Massa Molar

As amostras foram solubilizadas em nitrito de sódio (NaNO_2) 0,1M contendo azida de sódio (NaN_3) 0,2 g.L⁻¹ em uma concentração de 1 mg.mL⁻¹ e foram filtradas através da membrana de acetato de celulose com tamanho de poro 0,22 μm . Em seguida, foi aplicada em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) equipado com detector de índice de refração (RI), modelo WATERS 2410, detector de ultravioleta (UV) Pharmacia LKB modelo VW 2251 e com detector de espalhamento de luz laser multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP com 18 canais, acoplados em série. Foram utilizadas quatro colunas de gel permeação WATERS em série, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 . O eluente utilizado foi o mesmo da solubilização da amostra, com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ monitorado por bomba peristáltica WATERS 515.

A taxa de variação do índice de refração com a concentração (dn/dc) das amostras homogêneas foi determinada, sendo que para cada amostra foram utilizadas cinco diferentes concentrações (0,2 - 1 mg.mL⁻¹) diluídas em NaNO_2 0,1 M com NaN_3 0,2 g.L⁻¹. A massa molar ponderal média foi calculada pelo programa ASTRA utilizando os valores de dn/dc previamente obtidos.

5.7 CÉLULAS

Foram utilizadas células de hepatocarcinoma humano (HepG2) provenientes da American Type Culture Collection, adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro – BCR. Estas células têm tendência em crescerem em monocamadas, de natureza epitelial e apresentam ciclo celular com tempo médio de 20 horas.

5.8 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE GALACTOMANANA PARA OS ENSAIOS BIOLÓGICOS

As soluções de galactomanana foram preparadas em água ultrapura, na concentração de 5 mg.mL^{-1} . Posteriormente a solução foi esterilizada por filtração em membrana Millipore $0,22 \mu\text{m}$. As soluções foram mantidas congeladas e então diluídas em meio de cultura para a realização dos experimentos.

5.8.1 Dosagem de carboidratos totais

Após filtração foi realizada a dosagem de carboidratos totais. Para determinar a concentração de carboidratos totais das soluções de polissacarídeos foi realizada a dosagem de carboidratos totais pelo método fenol-sulfúrico como descrito por DUBOIS e colaboradores (1956). Esta dosagem baseia-se na formação de derivados furfural e hidroximetilfurfural a partir das pentoses e hexoses, respectivamente, na presença dos reagentes obtendo-se complexo de cor alaranjada. A formação do complexo foi verificada com leitura em espectrofotômetro a 490 nm . Para realização dos cálculos realizou-se uma curva de calibração para cada dosagem, utilizando-se solução padrão do monossacarídeo presente em maior quantidade no respectivo polissacarídeo.

5.9 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

5.9.1 Meio de cultura para as células HepG2

Para o cultivo de células HepG2 foi utilizado o meio essencial mínimo de Dulbecco (DMEM) com alta concentração de glucose, disponível em forma de pó reconstituível. Após dissolução em água ultrapurificada, o meio foi esterilizado por filtração e armazenado sob refrigeração. Para a adesão, crescimento e multiplicação das células este meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v), penicilina G 100 UI.mL^{-1} , estreptomicina $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, HEPES 20 mM bicarbonato de sódio e o pH foi ajustado em 7,4.

5.9.2 Solução de tripsina-EDTA

A solução tripsina-EDTA, uma solução dispersante de células que foi preparada com a finalidade de descolar as células HepG2 das garrafas de cultura, foi constituída de: NaCl 137 mM, KCl 5,4 mM, glucose 5 mM, Na₂HPO₄ 0,42 mM, KH₂PO₄ 0,44 mM, NaHCO₃ 2,3 mM, EDTA 0,53 mM, 0,05 % (m/v) tripsina (1:250) e 0,002 % (m/v) de vermelho de fenol, sendo o pH ajustado para 7,4 com bicarbonato de sódio. A esterilização da solução foi feita por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 µm sob pressão em aparelho Sartorius. A solução foi armazenada em frascos estéreis e mantida a -18°C.

5.9.3 Solução salina fosfato tamponada (PBS)

A solução foi preparada na forma de estoque 5 vezes concentrada, dissolvendo os seguintes componentes em água ultrapura: NaCl 680 mM, KCl 13,4 mM Na₂HPO₄ 40,5 mM. O pH foi ajustado para 7,4 e o volume completado para 1 litro em balão volumétrico. A solução foi então autoclavada a 120 °C, 1 atm, por 40 minutos para posterior armazenagem em frasco estéril, mantendo a solução sob temperatura ambiente.

5.9.4 Solução salina balanceada de Hanks (HBSS)

A solução salina balanceada de Hanks (HBSS) foi constituída da mistura de duas soluções (A e B), as quais foram preparadas como soluções estoque (concentradas 20x) e armazenadas a 4°C. A solução A foi composta de NaCl, 2,73 M, KCl, 107 mM, CaCl₂ 25 mM MgSO₄. H₂O 27 M. A solução B foi composta por Na₂HPO₄ 8,5 mM glucose 111 mM. Essas soluções foram preparadas em água ultrapura em volume de 50 mL e armazenadas a 4°C. Na utilização do HBSS, as soluções A e B foram misturadas (1:1), posteriormente diluídas com água ultrapura e o pH foi ajustado para 7,4. A solução salina balanceada foi esterilizada por filtração em membranas estéreis com poros de 0,22 µm em câmara de fluxo laminar.

5.10 MÉTODOS ANALÍTICOS

5.10.1 Viabilidade celular pelo método do MTT

A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) de acordo com MOSMANN (1983). Segundo a metodologia, as células viáveis e metabolicamente ativas reduzem o sal de tetrazólio formando cristais de formazan solúveis em DMSO que absorvem um comprimento de onda de 550 nm. O MTT é reduzido por desidrogenases de células viáveis.

As células HepG2 foram plaqueadas (1×10^4 células/poço) em placas de 96 poços e deixadas em estufa para a adesão a 37 °C, em atmosfera de CO₂ 5% por 24 h. Após aderência foram adicionadas soluções dos polissacarídeos nativo e sulfatado diluídos em meio de cultura nas concentrações de 50, 100 e 250 µg.mL⁻¹, seguido de incubação por 24 horas, 48 horas e 72 horas a 37 °C, em atmosfera de CO₂ 5%. Após a incubação, o meio foi retirado e substituído por HBSS acrescido de solução de MTT (5 mg.mL⁻¹ em HBSS), obtendo-se uma concentração final de 0,5 mg.mL⁻¹. As células, então, foram então incubadas por 3 horas a 37 °C, em atmosfera de 5% CO₂ e, após esse tempo, o sobrenadante foi retirado e DMSO adicionado para dissolução dos cristais de formazan. A absorbância das amostras foi medida em leitor de microplacas, e foi utilizado para leitura de comprimento de onda de 550 nm, utilizando DMSO como branco.

5.10.2 Viabilidade celular pelo método do cristal violeta

O ensaio do cristal violeta baseia-se no fato de que somente as células viáveis permanecem aderidas à superfície de cultivo (KUENG; SILBER; EPPENBERGER, 1989). Após fixação das células, é adicionado o corante cristal violeta que, por sua vez, se liga ao DNA. O corante então é eluído e a viabilidade celular é avaliada espectrofotometricamente em leitor de microplacas em um comprimento de onda de 550 nm.

As células HepG2 foram plaqueadas (1×10^4 células/poço) em placas de 96 poços e deixadas por 24 horas em estufa à 37°C em 5% de atmosfera CO₂ para aderirem. O

meio de cultura foi, então, substituído por meio novo contendo os polissacarídeos nas respectivas concentrações. Como controle negativo, as células foram incubadas somente com meio de cultura. O tempo de tratamento utilizado foi de 72 horas. Após o tempo de tratamento o meio foi aspirado e os poços foram lavados com PBS e então fixados com metanol (100%). Após fixação com metanol foi adicionado o corante cristal violeta. Após lavagem das placas com PBS e eluição do corante com citrato de sódio foi realizada a leitura da absorbância em 550 nm em leitor de microplacas.

5.10.3 Análise do Ciclo Celular por citometria de fluxo

As células HepG2 foram plaqueadas em placas de 12 poços a uma densidade de 5×10^5 células por poço. Após 24 horas de adesão, o sobrenadante foi retirado e as células foram tratadas com o polissacarídeo nativo na concentração de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, por um tempo de 72 horas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO_2 . A seguir foi realizado o procedimento de preparo das amostras para posterior análise. Primeiramente foi realizada a coleta do sobrenadante, e colocado em tubo *falcon*, mantido em gelo. As células foram então lavadas duas vezes com PBS e também foram adicionados no mesmo tubo do sobrenadante que fora coletado anteriormente. As células aderidas foram tripsinizadas e colocadas ao mesmo tubo anteriormente citado. Os tubos contendo as amostras foram centrifugados (3000g por 5 minutos), e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* das células foi ressuspensão em 0,5 mL de PBS e novamente centrifugado na mesma condição anterior. O iodeto de propídio é conhecido por ser um intercalante de DNA e é excitável por laser de argônio emitindo fluorescência na faixa de 560-580 nm.

Para a análise, as células foram ressuspensas em 0,3 mL de solução composta por $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de iodeto de propídio e 0,1% de Triton-X-100 preparado em PBS por 40 minutos e então analisadas no aparelho FACScalibur. No citômetro os 10.000 eventos foram adquiridos usando como filtro de fluorescência FL2, e as análises foram realizadas utilizando um histograma (eixo X: filtro FL2, eixo Y: números de eventos) pelo *software* WinMDI versão 2.9.

5.11 ANÁLISE DO METABOLISMO DAS CÉLULAS HepG2

5.11.1 Consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio foi monitorado por respirometria de alta resolução (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria). As medições foram feitas em duas câmaras a 37°C, sob agitação. As células foram plaqueadas na densidade de 5×10^5 células por placa de 60 mm de diâmetro e deixadas aderirem em estufa pelo período de 24 horas. Após este tempo, as células foram tratadas com concentrações de 100 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do polissacarídeo nativo e sulfatado 1 (S1) pelo período de 72 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e reservado para a análise dos níveis de lactato e piruvato, conforme descrito no item 5.12.2. A seguir as células aderidas foram soltas com solução de tripsina-EDTA (1mL), ressuspensas em meio de cultura (2,1 mL). Em seguida a suspensão foi adicionada às câmaras do oxígrafo. O consumo de oxigênio durante os estados Basal, Leak e desacoplado da respiração (GNAIGER, 2008) foi determinado como descrito a seguir.

O monitoramento da respiração iniciou-se com a adição da suspensão de células à câmara, sendo este período denominado estado basal da respiração. Após alguns minutos foi adicionada oligomicina ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), um inibidor da ATP sintase, sendo este período denominado de estado *Leak* da respiração, no qual o consumo de oxigênio é decorrente da reentrada de prótons na matriz mitocondrial. Em seguida, foi adicionado o desacoplador FCCP ($0,5 \mu\text{M}$), que promove um aumento significativo do consumo de oxigênio, sendo este estado denominado de desacoplado da respiração. Por fim, para cessar a respiração mitocondrial, foram adicionados os inibidores da cadeia de transporte de elétrons, rotenona ($0,5 \text{ mM}$) e antimicina A ($3 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

O consumo de oxigênio foi expresso como fluxo de oxigênio em $\text{pmols/seg/ } 10^6$ células.

5.11.2 Determinação dos Níveis de Lactato e Piruvato

Como descrito anteriormente, o sobrenadante das células tratadas para o ensaio de consumo de oxigênio (item 5.11.1), foi utilizado para a determinação da concentração de lactato e piruvato segundo a metodologia descrita por GUTMAN & WAHLEFELD (1974) e CZOC & LAMPECHT (1974), respectivamente.

O lactato foi dosado em volume final de 300 μL , em meio de reação contendo tampão glicina 0,1M - hidrazina 0,4 M pH 9,5, NAD^+ 1,5 mM, lactato desidrogenase 1,5 U e 150 μL de amostra. O sistema foi mantido em estufa a 37°C por 90 minutos e a quantidade de NADH formada foi determinada em 340 nm em leitor de microplacas (Epoch). Para a determinação de piruvato, o volume final também foi de 300 μL , em uma mistura de reação contendo tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,4, NADH 0,15 mM, lactato desidrogenase 0,05 U e 150 μL de amostra. A quantidade de NADH oxidada foi avaliada espectrofotometricamente em 340 nm após 20 minutos de incubação a 37°C.

Os resultados foram expressos em nmol/L sendo a quantidade de lactato e piruvato calculada a partir do coeficiente de extinção molar do NADH $\epsilon = 6220 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

5.12 AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE MORTE CELULAR

5.12.1 Marcações com Anexina V e Iodeto de propídio

As células HepG2 foram plaqueadas em uma densidade de 5×10^5 células em placas de plástico de 60 mm. Após 24 horas de adesão, o sobrenadante foi retirado e as células foram tratadas com o polissacarídeo na concentração de $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, com a cisplatina (controle positivo para apoptose tardia) em uma concentração de 50 mM e com AAS (controle positivo para apoptose), em uma concentração de 5 mM, por um tempo de 72 horas à 37°C sob atmosfera de 5% de CO_2 . Após o tempo de tratamento foi realizado o procedimento de preparação das amostras para posterior análise.

Primeiramente foi realizada a coleta do sobrenadante, e colocado em tubo *falcon*, mantido em gelo. As células foram então lavadas duas vezes com PBS e também foram adicionados no mesmo tubo do sobrenadante que fora coletado anteriormente. As células

aderidas foram tripsinizadas e colocadas ao mesmo tubo anteriormente citado. Os tubos contendo as amostras foram centrifugados (3000g por 5 minutos), e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* das células foi ressuspensão em 0,5 mL de tampão de ligação (Tampão HEPES 10 mM em pH 7,4, contendo: NaCl 150 mM; KCl 5mM; MgCl₂ 1mM e CaCl₂ 1,8mM à 4°C). 0,1 mL das células que foram ressuspensas foram transferidas para tubos de citometria de fluxo.

A Anexina V-FTIC (5 µL) foi adicionada no escuro nas células que foram tratadas com o polissacarídeo e AAS e dois tubos de citometria foram separados, ou seja sem a marcação com a anexina, um para o branco e o outro para a marcação somente com iodeto de propídio (PI), os quais seriam referentes as células viáveis e células necróticas (controle positivo para a necrose), respectivamente. O PI diluído em PBS (10 µL) também foi adicionado no escuro na concentração de 50 µg.mL⁻¹, nos tubos que continham as células tratadas somente com o polissacarídeo, cisplatina e para os controles negativos, aqueles que foram tratados somente com o meio de cultura.

No aparelho FACScalibur os 10.000 eventos foram adquiridos usando os filtros FL1 (anexina V) e FL2 (iodeto de propídeo), e as análises foram feitas utilizando um gráfico do tipo dot-plot (eixo X: filtro FL1, eixo Y: FL2) pelo *software* WinMDI versão 2.9.

5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism 5.1 para Windows. Foi empregada a análise de variância ANOVA seguida do teste de *Tukey*, sendo considerado o nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO POLISSACARÍDEO DO ENDOSPERMA DE SEMENTES DE *Schizolobium amazonicum*

O *S. amazonicum* é uma árvore nativa (FIGURA 6), pertencente à família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae. É encontrada abundantemente na Amazônia sendo conhecido como pinho cuiabano, paricá ou faveira. Estudos prévios demonstraram que suas sementes (FIGURA 6) são ricas em galactomananas (GANTER *et al.*,1994; PETKOWICZ *et al.*,1998).

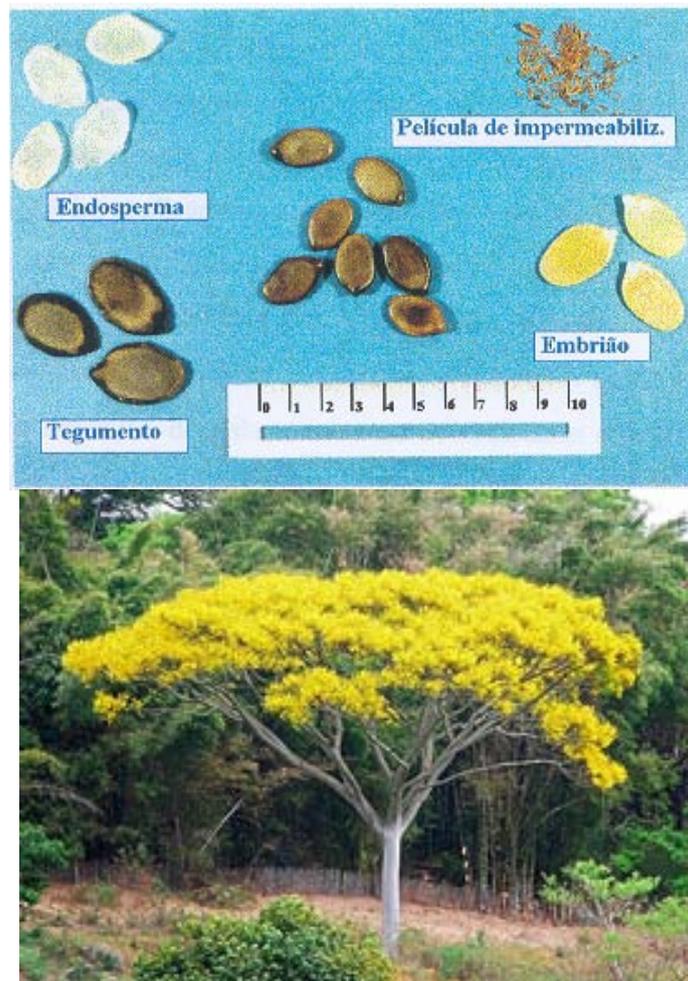


FIGURA 6 - ASPECTOS GERAIS E SEMENTES DE *Schizolobium amazonicum*
 FONTE: jardineiro.net/br/banco/schizolobium_parahyba.php acessado em 3 fev.2011

Neste trabalho a galactomanana de *S. amazonicum*, foi obtida por extração aquosa a 25°C, a partir do endosperma moído e seco, como descrito no item 5.3. A fração polissacarídica (SN) foi obtida por precipitação do extrato aquoso com dois volumes de etanol e logo em seguida centrifugada e seca em estufa à vácuo. O rendimento foi de 41% do endosperma seco, um conteúdo semelhante foi obtido para esta mesma espécie o qual foi utilizado o mesmo protocolo de extração (PETKOWICZ *et al.*, 1998; GANTER *et al.*, 1994). Um alto rendimento a partir do endosperma seco de sementes de leguminosas é característico para algumas espécies de galactomananas, como as sementes de *Cassia* sp, por exemplo (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005).

