



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

CYBELLE TEIXEIRA MARQUES

**ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DE UMA HETEROFUCANA DA
ALGA MARROM *Padina gymnospora***

**NATAL/RN
2007**

CYBELLE TEIXEIRA MARQUES

**ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DE UMA HETEROFUCANA DA
ALGA MARROM *Padina gymnospora***

Dissertação apresentada ao
Departamento de Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande do
Norte como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica.

Orientador: Prof^a Dr^a Edda Lisboa Leite

**NATAL/RN
2007**

Divisão de Serviços Técnicos

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Central Zila Mamede

Marques, Cybelle Teixeira.

Atividade antiinflamatória de uma heterofucana da alga marrom
Padina gymnospora / Cybelle Teixeira Marques. – Natal, RN, 2007.
74 f.

Orientadora: Edda Lisboa Leite.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do
Norte. Centro de Biociências. Departamento de Bioquímica. Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Alga marrom – Dissertação. 2. *Padina gymnospora* – Dissertação. 3.
Heterofucana – Atividade antiinflamatória – Dissertação. I. Leite, Edda
Lisboa. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 582.272(043.3)

CYBELLE TEIXEIRA MARQUES

**"ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DE UMA HETEROFUCANA DA ALGA
MARROM *PADINA GYMNOSPORA*"**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande do
Norte como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica.

Aprovado em: 05/09/2007

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Edda Lisboa Leite
Departamento de Bioquímica - UFRN
Orientadora



Prof^a. Dr^a. Luciana Guimarães Alves
Professora de Bioquímica - FACEX
1º Examinador



Prof^a. Dr^a. Suely Ferreira Chavante
Departamento de Bioquímica- UFRN
2º Examinador

A Deus, pela oportunidade de viver e compreender seus desígnios e crescer em minha vocação.

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a Edda Lisboa Leite por ter me dado segurança e apoio sempre que necessário. Obrigada pela confiança em me aceitar em seu laboratório, pelos valiosos ensinamentos e conselhos profissionais e por seu exemplo único de orientadora e professora.

Agradeço em especial ao Prof. Dr. Hugo Alexandre por ter me ajudado sempre que precisei. Obrigada pela sua paciência e amizade!

Aos meus pais Gilvan Marques e Fátima Marques por terem me apoiado e incentivado em todos os momentos da minha vida. Vocês me deram a base necessária para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos meus irmãos Cyntya Marques e Giullian Marques que de uma forma ou de outra sempre me apoiaram.

Às amigas do laboratório de Polissacarídeos de algas: Micheline, Maria Emília, Marília e Lissandra. Muito obrigada por me ajudarem sempre, não só no laboratório, mas em todos os momentos.

Aos ex-integrantes do laboratório de Polissacarídeos de algas: Celina Dore, Fernando Roberto, Júlio César, Karla Queiroz, Luciana Guimarães, Tarciana Gurgel (amiga, também te amo) e Valquíria Medeiros. Sempre dispostos a me ajudar e aqueles mais antigos a repassar seus conhecimentos para que eu pudesse seguir sozinha. Vocês deixaram saudades!

Aos amigos do BIOPOL: Eduardo Henrique, Ivan Rui, Leandro costa, Mariana Santana, Nednaldo Dantas e Sara Cordeiro. Vocês formaram a minha segunda família dentro do departamento de Bioquímica. Obrigada pelo apoio e ajuda, não só na bancada, mas na vida. Vocês são pessoas muito especiais!

Às minhas amigas Heryka Myrna e Maria Leila pelo apoio durante os primeiros passos no mestrado e pela amizade, alegria e companheirismo em todos os momentos desta trajetória. Muito obrigada!

À minha amiga Viviane Katielly que vem me acompanhando da graduação até os dias de hoje. Chegamos até aqui e se Deus quiser iremos muito além.

Aos colegas da turma de mestrado: Danielle, Edilson, Gioconda, Josane, Karla Daniele, Kátia, Leonardo, Robério e Ticiane.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica da UFRN: Cleysyvan, Videanny, Olívia, Núbia, Glória, Ana Celly, Adriana, Ana Karine, Diego (Popó), Jailma, Daiane, Railson, Leonardo e Adeliara.

Aos professores do Departamento de Bioquímica da UFRN: Maurício Sales, Luiz Diz, Roberto Dimenstein, Dilma Ferreira, Elizeu Antunes, João Felipe, Jacira Maria, Luciana Matta, Fernanda Wanderley, Suely Ferreira, José Fernandes.

À professora Dr^a Selma Jerônimo, coordenadora do curso de pós-graduação em Bioquímica da UFRN.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRN: Creuza, Eliene, Itamar, Jonas, Kildare, Marcos, Margarita e Michelle.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pela realização do IV.

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Ceará (UFC), pela realização da RMN.

Aos órgãos financiadores: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da UFRN.

*O poder nasce do querer. Sempre que o
homem aplicar a veemência e
perseverante energia de sua alma a um
fim, vencerá os obstáculos, e, se não
atingir o alvo fará, pelo menos, coisas
admiráveis.*

Dale Carnegie

RESUMO

Fucanas, polissacarídeos sulfatados extraídos de alga marrom e alguns equinodermos, têm sido extensivamente estudadas devido as suas diversas atividades biológicas e pela sua interferência com mecanismos moleculares de reconhecimento celular, incluindo o tráfego de leucócitos dos vasos sanguíneos para o interior de sítios inflamatórios mediado pela família das moléculas de adesão denominada selectinas. Neste presente estudo, nós examinamos a estrutura de uma heterofucana extraída da alga marrom *Padina gymnospora* e seu efeito sobre a migração de leucócitos para o peritônio. Os polissacarídeos sulfatados foram extraídos da alga marrom por proteólise com a enzima proteolítica maxatase. A presença de contaminação por proteínas e ácido urônico foi detectada no extrato bruto dos polissacarídeos. Fracionamento do extrato bruto com concentrações crescentes de acetona produziu cinco frações com diferentes concentrações de fucose, xilose, ácido urônico, galactose, glicose e sulfato. A fração precipitada com 1,5 volume de acetona foi caracterizada por infravermelho e ressonância magnética nuclear, através das quais se pôde constatar a presença de grupos sulfato no C4 da α -L-fucose. A ação antiinflamatória deste composto foi avaliada através do ensaio de peritonite induzida por tioglicolato de sódio e através da produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais utilizando-se o reagente de Griess. A fração F1,5 mostrou-se eficiente na redução do influxo leucocitário para a cavidade peritoneal quando utilizados 10 mg/Kg e 25 mg/Kg resultando em uma diminuição na ordem de 56 e 39 %, respectivamente. Uma diminuição na produção de óxido nítrico ocorreu quando altas concentrações de fucana foram usadas. A citotoxicidade do composto também foi avaliada utilizando-se como parâmetro a redução do 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). A fração F1,5 não apresentou citotoxicidade quando utilizados 500 μ g/ml da fração. Este estudo sugere o uso da fração F1,5 (heterofucana) como um antiinflamatório.

Palavras-chave: Fucanas. Alga marrom. Inflamação. Viabilidade celular.

ABSTRACT

Fucans, sulfated polysaccharides extracted from brown algae and some echinoderms, have been extensively studied for its diverse biological activities and because of its interference with molecular mechanisms of cell to cell recognition, including leukocyte trafficking from blood vessels into sites of inflammation mediated by selectin, a family of adhesion molecules. In the present study, we examined structural features of a heterofucan extracted from brown algae *Padina gymnospora* and its effect on the leukocyte migration to the peritoneum. The sulfated polysaccharides were extracted from the brown seaweed by proteolysis with the proteolytic enzyme maxatase. The presence of protein and uronic acid contamination was detected in the crude polysaccharide extract. Fractionation of the crude extract with growing concentrations of acetone produced five fractions with different concentrations of fucose, xylose, uronic acid, galactose, glucose and sulfate. The fraction precipitated with 1.5 volumes of acetone was characterized by infrared and nuclear magnetic resonance, through which can be observed the presence of sulfate groups in the C4 of α -L-fucose. The anti-inflammatory action of this composite was assessed by a sodium thioglycollate-induced peritonitis assay and through nitric oxide production by the peritoneal macrophages using Gries's reagent. Fraction F1.5 was efficient in reducing leukocyte influx into the peritoneal cavity when 10 mg/kg and 25mg/kg were used, resulting in a decrease of 56 and 39%, respectively. A decrease of nitric oxide production occurred when high concentrations of fucana were used. The cytotoxicity of the composite was also assessed using the reduction of 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Fraction F1.5 had no cytotoxicity when 500 μ g/mL of the fraction was used. This study suggests the use of fraction F1.5 (heterofucan) as an anti-inflammatory.

Keywords: Fucans. Brown algae. Inflammation. Cell viability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Interação entre leucócitos e o endotélio durante alteração vascular	18
Figura 2 - Alga marrom pertencente à espécie <i>Padina gymnospora</i> utilizada neste estudo	31
Figura 3 - Esquema de extração e fracionamento dos polissacarídeos sulfatados obtidos da alga marrom <i>Padina gymnospora</i>	36
Figura 4 - Ensaio de viabilidade celular e produção de óxido nítrico <i>in vitro</i>	42
Figura 5 - Esquema do ensaio de peritonite induzida por tioglicolato de sódio em camundongos da linhagem <i>Swiss</i>	44
Gráfico 1 - Rendimento das frações polissacarídicas provenientes da extração com acetona	46
Figura 6 - Perfil eletroforético das frações de polissacarídeos provenientes do fracionamento com acetona	47
Figura 7 - Perfil eletroforético das frações polissacarídicas em presença de tampão acetato	48
Figura 8 - Cromatografia descendente em papel das frações polissacarídicas	50
Figura 9 - Espectroscopia de Infravermelho da fração F1,5 extraída de <i>P. gymnospora</i>	52
Figura 10 - Espectroscopia de RNM de ^1H da fração F1,5 de <i>P. gymnospora</i>	53
Gráfico 2 - Efeito <i>ex vivo</i> da fração F1,5 sobre a viabilidade celular	54
Gráfico 3 - Ensaio colorimétrico com MTT.....	55
Gráfico 4 - Determinação da concentração de ON por macrófagos tratados com a fração F1,5.....	56
Gráfico 5 - Efeito da fração F1,5 na migração dos leucócitos.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