Após análise da composição monossacarídica por cromatografia líquido-gasosa (GLC) foi calculada a razão Man:Gal da fração SN, sendo obtida uma razão de 3,2:1. Estudos prévios demonstraram que as sementes de *S. amazonicum* contém galactomananas com diferentes graus de substituição. O valor encontrado está de acordo com as razões Man:Gal previamente descritas para as galactomananas das sementes da mesma espécie extraídas com água a 25 °C (PETKOWICZ, 1998; PETKOWICZ; SCHAEFER; REICHER, 2007; BENTO *et al.*, 2013).

O perfil de eluição da fração SN por cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) está indicado na figura 7. A amostra apresentou um perfil de eluição monomodal, detectado simultaneamente pelos detectores de índice de refração (RI) e espalhamento de luz (MALLS) confirmando a presença de um único tipo de polissacarídeo. Quando o perfil de eluição foi monitorado com detector de UV em 280nm nenhum sinal foi observado indicando a ausência de proteína na amostra. A massa molar (M_w) determinada pela técnica de espalhamento de luz para SN foi de $4,34 \times 10^5$ g/mol. A razão entre a massa molar média e a massa numérica média M_w/M_n , conhecida como índice de polidispersão, foi baixa, $1,123 \pm 0,012$, indicando baixa polidispersão da amostra.

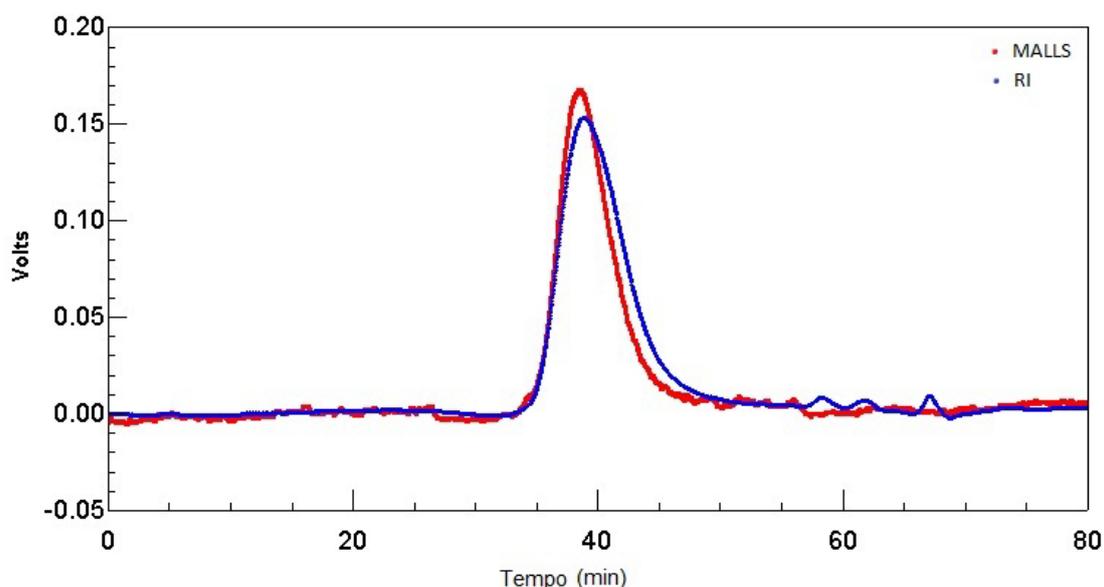


FIGURA 7 - PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC UTILIZANDO O ESPALHAMENTO DE LUZ MULTIANGULOS (MALLS) E DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RI) DO POLÍMERO SN
 NOTA: A amostra foi solubilizada em nitrito de azida e então analisada por cromatografia de exclusão estérica (HPSEC) acoplado ao índice de refração (RI) e espalhamento de luz multiângluos (MALLS).
 FONTE: O Autor (2013)

O espectro de RMN¹³C do polímero confirmou tratar-se de uma galactomanana de estrutura usual, composta por uma cadeia principal de unidades de D- manopiranoses unidas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4), com ramificações laterais de unidades de D- galactopiranoses unidas por ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 6) . A atribuição dos sinais está indicada na tabela 1. Todas as atribuições foram baseadas em dados da literatura (GANTER *et al.*,1994, PETKOWICZ *et al.*,1998; RAMESH *et al.*, 2001; SOUZA, 2009; BUCKERIDGE *et al.*, 1992; BENTO *et al.*, 2013).

TABELA 1 - ATRIBUIÇÃO DOS SINAIS DO ESPECTRO DE RMN ¹³C PARA O POLÍMERO SN

	(ppm) δ					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
α -Gal(1 \rightarrow	98,9	68,6	69,5	69,6	70,1	61,3
\rightarrow 4)- β -Man-(1 \rightarrow	100,1	71,2	71,6	76,4	75,1	60,7
\rightarrow 4,6)- β -Man-(1 \rightarrow	100,1	71,2	71,6	76,7	73,4	66,6

6.2 SULFATAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS SULFATADOS

São conhecidos na literatura diversos reagentes que podem ser utilizados na reação de sulfatação química em polissacarídeos, como por exemplo: complexos de trióxido de enxofre (SO_3) e piridina (FOCHE; MASSOLI, 1986; MESTECHKINA; EGOROV; SHCHERBUKHIN, 2006), ácido clorossulfônico e piridina (O'NEILL, 1955) e ácido piperidina-N-sulfônico em DMSO (MIHAI; MOCANU; CARPOV, 2001), dentre esses o mais citado na literatura para sulfatação química é o ácido clorossulfônico em piridina, pois este está relacionado em um maior grau de substituição de seus derivados sulfatados. O agente sulfatante é sempre utilizado em excesso com relação ao número de hidroxilas livres presentes na estrutura de um polissacarídeo. Juntamente com a temperatura, a proporção molar do agente sulfatante para a cada hidroxila livre pode ser considerado um fator fundamental para regular o número de grupos sulfatos introduzidos (MESTECHKINA; SHCHERBUKHIN, 2010).

Após o isolamento e caracterização, a galactomanana SN foi submetida ao processo de sulfatação utilizando complexo trióxido de enxofre piridina de acordo com o método descrito por Mestechkina *et al.* (2006). Este método foi inicialmente utilizado, pois de acordo com a literatura acarretaria menor degradação do polissacarídeo. Além disto, o mesmo método já foi aplicado com sucesso para outras galactomananas (MESTECHKINA; EGOROV; SHCHERBUKHIN; 2006). Porém, após sucessivas tentativas utilizando diferentes relações molares do complexo trióxido de enxofre piridina por unidade monossacarídica, não foi obtido sucesso no procedimento. Conforme observado por Wang *et al.* (2009), polissacarídeos podem apresentar solubilidades e conformações distintas em diferentes solventes e um método de sulfatação aplicado com sucesso a um determinado polímero pode não ser aplicável a outro. Optou-se então pela modificação química pelo método de O'Neill (1955).

A galactomanana foi então submetida à reação de sulfatação química, utilizando como agente sulfatante o ácido clorosulfônico e a piridina como catalisador. A piridina possui um par de elétrons disponível o que acarretaria na formação de pontes de hidrogênio com as hidroxilas livres dos polissacarídeos, resultando em um aumento da nucleofilia desses grupamentos, fazendo com que estes sejam mais reativos (HAINES, 1976). A reação foi realizada com uma proporção de 25 mol de ácido clorosulfônico/OH, e

o produto obtido após a reação de sulfatação foi denominado S1. Posteriormente, a amostra S1 foi submetida ao processo de ressulfatação pelo mesmo método resultando na amostra S2.

As amostras S1 e S2 foram analisadas quanto ao teor de enxofre para determinação do grau de sulfatação (DS) conforme mostrado na tabela 2. O DS corresponde ao número médio de grupos sulfato substituinte por unidade monossacarídica.

O valor de DS obtido para a fração S1 foi de 0,4 e o teor de enxofre (S) foi de 6,21%. O mesmo DS foi encontrado por Pires et al. (2001) na sulfatação da galactomanana de sementes de *Senna macranthera* (Man:Gal 3,0:1) utilizando ácido clorosulfônico. Um DS (0,4) similar também foi encontrado após a sulfatação química da galactomanana de goma guar pelo mesmo método utilizado no presente trabalho (WANG et al., 2010).

Na tentativa de obter uma amostra com maior DS, a amostra S1 foi submetida ao processo de ressulfatação gerando a amostra S2 que apresentou um DS de 0,6 e a porcentagem de enxofre foi de 8,2%. CHRESTANI et al. (2009) também obteve um DS de 0,6 na sulfatação da galactomanana de *Mimosa scabrella* (Man:Gal 1,1:1). Estes autores realizaram a reação de sulfatação pelo mesmo método utilizado no presente trabalho. Gemin (2008) sulfatou galactomananas de *L. leucecephala* (Man:Gal 1,84:1) segundo o método do ácido clorossulfônico, o DS encontrado foi o mesmo ao deste trabalho após a ressulfatação do polímero de 0,4 para 0,6.

O número de grupos sulfatos introduzidos por unidade monossacarídica (DS) depende de diversos fatores incluindo: o tipo de solvente utilizado na reação, a natureza química dos polissacarídeos, o tipo e configuração de ligações glicosídicas, massa molar e outros fatores estruturais (MESTECKHINA; SHCHERBUKHIN, 2010).

Há relatos na literatura (WANG et al., 2010; LIU et al., 2009) que, se controlar a quantidade de reagente a ser adicionado na reação é melhor do que controlar a temperatura, para assim obter derivados sulfatados com elevados DS. No presente trabalho foi observado que a galactomanana de *S. amazonicum* não solubilizou totalmente no sistema utilizado (formamida-piridina), o que pode ter dificultado a reação.

TABELA 2 - DETERMINAÇÃO DO GRAU DE SULFATAÇÃO (DS) E PORCENTAGEM DE ENXOFRE (%S) DAS FRAÇÕES SN, S1 E S2 OBTIDAS DAS SEMENTES DE *S. amazonicum*

Polissacarídeo	S%	DS
SN	0	0
S1	6,2	0,4
S2	8,2	0,6

*média de 3 experimentos realizados em triplicata

As galactomananas nativas e modificadas foram investigadas por espectrometria de infravermelho (FIGURA 8). Para as amostras que passaram pelo processo de sulfatação, uma banda de vibração de estiramento axial deveria aparecer em torno de 1250 cm^{-1} , correspondente à vibração de S=O. A banda em 1250 cm^{-1} , ausente na amostra nativa, ficou bem evidente nas amostras S1 e S2, confirmando a sulfatação. Alguns estudos (AKASHI *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010; JUNG *et al.*, 2011) evidenciaram que após a sulfatação química em polissacarídeos, além da bandas de estiramento axial em torno de 1250 cm^{-1} , surgiram bandas de estiramento axial em torno de 810 cm^{-1} referente as ligações C-O-S.

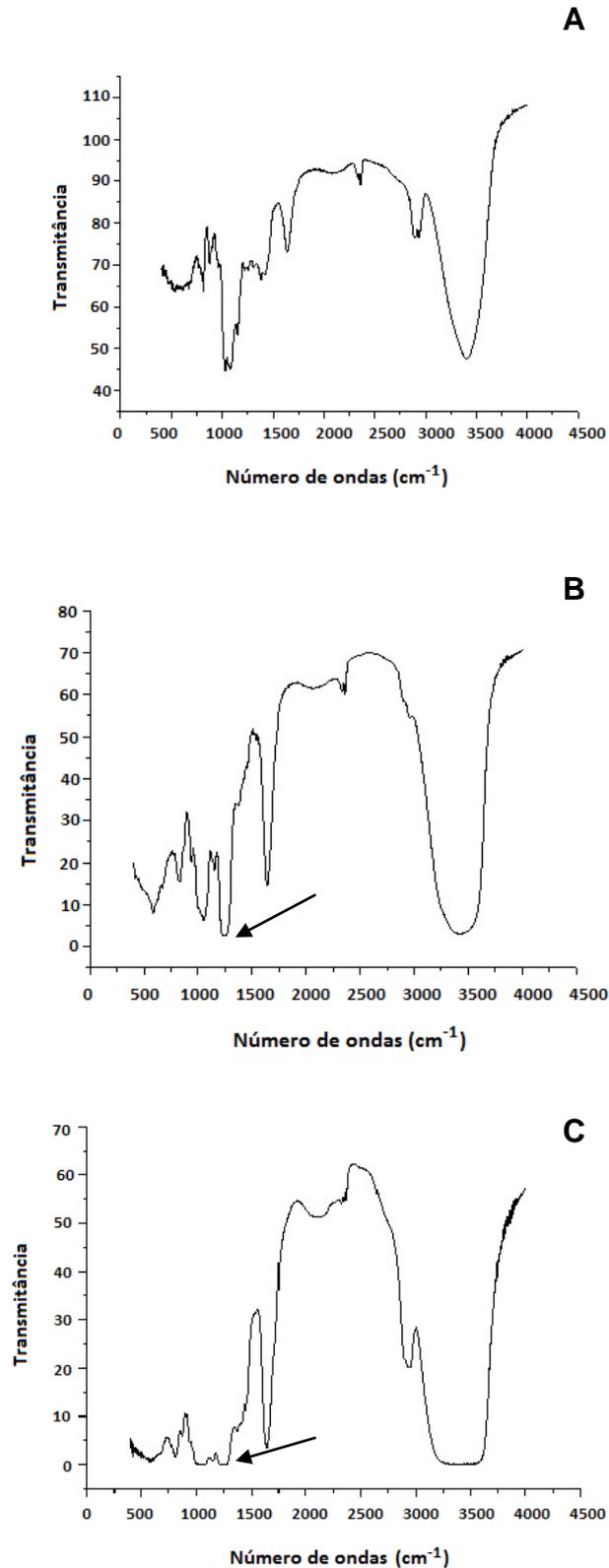


FIGURA 8 - ESPECTROS DE INFRAVERMELHO (FTIR) DAS GALACTOMANANAS SN (A), S1 (B) E S2 (C) EM PASTILHAS DE KBr

FONTE: O autor (2013).

NOTA: As amostras (2 mg) foram homogeneizadas em KBr previamente seco (100 mg) e então analisadas em forma de pastilhas. A seta aponta o local onde se verifica a banda de sulfatação a 1250 cm⁻¹. A amostra S2, apresentou uma banda mais alargada o que indica uma possível hidratação da amostra.

Os polímeros quimicamente sulfatados (S1 e S2) foram analisados por RMN ^{13}C (FIGURA 9) e seus espectros foram comparados com o espectro obtido para a mostra SN. Nos espectros das amostras sulfatadas os sinais são mais alargados e com uma resolução diferenciada quando comparada com a SN (FIGURA 9A). Este efeito já foi observado por outros autores nos espectros de RMN ^{13}C de polissacarídeos após sulfatação química (MARTINICHEN *et al.*, 2001; PIRES *et al.*, 2001; GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2007b; CHRESTANI *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2010).

Quando comparado ao espectro de RMN ^{13}C da galactomanana nativa (SN), o espectro da fração S1 mostrou uma redução da intensidade dos sinais referentes ao C-6 das unidades de galactose e manose não substituídas, sugerindo que a sulfatação ocorreu nesta posição. O experimento de DEPT na da amostra não sulfatada-SN (inserto na FIGURA 9A) confirma a identificação dos sinais correspondente ao C-6 livre das unidades de manose e galactose. O espectro de S1 também apresenta um sinal adicional intenso em δ 67,45, que poderia corresponder ao sinal do C-6 das unidades que foram sulfatadas. A sulfatação preferencial dos grupamentos mais reativos CH_2OH -6 já foi descrita anteriormente (PIRES *et al.*, 2001; CHRESTANI *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2010; WANG; ZHAO; WANG, 2012).

No espectro da amostra S2, os sinais referentes ao C-6 das unidades de galactose e manose não substituídas se tornam praticamente inexistentes sugerindo completa sulfatação do polímero nestas posições. O DS determinado para a amostra (0,6) corrobora com esta hipótese.

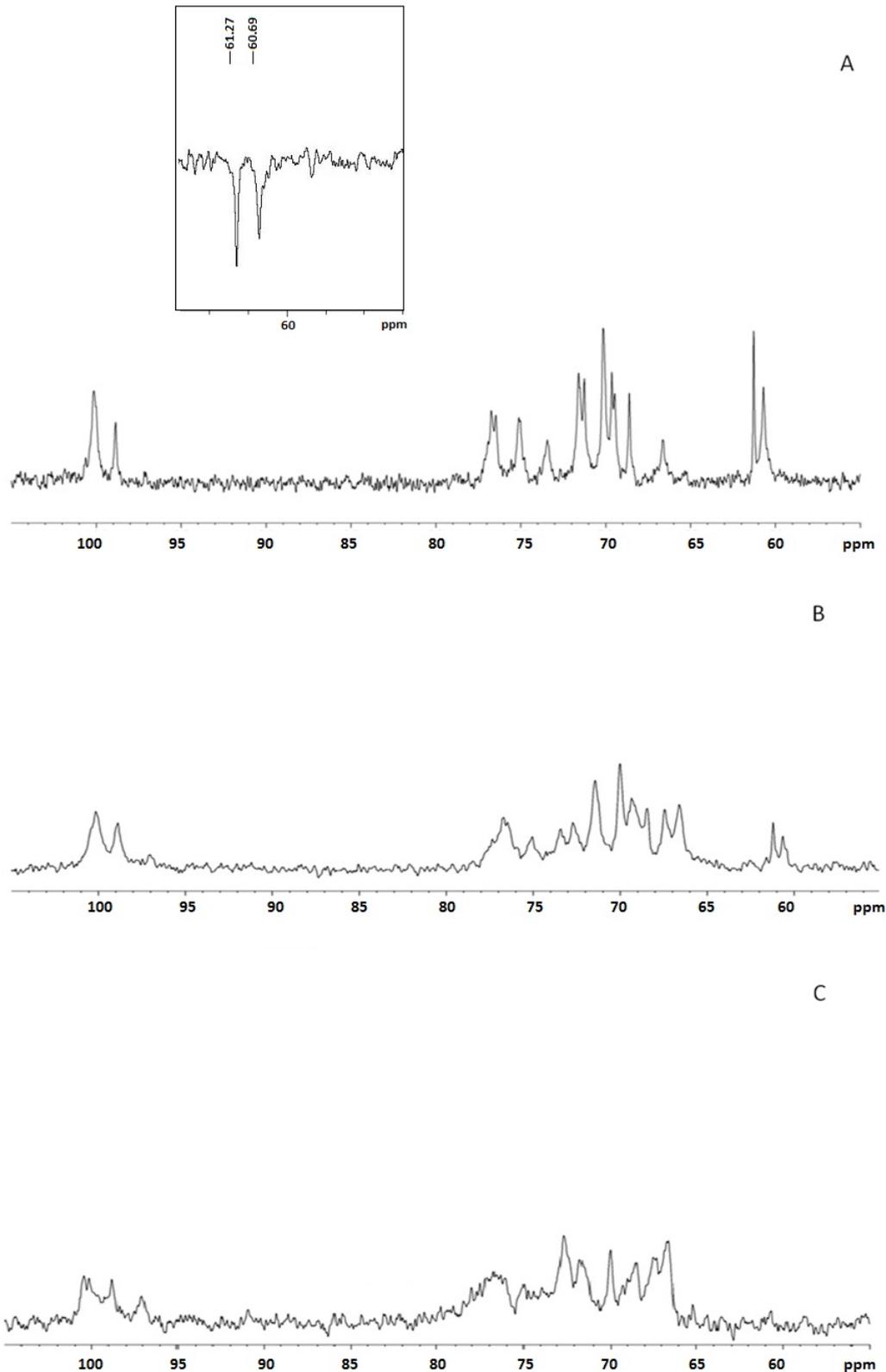


FIGURA 9 - ESPECTROS DO RMN ^{13}C DOS POLÍMEROS SN (A), S1 (B) E S2 (C) DE *S. amazonicum*
 FONTE: O autor (2013)

NOTA: As amostras (15 mg) foram solubilizadas em $\text{D}_2\text{O}:\text{H}_2\text{O}$ e então analisadas em RMN ^{13}C a 70°C .
 Inseto) DEPT da amostra SN, sinais invertidos referentes aos C-6 não substituídos.

As galactomananas modificadas, S1 e S2, foram analisadas por HPSEC (FIGURA 10). Diferentemente da amostra nativa (SN), as amostras S1 e S2 apresentaram um perfil de eluição polimodal, indicando que o processo de sulfatação promoveu degradação do polissacarídeo. Em ambas as amostras sulfatadas observa-se o aparecimento de um pico adicional detectado apenas pelo RI, eluindo em tempos de eluição superiores a 50 min. A massa molar calculada para S1 ($3,41 \times 10^5$ g/mol) e S2 ($2,433 \times 10^5$ g/mol) foi determinada por valores obtidos de dn/dc , esses valores se mostraram inferiores aos obtidos para a amostra nativa.

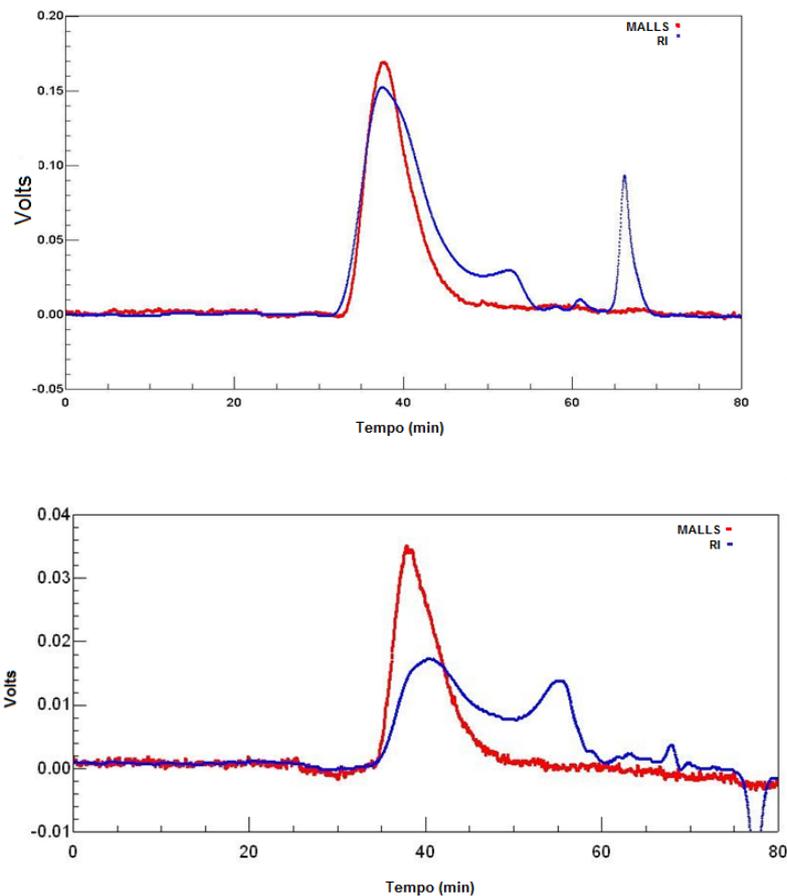


FIGURA 10 - PERFIL DE ELUIÇÃO HPSEC-MALLS/RI DA GALACTOMANANA OBTIDA PELA REAÇÃO DE SULFATAÇÃO E RESSULFATAÇÃO DE S1 E S2 RESPECTIVAMENTE
 FONTE: O Autor (2013).

NOTA: As amostras foram solubilizadas em nitrito de azida e então analisadas por cromatografia de exclusão estérica (HPSEC) acoplado ao índice de refração (RI) e espalhamento de luz multiângulos (MALLS).

Muitas pesquisas envolvendo a sulfatação de polissacarídeos de diversas fontes indicam que com um aumento na temperatura da reação, prolongamento do tempo de reação e aumento da razão molar tanto do solvente como do agente sulfatante pode contribuir para um maior grau de substituição (WANG *et al.*, 2009)

O ácido clorossulfônico, um agente sulfatante muito citado em diversos trabalhos (GRACHER, 2010; GERESH *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2011; JUNG *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2010), é um ácido forte o qual pode ser responsável pela degradação do polissacarídeo e conseqüentemente ocorrendo um decréscimo na massa molar do polímero, como observado neste trabalho. A diminuição da massa molar também foi observada em galactomananas de goma guar quimicamente sulfatadas pelo método do ácido clorosulfônico em piridina. A massa molar das amostras sulfatadas diminuiu quando a reação foi realizada com excesso de piridina. Estes resultados estão relacionados com a extensa degradação do polímero durante a reação química, o que leva a hidrólise do polissacarídeo na presença de um ácido forte (WANG *et al.*, 2010)

Uma vez que os polissacarídeos nativos e modificados foram caracterizados, estes foram então submetidos em ensaios biológicos visando a avaliação quanto a toxicidade em células HepG2.

6.3 ENSAIOS EM CULTURA DE CÉLULAS HepG2

6.3.1 Efeitos dos polissacarídeos SN, S1 e S2 sobre a viabilidade de células HepG2

Quando se trata de avaliações de citotoxicidade *in vitro*, ensaios de viabilidade celular são fundamentais por fornecerem informações que nortearão o delineamento experimental, como a definição das concentrações do composto estudado e tempo de tratamento. Neste contexto, recomenda-se que diferentes metodologias de avaliação da viabilidade celular sejam realizadas, com o objetivo de garantir a confiabilidade dos resultados. Com esta finalidade, neste estudo, inicialmente foi utilizado o método do MTT, o qual é reduzido por desidrogenases mitocondriais de células viáveis a cristais de formazan.

Os resultados da viabilidade celular pelo método do MTT estão representados na figura 11, onde se observa que a galactomanana na sua forma nativa (FIGURA 11A) exerce efeito citotóxico a partir de 24 horas. A intensidade do efeito foi concentração dependente, ocorrendo a diminuição da viabilidade em 25, 30 e 50%, para 24, 48 e 72 horas respectivamente, na maior concentração avaliada ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$). No entanto, a redução da viabilidade não foi tão pronunciada para as amostras sulfatadas S1 e S2 (FIGURA 11, B e C), quando comparada com o polissacarídeo nativo (SN). O polímero S1 na concentração de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, em 72 horas de incubação reduziu a viabilidade das células HepG2 em torno de 30% (FIGURA 11B).

Para a amostra S2, que apresentava maior DS e conseqüentemente a porcentagem de enxofre, não foi observado nenhum efeito citotóxico para ambas as concentrações e tempos avaliados, como mostrado na figura 11C. Como mostrado anteriormente, o método utilizado para a sulfatação da galactomanana promoveu degradação do polímero, resultando em redução da massa molar. Esta diminuição da massa pode ser responsável pelo menor efeito citotóxico observado para as galactomananas sulfatadas quando comparadas ao polímero nativo. Alguns trabalhos mostram que após a sulfatação química, o tamanho do polissacarídeo pode influenciar na eficiência da atividade antitumoral, sendo que, uma maior massa molar e DS poderão resultar em aumento na atividade antitumoral (CHEUNG, 2006; GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2007b; YE *et al.*, 2008; TAO; ZHANG; LIU *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2011).

Diferenças importantes na viabilidade celular entre polissacarídeos sulfatados e, seus respectivos polímeros nativos têm sido observadas. Gamal-Eldeen e colaboradores (2007b) avaliaram os efeitos de galactomananas quimicamente sulfatadas e não sulfatadas de *Leucaena leucacephala* sobre a viabilidade de células HepG2 pelo método do MTT. A partir de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o efeito citotóxico provocado pelo polímero sulfatado foi de aproximadamente 50%, enquanto que para a amostra nativa, este efeito foi de ~30%.

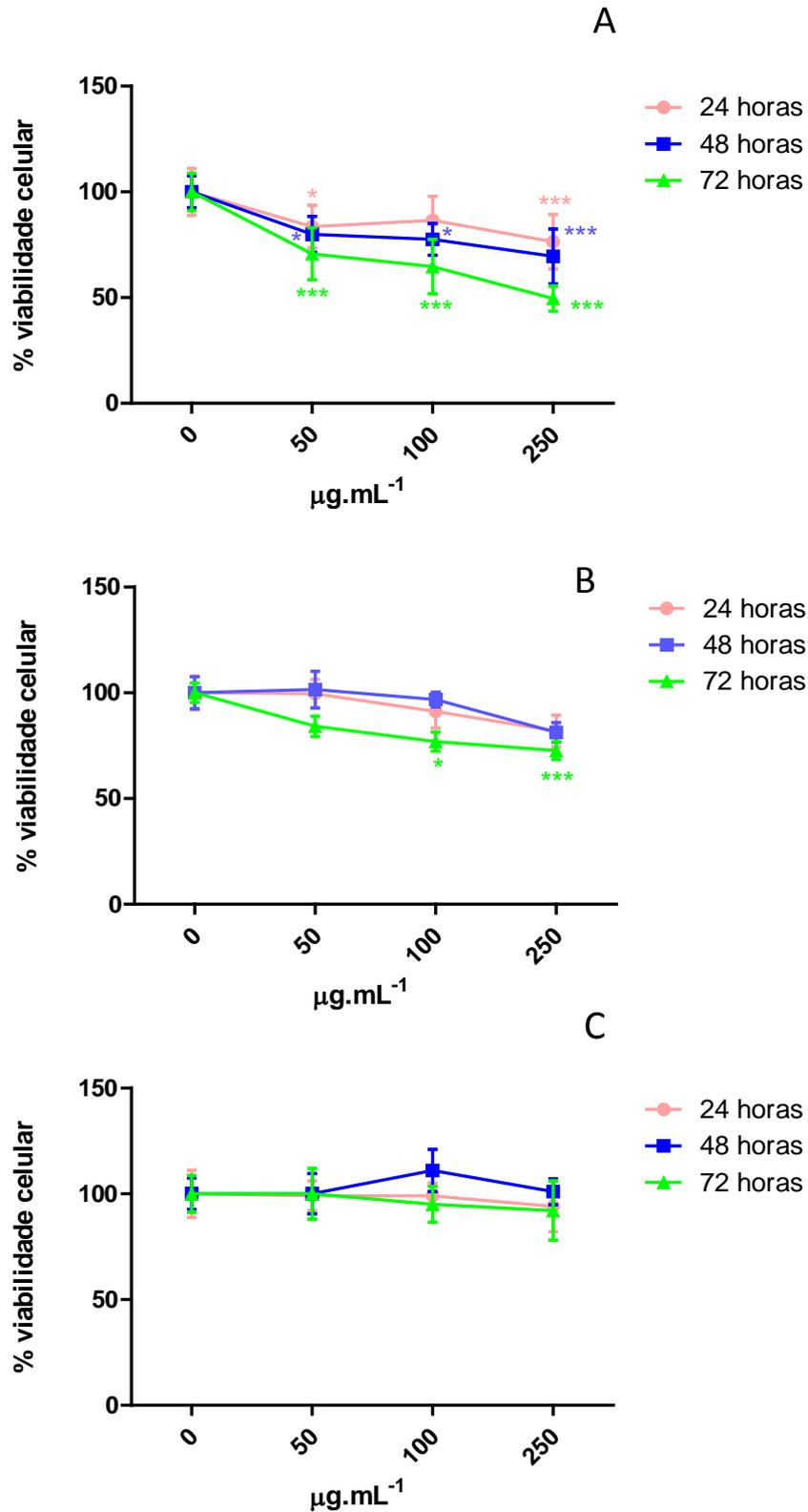


FIGURA 11 - EFEITO DE SN, S1 E S2 SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS HepG2

FONTE: O Autor (2013)

NOTA: A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT, conforme descrito no item 5.10.1, após os tratamentos com SN (A), S1 (B) e S2 (C), nas concentrações 50, 100 e 250 µg.mL⁻¹, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. O controle foi considerado com 100% de viabilidade, é representado somente pelo tratamento com meio (DMEM). Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em quadruplicata. (ANOVA, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Um efeito semelhante foi observado por CHEN e colaboradores (2011). Os autores isolaram e realizaram a sulfatação química em polissacarídeos de *Gynostemma pentaphyllum*, contendo unidades de galactose, manose, rhamnose e arabinose. O polímero com maior DS (1,34) exerceu um melhor (~46%) efeito citotóxico nas células HepG2 do que o polímero nativo, na maior dose avaliada (1mg.mL⁻¹). Possivelmente, os resultados destes autores, distintos daqueles obtidos no presente trabalho estejam relacionados com o aumento da massa molar, cuja massa foi de 8,64 para 11,2 Da após sulfatação e neste caso não houve a degradação do polissacarídeo.

Esta diferença na viabilidade das células HepG2, com os diferentes polímeros avaliados (GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2007b; CHEN *et al.*, 2011) além de estar relacionada com a diferença na concentração dos polímeros utilizados, uma vez que um autor utilizou 5 µg.mL⁻¹ e o outro 1 mg.mL⁻¹, pode estar intimamente ligada com a estrutura do polissacarídeo bem como a quantidade de unidades de galactose em sua estrutura, sendo que esta, pode ser reconhecida por receptores presentes nas células HepG2, uma vez que, como citado anteriormente, as células do fígado possuem receptores de galactose que podem influenciar na eficiência da atividade antitumoral (OHYA *et al.*, 2001).

Em outro estudo Wang, Li e Chen (2009) avaliaram os efeitos de polissacarídeos sulfatados de farelo de arroz pelo método de O'Neill (1955), obtendo nove frações polissacarídicas com diferentes DS e porcentagem de enxofre. O DS das frações variou de 0,04 a 1,29 e as nove frações foram avaliadas em ensaios *in vitro* com células HepG2 e B16-F10. Os resultados obtidos pelos autores indicaram que a viabilidade das duas linhagens avaliadas diminuiu com o aumento do DS das frações avaliadas, ou seja, com um alto DS (1,29), o polímero inibiu o crescimento das células em ~47% e 55%, para as duas linhagens, em um tempo de incubação de 48 horas.