AP-1	Ativador de proteína 1
CD	Condroitim sulfato
CETAVLON	Brometo de cetiltrimetilamônio
c-NOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
DS	Dermatam sulfato
EDTA	Etileno diamino tetraacetato de sódio dihidratado
EGF	Fator de crescimento
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos
GNC	Granulócitos
HS	Heparam sulfato
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular 1
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-1β	Interleucina-1 β
i-NOS	Óxido nítrico sintase induzível
IV	Infravermelho
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NO	Óxido nítrico
NO₂⁻	Nitrito
NOS	Óxido nítrico sintase
PBS	Tampão fosfato salino
PDA	1,3-diaminopropano acetato

PECAM-1	Molécula de adesão celular plaqueta-endotélio 1
PMN	Polimorfonucleares
RMN	Ressonância magnética nuclear
sLe^x	Sialil Lewis x
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM-1	Molécula de aderência às células vasculares 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	INFLAMAÇÃO	14
1.1.1	Selectinas	17
1.1.2	Óxido Nítrico	19
1.2	MACROALGAS MARINHAS: CONSIDERAÇÕES GERAIS	21
1.2.1	Algas Marrons (Phaeophyceae)	23
1.3	FUCANAS	24
2	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVO GERAL	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO	30
3.1.1	Alga Marrom	30
3.1.2	Animais	32
3.1.3	Células	32
3.2	MATERIAIS E REAGENTES	32
3.3	APARELHOS	34
3.4	MÉTODOS	35
3.4.1	Extração e fracionamento	35
3.4.1.1	Obtenção do pó cetônico	35
3.4.1.2	Proteólise	35
3.4.1.3	Fracionamento com acetona	36
3.4.2	Eletroforese em gel de agarose	37

3.4.3	Análises colorimétricas	38
3.4.4	Cromatografia descendente em papel	39
3.4.5	Espectroscopia de infravermelho	39
3.4.6	Ressonância magnética nuclear de ^1H	39
3.4.7	Obtenção de Macrófagos	40
3.4.8	Viabilidade celular <i>ex vivo</i>	41
3.4.9	Viabilidade celular <i>in vitro</i>	41
3.4.10	Produção de óxido nítrico <i>in vitro</i>	43
3.4.11	Peritonite induzida por tioglicolato de sódio	43
3.4.12	Métodos Estatísticos	45
4	RESULTADOS	46
4.1	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL DAS FUCANAS EXTRAÍDAS DA ALGA MARROM <i>P. gymnospora</i>	46
4.2	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (IV) DA FRAÇÃO F1,5	51
4.3	RESSONÂNCIA NUCLEAR MAGNÉTICA (RNM) ^1H DA FRAÇÃO F1,5	52
4.4	VIABILIDADE CELULAR <i>EX VIVO</i> DA FRAÇÃO F1,5	53
4.5	EFEITO <i>IN VITRO</i> DA FRAÇÃO F1,5 NA VIABILIDADE CELULAR	54
4.6	EFEITO <i>IN VITRO</i> DA FRAÇÃO F1,5 NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	55
4.7	AÇÃO ANTIINFLAMATÓRIA DA FRAÇÃO F1,5	57
5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFLAMAÇÃO

Inflamação ou flogose (do latim *inflamare* e do grego *phlogos*, que significa pegar fogo) é um processo fisiológico que ocorre como uma resposta natural de muitos organismos multicelulares a uma variedade de agentes estranhos a eles, incluindo parasitas, microorganismos patogênicos, substâncias químicas tóxicas e danos físicos aos tecidos (SCOTT; BRYANT; BIDGGOD, 1999). O objetivo desse processo é sanar o dano que o causou e induzir a reparação, no caso de destruição de células e tecidos, por reposição de células saudáveis oriundas do epitélio adjacente (reepitelização), do parênquima (regeneração) ou do estroma (cicatrização).

Com relação à persistência dos sintomas, a inflamação pode ser classificada em aguda ou crônica. A fase aguda é de curta duração (minutos, horas ou até poucos dias) e suas principais características são a exsudação de fluido rico em proteínas plasmáticas (edema) e a migração de leucócitos (BUTCHIER, 1991; MAJNO, 1961; STEVENS; LOWE, 1998). A fase crônica é de longa duração e está associada à presença de linfócitos, macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (DRAY, 1995; POBER; COTRAN, 1990). Muitas vezes a fase crônica pode ser precedida pela fase aguda.

As causas que podem desencadear o processo inflamatório são muito variadas, porém, Pereira e Bogliolo (1998) classificaram-nas em endógenas e exógenas. As primeiras seriam aquelas derivadas de degenerações ou necroses tissulares e de alterações na resposta imunológica (por imunocomplexo ou reação autoimune). Já as segundas poderiam ser atribuídas a agentes físicos, químicos

e/ou biológicos. Porém, independente da sua causa, uma das principais características do processo inflamatório é a saída de líquidos e de células do sangue para o interstício (PEREIRA; BOGLIOLO, 1998). Para que isso ocorra, é necessário a participação do plasma, de células circulantes, dos vasos sanguíneos e dos constituintes celulares e extracelulares do tecido conjuntivo (COTRAN et al., 1999).

Das células com grande capacidade de responder a estímulos inflamatórios destacam-se os granulócitos (GNC) circulantes no sangue periférico. Dentre esses, há os neutrófilos, também conhecidos como polimorfonucleares (PMN), que constituem a população celular primária na defesa aguda contra vários tipos de microorganismos presentes no meio ambiente, acumulando-se rapidamente no sítio invasivo ou de lesão. Sua participação no processo inflamatório é multifuncional e envolve o reconhecimento seletivo do agente agressor, resposta apropriada por meio de locomoção, fagocitose do microorganismo e sua subsequente destruição. Para tanto, possuem a habilidade de secretar substâncias não só capazes de retardar a disseminação da infecção, mas, quando necessário, também recrutar outros tipos de leucócitos para o foco infeccioso/inflamatório (CASSATELA, 1995).

O início e a condução do processo inflamatório ocorrem com a participação de mediadores de origem plasmática ou celular liberados a partir da ativação de células locais e migratórias (GALLIN; GOLDSTEIN; SNYDERMAN, 1982). Esses mediadores inflamatórios atuam normalmente restringindo as conseqüências e a extensão do dano tecidual, induzindo somente os sinais locais (dor, calor, rubor e tumor), acompanhados ou não da perda de função do tecido ou órgão afetado. Entretanto, dependendo da persistência e/ou intensidade da lesão, alguns mediadores podem difundir-se e mediar sinais e sintomas sistêmicos. As alterações provocadas pelos mediadores podem ser observadas nas mudanças que ocorrem

nos vasos sanguíneos locais, visto que, primeiramente, ocorre o aumento do diâmetro vascular, levando a um aumento no fluxo sanguíneo local, resultando em calor e rubor, especialmente nas superfícies dos pequenos vasos sanguíneos locais. Posteriormente, as células endoteliais são ativadas a expressar moléculas de adesão celular para promoverem a adesão dos leucócitos circulantes. Essa combinação permite que os leucócitos possam aderir ao endotélio e migrarem para os tecidos, em um processo denominado extravasamento. Para finalizar ocorre um aumento da permeabilidade do vaso sanguíneo. Como exemplo de mediador pode-se citar as citocinas que são substâncias químicas circulantes no plasma e importantes mediadores das respostas vascular e celular desencadeadas pelo estímulo inflamatório agudo. Dentre elas, destacam-se as interleucinas 1 (IL-1), IL-6 e IL-8, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (CASSATELA, 1995; SPRINGER, 1994; SPRINGER, 1995). Outro exemplo de mediador inflamatório é o óxido nítrico (NO) que medeia a ativação de citocinas, mudanças na permeabilidade vascular do tecido inflamado, além de potencializar a ação do TNF- α e IL-1 β (interleucina-1 β) pelos leucócitos (RALTSON, 1997).

Para que ocorra a infiltração dos leucócitos durante o processo inflamatório é necessário sua aderência seguida por seu extravasamento no tecido (diapedese). Esse processo é regulado, em parte, por moléculas de adesão pertencentes à família das selectinas e sua ação é necessária para permitir uma maior estabilidade no rolamento dos leucócitos (TEDDER et al., 1995). Além das selectinas, as proteínas do tipo imunoglobulinas (ICAM-1: molécula de adesão intracelular 1 e VCAM-1: molécula de aderência às células vasculares 1), integrinas e glicoproteínas semelhantes à mucina estão envolvidas neste processo (TAK, 1995).

1.1.1 Selectinas

Uma etapa crítica para a efetiva ação do processo inflamatório é a migração de células especializadas provenientes do sangue periférico para o tecido conjuntivo no qual se situa o foco inflamatório. Estudos têm demonstrado que os mecanismos moleculares que recrutam os diferentes tipos de leucócitos para as áreas inflamadas são similares (MACKAI; ROSEN, 2000).

A passagem dos leucócitos do vaso para os tecidos, extravasamento, decorre de uma seqüência de eventos que inclui três passos: marginação, rolagem e adesão ao vaso sanguíneo; transmigração através do endotélio (diapedese) e migração nos tecidos em direção a estímulos quimiotáticos. A adesão, a transmigração e a locomoção de leucócitos envolvem a ativação, por ligantes específicos, de diferentes famílias de receptores presentes na superfície dessas células e na matriz extracelular (BOKOCH, 1995; DEKKER; SEGAL, 2000) (Figura 1).

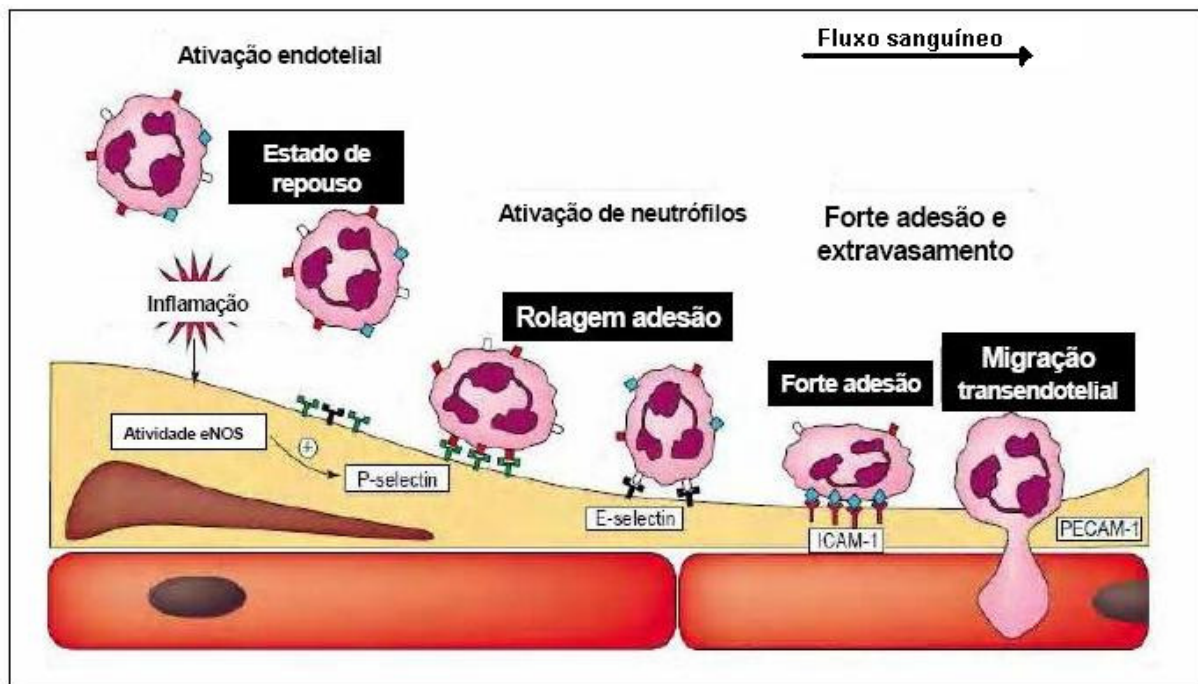


Figura 1: Interação entre leucócitos e o endotélio durante alteração vascular¹.

A família das moléculas de adesão, denominada selectina, medeia a interação inicial dos leucócitos com as células do endotélio durante o processo de transmigração (VERDRENGH; ERLANDSSON-HARRIS; TARKOWSKI, 2000). Denominadas de acordo com os tecidos onde elas foram identificadas, as selectinas são classificadas em L-selectina, P-selectina e E-selectina (KHAN; LANDIS; MALHOTRA, 2003). L-selectina é expressa pelos leucócitos circulantes; P-selectina é rapidamente expressa pelas células endoteliais ou plaquetas expostas a histamina ou trombina e a expressão da E-selectina é induzida após algumas horas de ativação das células do endotélio por interleucina-1, TNF- α ou endotoxina (KANSAS,

¹ Em condições normais leucócitos expressam L-selectina e trafegam livremente na circulação. Durante uma lesão local, macrófagos teciduais liberam citocinas inflamatórias como IL-1 e TNF, as quais ativam células endoteliais, que passam a expressar E e P-selectinas, que servem como receptores para a L-selectina leucocitária, promovendo adesão e rolamento sobre o endotélio vascular. Então, células endoteliais ativadas expressam ICAM-1, que funciona como receptor para integrinas β_2 que, após interação, estimulam a transmigração dos leucócitos pelo endotélio (diapedese), em direção ao foco de injúria. Fonte: Adaptado de Kakkar e Lefer, 2004.

1996; MCEVER; CUMMINGS, 1997; MCEVER; MOORE; CUMMINGS, 1995; ROSEN; BERTOZZI, 1994; SPRINGER, 1994; TEDDER *et al.*, 1995). A ação coordenada dessas moléculas é necessária para uma efetiva e estável rolagem dos leucócitos (LEY; TEDDER, 1995).

Os membros da família das selectinas apresentam uma estrutura modular comum caracterizada pela presença de um domínio N-terminal ligante de carboidrato (característico de lectina) dependente de cálcio, um domínio semelhante ao dos fatores de crescimento (EGF), um variado número de repetições consenso, um segmento transmembrana e uma pequena porção citoplasmática (NORMAN *et al.*, 1998).

Diversos grupos de pesquisas identificaram o tetrassacarídeo fucosilado, sialil Lewis x (sLe^x) como ligante para selectinas. Dessa forma, captura e rolagem dos leucócitos podem ser mediadas por interação da E- e P-selectina a esse tipo de carboidrato presente em glicoproteínas e alguns glicolípídeos nos leucócitos. Já a L-selectina, em contraste com E- e P-selectina, liga-se ao sialil Lewis x e carboidratos semelhantes expressos no endotélio podendo também mediar a rolagem dos leucócitos (BEVILACQUA; NELSON, 1993; CARLOS; HARLAN, 1994; SPRINGER, 1995).

1.1.2 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado (BECKMAN; KOPPENOL, 1996). Ele constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas (MORRIS; BILLIAR, 1994).

A síntese do NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalisada pela enzima NO-sintase (NOS) (MARLETTA, 1993; MONCADA, PALMER; HIGGS, 1991). Uma variedade de isoformas de NOS tem sido purificada em diferentes tecidos de mamíferos e muitas já tiveram seus genes clonados. Estudos bioquímicos e análise seqüencial de aminoácidos revelaram que estas isoformas representam uma família de proteínas e, aparentemente, são produtos de três genes distintos. Assim, as isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (c-NOS), dependente de íons cálcio (Ca^{++}) e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (i-NOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (MARLETTA, 1994; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). Segundo Davies, Fulton e Hagen (1995), após a indução, i-NOS é ativa por 20 horas e sintetiza NO em concentrações nanomolares 1000 vezes maior que c-NOS (WONG; MARSDEN, 1996).

O NO medeia vários fenômenos, como vasorrelaxamento dependente do endotélio, citotoxicidade mediada por macrófagos, inibição da ativação, adesão e agregação plaquetária, relaxamento do corpo cavernoso peniano humano, regulação da pressão sangüínea basal, depressão sináptica a longo prazo, potencialização da transmissão sináptica a longo prazo, microcirculação medular e glomerular e prevenção de piloroespasmo em estenose pilórica hipertrófica infantil (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002). Porém, seu papel dentro do processo inflamatório é um dos aspectos mais estudados na Fisiologia nos últimos anos.

Estudos mostram um importante papel do NO como agente antiinflamatório, entretanto muitos outros demonstram a participação dessa molécula como indutora de disfunções teciduais e da ativação de células inflamatórias. Como o NO é um

potente vasodilatador seu envolvimento na resposta inflamatória pode ter relação com sua habilidade em aumentar a permeabilidade vascular e o edema através de mudanças no fluxo sanguíneo local e do aumento na produção de prostaglandinas pró-inflamatórias.

A quantidade de NO produzida pode determinar se ele é benéfico ou tóxico, visto que, pequenas quantidades dessa molécula são necessárias para a homeostasia, já grandes quantidades, como aquelas produzidas na ativação da i-NOS são citotóxicas (KIECHELE; MALINSKI, 1993). Entretanto, a produção de grandes quantidades de NO pode ser importante na defesa contra invasores celulares, tumores celulares e ainda em lesões vasculares com perda endotelial (GABOURY et al., 1993; KUO; SCHROEDER, 1995; PAYNE; KUBES, 1993; YAN et al., 1996). Então, como a expressão da i-NOS é o resultado de uma resposta inflamatória localizada ou difusa resultante de uma infecção ou dano tecidual, quando a resposta inflamatória é parte de uma resposta adaptativa (isto é, infecção ou sepse), a expressão de i-NOS é benéfica; já quando a expressão da i-NOS é parte da inflamação anormal (não adaptativa), a expressão de i-NOS pode ser nociva (isto é, doença autoimune).

1.2 MACROALGAS MARINHAS: CONSIDERAÇÕES GERAIS

O termo alga é utilizado para denominar vários grupos de seres vivos aquáticos e fotossintetizantes. De acordo com o tamanho, as algas são separadas em dois grandes grupos: as algas microscópicas (microalgas) e as algas macroscópicas (macroalgas). Em relação ao habitat as algas são predominantemente aquáticas, sendo encontradas no mar, em águas estuárias,

dulcíolas e superfícies úmidas. Sua distribuição depende da salinidade e temperatura da água, disponibilidade de luz solar, corrente dos oceanos e das condições físicas e químicas afins (RAVEN; EVERT; EICHHOM, 1996).

As algas marinhas pertencem a vários grupos taxonômicos heterogêneos caracterizados por terem a capacidade de invadir ambientes susceptíveis de serem colonizados, sendo consideradas as maiores produtoras de matéria orgânica das cadeias tróficas (PEREZ-LORENZO; LEVY-BENSHIMOL; GOMEZ-ACEVEDO, 1998).

As macroalgas marinhas usualmente possuem grandes quantidades de carboidratos e proteínas (MABEAU et al., 1992; BENEVIDES et al., 1998; RAMOS et al., 1998), assim, podem ser consideradas como uma fonte potencial de nutrientes. A presença desses componentes é muito variável e é decorrente dos seguintes fatores: sazonalidade, meio ambiente, profundidade de imersão, estágio de desenvolvimento celular e luminosidade. A variação dos teores de polissacarídeos em diferentes espécies, gêneros e sub-classes de algas diz respeito também ao ciclo de vida da alga (PARKER, 1970).

Além da importância ecológica das macroalgas marinhas, elas apresentam grande participação em atividades industriais e econômicas para o homem. São utilizadas como matéria-prima para a produção de espessantes (a partir das Feofícias, produz-se a algina, utilizada na indústria alimentar e de cosméticos); na produção de medicamentos e indústria farmacêutica, para produção de meio-de-cultura de fungos e bactérias (a partir das algas Rodofícias, obtem-se o ágar); mais de setenta espécies de macroalgas marinhas são usadas como alimento, principalmente pelos povos orientais.

As três principais divisões de algas marinhas são as Phaeophyta (algas marrons), Chlorophyta (algas verdes) e Rhodophyta (algas vermelhas), que juntas compreendem cerca de 7000 espécies (RORRER; CHENEY, 2004).

1.2.1 Algas Marrons (Phaeophyceae)

As algas marrons (Divisão Phaeophyta / Classe Phaeophyceae) são um grupo de algas multicelulares, quase exclusivamente marinhas, já que alguns gêneros são de água doce. As Phaeophyceae são em sua maioria encontradas em regiões frias e temperadas, mas alguns representantes, Ordem Dictyotales, podem estar presentes nas regiões tropicais.

Com relação aos pigmentos, além de clorofila a, possuem clorofila c, carotenos e xantofilas, sendo a fucoxantina o pigmento mais comum e responsável pela cor marrom. As principais moléculas de reserva dessas algas são as laminarinas, polissacarídeos neutros.