β-glucanas de *Pleurotus eryngii* (JUNG *et al.*, 2011) sulfatadas quimicamente pelo método de O'Neill (1955) foram investigadas em células do adenocarcinoma humano. Quando comparado com o polímero nativo os derivados sulfatados variando o DS de 0,12 a 0,92 inibiram o crescimento das células tumorais de uma maneira dose-dependente o que pareceu ser dependente do DS. O maior DS se mostrou capaz em inibir a proliferação das células em ~70% na maior concentração testada (1000µg.mL⁻¹)

Testes *in vitro* com células HepG2 demonstraram que o polissacarídeo de raízes de *Limonium sinense* Kuntze, uma planta medicinal utilizada para o tratamento de

diversas doenças, (TANG *et al.*, 2012) exerceu uma inibição do crescimento de ~38% das células na maior dose avaliada ($400 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Estes mesmos autores realizaram testes *in vivo*, e foi demonstrado que o polissacarídeo, exerceu uma inibição no crescimento do tumor de camundongos transplantados (células HepG2 implantadas na cavidade peritoneal) e o efeito foi mais significativo quando o polissacarídeo foi utilizado com um composto de ação antitumoral (5-FU).

O próximo ensaio de viabilidade realizado utilizou o cristal violeta. Os resultados desta metodologia amplamente utilizada para avaliar a citotoxicidade, foram distintos aos observados pelo método do MTT (FIGURA 12). Observa-se na figura 12 que o tratamento das células HepG2 com as galactomananas não promoveu redução significativa da viabilidade celular em todas as concentrações e tempos avaliados.

Esta diferença nos resultados pode relacionar-se com a variação metodológica. O método do MTT é associado com a atividade de desidrogenases mitocondriais de células viáveis e, o ensaio do cristal violeta, com a quantidade de células aderidas na placa de cultivo. Diante desta consideração pode-se sugerir a ocorrência de dano mitocondrial sem ter ocorrido o desprendimento das células até a interrupção do tratamento. Ainda no ensaio do cristal violeta, a absorbância das células com o DNA corado não corresponde necessariamente ao número de células viáveis, após a cultura ter atingido sua confluência, uma vez que os resultados podem variar quando as células podem não crescer uniformemente ao fundo de cada poço. Em alguns casos, as células aderentes, incluindo as células mortas são consideradas células viáveis devido à coloração não específica do corante (CHIBA; KAWAKAMI; TOHYAMA, 1998).

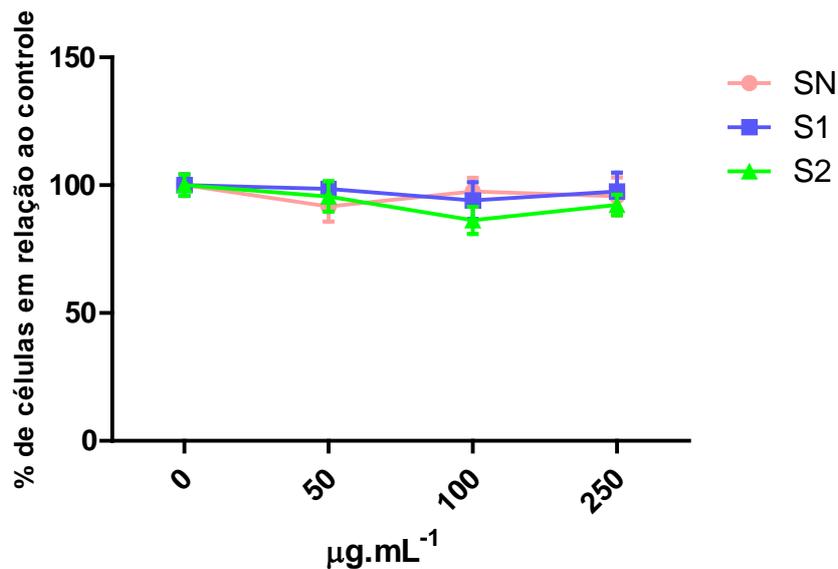


FIGURA 12 - EFEITO DOS POLÍMEROS SN, S1 E S2 NA VIABILIDADE CELULAR EM 72 HORAS DE TRATAMENTO NAS CÉLULAS HepG2, PELO MÉTODO DO CRISTAL VIOLETA

FONTE: O Autor (2013)

NOTA: A viabilidade celular foi avaliada pelo método do cristal violeta conforme descrito no item 5.10.2. Após os tratamentos com SN, S1 e S2, nas concentrações de 50, 100 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, no tempo de 72 horas. O controle foi considerado com 100% de viabilidade e é representado somente pelo tratamento com meio (DMEM). Os resultados estão representados em média \pm desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em quadruplicata.

Outra abordagem para investigar a ação dos polissacarídeos nas células HepG2 foi a análise do ciclo celular utilizando o iodeto de propídeo, um agente intercalante de DNA (PERES; CURI, 2005). As células foram tratadas com SN na concentração de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ durante 72 horas e processadas como descrito no item 5.10.3. O histograma representativo de tais experimentos pode ser visualizado na figura 13A.

Como representado na figura (13A), o histograma pode ser delimitado por regiões denominadas M1, M2, M3 e M4. A região M1 corresponde à intensidade de fluorescência emitida pelas células que estão com o DNA fragmentado, sendo representadas por Sub-G1. A região M2 é correspondente às células que estariam na fase G1. E as regiões M3 e M4, são regiões que correspondem às células que estariam na fase G2-M do ciclo celular.

Como observado na figura 13B nestas condições experimentais, o tratamento com SN, não interferiu na progressão do ciclo celular das células do hepatocarcinoma humano, quando comparado ao grupo controle, no qual as células foram tratadas somente com o meio de cultivo.

Diversos trabalhos avaliando frações vegetais contendo polissacarídeos sobre a progressão do ciclo celular de células tumorais (LIANG *et al.*, 2012; GAMAL-ELDEEN *et*

al.,2007; CHIA-JUNG *et al.*, 2012; HIU-LI *et al.*, 2013), demonstraram uma parada na progressão do ciclo celular, resultado diferente do obtido neste estudo.

Uma fração extraída da planta *Aconitum coreanum* uma planta medicinal utilizada como adjuvante no tratamento do câncer em países orientais, se mostrou capaz de impedir a progressão do ciclo celular em células do hepatocarcinoma humano (H22). De acordo com os autores, a fração estudada promoveu um aumento de ~80% na quantidade de células nas fases SubG1 do ciclo, enquanto que nas fases G2/M ocorreu uma diminuição quantitativa dessas células (LIANG *et al.*,2012). Entretanto, estes autores trabalharam com uma fração bruta, que além de polissacarídeos pode conter outros componentes químicos que podem também serem responsáveis pelo efeito observado.

Um extrato etanólico de *Corchorus olitorius* (CHIA-JUNG *et al.*, 2012), se mostrou capaz de induzir a apoptose em células HepG2 devido ao aumento de células na fase SubG1 do ciclo, o que está relacionado com a quantidade de DNA fragmentado. O aumento de células na fase SubG1 foi significativo uma vez que as células tiveram um tempo de 12 e 24 horas de tratamento, na menor dose avaliada (12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Galactomananas de *L. leucacephala* nativas e sulfatadas segundo o método de O'Neill (1955), foram incubadas com as células HepG2 (GAMAL-ELDEEN *et al.*, 2007b). Os resultados mostraram que na concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da galactomanana nativa ocorreu uma parada no ciclo celular nas fases S e G2/M. Neste estudo ambos os polímeros apresentaram o mesmo efeito na concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados sugerem que tanto o polissacarídeo nativo quanto o polissacarídeo sulfatado afetam a progressão das células, o que indica que neste caso a sulfatação química da galactomanana não seria necesssária.

Em outro estudo (HIU-LI *et al.*, 2013) polissacarídeos nativos e seus derivados quimicamente sulfatados isolados de *P. massoniana* foram incubados com as células HepG2. Os autores observaram que a porcentagem de células na fase S foi significativamente reduzida e a porcentagem de células na fase G2/M foi significativamente aumentada (~20%) quando comparada com o controle, este efeito foi mais pronunciado quando as células HepG2 foram incubadas com o polissacarídeo sulfatado. Esses resultados sugerem que o polímero sulfatado promoveu uma parada no ciclo celular dessas células.

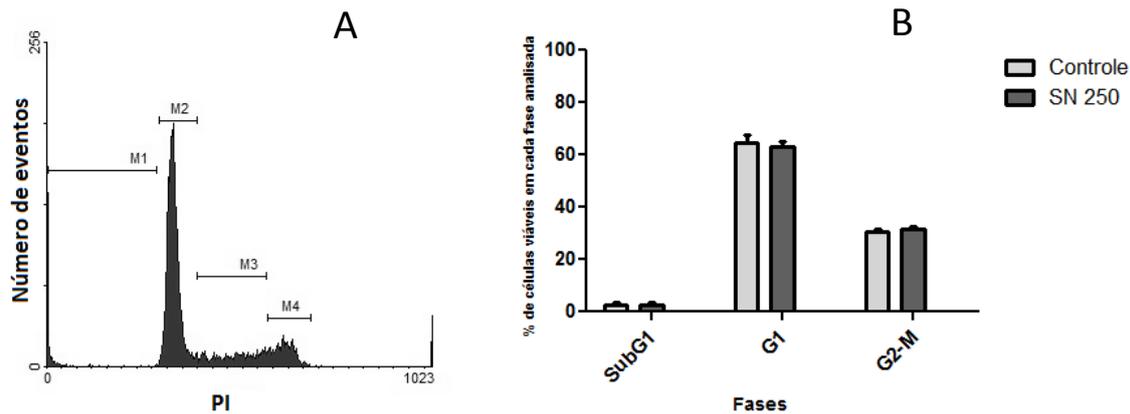


FIGURA 13 - ANÁLISE DO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS HepG2

FONTE: O autor (2013)

NOTA: A) Histograma representativo das células HepG2 tratadas com o polissacarídeo nativo, na concentração de $250\mu\text{g.mL}^{-1}$. As regiões delimitadas M1, M2, M3 e M4 na figura correspondem a: M1-Sub-G1; M2-fase G1; M3 e M4-fase G2-M. B) Porcentagens de células em cada fase do ciclo celular após 72 horas de tratamento com SN na concentração de $250\mu\text{g.mL}^{-1}$. Gráfico representativo de três experimentos independentes realizados em duplicata, média \pm desvio padrão.

Apesar dos resultados de viabilidade celular pelos métodos do cristal violeta e análise do ciclo celular não terem apresentado diferença significativa em relação ao controle, não se exclui a possibilidade do polímero nativo estar induzindo a morte das células, uma vez que em alta concentração, SN (FIGURA 11A) promoveu perda na viabilidade celular, o que poderia estar relacionado com um dano mitocondrial.

É conhecido que a morte celular por apoptose é caracterizada por certas alterações bioquímicas e morfológicas, como ativação de cascatas de caspases intracelular, condensação da cromatina, fragmentação do DNA, permeabilização da membrana mitocondrial, inchamento da membrana, não ocasionando a perda de integridade, formação de vesículas ligadas a corpos apoptóticos e dentre outras (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; TINARI *et al.*, 2008).

Uma característica importante observada em células em processo de apoptose é a exposição do fosfolípido fosfatidilserina para o lado extracelular da membrana (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Esta alteração é útil para avaliar se o mecanismo de morte é por apoptose, uma vez que exposto na membrana a fosfatidilserina se liga a proteína anexina V com alta afinidade e, após a ligação da anexina V marcada com isotiocianato de fluorescência (FTIC), o qual emite fluorescência na faixa de comprimento de onda de 515-530 nm (FL1) é possível avaliar se as células estão em apoptose. Nesta avaliação é realizada concomitantemente a marcação com iodeto de propídio (PI) que

penetra na célula se ela não estiver com a membrana íntegra e emite fluorescência no comprimento de onda de 560-580 nm (FL2), o que corresponde à marcação positiva para PI, indicando que as células perderam a integridade da membrana celular, excluindo assim a ocorrência de morte por apoptose, indicando morte celular por processo de necrose (PERES; CURI, 2005; DARZYNKIEWICZ *et al.*, 1992).

Para avaliar se SN promovia morte celular por apoptose, as células HepG2 foram então tratadas com o polissacarídeo (SN) na concentração de 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, AAS (Ácido acetilsalicílico - 5 mM) e cisplatina (32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) por um período de 72 horas. O AAS foi utilizado para controle positivo de apoptose e a cisplatina foi utilizada para controle positivo de apoptose tardia. Após este tempo as células foram então processadas e analisadas no citômetro de fluxo.

Na figura 14 estão representados os *dot-plots* das células HepG2 tratadas com SN e os respectivos controles. Os *dot-plots* estão divididos em quatro partes, onde cada quadrante representa um tipo de marcação: quadrante 1 (superior esquerdo) – localizam as células marcadas somente com PI, indicando morte celular por necrose; quadrante 2 (inferior esquerdo) – representam as células viáveis que não possuem nenhuma marcação; quadrante 3 (superior direito) – células com a dupla marcação (PI + Anexina/FITC), representando as células que estariam em apoptose tardia e quadrante 4 (inferior direito) – marcação somente com Anexina V/FITC, o qual representa as células que estariam em um processo inicial de apoptose.

Como pode ser observado na figura 15, o tratamento com a galactomanana nativa na concentração avaliada não foi capaz de induzir a morte celular, tanto por apoptose e necrose nas condições experimentais avaliadas, portando, sugere-se que o polissacarídeo pode estar causando algum dano mitocondrial sem ter promovido a morte celular, uma vez que no método de viabilidade celular, o MTT, o polissacarídeo na sua forma nativa foi capaz de inibir o crescimento das células HepG2 em um tempo de 72 horas de tratamento, na maior concentração avaliada.

Similar comportamento foi observado para xiloglucana de sementes de *C. langsdorffi* em células de melanoma murino (B16F10). Pelo método do MTT a xiloglucana foi citotóxica a partir de 24 horas de tratamento, porém na análise de indução morte celular não foi observado efeito significativo (FARIAS, 2012).

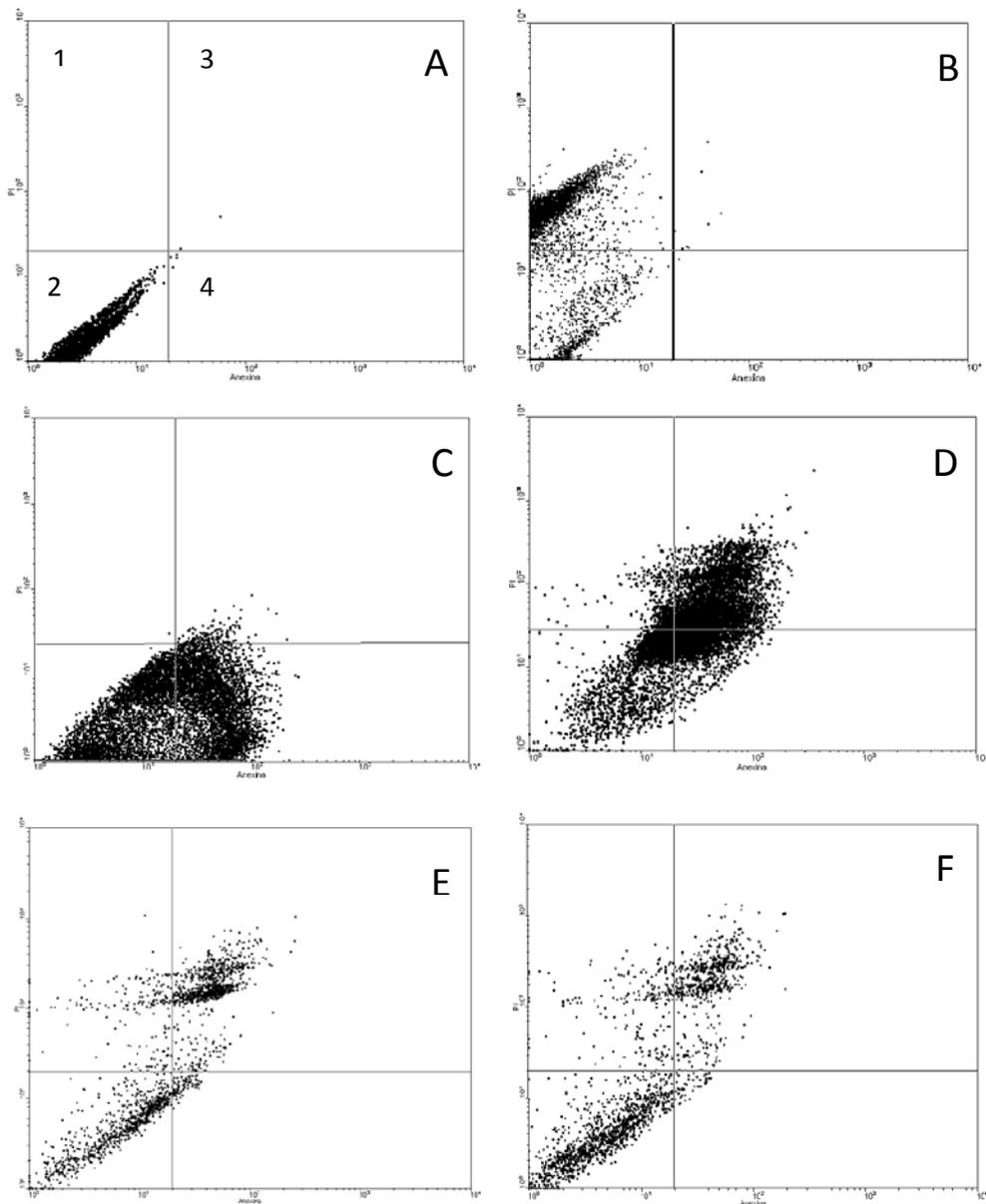


FIGURA 14 - ANÁLISE DE MORTE CELULAR DAS CÉLULAS HepG2 TRATADAS COM SN, AAS E CISPLATINA
 FONTE: O autor (2013)

NOTA: *Dot-plots* representativos com o polissacarídeo SN, na concentração de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, AAS e Cisplatina por um tempo de 72 horas de tratamento. Células que não receberam marcação nem com PI e nem com Anexina-V/FITC (células viáveis - A); células marcadas somente com PI (controle positivo para necrose - B); células marcadas somente com Anexina V/FITC (controle positivo para apoptose - C); células com dupla marcação PI+Anexina V (controle positivo para apoptose tardia - D); células tratadas somente com meio de cultura; E) e células tratadas com o polissacarídeo nativo (F).