A parede celular de algas marrons tem um compartimento fibrilar formado principalmente de microfibrilas de celulose, a qual é embebida em uma matriz amorfa de polissacarídeos ácidos ligados uns aos outros por proteínas (KLOAREG; QUATRANO, 1988). Os polissacarídeos ácidos são principalmente compostos por ácidos algínicos, os alginatos, e fucanas. A estrutura química, propriedades físico-químicas e atividades biológicas desses açúcares têm sido amplamente estudadas (ANDRADE et al., 2004).

O ácido algínico é um polissacarídeo não sulfatado, linear, constituindo o principal polissacarídeo ácido das Phaeophyceae (ALVES, 2000). Esses açúcares são polímeros de ácido β -D-manurônico e ácido α -L-gulurônico com ligações 1 $\rightarrow$ 4.

Os ácidos algínicos são bastante utilizados economicamente como estabilizantes, emulsificantes e géis empregados pelas indústrias cosméticas, têxtil e de alimento (CHANDIA et al., 2001; PAINTER, 1983; PANIKKAR; BRASCH, 1997).

1.3 FUCANAS

As algas marinhas marrons possuem em sua matriz mucilaginosa polissacarídeos conhecidos como Fucanas, denominação utilizada para polissacarídeos sulfatados que possuem como principal característica a presença de uma substancial quantidade de α -L-fucose e grupos sulfato (YANG et al., 2006). Além de fucose, podemos encontrar no polímero outros monossacarídeos, como β -D-xilose, β -D-galactose, ácido β -D-glucurônico, β -D-manose e β -D-glicose (DUARTE et al., 2001; LEITE et al., 1998; PONCE et al., 2003; ROCHA, 2002).

Acredita-se que por possuir um caráter altamente higroscópico esses polissacarídeos estariam relacionados com a proteção da alga contra desidratação quando esta é submetida a longos períodos de exposição ao sol durante marés baixas. Além disso, a natureza mucilaginosa das fucanas parece tornar a alga flexível o bastante para crescer em ambiente líquido e rígida o suficiente para permanecer estendida, de forma a melhor captar a luz e os nutrientes existentes (PERCIVAL; MC DOWELL, 1967).

Os primeiros estudos sobre fucanas foram feitos por Kylin (1913,1915) com as algas *Laminaria digitata*, *Fucus vesiculosus* e *Ascophyllum nodosum*. Porém, somente com os estudos feitos por Bird e Haas (1931) foi demonstrada a presença de grupos sulfatos nos monômeros de fucose. Com relação à estrutura desses polissacarídeos, relatos iniciais relevantes só foram obtidos em 1950 através de

pesquisas realizadas por Conchie e Percival com a alga *Fucus vesiculosus*. Larsen, Haug e Painter (1970), estudando a alga *Ascophylum nodosum*, obtiveram resultados que indicavam a presença de polissacarídeos com diferentes graus de sulfatação.

Kloareg e Quatrano (1988), levando em consideração a heterogeneidade das fucanas, resolveram classificá-las com base nos seus açúcares constituintes em homofucanas e heterofucanas. As primeiras seriam aquelas cujos polímeros eram formados apenas por L-fucose sulfatada e no segundo grupo estariam incluídas aquelas, cujos polímeros seriam constituídos de fucose e outros açúcares.

Apesar das homofucanas de algas apresentarem particularidades que dificultam a determinação de suas estruturas, estas conservam algumas características como o tipo de ligação na cadeia central e nos pontos de sulfatação. Contudo, quando se trata de heterofucanas de algas estamos nos referindo a estruturas que apresentam combinações entre seus monossacarídeos ainda mais complexas (QUEIROZ, 2003).

As heterofucanas são usualmente heterogêneas e ramificadas, o padrão de sulfatação não é regular, e por este motivo, métodos químicos de análises estruturais, como espectro de RMN de fucanas nativas, normalmente só resultam em informações parciais de suas estruturas (BILAN et al., 2002). Desta forma, apesar dos diversos estudos realizados com essas moléculas a estrutura química precisa destes compostos ainda não pôde ser bem esclarecida (BILAN et al., 2002; NAGUNO; NISHINO, 1996;).

Alguns relatos de estruturas propostas para polissacarídeos de algas foram realizados por Patankar *et al.* (1993) com a alga *Fucus vesiculosus*, por Usov et al. (1998) com as algas *Ecklonia hurome* e *Laminaria saccharina*, por Leite et al.

(1998) em *Spatoglossum schröderi*, por Nagaoka et al. (1999) em *Cladosiphon okamuranus*, por Chevolot et al. (2001) em *Ascophyllum nodosum*, por Rocha (2002) em *Spatoglossum schröderi* e por Bilan et al. em *Fucus evanescens* (2002), *Fucus distichus* (2004) e *Fucus serratus* (2006).

Silva (2005) caracterizou uma heterofucana da alga *Padina gymnospora* e através das análises de metilação verificou que esta era formada por uma cadeia central de resíduos de ácido β -D-glucurônico unidos por ligações do tipo (1 $\rightarrow$ 3). Foi constatada ainda a presença da β -D-galactose em menor quantidade. Esta fucana apresentou-se ramificada por xilofucanas e o grupamento sulfato ocupando o C3 da fucose. Entretanto ainda não foi possível propor a estrutura fina desta molécula.

Por muitos anos, fucanas foram observadas só como uma potencial fonte de L-fucose, porém, recentemente, elas têm sido extensivamente estudadas devido ao alto potencial biológico que apresentam (LI; ZHANG; SONG, 2005), visto que, várias atividades biológicas foram atribuídas às fucanas, como anticoagulante (NARDELLA et al., 1996; NISHINO et al., 2000), antitrombótica (MOURÃO; PEREIRA, 1999; NISHINO et al., 2000), ativação plaquetária (ALWAYN et al., 2000; DURIG et al., 1997), antiproliferativa (LOGEART et al., 1997) e antiinflamatória (LASKY, 1995).

Como já foi mencionado a inflamação é fundamentalmente um mecanismo de defesa. Entretanto, a inflamação e o reparo podem ser potencialmente prejudiciais. Estudos demonstram que os neutrófilos e o processo de adesão e migração podem provocar injúria tissular devido ao acúmulo dessas células no sítio inflamatório e liberação de moléculas tóxicas ao organismo como, por exemplo, o NO. Então, a busca de compostos que possam reduzir o extravasamento dos neutrófilos, mas que não prejudiquem a resposta inflamatória vem sendo realizada.

Um grande alvo nos estudos científicos relacionados à inflamação são as moléculas de adesão da família das selectinas, visto que, estas desempenham um papel fundamental durante o processo de migração dos leucócitos. A presença de um domínio do tipo C (dependente de cálcio) semelhante ao das lectinas (proteínas com afinidade a carboidratos) nessas moléculas têm levado a pesquisas envolvendo carboidratos que possam atuar como ligantes para as selectinas (BEVILACQUA; NELSON, 1993).

As fucanas são polissacarídeos que possuem estrutura semelhante aos ligantes naturais, como o sLe^x, que são reconhecidos pelas selectinas. Esses carboidratos têm sido utilizados para bloquearem a função das L- e P- selectinas (BEVILACQUA, 1993; VARKI, 1994) e, conseqüentemente, impedirem o extravasamento dos neutrófilos para o sítio inflamatório durante estágios iniciais da inflamação (PREOBRAZHenskAYA et al., 1997). Porém, é necessário um maior conhecimento com relação às estruturas desses polissacarídeos devido às possíveis correlações estrutura/atividade que poderão ser feitas a partir dos dados obtidos sobre as mesmas (ALBUQUERQUE, 2005) e pelo fato de que a descoberta e identificação de compostos a serem utilizados na medicina alternativa que não possuam efeitos colaterais é um importante alvo nas pesquisas científicas (CHOI; KOO; HWANG, 2004).

Atualmente, os estudos indicam que as atividades biológicas descritas para fucanas estão relacionadas com as interações entre carboidratos e proteínas, e que estas interações são fatores determinantes para a função biológica e fisiológica destes compostos (WILLIAMS; DAVIES, 2001). Portanto, o conhecimento da estrutura desses polissacarídeos é muito importante, pois a elucidação de diferentes estruturas não só determina a atividade biológica, mas também o mecanismo pelo

qual eles exercem sua atividade, uma vez que esta está relacionada com peso molecular, tipo de açúcar, e conteúdo de sulfato. Posição do sulfato, tipo de ligação e geometria molecular também são importantes (SHANMUGAN; MODY, 2000). Além disso, a composição de fucanas de algas varia de acordo com a espécie (DIETRICH et al., 1995), o procedimento de extração (GRAUFFEL et al., 1989), a época da coleta e as condições climáticas locais (PERCIVAL; MC DOWELL, 1967). Sendo assim, cada nova fucana descrita é um composto com características estruturais únicas que possui um potencial para ser usado como uma nova droga.

Baseado no que foi visto anteriormente, e por haver necessidade de maiores estudos com relação à inibição da migração leucocitária por heterofucanas pertencentes à ordem Dictyotales, desenvolvemos nosso estudo visando avaliar a ação antiinflamatória de uma heterofucana presente na alga marrom *Padina gymnospora*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar parcialmente a estrutura de uma fucana extraída da alga marrom *Padina gymnospora* e avaliar o papel desse polissacarídeo frente ao processo inflamatório.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

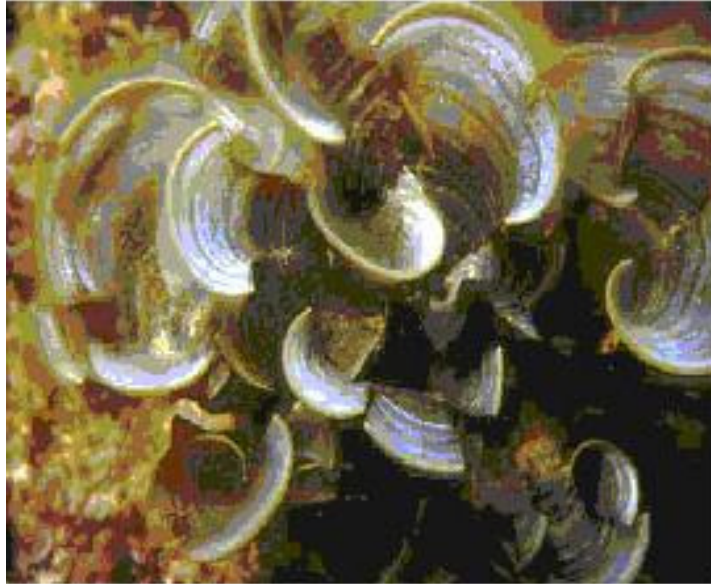
- Extrair e fracionar os polissacarídeos sulfatados presentes na alga marrom *Padina gymnospora*;
- Analisar quimicamente as frações de fucanas extraídas;
- Analisar a fração mais homogênea, em eletroforese, através de IV e RMN;
- Verificar a ação da fração escolhida sobre a viabilidade celular, migração leucocitária e produção de óxido nítrico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1 Alga Marrom

A espécie de alga marrom *Padina gymnospora* (Figura 2), objeto deste estudo, foi coletada no litoral sul do Estado do Rio Grande do Norte, em marés baixas entre 0,0-0,2m. Uma vez coletadas, foram levadas ao laboratório e, no mesmo dia, lavadas em água corrente, examinadas cuidadosamente para que ficassem livres de epífitas, inclusões calcárias e sais e, então, posteriormente foram postas para secar em estufa aerada a 45°C. Em seguida foram trituradas, pesadas e guardadas em frascos hermeticamente fechados para posteriormente serem submetidas ao processo de extração e fracionamento dos seus polissacarídeos sulfatados.



Divisão: **Phaeophyta**

Classe: **Phaeophyceae**

Ordem: **Dictyotales**

Família: **Dictyotaceae**

Gênero: ***Padina***

Espécie: ***Padina gymnospora***

Figura 2: Alga marrom pertencente a espécie *Padina gymnospora* utilizada neste estudo.

3.1.2 Animais

Foram utilizados nos diversos ensaios biológicos camundongos albinos da linhagem *Swiss* com dois meses de idade, pesando entre 25-30g, obtidos no biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Estes animais foram mantidos em gaiolas individuais, submetidos à dieta e água *ad libitum* em condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/ escuro) e temperatura (25°C).

3.1.3 Células

As células utilizadas neste trabalho foram macrófagos provindos da cavidade peritoneal de camundongos albinos da linhagem *Swiss*.

3.2 MATERIAIS E REAGENTES

⇒ Acetato de etila, ácido butírico, ácido fosfórico, ácido tioglicólico, hidróxido de sódio, nitrato de prata, da Vetec Química Fina Ltda. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

⇒ Acetato de sódio, ácido acético, ácido clorídrico, álcool isopropílico, cloreto de bário, cloreto de cálcio, cloreto de potássio, cloreto de sódio, sulfato de sódio e tiosulfato de sódio da Reagen Quimibrás Indústrias Químicas S.A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

⇒ Acetona, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, álcool etílico, fenol, floroglucinol, nitrito de sódio e hidróxido de amônio da Merck (Darmstadt, Alemanha).

⇒ ácido D-glucurônico, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido isobutírico, azul de toluidina, azul de Trypan, brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), carbazol, 1,3-diaminopropano acetato, D-galactose, D-glicose, L-fucose, D-manose, D-xilose, meio para cultura celular RPMI 1640, naftiletildiamina, sulfanilamida, tolueno e vermelho de cresol da Sigma-Aldrich Brasil Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).

⇒ Agarose (Standart Low-Mr) e comassie brilliant blue da BioRad Laboratories (Richmond, CA, EUA).

⇒ Bacto-Gelatina da Difco Laboratories (Detroit, MI, USA).

⇒ Câmara de contagem Neubauer - L. Optik e placas para cultura de células em poliestireno estéril com tampa, 96 poços e fundo chato da Ciencor Scientific Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).

⇒ Condroitim 4-sulfato (extraído de cartilagem de baleia), condroitim 6-sulfato (extraído de cartilagem de tubarão) e dermatam sulfato (extraído de pele de porco) adquiridos da Miles Laboratories Inc. (Elkhart, IN, EUA).

⇒ Cloridrato de Ketamina e cloridrato de xilazina, Laboratórios Köning S.A. do Brasil Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).

⇒ Heparin sulfato (extraído de pâncreas bovino) adquiridos da Opocrin Laboratories (Modena, Itália).

⇒ Maxatase (protease alcalina P 126) da BIOCON do Brasil industrial Ltda. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

⇒ Papel de Cromatografia Whatman n° 1 e 3 mm, da W & R Balston Ltda (Inglaterra).

⇒ Piridina, da Labsynth Produtos para laboratórios Ltda (Diadema, SP, Brasil).

3.3 APARELHOS

Além dos aparelhos usuais de laboratório podemos destacar:

⇒ Agitador orbital mod. 255-B da FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).

⇒ Banhos e estufas de temperatura constante da FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).

⇒ Câmara para eletroforese em gel de agarose, modelo desenvolvido por Jaques e col. (1968) (Técnica Permatron Ltda., São Paulo, SP, Brasil).

⇒ Centrífuga refrigerada CR 21 da Hitachi Koki Co. Ltd. (Tóquio, Japão).

⇒ Espectrofotômetros Varian - Series 634 da Varian Techtron PPTY Ltd. (Springvale, Vico, Austrália) e Hitachi U-2000 (Tóquio, Japão).

⇒ Fontes de corrente contínua regulável desenvolvidas pelo Dr. H. Rzeppa, Técnica Permatron Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).

⇒ Microscópio de luz Olympus modelo BX – 41 (Tokyo, Japão).

3.4 MÉTODOS

3.4.1 **Extração e fracionamento**

3.4.1.1 Obtenção do pó cetônico

A alga seca e pulverizada foi tratada quatro vezes, com dois volumes de acetona para despigmentação e delipidação do material. A acetona foi decantada, e o resíduo colocado para secar sob aeração, aferindo-se o peso seco do material, que se convencionou chamar de pó cetônico.

3.4.1.2 Proteólise

Ao pó cetônico foram adicionados dois volumes de NaCl 0,15M, sendo o pH ajustado para 8,0 com NaOH. A este material foi adicionada a enzima proteolítica Maxatase (14 mg por grama de pó cetônico), incubando-se a 60°C “overnight”. A suspensão foi em seguida centrifugada a 4620 g por 15 minutos. O precipitado foi desprezado e aferido o volume do sobrenadante, denominado de cru de polissacarídeos.

3.4.1.3 Fracionamento com acetona

O cru de polissacarídeos foi fracionado pela adição de volumes crescentes de acetona (0,3v; 0,5v; 1,1v; 1,5v e 2,6v) (Figura 3), segundo metodologia descrita por Rocha (1998), desta forma os polissacarídeos foram centrifugados e precipitados.

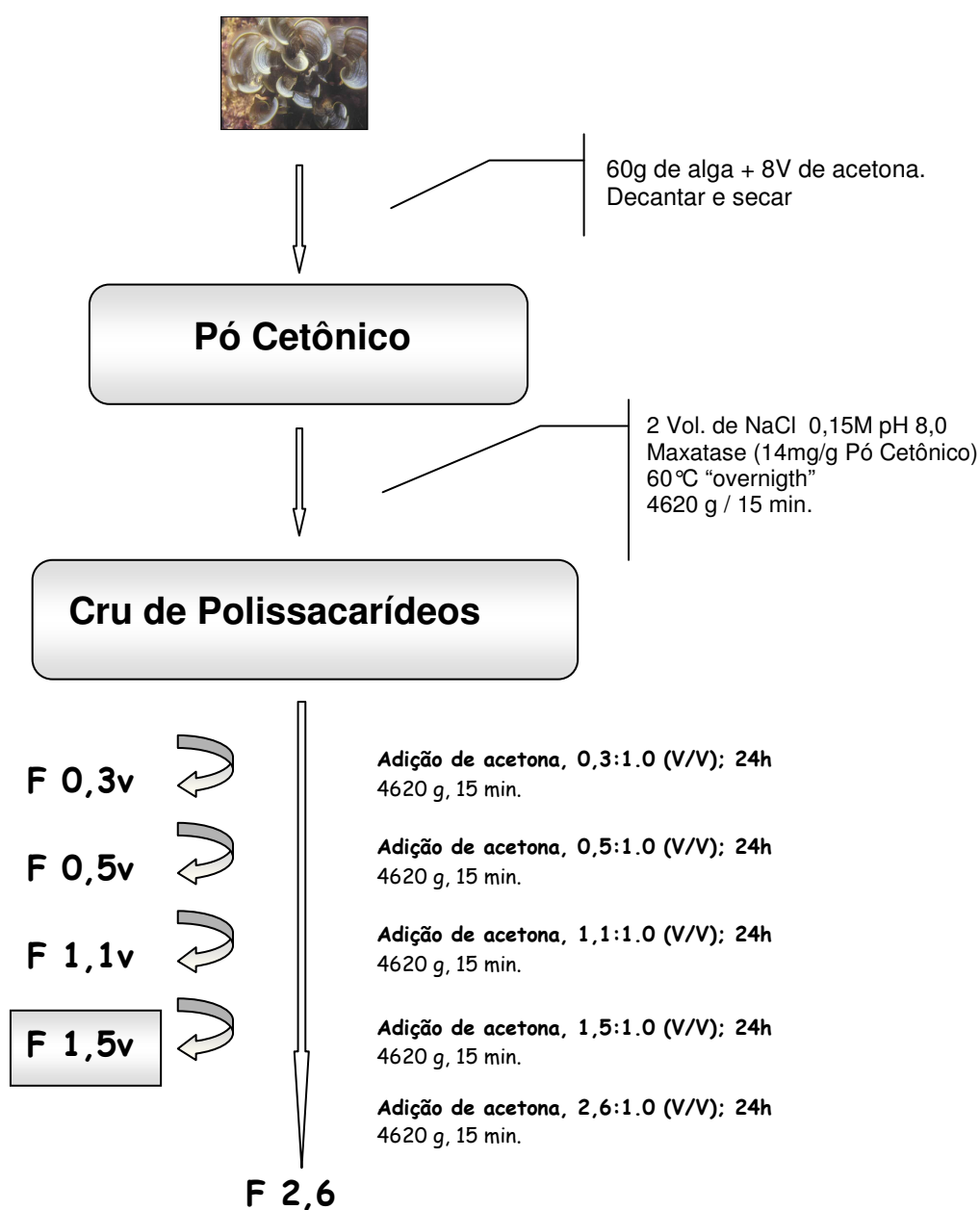


Figura 3: Esquema de extração e fracionamento dos polissacarídeos sulfatados obtidos da alga marrom *Padina gymnospora*.