Resultados distintos dos obtidos no presente estudo, em relação à morte celular por apoptose induzida por polissacarídeos foram observados por Wu; Yanqun (2010). Um polissacarídeo extraído de *Astragalus membranaceus* constituído de glucose, manose e

xilose, levou a morte celular por apoptose em células HepG2 em aproximadamente 45% em relação ao controle, quando incubado por um período de 48 horas de tratamento em uma concentração de $45 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Em outra linhagem celular, Zeng e colaboradores (2012) avaliaram o efeito de uma fração contendo polissacarídeos (não fracionados e nem caracterizados) extraídos de *Curcuma kwangsiensis* em células do carcinoma nasofaríngeo (CNE-2). Os resultados mostraram um aumento no percentual de células apoptóticas quando incubadas com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em 48 horas de tratamento.

Um extrato etanólico derivado de *Chlorella* sp (JING-GUNG *et al.*, 2012), uma alga verde foi incubado com as células HepG2 em um tempo de 48 horas de tratamento para avaliar possíveis efeitos na indução de morte celular causada pelos polissacarídeos, uma vez que no método do MTT o extrato etanólico apresentou efeito citotóxico de uma maneira dose-dependente, a qual na maior concentração avaliada ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) a diminuição da viabilidade celular foi de ~38%.

Ensaio de citometria de fluxo mostraram mudanças marcantes nos perfis de células HepG2 após o tratamento com 150, 300 e $600 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de heteropolissacarídeos isolados de cogumelos (*M. sculenta*). O polímero induziu a apoptose quando comparado com o grupo controle em ~50% na maior concentração avaliada. No entanto houve um aumento na quantidade de células HepG2 necróticas após a exposição ao polímero (HU *et al.*, 2013).

Polissacarídeos de *P. linteus*, induziram a apoptose em células HepG2 após 24, 60 e 96 horas de tratamento a partir da menor concentração ($0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). A porcentagem de células apoptóticas foi de 7,62%, 18,7% e 36,6%, respectivamente, para os tempos avaliados em relação ao controle. Os resultados indicaram que a morte celular por apoptose foi tempo e dose-dependente (WANG *et al.*, 2012).

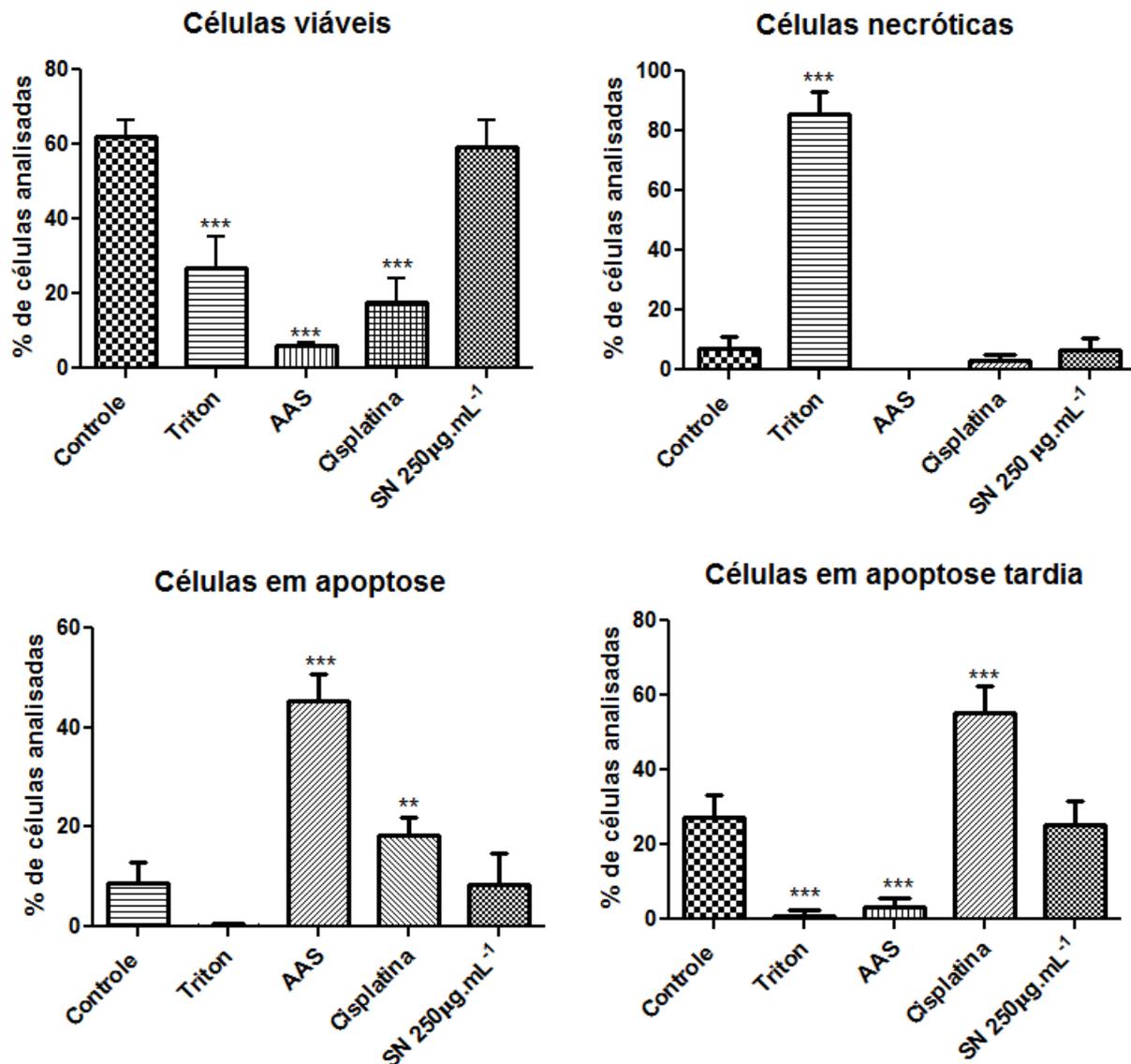


FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO QUANTITATIVA DA ANÁLISE DE MORTE DAS CÉLULAS HepG2 TRATADAS COM SN, AAS E CISPLATINA.

FONTE: O autor (2013)

NOTA: O grupo controle negativo representa as células tratadas somente com meio de cultura. As condições experimentais estão descritos em material e métodos no item 5.12.1. Como controle positivo para apoptose foi utilizado AAS 5 mM e controle positivo para apoptose tardia foi utilizada a cisplatina 50 mM, por um tempo de 72 horas de tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão de cinco experimentos independentes realizados em duplicata. (ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Embora os ensaios de citotoxicidade (cristal violeta, análise de ciclo e de morte celular) não tenham indicado efeitos citotóxicos da galactomanana para as células

HepG2, no teste do MTT (FIGURA 11) foi evidente a perda de viabilidade destas células tratadas com este polímero. Para tentar compreender os efeitos citotóxicos observados, os estudos foram direcionados para avaliar possíveis interferências da galactomanana no metabolismo das células HepG2, uma vez que, o diferenciado metabolismo das células tumorais é alvo de estudo visando o desenvolvimento de medicamentos antineoplásicos (TENANT *et al.*, 2010; HSU; SABATINI, 2008; DIAZ-RUIZ; RIGOULET; DEVIN, 2011). Além disso, são escassos os dados na literatura sobre os efeitos de polissacarídeos em especial, galactomananas sobre qualquer parâmetro do metabolismo de células tumorais.

6.4 EFEITOS DA GALACTOMANANA NATIVA E SEU DERIVADO SULFATADO SOBRE ALGUNS PARÂMETROS DO METABOLISMO DAS CÉLULAS HepG2

O desenvolvimento de tratamentos para o câncer tendo como o alvo o metabolismo de células tumorais tem recebido muita atenção nos últimos anos, visto que alterações específicas em vias metabólicas podem gerar oportunidades em desenvolver novas abordagens terapêuticas (TENANT *et al.*, 2010; HSU; SABATINI, 2008).

Entre os alvos do metabolismo de interesse no estudo de atividade anticâncer, grande destaque tem sido dado para avaliações visando interferência no metabolismo mitocondrial (GOHIL *et al.*, 2010). Sabe-se que a mitocôndria possui uma função essencial na provisão de energia para as células eucarióticas, garantindo assim a sua sobrevivência. Compostos que podem desencadear alteração nas funções mitocondriais e que comprometam a sua função podem desencadear mecanismos de morte das células tumorais.

Tendo em vista que os resultados do método do MTT (FIGURA 11), o qual é baseado na atividade de desidrogenases mitocondriais e demonstraram que a galactomanana nativa e seu derivado sulfatado S1 reduzem significativamente a viabilidade das células HepG2, decidiu-se avaliar os efeitos destes polissacarídeos sobre diferentes estados da respiração destas células. Após 72 horas de tratamento o consumo de oxigênio da suspensão celular foi monitorado por respirometria de alta resolução em Oxígrafo oroboros®. As análises foram realizadas com as células intactas e as velocidades do consumo de oxigênio determinadas na presença e ausência de inibidores da cadeia de transporte de elétrons, como a oligomicina e de um desacoplador clássico o

FCCP (Carbonil cianeto p-trifluormetoxifenilhidrazona). Os estados da respiração que refletem o consumo de oxigênio das células foram acompanhados como descrito abaixo:

1. Estado Basal: reflete o estado da respiração logo após a suspensão celular ser adicionada às câmaras do oxígrafo, sem a adição de inibidores da cadeia respiratória ou desacopladores da fosforilação oxidativa;
2. Estado *leak*: corresponde ao estado da respiração logo após a adição de oligomicina. A oligomicina é um importante inibidor do componente OSCP (*Oligomycin Sensitivity Conferring Protein*) da F_1F_0 ATP sintase, ocasionando o bloqueio da reentrada de prótons para a matriz mitocondrial através deste complexo enzimático. Este estado reflete o transporte de elétrons que ocorre em resposta a entrada de prótons na matriz mitocondrial via membrana mitocondrial interna, impulsionada pelo gradiente eletroquímico de prótons. O consumo de oxigênio durante este estado da respiração é maior em resposta ao aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna a prótons;
3. Estado desacoplado: corresponde a respiração celular em resposta à adição de um desacoplador (FCCP), caracterizando o transporte de elétrons que ocorre em velocidade máxima e de forma independente à síntese de ATP;
4. Estado inibido: corresponde ao consumo de oxigênio na presença de oligomicina, FCCP, rotenona e antimicina, sendo estes últimos inibidores do transporte de elétrons a partir do complexo I e III da cadeia respiratória, respectivamente.

Na figura 16, estão representados os traçados de cada estado da respiração, definidos acima. A linha vermelha representa o fluxo e a linha azul a concentração de oxigênio.

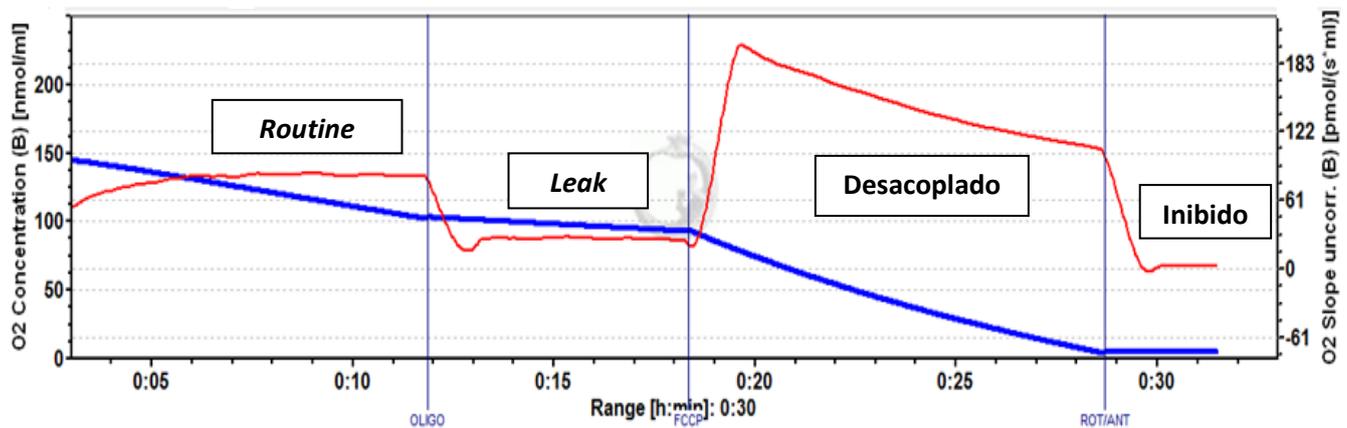


FIGURA 16 - TRAÇADO REPRESENTATIVO DA ANÁLISE DO CONSUMO DE OXIGÊNIO PELAS CÉLULAS HepG2 TRATADAS SOMENTE COM O MEIO (DMEM).

FONTE: O autor (2013)

NOTA: O traçado representa os 4 estados da respiração refletidos após a adição da suspensão celular no oxígrafo oroboros®. Este traçado representa as células HepG2 tratadas somente com o meio de cultura por um período de 72 horas. Linha azul - concentração de O₂; Linha vermelha – fluxo de O₂. OLIGO: Oligomicina; FCCP; ROT/ANT: Rotenona e Antimicina.

Na figura 17 são mostrados os resultados das análises quantitativas da respiração de células HepG2, após 72 horas de tratamento com os polissacarídeos. Na figura 17A, que representa o estado basal de respiração, pode-se observar uma inibição para ambos os polímeros. A inibição na presença de SN com 100 µg. mL⁻¹ foi de aproximadamente 62% e de ~85% para 250 µg. mL⁻¹, em relação ao controle. O derivado sulfatado S1 também demonstrou um efeito inibitório (aproximadamente de ~70 e 82%) nas concentrações de 100 e 250 µg.mL⁻¹, respectivamente. Para o estado desacoplado (FIGURA 17B), os polissacarídeos promoveram uma significativa inibição de ~90%, para as concentrações testadas. Um efeito inibitório de ~60% foi também observado para o estado leak (FIGURA 17C). Estes resultados mostram que os polissacarídeos SN e S1 comprometem de forma significativa a respiração celular e sugerem que este efeito pode ser o responsável pela redução da viabilidade observada pelo teste do MTT (FIGURA 11). No entanto, os mecanismos envolvidos nesta inibição não podem ser esclarecidos através destes experimentos. Uma vez que a respiração foi inibida já no estado basal, pode-se sugerir que os polissacarídeos comprometem a geração das coenzimas NADH e FADH₂. Por sua vez, esta hipótese abre uma gama de possibilidades como a interferência destes polímeros em vias metabólicas geradoras destas coenzimas, no transporte de substratos para a matriz mitocondrial, entre outras. Ainda, seria possível admitir que os polissacarídeos estivessem atuando diretamente na mitocôndria, promovendo uma

inibição de complexos da cadeia respiratória. Seja qual for a hipótese considerada, estudos futuros devem ser realizados para esclarecer os mecanismos pelos quais este polissacarídeos comprometem a respiração das células HepG2.

Efeito oposto ao observado neste estudo foi descrito por Farias (2012). A autora demonstrou que a xiloglucana de *C. langsdorffi* ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) promoveu um aumento no consumo de oxigênio de células de melanoma murino B16F10. Este aumento foi observado em todos os estados da respiração, alcançando 132% em relação ao controle no estado desacoplado. Por outro lado, no mesmo estudo, evidenciou-se que o tratamento com o complexo desta xiloglucana com oxovanádio resultou em uma importante redução no consumo de oxigênio pelas células B16F10 em todos os estado da respiração celular alcançando ~67% de inibição no consumo de oxigênio na concentração de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, em relação ao controle.

Os estudos têm mostrado que os efeitos de polissacarídeos como MRB estão diretamente relacionados com sua estrutura molecular incluindo o tipo de unidade monomérica, ligação glicosídica da cadeia principal, os tipos e graus de ramificações e ainda, flexibilidade e configuração das cadeias (WANG et al., 2010). Além disso, sabe-se que modificações químicas como derivados obtidos por hidrólise parcial (KULICKE; LETTAU; THIELKING, 1997), carboximetilação (SASAKI et al., 1979), oxidação ou introdução de novos grupos funcionais, como sulfato ou complexação com metais (NOLETO et al., 2002; 2004; CROSS et al., 2001) podem resultar em alterações conformacionais nos polissacarídeos, e conseqüentemente proporcionar maior atividade biológica.