3.4.2 Eletroforese em gel de agarose

O gel de agarose (0,6%) diluído no tampão de escolha foi colocado sobre lâminas de vidro medindo (7,5 x 5,0 x 0,2) e (7,5 x 10 x 0,2 cm). Alíquotas de 5 µl da amostra, contendo 200 µg do material, foram aplicadas em canaletas no gel e submetidas à eletroforese, em caixa resfriada a 4°C. A origem corresponde ao pólo negativo.

A eletroforese foi realizada no tampão 1,3-diaminopropano acetato (PDA) 0,05M, pH 9,0 (100 V durante 1 hora) (DIETRICH; DIETRICH, 1976). Nesta eletroforese, foram usados como referência de mobilidade, os padrões de glicosaminoglicanos sulfatados. Decorrido o tempo previsto para a migração eletroforética em cada sistema de tampão, os compostos foram precipitados no gel de agarose com CETAVLON 0,1%, por um tempo mínimo de duas horas, à temperatura ambiente.

Em seguida o gel foi seco sob uma corrente de ar quente e corado com azul de toluidina 0,1%, numa solução de ácido acético 1% e etanol 50%, sendo o excesso de corante removido por uma solução de ácido acético 1% em etanol 50% (solução descorante). A operação foi repetida até completa descoloração do fundo da lâmina. A seguir o gel foi seco à temperatura ambiente.

A revelação das bandas de migração é decorrente da atividade metacromática característica de cada composto. Os compostos ricos em sulfato desenvolvem uma coloração roxo característica e aqueles cujas cargas são fornecidas apenas pelas carboxilas necessitam de uma imersão em acetato de sódio 0,2M pH 5,8 (NEWTON; SCOTT; WHITEMAN, 1974) desenvolvendo uma coloração rosa, descrita histologicamente por Mc Cully (1965).

3.4.3 Análises colorimétricas

Os açúcares totais foram determinados pelo método do fenol/ácido sulfúrico de acordo com Dubois et al. (1956), empregando-se como padrão L-fucose, sendo as leituras realizadas a 490 nm.

O conteúdo de ácido urônico foi estimado pela reação do carbazol descrita por Dische (1974), utilizando-se como padrão o ácido D-glucurônico sendo as leituras realizadas a 525 nm.

Os teores de fucose foram determinados de acordo com o método de Dische (1962) para 6-desóxi-oses, usando L-fucose como curva padrão. Para eliminar a interferência por ácidos urônicos e pentoses, foram realizadas leituras dicromáticas a 400 e 430 nm. Desta forma, a concentração de fucose é função linear de $D.O._{400\text{ nm}} - D.O._{430\text{ nm}}$.

O conteúdo de proteína foi determinado utilizando-se o reagente Coomassie brilliant blue, segundo o método de Spector (1978), sendo a leitura realizada a 595 nm. Para a curva padrão foi utilizada albumina bovina.

O teor de sulfato total foi determinado após hidrólise ácida (HCl 6N, 6 horas, 100°C) por turbidimetria pelo método da gelatina-bário (DODGSON; PRICE, 1962). O sulfato de sódio (1 mg/ml) foi utilizado como curva padrão sendo submetido as mesmas condições das amostras em estudo.

3.4.4 Cromatografia descendente em papel

A cromatografia dos produtos de hidrólise ácida (HCl 2,0 N, 100 °C, 2 h) das frações de polissacarídeos obtidas de *Padina gymnospora* foi realizada em papel Whatman N° 1 nos seguintes sistemas de solventes:

- Ácido isobutírico : Amônia 1,0 N (5 : 3) V/ V
- Butanol : Piridina : Água (2 : 3 : 1,5)V/ V
- Acetato de etila : Piridina : Água (8 : 2 : 1) V/ V

Os compostos foram visualizados através de revelação com prata em meio alcalino (TREVELYAN; PROCTER; HARRISON, 1950).

3.4.5 Espectroscopia de infravermelho (IV)

A espectroscopia de infravermelho foi realizada em espectômetro FT-IR ABB Bomem modelo MB 104, de 4000 a 400 cm^{-1} . Os polissacarídeos (5 mg) foram analisados após secagem sob a forma de pastilha de KBr.

3.4.6 Ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H

Os espectros de RMN foram obtidos a 60°C utilizando 10 mg das amostras. Os polímeros foram dissolvidos em 0,5 mL de água deuterada (D_2O) a 99,75% e todos os espectros foram obtidos a 60 °C com supressão da água por pressaturação.

3.4.7 Obtenção de Macrófagos

Com o intuito de promover a migração dos macrófagos para a cavidade peritoneal dos camundongos, foi inoculado 1 mL de tioglicolato de sódio 3% na cavidade peritoneal de cada animal, sendo a coleta realizada após 3-4 dias (tempo necessário para a migração). Passado esse período, os animais foram anestesiados utilizando-se cloridrato de xilazina e cloridrato de ketamina. Após assepsia com álcool etílico 70% (v/v) e exposição do peritônio, com auxílio de seringa e agulha estéreis, foram inoculados na cavidade peritoneal 5 mL de PBS (pH 7,4) estéril e gelado. Após o massageamento do abdômen por aproximadamente 30 segundos para o desprendimento das células, o lavado peritoneal dos camundongos foi aspirado e acondicionado em tubos plásticos estéreis, mantidos em banho de gelo até sua utilização. Foram utilizadas células provenientes da união de lavados de 3 a 5 camundongos. Após coleta, os lavados foram centrifugados a 1080 g por 5 minutos. O sobrenadante obtido foi desprezado e o “pellet” de células foi ressuspenso em 1 mL PBS (pH 7,4) estéril. Após contagem do número de células em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio de luz, o volume da suspensão foi então ajustado de forma a se obter o número de células desejado para cada experimento. Em seguida, as células foram plaqueadas em placas de cultura estéreis de 96 poços, de acordo com a condição experimental desejada, e colocadas para aderir durante 30 minutos a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂. Após esse tempo, a monocamada de células aderentes foi então lavada por duas vezes com solução de PBS (pH 7,4) estéril pré-aquecida a 37 °C, para a remoção das células não aderentes, e foram imediatamente utilizadas. Por este método, acima de 90%

das células aderidas são macrófagos, não sendo necessário posterior purificação das preparações (ADAMS, 1979; MORETÃO; BUCHI, 2002).

3.4.8 Viabilidade celular *ex vivo*

Para avaliar se fucanas isoladas da alga *Padina gymnospora* apresentavam algum efeito tóxico *in vivo*, foram realizados experimentos utilizando-se a técnica de exclusão de Azul de Tripán (WALLUM; STRENNBERG; JENSSEN, 1990), onde apenas as células não viáveis coram-se de azul. Foram constituídos grupos contendo cinco animais, para cada dose da amostra de polissacarídeo (F1,5) testada (10, 25 e 50 mg/Kg) e para o grupo controle, o qual recebeu tampão PBS (pH 7,4) no lugar da amostra. Os animais foram inoculados intraperitonealmente com o composto a ser testado e após 3 h foram sacrificados. A coleta de células foi realizada como descrito anteriormente no item 3.4.7 e então 20 µL da suspensão celular foram misturados a 20 µL de uma solução de azul de tripan. A porcentagem de células viáveis foi determinada a partir de contagem diferencial realizada em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio de luz.

3.4.9 Viabilidade celular *in vitro*

Células do exudato peritoneal foram obtidas como já descrito no item 3.4.7. Em placas de 96 poços, macrófagos aderentes (2×10^5 células/poço) foram cultivados na presença de diferentes concentrações de fucana (125 - 500 µg/mL), no grupo controle os macrófagos foram cultivados na ausência do polissacarídeo. Após 24 ou

48 horas de incubação, o meio foi retirado e a viabilidade da monocamada de macrófagos foi avaliada segundo o método de Mosmann (1983), utilizando MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Este método se baseia na utilização de um sal derivado de tetrazolium que tem sua coloração alterada na presença de células viáveis e possuidoras de mitocôndria. Passado o tempo de incubação foram adicionados a cada poço 10 μ L de MTT (5 mg/mL), incubando-se outra vez a 37 °C sob atmosfera de 5% CO₂. Após 4 h foram adicionados 100 μ L de ácido clorídrico/isopropanol, para dissolver os cristais de formazan formados. Após 10 minutos foram efetuadas as leituras a 540 nm em leitor de microplacas (Figura 4).

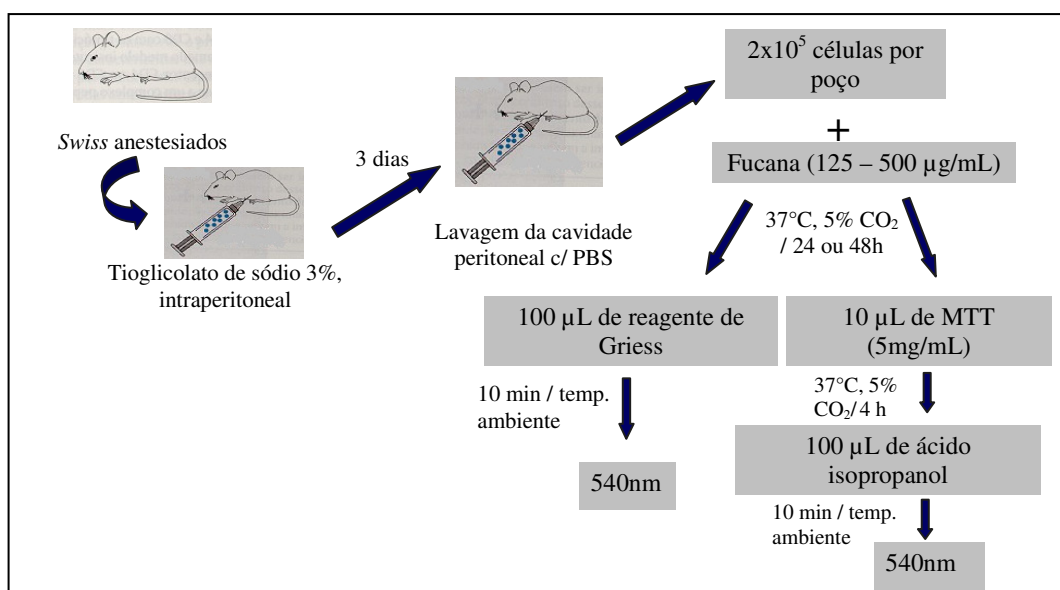


Figura 4: Ensaio de viabilidade celular e produção de óxido nítrico *in vitro*.