SILVEIRA (2010), em estudo sobre os efeitos de xiloglucana de Jatobá em células HeLa, observou que a respiração destas células, quando não permeabilizadas, não era afetada pela presença do polissacarídeo. Porém, após a permeabilização com digitonina, o polissacarídeo promoveu uma inibição na respiração celular em torno de 60% ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$), resultado similar ao encontrado no presente estudo. Vale ressaltar que para galactomanana a inibição sobre a respiração foi mais intensa (FIGURA 17) e, que as células não foram permeabilizadas, o que sugere que o polissacarídeo seja capaz de permeabilizar a membrana celular ou que, ao interagir com receptores na superfície celular, desencadeie este efeito.

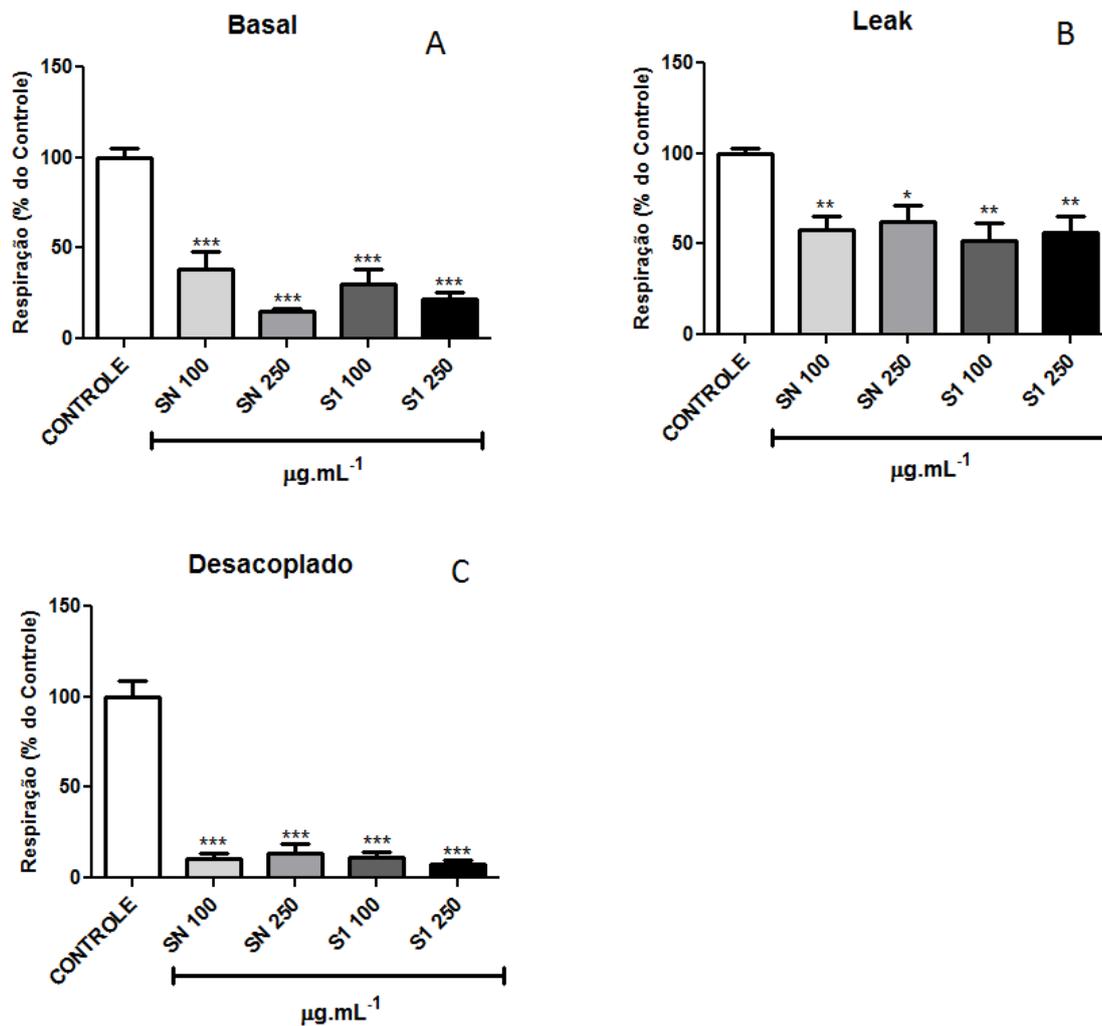


FIGURA 17 - EFEITO DE SN E S1 SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO DAS CÉLULAS HepG2

FONTE: O autor (2013)

NOTA: A respiração celular foi monitorada conforme descrito no item 5.11.1. A) Estado *routine* (basal); B) estado *leak* e C) estado desacoplado da respiração celular representados pelas células HepG2 após o tempo de 72 horas de tratamento, com os polissacarídeos SN e S1. O grupo controle representa as células tratadas somente com o meio de cultura. Os resultados estão expressos como média \pm DP de seis experimentos independentes realizados em duplicata. (ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Como já descrito, em algumas linhagens celulares a glicólise predomina em relação à fosforilação oxidativa, caracterizando assim o efeito Warburg (FERREIRA *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2011; PELICANO *et al.*, 2006; JEZEK *et al.*, 2010; HSU; SABATINI, 2008). Com a finalidade de verificar uma possível interferência das galactomananas nesta via metabólica, as concentrações de piruvato e lactato foram determinadas no sobrenadante das células HepG2 tratadas com SN e S1 por 72 horas nas concentrações indicadas. A concentração de lactato e piruvato foi determinada de maneira indireta pela

formação ou oxidação de NADH. Os resultados estão expressos em porcentagem, considerando 100% de formação de piruvato e lactato no grupo controle.

Na figura 18, estão representados os resultados destas avaliações. O polímero SN aumentou a produção de lactato em aproximadamente 25% na concentração de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, similar intensidade de efeito foi observado para o derivado sulfatado S1, alcançando 23 % de aumento na produção deste metabólito (FIGURA 18A). Em relação à produção de piruvato observa-se que ambas as formas da galactomanana diminuíram a produção de piruvato nas células HepG2, alcançando 13% para SN na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 20% para S1 com 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (FIGURA 18B).

Diante dos resultados inibitórios de SN e S1 sobre a respiração mitocondrial das células HepG2, evidenciados pela inibição do consumo de oxigênio, em todos os estados da respiração (FIGURA 17), um aumento da produção de lactato pode sugerir que as células estejam desviando o metabolismo de provisão de energia para a via glicolítica anaeróbia, ocorrendo então um aumento da produção de lactato e conseqüentemente uma diminuição na produção do piruvato.

Contudo, são necessários estudos adicionais para confirmar este efeito, como por exemplo, avaliar a atividade da enzima lactato desidrogenase, uma vez que esta catalisa a reação reversível de redução do piruvato a lactato, bem como de enzimas da via glicolítica.

Em células de melanoma murino B16F10, o tratamento com a xiloglucana (XGC) na sua forma nativa provocou um aumento na produção de lactato de ~14% e ~17% para as concentrações de 10 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, em relação ao controle (FARIAS, 2012). Por outro lado, não foram observadas alterações significativas na produção de piruvato. Ao contrário do observado para XGC o tratamento com complexo xiloglucana-oxovanádio não alterou de maneira significativa a produção de lactato pelas células B16F10. Em contrapartida, a presença do complexo provocou uma importante diminuição na produção de piruvato, em torno de 34% e 22,5%, para as concentrações de 5 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, em relação ao controle. A xiloglucana complexada deve exercer um efeito na via glicolítica. A diminuição na velocidade do consumo de oxigênio observada pela autora pode ser reflexo da diminuição na produção de piruvato. Uma vez que não ocorre um aumento concomitante na produção de lactato, a via glicolítica poderia estar sendo inibida pela ação do complexo.

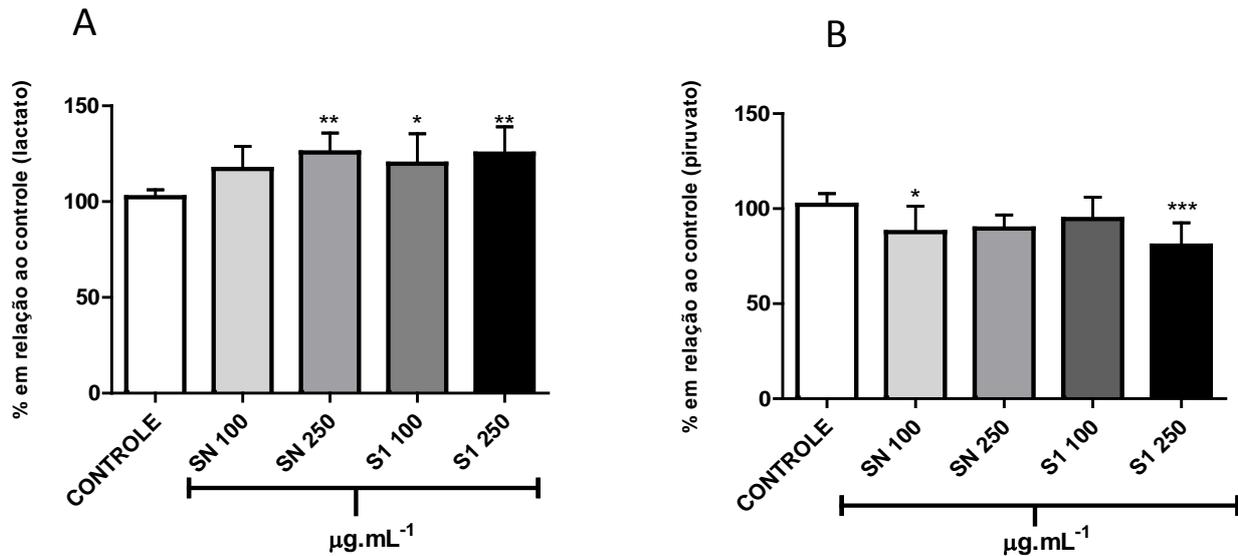


FIGURA 18 - EFEITOS DE SN E S1 NA PRODUÇÃO DE LACTATO E PIRUVATO POR CÉLULAS HepG2
 FONTE: O autor (2013).

NOTA: O ensaio foi realizado após o tempo de 72 horas de tratamento com os polissacarídeos SN e S1. O grupo controle representa as células tratadas com meio de cultura. A quantificação foi realizada conforme formação e oxidação de NADH e ajustadas em forma de porcentagem. Os resultados estão expressos como média \pm DP de 6 experimentos realizados em duplicata. (ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

A intensidade de aumento da produção de lactato pelas células HepG2 na presença da galactomanana, avaliada no presente estudo foi maior quando comparado ao observado para as células B16F10 na presença da xiloglucana (FARIAS, 2012). Porém a galactomanana estava em concentração 10 vezes maior. Em relação ao piruvato a inibição foi praticamente equivalente nos dois estudos.

O piruvato, produto final da via glicolítica, pode ser direcionado para dois destinos diferentes considerando a demanda de oxigênio nas células (TENNANT; DURAN; GOTTLIEB; 2010). Em células normais, não proliferativas e, na presença de oxigênio o piruvato pode ser transportado para a matriz mitocondrial e então convertido em acetil-coA, o qual entra no ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs) onde é oxidado produzindo os equivalentes redutores NADH e FADH₂ que são oxidados na cadeia respiratória; 2) em células normais proliferativas, em células com baixa tensão de oxigênio e em certas células tumorais mesmo em alta tensão de oxigênio, o piruvato permanece no citosol e é reduzido a lactato pelo complexo lactato desidrogenase (FIGURA 19) a fim de manter um fornecimento constante de NAD⁺ para condução da glicólise. Desta forma, ao

avaliar os conteúdos de piruvato e lactato produzidos pelas células pode-se sugerir para qual via está sendo direcionado o consumo de piruvato.

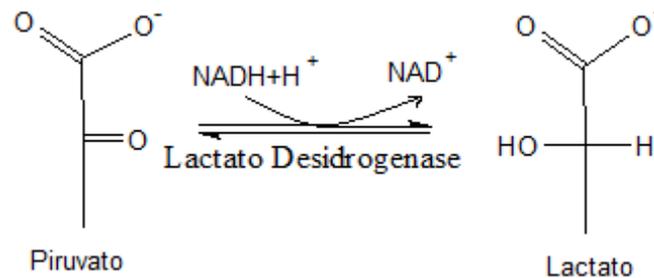


FIGURA 19 - REDUÇÃO REVERSÍVEL DO PIRUVATO A LACTATO

NOTA: Quando não há oxigênio suficiente para a oxidação aeróbia de piruvato e do NADH, que são produtos da via glicolítica, o NAD⁺ é regenerado a partir do NADH pela redução do piruvato a lactato. Esta redução é catalisada pela enzima lactato desidrogenase.

Os resultados descritos sobre os efeitos de polissacarídeos sobre o metabolismo energético de células tumorais são complexos, uma vez que os estudos foram realizados com diferentes polissacarídeos em diferentes linhagens celulares (FARIAS, 2012; SILVEIRA, 2010). Como característica comum, estes estudos apontam para a possibilidade de que os polissacarídeos permeiem as membranas celulares. Estudos mostrando a internalização de polissacarídeos em células tumorais ou células não fagocíticas são escassos na literatura. Péterszegi *et al* (2003), avaliaram o efeito de oligos e polissacarídeos, contendo galactose, ácido galacturônico e fucose em suas estruturas em fibroblastos de pele humana. Os autores demonstraram que polissacarídeos marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) possuem dois sítios de interação com os fibroblastos, a membrana plasmática e o núcleo. Desta forma, estes autores mostraram que o polissacarídeo foi internalizado nestas células.

O significativo efeito dos polissacarídeos sobre as funções mitocondriais ligadas a provisão de energia, pode relacionar-se com o mecanismo da ação antitumoral destes compostos. No entanto, estudos adicionais são necessários para esclarecer as vias envolvidas.

7. CONCLUSÕES

- Utilizando extração aquosa foi possível obter uma galactomanana livre de contaminantes das sementes de *S. amazonicum*;
- A sulfatação deste polissacarídeo pelo método do ácido clorossulfônico promoveu a substituição por sulfato na posição 6 das unidades de galactose e manose não substituídas;
- A sulfatação não aumentou a citotoxicidade das células HepG2 uma vez que SN foi mais citotóxica, como demonstrado pelo ensaio do MTT;
- SN, S1 e S2, não interferiram na viabilidade celular pelo método do cristal violeta;
- A galactomanana na sua forma nativa (SN) não exerceu interferência no ciclo celular;
- SN não foi capaz de induzir a morte celular, pela dupla marcação com Anexina V/FITC – PI;
- As galactomananas nativa (SN) e sulfatada (S1) (100 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) promovem uma significativa inibição na respiração de células HepG2 que pode relacionar-se ao aumento dos níveis de lactato nestas células, indicando uma ativação da via glicolítica anaeróbia.

REFERÊNCIAS

ADAMS, G. A. Complete acid hydrolysis. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. v. 5, p. 269-276, 1965.

ALBAN, S.; SHAUERTE, A.; FRANZ, G. Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure – activity relationships of new pullulan sulfates. **Carbohydrates polymers**. v. 47, p. 267 – 276, 2002.

AMARAL, A. E. **Avaliação dos efeitos de complexos de polissacarídeos-oxovanádio (IV/IV) sobre macrófagos peritoneais de camundongos e *Leishmania (L) amazonensis in vitro***. Trabalho de dissertação de mestrado em Ciências-Bioquímica - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2011.

AMORIM, J. C. **Efeitos biomoduladores da pecticina da casca dos frutos de cacau (*Theobroma Cacao I.*) sobre macrófagos peritoneais de camundongos**. Trabalho de dissertação de mestrado em Ciências – Bioquímica – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

ANGELI, J. P. F.; RIBEIRO, L. R.; CAMELINI, C. M.; MENDONÇA, M. M.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of the antigenotoxicity of polysaccharides and b-glucans from *Agaricus blazei*, a model study with the single cell gel electrophoresis/HepG2 assay. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 22, p.699–703, 2009.

ACS - AMERICAN CANCER SOCIETY (ESTADOS UNIDOS). Disponível em: <<http://www.cancer.org>> Acesso em: 11/07/2011.

AKASHI, M.; SAKAMOTO, N.; SUZUKI, K.; KISHIDA, A. Synthesis and Anticoagulant Activity of Sulfated Glucoside-Bearing Polymer. **Bioconjugated Chemistry**. v.7, p.393-395, 1996.

BABA, M.; SNOECK, R.; PAUWELS, R.; CLERCQ, E. Sulfated Polysaccharides Are Potent and Selective Inhibitors of Various Enveloped Viruses, Including Herpes Simplex Virus, Cytomegalovirus, Vesicular Stomatitis Virus, and Human Immunodeficiency Virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 32, p. 1742-1745, 1988.

BAE, S. Y.; YIM, J. H.; LEE, H.K.; PYO, S. Activation of murine peritoneal macrophages by sulfated exopolysaccharide from marine microalgal *Gyrodinium impudicum* (strain

KG03): Involvement of the NF- κ B and JNK pathway. **International Immunopharmacology**. v. 6, p. 473-484, 2006.

BENTO, J. F.; MAZZARO, I.; SILVA, L. M. A.; MOREIRA, R. A.; CORREA-FERREIRA, M. L.; REICHER, F.; PETKOWICZ, C. L. O. Diverse patterns of cell wall mannan/galactomannan occurrence in seeds of the Leguminosae. **Carbohydrate Polymers**. v.92, p.192– 199, 2013.

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. **Carbohydrate Research**. v. 231, p. 293-307, 1992.