3.4.10 Produção de óxido nítrico *in vitro*

A síntese do NO foi determinada mensurando-se o acúmulo de nitrito (NO_2^-), um metabólito estável do NO, usando a reação de Griess (GREEN et al., 1982). Células do exudato peritoneal foram obtidas como já descrito no item 3.4.7. Em placas de 96 poços, macrófagos aderentes (2×10^5 células/poço) foram cultivados na presença de diferentes concentrações de fucana (125 – 500 μg) durante 24 ou 48 horas. Em seguida, 100 μL do sobrenadante destas culturas, foram misturados com 100 μL de reagente de Griess, contendo 1% de sulfanilamida, 0,1 % naftiletilenodiamina e 2,5% de ácido fosfórico (H_3PO_4) e após 10 minutos em temperatura ambiente para formar o cromóforo, a absorbância foi lida a 540 nm em leitor de microplacas e o óxido nítrico quantificado, usando como padrão o NaNO_2 (Figura 4).

3.4.11 Peritonite induzida por tioglicolato de sódio

Os animais utilizados para este experimento foram pesados e, subseqüentemente, foi calculada a quantidade de fucana necessária para cada indivíduo nas doses de 10, 25, 50 mg/Kg. Foram formados três grupos contendo cinco animais cada, para testar as diferentes doses da fucana e os outros dois para os controles positivo (animais não tratados) e negativo (animais que receberam solução salina no lugar da amostra). Os compostos foram pesados e dissolvidos em 300 μL de solução salina e aplicados subcutaneamente nos animais. Os grupos

controles foram submetidos ao mesmo procedimento sendo que os animais receberam 300 μ L de solução salina estéril.

Após 30 minutos, os animais receberam intraperitonealmente uma injeção contendo 1 mL de tioglicolato de sódio 3% conforme metodologia proposta por Xie et al. (2000). O grupo controle negativo recebeu uma injeção de 1 mL de solução salina estéril. Os animais foram então mantidos com água e dieta *ad libitum*. Três horas após a aplicação do tioglicolato de sódio 3%, os animais foram sacrificados e submetidos à lavagem da cavidade peritoneal com 5 mL de uma solução de PBS (pH 7,4) estéril. O líquido peritoneal de cada animal foi recolhido e acondicionado em tubos de hemólise contendo EDTA. Posteriormente, os leucócitos presentes no líquido coletado da cavidade peritoneal dos animais foram corados pela solução de Türk e então contados em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio de luz (Figura 5).

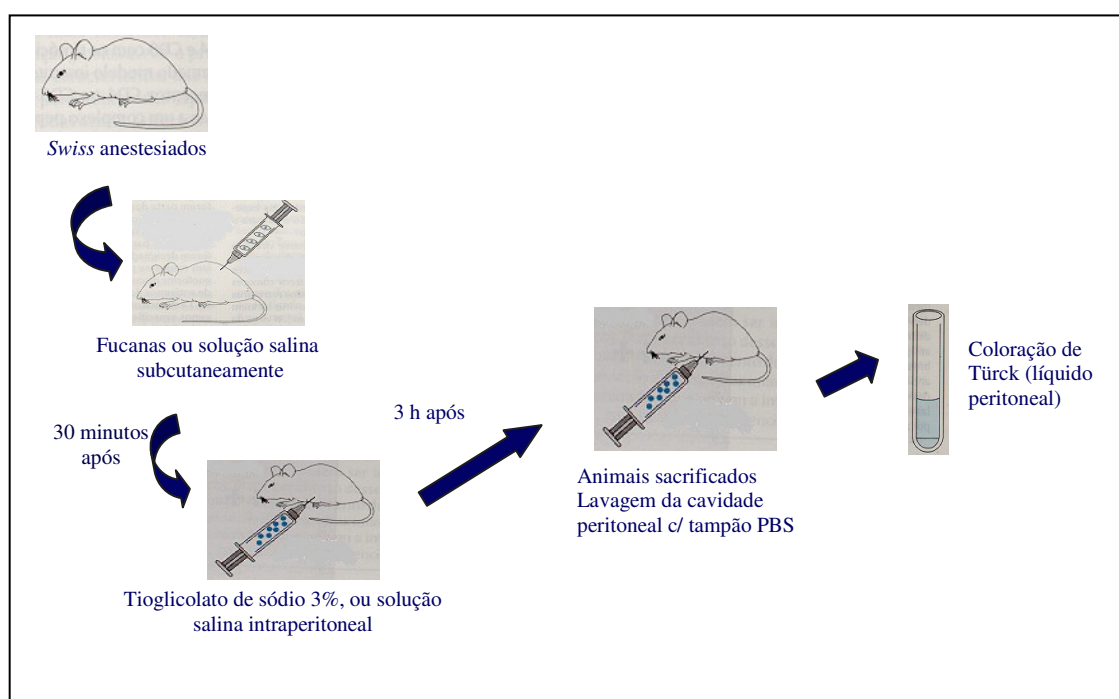


Figura 5: Esquema do ensaio de peritonite induzida por tioglicolato de sódio em camundongos da linhagem Swiss. Adaptado de Medeiros, 2003.

3.4.12 Métodos Estatísticos

Para análise estatística do grupo controle e dos modelos experimentais foram utilizados os seguintes testes:

Análise de variância (ANOVA), compara três ou mais grupos definindo se a diferença entre os grupos é significativa ($P < 0,05$);

Teste de Tukey-Kramer, para determinar que grupos diferem entre os valores obtidos para o grupo controle e os experimentais (comparações múltiplas).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL DAS FUCANAS EXTRAÍDAS DA ALGA MARROM *P. gymnospora*

Tendo-se em vista que moléculas hidrofílicas, como polissacarídeos e proteínas, são normalmente insolúveis em solventes orgânicos e, portanto, prontamente precipitadas por ação destes solventes, utilizamos uma metodologia de fracionamento com acetona para isolar as populações de polissacarídeos presentes na alga marrom *Padina gymnospora*. Através deste processo foram obtidas cinco frações de polissacarídeos denominadas F0,3, F0,5, F1,1, F1,5 e F2,6. As frações F0,5 e F1,1 apresentaram um maior rendimento em peso total, que na Gráfico 1 são expressos em percentuais.

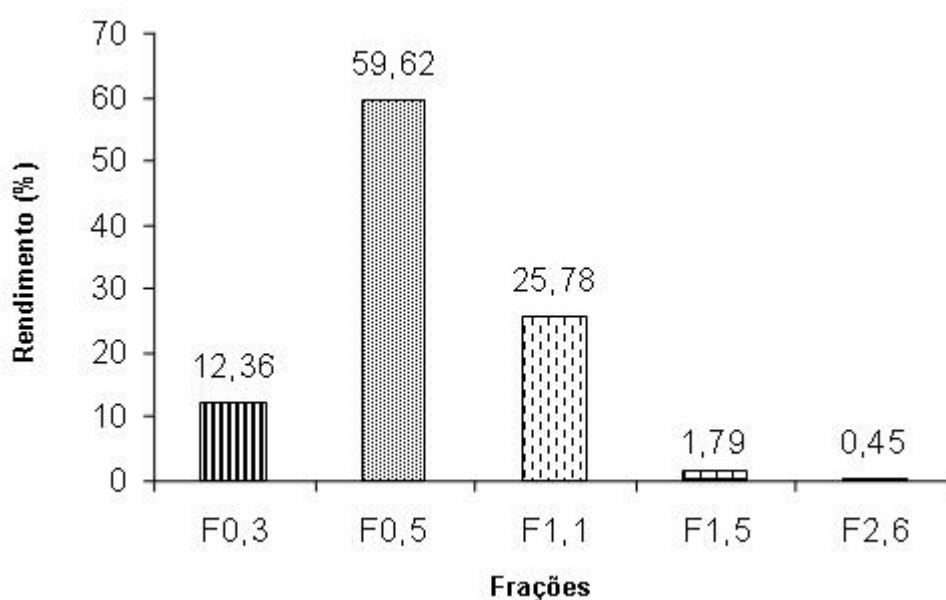


Gráfico 1: Rendimento das frações polissacarídicas provenientes da extração com acetona. Da massa total obtida no fracionamento calculou-se o rendimento percentual de cada fração.

Após fracionamento com acetona as frações obtidas foram, subsequentemente, submetidas a eletroforese em gel de agarose em tampão 1,3 diaminopropano-acetato (PDA) 0,05M, pH 9,0, para evidenciar a separação de compostos polianiônicos. A presença de grupos sulfatos foi constatada através da utilização do corante azul de toluidina, visto que, os grupamentos sulfatos em presença desse corante assumem uma coloração roxa (metacromasia). Para constatar a presença de ácidos algínicos utilizou-se tampão acetato de sódio, uma vez que, grupamentos carboxílicos em presença desse tampão reagem e assumem uma coloração rosa.

Todas as frações obtidas mostraram-se metacromáticas (Figura 6) podendo-se observar um perfil menos polidesperso para as frações F1,5 e F2,6. Com relação a presença de ácidos algínicos, foi observado que apenas as frações F0,3, F0,5 e F1,1, quando postas em tampão acetato, apresentaram esses carboidratos (Figura 7).

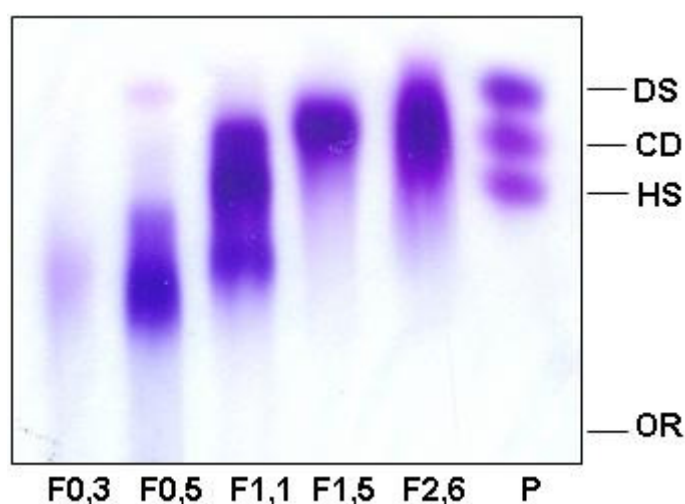


Figura 6: Perfil eletroforético das frações de polissacarídeos provenientes do fracionamento com acetona².