BOHN, J.A.; BeMILLER, J. N. (1→3) - β - D- Glucans as biological response modifiers: a review of structure – functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**. v. 28, p.3-14, 1995

BUCKERIDGE, M. S.; DOS SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiology Biochemistry**. v. 38, p.141-156, 2000.

BUCKERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.C. Galactomannans from Brazilian legume seeds. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo. v.13, p. 109-112, 1992.

BRESOLIN, T.M.B.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; GANTER, J.L.M.S. Xanthan galactomannan interaction as relate to xanthan conformation. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 23, p. 263-275, 1998.

CALABRESI, P.; CHABNER, B. A. Quimioterapia das doenças neoplásicas. IN: GOODMAN GILMAN, A.; RALL, T. W.; NIES, A.S. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8.ed, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p. 137-143, 1991.

CALABRESI, F.; GAMUCCI, T. Biological response modifiers. **Lung Cancer**. v. 12, p.193-198, 1995.

CAO, Y.; IKEDA, I. Antioxidant activity and antitumor activity (in vitro) of xyloglucan selenious ester and surfated xyloglucan. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 45, p. 231-235, 2009.

CARLUCCI, M. J.; PUJOL, C.A.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M. D.; MATULEWICZ, M. C.; DAMONTE, E. B.; CERESO, A. S. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 20, p. 97 – 105, 1997.

CARNEIRO LEÃO, A. M. A.; BUCHI, D. F.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; OLIVEIRA, M. B. M. Cytotoxic effects against HeLa cells of polysaccharide from the Lichen *Ramalina celastri*. **Journal of Submicroscopy, Cytology and Pathology**. v.24, n. 4, p. 1-5, 1997.

CERQUEIRA, M. A.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; MARTINS, J. T.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. **Trends in Food Science & Technology** v.22, p. 662-671, 2011.

CERQUEIRA, M. A.; PINHEIRO, A. C.; BARTOLOMEU, W.S.; SOUZA, B. W. S.; ALVARO, LIMA, A. M. P.; RIBEIRO, C.; MIRANDA, C.; TEIXEIRA, J.A.; MOREIRA, R. A.; COIMBRA, M. A.; GONCALVES, P. M.; VICENTE, A. A.. Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. **Carbohydrate Polymers**. v.75, p. 408-414, 2009.

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

CHEN, T.; LI, B.; LI, Y.; ZHAO, C.; SHEN, J.; ZHANG, H. Catalytic synthesis and antitumor activities of sulfated polysaccharide from *Gynostemma pentaphyllum* Makino. **Carbohydrate Polymers**. v. 83, p. 554 – 560, 2011.

CHEN, R.; MENG, F.; LIU, Z.; CHEN, R.; ZHANG, M. Antitumor activities of different fractions of polysaccharide purified from *Ornithogalum caudatum* Ait. **Carbohydrate Polymers**. v. 80, p. 845–851, 2010.

CHEN, X.; ZHANG, L.; CHEUNG, P. C. K. Immunopotential and anti-tumor activity of carboxymethylated-sulfated β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan from *Poria cocos*. **International Immunopharmacology**. v.10, p. 398–405, 2010.

CHEN, H.; ZHANG, M.; XIE, B. Components and antioxidant activity of polysaccharide conjugate from green tea. **Food Chemistry**, v. 90, n. 1-2, p. 17–21, 2005.

CHIA-JUNG, L.; SHANG-YU, H.; MENG-YU, W.; YU-CHING, C.; SHIH-FANG, T. Induction of Apoptosis by Ethanolic Extract of *Corchorus olitorius* Leaf in Human Hepatocellular Carcinoma (HepG2) Cells via a Mitochondria-Dependent Pathway. **Molecules**. v, 17, p. 9348-9360, 2012.

CHIBA, K.; KAWAKAMI, K.; TOHYAMA, K., Simultaneous Evaluation of Cell Viability by Neutral Red, MTT and Crystal Violet Staining Assays of the Same Cells. **Toxicology in Vitro**. v.12, p.251-258,1998.

CHRESTANI, F.; SIERAKOWSKI, M. R.; UCHOA, D. A. E.; NOZAWA, C.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; ONO, L. In vitro antiherpetic and antirotaviral activities of a sulfate prepared from *Mimosa scabrella* galactomannan. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.45, p. 453–457, 2009.

CHLUBNOVÁ, I.; SYLLA, B.; NUGIER-CHAUVIN, C.; DANIELLOU, R.; LEGENTIL, L.; KRALOVÁ, B.; FERRIÈRES, V. Natural glycans and lycoconjugates as immunomodulating agents. **Natural Products Reports**.v.28, p. 937–952, 2011.

CUI, S.; ESKIN, M. A. N.; WU, Y.; DING, S. Synergisms between yellow mustard mucilage and galactomannans and applications in food products — A mini review. **Advances in Colloid and Interface Science**. v.128, p.249–256, 2006.

CROSS, G. G.; JENNINGS, H. J.; WHITEFIELD, D. M.; PENNY, C.L.; ZACHARIE, B.; GAGNON, L. Immunostimulant oxidized b-glucan conjugates, **International Journal Immunopharmacology**. v. 1, p.539-550, 2001.

CZOC, R. LAMPRECHT, W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and -glycerate-2-phosphate. **Methods Enzymology**. v.3, p.1446–1451, 1974.

DALONSO, N. **Polissacarídeos das sementes de guaraná (*Paullinia cupana kunth*): análises estruturais, reológicas e atividade antioxidante**. Dissertação de Mestrado em Bioquímica – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2010.

DAMONTE, E.; NEYTS, J.; PUJOL, C. A.; SNOECK, R.; ANDREI, C. F.; IKEDA, S.; WITVROUW, M.; REYMER, D.; HAINES, H.; MATULEWICZ, M. C.; CERESO, A.; COTO, C.E.; CLERCQ, E. Antiviral activity of a sulphated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Biochemical Pharmacology**. v. 47-12, p. 2181-2192, 1994.

DARZYNKIEWICZ, Z.; BRUNO, S.; DEL BINO, G.; GORCZYCA, W.; HOTZ, M.A.; LASSOTA, P.; TRAGANOS, F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**. v. 13, p. 795-808, 1992.

DEA, I. C. M; MORRISON, A. Chemistry and interactions of seed galactomannans. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. v. 31, p. 241 – 312, 1975.

DE-LENA, M.; LORUSSO, V.; LATORRE, A.; FANIZZA, G.; GARGANO, G.; CAPORUSSO, L.; GUIDA, M.; CATINO, A.; CRUCITTA, E.; SAMBIASI, D.; MAZZEI, A. Paclitaxel , cisplatin and londamine in advanced ovarian câncer. A phase two study. **European Journal of Cancer**. v. 37, p.364-368, 2001.

DIAS, P. F.; SIQUEIRA-JR, J. M.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, A. G.; GAGLIARDI, A. R.;VALLE, R. M. R. A polysaccharide isolated from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum* exerts antivasculogenic effects evidenced by modified morphogenesis. **Microvascular Research**. v. 75, p.34–44, 2008.

DI - BISCEGLIE, A. M.; RUSTGI, V.K.; HOOFNAGLE, J. H.; DUSHEIKO, G. M.; LOTZE, M. T. **Annals of Internal Medicine**. v. 108, p. 390-401, 1988.

DIAZ-RUIZ, R.; RIGOULET, M.; DEVIN, A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1807, p. 568–576, 2011.

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

DODGSON, K.S. Determination of Inorganic Sulphate in Studies on the Enzymic and Non-Enzymic Hydrolysis of Carbohydrate and Other Sulphate Esters. **Biochemical Journal**. v. 78, p. 312-319, 1961.

DUNCAN, C. J. G.; PUGH, N.; PASCO, D. S.; ROSS, S. A. Isolation of galactomannnan that enhances macrophage activation from the Edible fungus *Morchella esculenta*. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 5683 – 5685, 2002.

ELLIS, P.R.; DAWOUD, F.M.; MORRIS, E.R.; Blood glucose, plasma insulin and sensory responses to guar containing what breads: effects of molecular weight and particle size of guar gum. **British Journal of Nutrition**. London, v. 66, p. 363-379,1991.

FARIAS, W. R. L.; VALENTE, A. P.; PEREIRA, M. S.; MOURÃO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 275-38, p. 29299 – 29307, 2000.

FARIAS, C. L. A. **Xiloglucanas de sementes de *Copaifera langsdorffii* (copaíba) e seu complexo com oxovanádio (IV/V): Efeitos sobre células de melanoma murino B16-F10 *in vitro***. Trabalho de Dissertação de Mestrado em Ciências Bioquímica –Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

FERREIRA, L. M.R. Cancer metabolism: The Warburg effect today. **Experimental and Molecular Pathology**. v. 89, p. 372-380, 2010.

FOCHE, B.; MASSOLI, A. High molecular weight chitosan 6-0-sulfate. Synthesis, ESR and NMR characterization. **Makromolecules Chemistry**. v. 187, p. 2609-2620, 1986.

FOON, K.A. Biological response modifiers: the new immunotherapy. **Cancer Research**. v. 49, p. 1621-1639, 1989.

GAMAL-ELDEEN, A. M. G.; AMER, H.; HELMY, W. A.; TALAAT, R. M.; RAGAB, H. Chemically-modified polysaccharide extract derived from *Leucaena leucocephala* alters Raw 264.7 murine macrophage functions. **International Immunopharmacology**. v. 7, p. 871 – 878, 2007a

GAMAL-ELDEEN, A. M.G. AMER, H.; WELMY, W.; RAGAB, H.M.; ROBA, M. T. Antiproliferative and cancer-chemopreventive properties of sulfated glycosylated extract derived from *Leucaena leucocephala*. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.69, P.805-811, 2007b

GANTER, J.L.M.S. **Estudos de carboidratos de sementes de *Mimosa scabrella* (Bracatinga): Análise estrutural dos oligossacarídeos e propriedades reológicas da galactomanana**. Trabalho de tese de Doutorado em Bioquímica– Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 1991.

GANTER, J. L. M. S.; HEYRAUD, A.; PETKOWICZ, C. L. O.; RINAUDO, M.; REICHER, F. Galactomannans from Brazilian seeds: characterization of the oligosaccharides produced

by mild acid hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 17, p. 13-19, 1994.

GEMIN, E. **Determinação da atividade antiviral de galactomananas sulfatadas contra o vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1)**. Trabalho de dissertação de mestrado em Patologia Básica – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2008.

GERESH, S.; MAMONTOV, A.; WEINSTEIN, J. Sulfation of extracellular polysaccharides of red microalgae: preparation, characterization and properties. **Journal of Biochemistry and Biophysical Methods**. v. 50, p. 179 – 187, 2002.

GOHIL, V.M.; SHETH, S. A.; WOJTOVICH, A.P.; LEE, J. H. ; CLISH, C. B.; AYATA, C.; BROOKE, P. S.; MOOTHA, K.; NILSSON, R. Nutrient-sensitized screening for drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis. **Nature biotechnology**. v.28,p.249-255, 2010.

GRACHER, A. H. **Avaliação do Potencial Anticoagulante e Antitrombótico de Polissacarídeos Nativos e Quimicamente Sulfatados de Basidiomicetos**. Trabalho de tese de Doutorado em Ciências – Bioquímica – Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

GUTMAN, I.; WAHLEFELD, W. A. L-(+)-Lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD. **Methods Enzymology Anal. Weinhei**. p. 1464-1469, 1974.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 53, n.3, p. 335-43, 2007

HAINES, A. W. Relative reactivities of hydroxyl groups in carbohydrates. **Advances in Carbohydrates Chemistry**., New York, v. 33, p. 11-110, 1976.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press, 936 p., 1999.

HAN, S.B; LEE, C.W.; JEON, Y. J.; HONG, N. D.; YOO, I. D.; YANG, K, H.; KIM, H. M. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. **Immunopharmacology**. v. 41, p. 157 – 164, 1999.

HELLERQVIST, C. G.; THURMAN, G. B.; PAGE, D. L.; WANG, Y. F.; RUSSEL, B.A.; MONTGOMERY, C. A.; SUNDELL, H. W. Antitumor effects of GBS toxin: a polysaccharide exotoxin from group B β -hemolytic streptococcus. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. v. 120, p. 63 – 70, 1993.

HENSEL, A.; MEIER, K. Pectins and Xyloglucans Exhibit Antimutagenic Activities against Nitroaromatic Compounds. **Planta Medica**. v. 65, p. 395-399, 1999.

HUANG, R.; DU, Y.; YANG, J.; FAN, L. Influence of functional groups on the *in vitro* anticoagulant activity of chitosan sulfate. **Carbohydrate Research**., Amsterdam, v. 338, p. 483- 489, 2003.

HU, M.; CHEN, Y.; WANG, C.; CUI, H.; DUAN, P.; ZHAI, T.; YANG, Y.; LI, S. Induction of apoptosis in HepG2 cells by polysaccharide MEP-II from the fermentation broth of *Morchella esculenta*. **Biotechnology Letters**. v. 35, p.1–10, 2013.

HIU-LI, C.; MAO, H.; FENG, W.; JING-WEN, L.; GENG, Y. Effects of sulfated polysaccharide from Masson pine (*Pinus massoniana*) pollen on the proliferation and cell cycle of HepG2 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 55, p. 104– 108, 2013.

HSU, P.P.; SABATINI, D. M. Cancer Cell Metabolism: Warburg and beyond. **Cell**. v. 134, p.703-707, 2008.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (BRASIL). Disponível em <http://www.inca.com.br> Acesso em: 11/07/2011.

INGOLFSDOTTIR, K.; JURCIC, K.; FISCHER, B.; WAGNER, H. Immunologically active polysaccharide from *Cetaria islandica*. **Planta Medica**. v. 60, p. 527-531, 1994.

JING-GUNG, C.; HSIN-YI, P.; YU-CHAN, C.; YOU-MIIN, H.; SAN-DER, W.; SU-TZE, C. Anti-invasion and apoptosis induction of chlorella (*Chlorella sorokiniana*) in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. **Journal of Functional Foods**. v. 4, p.302 –310, 2012.

JEZEK, P.; PLECITA – HLAVATA, L.; SMOLKOVA, K.; ROSSINGNOL, R. Distinctions and similarities of cell bioenergetics and the role of mitochondria in hypoxia, cancer, and embryonic development. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v.42, p. 604–622, 2010.

JUNG, H. J.; BAE, I. Y.; LEE, S.; LEE, H. G.; JUNG, H. Y. Effect of the degree of sulfation on the physicochemical and biological properties of *Pleurotus eryngii* polysaccharides. **Food Hydrocolloids**. v. 25, p.291-1295, 2011.

KANGUSSU-MARCOLINO, M. M. **Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de heteropolissacarídeos ácidos não sulfatados e naturalmente sulfatados**. Trabalho de dissertação de Mestrado em Ciências-Bioquímica – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2010.

KARMAKAR, P.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; GHOSH, T.; RAY, B. Polysaccharides from *Padina tetrastratica*: Structural features, chemical modification and antiviral activity. **Carbohydrate Polymers**. v.80, p. 513-520, 2010.

KAWASE, I.; KOMUTA, K.; OGURA, T.; FUJIWARA, H.; HAMAOKA, T.; KISHIMOTO, S. Murine tumor cell lysis by antibody-dependent macrophage mediated cytotoxicity using syngeneic monoclonal antibodies. **Cancer Research**. v. 45, 1985.

KLIMP, A. H.; VRIES, E. G. E.; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v. 44, p. 143–16, 2002.

KOOIMAN, P. Structure of the galactomannans from seeds of *Annona muricata*, *Arenga saccharifera*, *Cocos nucifera*, *Convolvulus tricolor* and *Sophora japonica*. **Carbohydrate Research**. v.20, p. 329-337, 1971.

KOPPENOL, W.H.; BOUNDS, P. L.; DANG, V. V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. **Nature Reviews**. v. 11, p. 325-337, 2011.

KOYANAGI, S.; TANIGAWA, N.; NAKAGAWA, H.; SOEDA, S.; SHIMENO, H. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. **Biochemical Pharmacology**. v. 65, p. 173 – 179, 2003.

KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. **Analytical Biochemistry**. v. 182, p. 16-19, 1989.

KULICKE, W. M.; LETTAU, A. I.; THIELKING, H. Correlation between immunological activity, molar mass, and molecular structure of different (1→3)- β -D-glucans. **Carbohydrate Polymers**. v. 297, p. 135-143, 1997.

KWON, H.J.; BAE, S. Y.; KIM, K. H.; HAN, C. H.; CHO, S. H.; NAM, S.W.; CHOI, Y. H.; KIM, B.W. Induction of apoptosis in HeLa cells by by ethanolic extract of *Corallina pilulifera*. **Food chemistry**. v. 104, p. 196–201, 2006.

LEUNG, M. Y. K.; LIU, C.; ZHU, L. F.; HUI, Y. Z.; YU, B.; FUNG, K.P. Chemical and biological characterization of a polysaccharide biological response modifier from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg. **Glicobiology**. v. 14 -6, p. 501-510, 2004.

LEUNG, M. Y. K.; LIU, C.; KOON, J. C. M.; FUNG, K. P. Polysaccharyde biological response modifiers. **Immunology Letters**. v.105, p.101-114, 2006.

LI, H.; SUN, M.; XU, J.; LI, H.; ZANG, M.; CUI, Y. Immunological response in H22 transplanted mice undergoing *Aconitum coreanum* polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.55, p. 295-300, 2013.

LIANG, M.; LI, S.; SHEN, B.; CAI, J.; LI,C.; WANG,Z.; LI,X. Anti-hepatocarcinoma effects of *Aconitum coreanum* polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**. v. 88, p.973-976, 2012.

LIU, C.; LEUNG, M. Y. K.; KOON, J. C. M.; ZHU, L. F.; HUI, Y. Z.; YU, B.; FUNG, K.P. Macrophage activation by polysaccharide biological response modifier isolated from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg. **International Immunopharmacology**. v.6, p. 1634-1641, 2006.

LIU, Y.; LIU, C.; TAN, H.; ZHAO, T.; CAO, J.; WANG, F. Sulfation of a polysaccharide obtained from *Phellinus ribis* and potential biological activities of the sulfated derivatives. **Carbohydrate polymers**. v. 77, p. 370 – 375, 2009.

MASCHEK, G.; SAVARAJ, N.; PRIEBE, W.; BRAUNSCHWEIGER, P.; HAMILTON, K.; TIDMARSH, G. F.; YOUNG, L. R.; LAMPIDIS T. J. 2-Deoxy-D-glucose Increases the Efficacy of Adriamycin and Paclitaxel in Human Osteosarcoma and Non-Small Cell Lung Cancers *in vivo*. **Cancer Research**. v. 64,p. 31–34, 2004

MASTROMARINO, P.; PETRUZZIELLO, R.; MACCHIA, S.; RIETI, S.; NICOLETTI, R.; ORSI, N. Antiviral activity of natural and semisyntextic polysaccharides on the early steps of rubella virus infection. **Journal of Antimicrobial chemotherapy**. v. 39, p. 339-345, 1997.

MIHAI, D.; MOCANU, G.; CARPOV, A. Chemical reactions on polysaccharides. I.Pullulan sulfation. **European Polymer Journal**. v. 37, p. 541-546, 2001.

MARTINICHEN, J. C. H.; CARBONERO, E. R.; SASSAKI, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Anticoagulant and antitrombotic activities of a chemically sulphated galactoglucomannan obtained from the lichen *Cladonia ibitipocae*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 35, p. 97-102, 2005.

MATSUNAGA, K.; MORITA, I.; IJIMA, H. Effects of biological modifiers with different modes of action used separately and together on immune responses in mice with syngenic tumors. **Journal of International Medicine Research**. v. 20, p. 406-421, 1992.

MERCE, A. L. R.; FERNANDES, E.; MANGRICH, A. S.; SIERAKOWSKI, M. R.; SZPOGANICZ, B. Fe(III) - Galactomannan Solid and Aqueous Complexes. Potentiometric, EPR Spectroscopy and Thermal Data. **Journal of The Brazilian Chemical Society**. v.12-6, p. 791-798, 2001.

MESTECHKINA, N. M.; EGOROV, A.V.; SHCERBUKHIN, V. D. Synthesis of Galactomannan Sulfates. **Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya**. v. 42 (3), p. 368–373, 2006.

MESTECHKINA, N. M.; SHCERBUKHIN, V. D.; BANNIKOVA, G.E.; VARLAMOV, V. P.; DROZD, N. N.; TOLSTENKOV, A. S.; MAKAROV, V. A.; TIKHONOV, V. E. Anticoagulant activity of Low-molecular-weight sulfated derivatives of galactomannan from *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) **Biochemistry and Microbiology**. v. 44 (1), p.98-103, 2008.

MESTECHKINA, N. M.; SHCERBUKHIN, V. D. Sulfated Polysaccharides and Their Anticoagulant Activity: A Review. **Biochemistry and Microbiology**. v. 46 (3), p. 267 – 273, 2010.

MIHAI, D.; MOCANU, G.; CARPOV, A. Chemical reactions on polysaccharides. I. Pullulan sulfation. **European Polymer Journal**. v. 37, p. 541-546, 2001.

MIZUNO, M.; MORIMOTO, M.; MINATO, K.; TSUCHIDA, H. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T – cell subsets in mice. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v. 62 – 3, p. 434 – 437, 1998.

MORETÃO, M.P. **Propriedades Biomoduladoras da Arabinogalactana (ARAGAL) de Anadenanthera colubrina (Angico Branco)**. Curitiba, 2004. Tese de Doutorado em Ciências Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MORETÃO, M. P.; ZAMPRONIO, A. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from de gum of *Anadenanthera colubrine* (Angico Branco). **Immunology Letters**. v. 93, p. 189-197, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferate and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**. Amsterdam. v. 65, p. 55-63, 1983.

NOLETO, G. R.; PETKOWICZ, C. L. O.; MERCÊ, A. L. R.; MÊNDEZ-SANCHEZ, S.C.; REICHER, F.; OLIVEIRA, M. B. M. Two galactomannan preparations from seeds from *Mimosa scabrella* (bracatinga): Complexation with oxovanadium (IV/V) and cytotoxicity on HeLa cells. **Journal of Inorganic Chemistry**. v.103 (5), p. 749-757, 2009.

NOLETO, G.R.; MERCÊ, A.L.R.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.; OLIVEIRA, M.B.M. Yeast mannan-vanadium (IV) complexes and then effects on peritoneal macrophages. **Carbohydrate Polymers, Barking**. v. 57, p. 113-122, 2004.

NOLETO, G. R.; MERCÊ, A. L. R.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J.; SOCCOL, V.T.; OLIVEIRA, M. B. M. Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v.233, p. 73-83, 2002.

NOWAK, A.K.; CHOW, P. K. H.; FINDLAY, M. Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: a review. **European Journal of Cancer**. v.40, p. 1474–1484, 2004.

OLDHAM, R. K. Biological response modifiers. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 70, p. 789-796, 1983.

OHYA, Y.; OUE, H.; NAGATOMI, K.; OUCHI, T. Design of Macromolecular Prodrug of Cisplatin Using Dextran with Branched Galactose Units as Targeting Moieties to Hepatoma Cells. **Biomacromolecules**. v.2, p. 927-933, 2001.

O'NEILL, A. N. Sulphated derivatives of laminarin. **Canadian Journal of Chemistry**. Ottawa. v. 33, p. 1097-1101, 1955.

ONO, L.; WOLLINGER, W.; ROCCO, I. M.; COIMBRA, T. L. M.; GORIN, P. A. J.; SIERAKOWSKI, M. R. In vitro and in vivo antiviral properties of sulfated galactomannans

against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). **Antiviral Research**. v. 60, p. 201-208, 2003.

PAULY, M.; FREIS, O.; PAULY, G. Galactomannan and xyloglucan: Bio-active polysaccharides. **Altured's Cosmetics & Toiletries**. v. 114, p. 65-78, 1999.

PELICANO, H.; MARTIN, D.S.; XU, P.H.; HUANG, P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. **Oncogene**. v.25, p. 4633–4646, 2006.

PERES, C. M; CURI, R. **Como cultivar células**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2005.

PETKOWICZ, C. L. O.; SIERAKOWSKI, M. R.; GANTER, J. L. M. S.; REICHER, F. Galactomannans and arabinans from seeds caesalpinicea. **Phytochemistry**. v. 49-3, p. 737-743, 1998.

PETKOWICZ, C. L. O.; SCHAEFER, S.; REICHER, F. The mannan from *Schizolobium parahybae* endosperm is not a reserve polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**. v. 69, p. 659–664, 2007.

PIRES, L.; GORIN, P. A. J.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M. R. An active heparinoid obtained by sulphation of galactomannan extracted from the endosperm of *Senna macranthera* seeds. **Carbohydrate Polymers**. v.46, p. 165-169, 2001.

RAMESH, H. P.; YAMAKI, K.; TSUHIDA, T. Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells. **Carbohydrate Polymers**. v. 50, p. 79-83, 2002.

RAMESH, H. P.; YAMAKI, K.; ONO, H.; TSUSHIDA, T. Two-dimensional NMR spectroscopic studies of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) galactomannan without chemical fragmentation. **Carbohydrate Polymers**. v.45, p. 69-77, 2001.

REID, J.S.G.; EDWARDS, M.E. Galactomannans and other cell wall storage polysaccharides in seeds. In: STEPHEN, A.M. **Food Polysaccharides and Their Applications**. New York: Marcel Dekker, Inc. p.155-186, 1995.

ROBINSON, G.; ROSS-MURPHY, S. B; MORRIS, E. R. Viscosity-molecular weight relationships, intrinsic chain flexibility, and dynamic solution properties of guar galactomannan. **Carbohydrate Research**. v. 107, p. 17-32, 1982.

ROSARIO, M. M. T; KANGUSSU-MARCOLINO, M. M.; AMARAL, A. E.; NOLETO, G. R.; PETKOWICZ, C. L. O. Storage xyloglucans: Potent macrophages activators. **Chemico-Biological Interactions**. v. 189, p.127–133, 2011.

ROSÁRIO, M.M.T.; NOLETO, G.R.; BENTO, J.F.; REICHER, F.; OLIVEIRA, M.B.M.; PETKOWICZ, C.L.O. Effect of storage xyloglucans on peritoneal macrophages. **Phytochemistry**, New York. v. 69, p. 464-472, 2008

SANTANDER, S. P.; AOKI, M.; HERNANDEZ, J. F.; POMBO, M.; MOINS-TEISSERENC, H.; MOONEY, N.; FIORENTINO, S.; Galactomannan from *Caesalpinia spinosa* induces phenotypic and functional maturation of human dendritic cells. **International Immunopharmacology**. v. 11, p. 652-660, 2011.

SASAKI, T.; ABIKO, N.; NITTA, K.; TAKASUKA, N.;SUGINO, Y. Antitumor activity of carboxymethyl glucans obtained by carboxymethylation of (1 leads to 3)-beta-D-glucan from *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*. **European Journal of Cancer**. v.15, p. 211-215, 1979.

SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**. v.6, p. 317 – 333, 2005.

SCHERBUKHIN, V.D.; ANULOV, O.V. Legume Seed Galactomannan (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 35 (3), p. 229-244, 1999.

SHAW, G.M.; LEVY, P.C.; LOBUGLIO, A.F. Human monocyte cytotoxicity to tumor cells. I. Antibody-dependent cytotoxicity. **Journal of Immunology**. v. 121, p. 573-578, 1978.

SHI, B. J.; NIE, X. H.; CHEN, L. Z.; LIU, Y. L.; TAO, W. Y.; Anticancer activities of a chemically sulfated polysaccharide obtained from *Grifola frondosa* and its combination with 5-fluorouracil against human gastric carcinoma cells. **Carbohydrate polymers**. v. 68, p. 687–692, 2007.

SILVEIRA, J. C. **Avaliação dos efeitos imunomoduladores e citotóxicos de polissacarídeos de *Chorisia speciosa* e *Hymenaea courbari***. Dissertação de mestrado em Bioquímica – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2010.

SITTIKIYOTHIN, W.; TORRES, D.; GONÇALVES, M.P. Modelling the rheological behavior of galactomannan aqueous solution. **Carbohydrate Polymers**. v. 59, p. 339-350,2005.

SOUZA, C. F. **Galactomanana de sementes de *Caesalpinia férrea* var. *ferrea*: estrutura, modificação química e caracterização de propriedades**. Dissertação de mestrado em Química – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, 2009.

STEVAN, F. R. **Atividade biológica *in vitro* de heteropolissacarídeos sulfatados e/ou carboxilados, isolados de macroalgas marinhas, sobre células HeLa**. Tese de doutorado em Bioquímica – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2001.

SRIVASTAVA, M.; KAPOOR, V. P.; Seed Galactomannans: An overview. **Chemistry & Biodiversity**. v. 2, p. 295 – 317, 2005.

SYNYTSYA, A.; NOVAK, M. Structural diversity of fungal glucans. **Carbohydrate Polymers**. v. 92, p. 792– 809, 2013.

TANG, X.H.; LI-FANG, Y.; GAO, J.; YANG, X .; XUA, Y. X.;GE, H. E.; YANG, H. D. Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from the root of *Limonium sinense* Kuntze. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.51, p.1134 – 1139, 2012.

TINARI, A.; GIAMMARIOLI, A. M.; MANGANELLI, V.; CIARLO, L.; MALORNI, W. Analyzing morphological and ultrastructural features in cell death. **Methods in Enzymology**. v. 442, p. 1-26, 2008.

TZIANABOS, A. O. Polysaccharide Immunomodulators as Therapeutic Agents: Structural Aspects and Biologic Function. **Clinical microbiological reviews**. v.4, p.523-533, 2000.

TALARICO, L. B.; ZIBETTI, R. G. M.; FARIA, P. C.S.; SCOLARO, L. A.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B. Anti-herpes simplex virus activity of

sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 34, p.63–71, 2004.

TAO, Y.; ZHANG, L.; CHEUNG, P. C. K. Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides. **Carbohydrate Research**. v. 341, p. 2261-2269, 2006.

TENNANT, D. A.; DÚRAN, R. V.; GOTTLIEB, E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**. v. 10, p.267-277, 2010

TELLES, C. B.; SABRY, D. A.; ALMEIDA-LIMA, J.; COSTA, M. S.S. P.; MELO-SILVEIRA, R. F.; TRINDADE, E. S.; SASSAKI, G. L.; WISBECK, E.; FURLAN, S. A.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. O. Sulfation of the extracellular polysaccharide produced by the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* alters its antioxidant, anticoagulant and antiproliferative properties *in vitro*. **Carbohydrates polymers**. v. 85, p. 514-521, 2011.

THORGEIRSSON, S. S.; GRISHAM, J. W. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. **Nature Genetics**. v.31, p.339-346, 2002.

VON POSER, G. L. Polissacarídeos In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFSC:2001: p.427, 2001.

VENDRUSCOLO, C. W.; FERRERO, C.; PINEDA, E. A. G.; SILVEIRA, J. L. M.; FREITAS, R.A.; JIMÉNEZ-CASTELLANOS, M. R.; BRESOLIN, T. M. B. Physicochemical and mechanical characterization of galactomannan from *Mimosa scabrella*: Effect of drying method. **Carbohydrate Polymers**. v.76, p. 86-93, 2009

VETVICKA, V. Glucan immunostimulant adjuvant, potential drug. **World Journal Clinical Oncology**. v. 10 (2), p. 115-119, 2011.

WANG, H. T.; SHIMURAA, K.; ITO, H. Antitumor activity of Polysaccharide from a Chinese medicinal herb, *Acanthopanax giraldii* Harms. **Cancer Letters**. v.65, p.79-84, 1992.

WANG, L.; LI, X.; CHEN, Z. Sulfated modification of the Polysaccharides obtained from defatted rice bran and their antitumor activities. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 44, p. 211–214, 2009.

WANG, G.; DONG, L.; ZHANG, Y.; JI, Y.; XIANG, W.; ZHAO, M. Polysaccharides from *Phellinus linteus* inhibit cell growth and invasion and induce apoptosis in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. **Section Cellular and Molecular Biology**. v. 67, p. 247—254, 2012

WANG, X.; WANG, J.; ZHANG, J.; ZHAO, B.; YAO, J.; WANG, Y. Structure–antioxidant relationships of sulfated galactomannan from guar gum. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 46, p.59-66, 2010.

WANG -YING; ZHAO–HUAN; MIAO – XIAOLIANG; LIU – DAN; JIANG – HUIXING; LIU-PEIPEI, WANG-YUFENG; YIN – HONGPING. Structural determination and antitumor activities of a water-soluble polysaccharide from *Mortierella hepialid*. **Fitoterapia**. v.86, p.13–18, 2013.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S. K. Biological Activities and Potential Health of Sulfated Polysaccharides derived from Marine Algae. **Carbohydrate Polymers**. v. 84, p.14-21, 2011.

WIJESINGHE, W. A. J. P.; YASANTHA,A.; JEON, Y. L. Effect of anticoagulative sulfated polysaccharide purified from enzyme assistant extract of brown seaweed *Ecklonia cava* on Wistar rats. **Carbohydrate polymers**. v. 86, p. 917-921, 2011.

WHISTLER, R. L.; SPENCER, W. W. Sulfation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. New York, v.4, p. 297-298, 1964.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. v. 2, p. 211-215, 1963b.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. **Methods in Carbohydrate Chemistry**. v. 2, p. 65-68, 1963a.

YE, H.; WANG, K.; ZHOU, C.; LIU, J.; ZENG, X. Purification,antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. **Food Chemistry**. v. 11, p. 428-432, 2008.

YEJIN-WU; YANQUN-WANG. Inhibition of *Astragalus membranaceus* polysaccharides against liver cancer cell HepG2. **African Journal of Microbiology Research**. v. 4 (20), p.2181-2183, 2010.

YIN, Y.; YU, R.; YANG, W.; YUAN, F.; YAN, C.; SONG, L. Structural characterization and anti-tumor activity of a novel Heteropolysaccharide isolated from *Taxus yunnanensis*. **Carbohydrate Polymers**. v.82, p.543–548, 2010.

YOON, SEON-JOO.; CHU, DJONG-CHI.; JUNEJA, L. R. Chemical and Physical Properties, safety and application of partially hydrolyzed guar gum as dietary fiber. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**. v.42, p. 1-7, 2008.

ZENG, J.; DAI, P.; REN, L.; SONG, B.; CHEN, X.; WANG, X.; WANG, J.; ZHANG, T.; ZHU, W. Apoptosis-induced anti-tumor effect of *Curcuma kwangsiensis* polysaccharides against human nasopharyngeal carcinoma cells. **Carbohydrate Polymers**. v. 89, p.1067–1072, 2012.

ZHAO - YUHUA; LIU- HAO; RIKER, A.; FODSTAD, O.; LEDOUX, S. P.; WILSON, G. L.; MING - TANG. Emerging metabolic targets in cancer therapy. **Frontiers in Bioscience**. v. 16, p. 1844-1860, 2011.

ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. **Carbohydrate Polymers**. v. 90, p.1395-1410, 2012.