² Alíquotas de 5µl (200µg), das frações foram aplicadas em gel de agarose no tampão PDA pH 9,0. Os compostos foram corados com azul de toluidina e descorados com solução descorante. P – mistura de padrões de glicosaminoglicanos: condroitin sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparan sulfato (HS). Sequência de aplicação: F0,3, F0,5, F1,1, F1,5 e F2,6 , P.

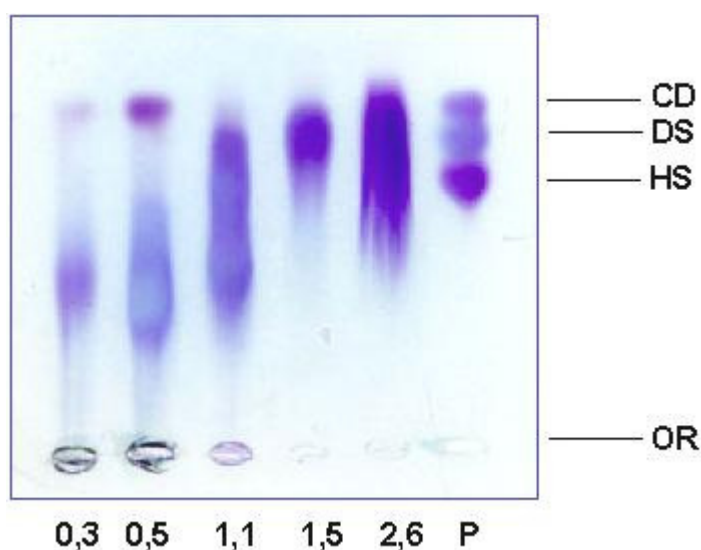


Figura 7: Perfil eletroforético das frações polissacarídicas em presença de tampão acetato³.

Para uma melhor caracterização das frações e avaliação do grau de contaminação protéica e teores de sulfato, as frações ricas em fucanas, obtidas por precipitação com acetona, foram submetidas a dosagens químicas, para quantificação de açúcares totais, proteína e sulfato; e cromatografia descendente em papel, para detectar a presença de seus açúcares constituintes e quantificação dos mesmos através de densitometria óptica.

Os resultados referentes ao percentual de açúcares totais, sulfato e proteínas (Tabela 1) mostraram que as frações obtidas com menores volumes de acetona (F0,3, F0,5 e F1,1) apresentaram uma maior quantidade de carboidrato em relação àquelas fracionadas com volumes maiores de acetona (F1,5 e F2,6). Isto pode ser devido à presença de ácidos algínicos nestas frações, já que estes açúcares não foram detectados nas outras frações. Com relação ao sulfato foi observado que ele

³ Alíquotas de 5µl (200µg) das frações foram aplicadas em gel de agarose no tampão PDA pH 9,0. Posteriormente, a lâmina foi imersa em tampão acetato pH 5,8 e, então, foi corada com azul de toluidina e descorada com solução descorante. P – mistura de padrões de glicosaminogliganos: condroitin sulfato (CS), dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS). Sequência de aplicação: F0,3, F0,5, F1,1, F1,5 e F2,6, P.

está presente em todas as frações, sendo que as frações F0,5 e F2,6 apresentaram uma maior quantidade, 31,2 e 17,5%, respectivamente. Foi observado também que todas as frações apresentaram uma baixa contaminação com proteínas (0,5 – 1,2%).

Tabela 1: Composição química das frações de fucanas isoladas de *P. gymnospora*.

Fração	Açúcares totais ^a (%)	Proteínas ^b (%)	Sulfato ^c (%)
F0,3	30,0	0,7	10,7
F0,5	33,5	1,0	31,2
F1,1	41,5	1,2	13,1
F1,5	21,0	0,5	8,9
F2,6	23,0	1,0	17,5

a – DUBOIS *et al.*, 1956

b – SPECTOR, 1978

c – DOGSON & PRICE, 1962

As análises cromatográficas, realizadas em sistema descendente em papel, foram feitas em três diferentes tipos de solventes como descrito no item 3.4.4. A necessidade de se utilizar solventes diferentes ocorre devido a diferentes solubilidades dos monossacarídeos aos diversos solventes, visto que, em um mesmo solvente alguns monossacarídeos podem apresentar solubilidades iguais e não se diferenciar entre si. Então, a utilização de solventes diferentes minimiza esse efeito. Esta metodologia foi utilizada para determinação dos monossacarídeos presentes nas frações polissacarídicas obtidas após extração com acetona. Os açúcares foram identificados com relação aos padrões de monossacarídeos (fucose, xilose, ácidos urônicos, galactose, manose e glicose). Os cromatogramas das

frações demonstraram que todos os polissacarídeos continham fucose e xilose, sendo que, apenas as frações F0,3v, F0,5v e F1,1v apresentaram ácido urônico (Figura 8).

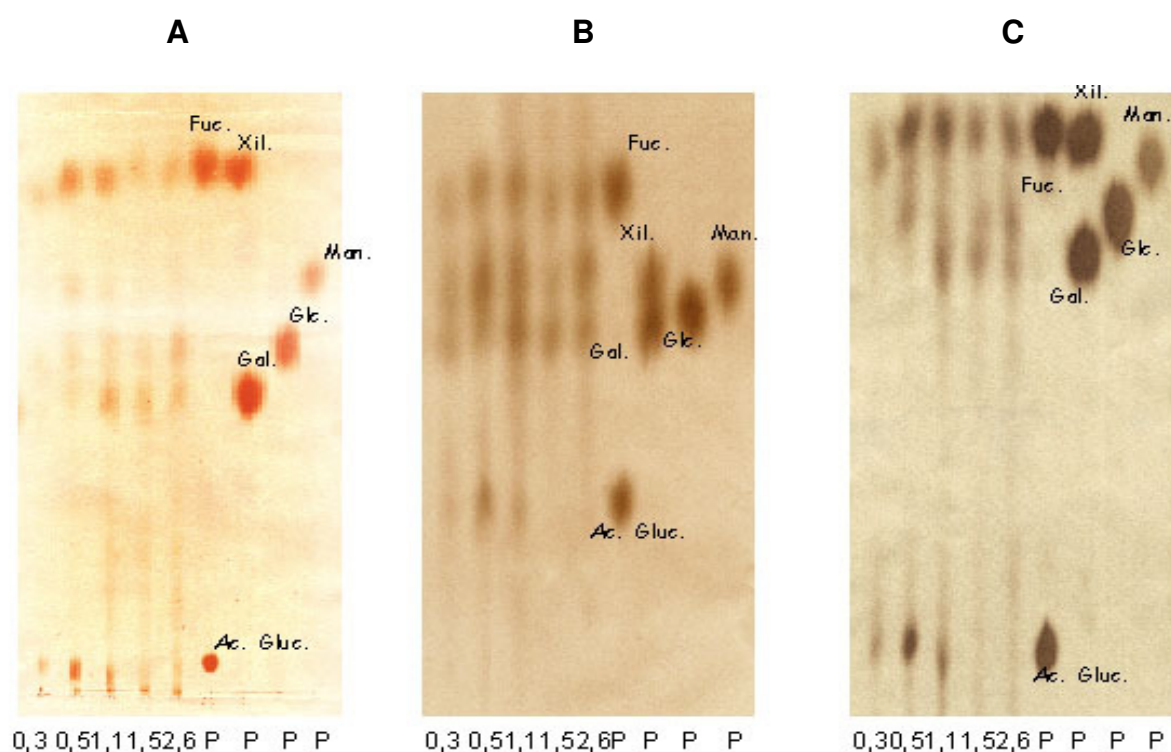


Figura 8: Cromatografia descendente em papel das frações polissacarídicas⁴.

As análises de quantificação dos açúcares presentes nas frações polissacarídicas de *P. gymnospora* confirmaram os dados obtidos na cromatografia descendente em papel. As relações molares dos teores de açúcar presentes nas frações de polissacarídeos podem ser observadas na Tabela 2.

⁴ As frações obtidas após fracionamento com acetona foram submetida à hidrólise com HCl 2 N durante 2 h. Cerca de 200µg de cada produto de hidrólise foram aplicados. Os sistemas de solventes utilizados foram: A - acetato de etila : piridina : água; B - ácido isobutírico : amônia; C - butanol : piridina : água. P – padrões de monossacarídeos: fucose (Fuc.), ácido glucurônico (Ac. Gluc.), xilose (Xil.), galactose (Gal.), glicose (Glc.), manose (Man.).

Com base nessa caracterização química preliminar foi observado que a fração F1,5, apesar de apresentar um baixo rendimento em relação às outras, possuía uma população polissacarídica pouco polidispersa em eletroforese com gel de agarose, baixa contaminação por proteínas e ausência de ácidos urônicos. Desta forma, esta fração foi escolhida para os estudos subseqüentes de caracterização química e ensaios biológicos.

Tabela 2: Razão molar dos monossacarídeos constituintes das fucanas da alga *P. gymnospora*.

Frações	Fucose ^a	Xilose ^b	Galactose ^b	Glicose ^b	Manose ^b	Ac. Urônico ^c
F0,3	1	0,3	-	-	0,2	1,3
F0,5	1	0,9	-	0,3	0,2	0,7
F1,1	1	0,9	0,6	0,3	0,2	0,6
F1,5	1	0,4	0,3	0,2	-	-
F2,6	1	0,8	0,3	0,5	0,1	-

a – DISCHE, 1962

b – Determinação feita através de densitometria óptica

c – DISCHE, 1974

4.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (IV) DA FRAÇÃO F1,5

A espectroscopia de infravermelho tem sido amplamente utilizada como ferramenta auxiliar na caracterização química de fucanas, visto que, as

absorbâncias das bandas de infravermelho revelam informações importantes acerca da presença de alguns grupamentos químicos.

O espectro da fração F1,5 (Figura 9) mostrou uma absorção a 3419 cm^{-1} referente aos grupos hidroxilas. Foram observadas bandas de absorções típicas em 1255 cm^{-1} , correspondente aos grupamentos presentes no sulfato, e em 847 cm^{-1} , indicando que a maior parte do sulfato está em posição axial no C4.

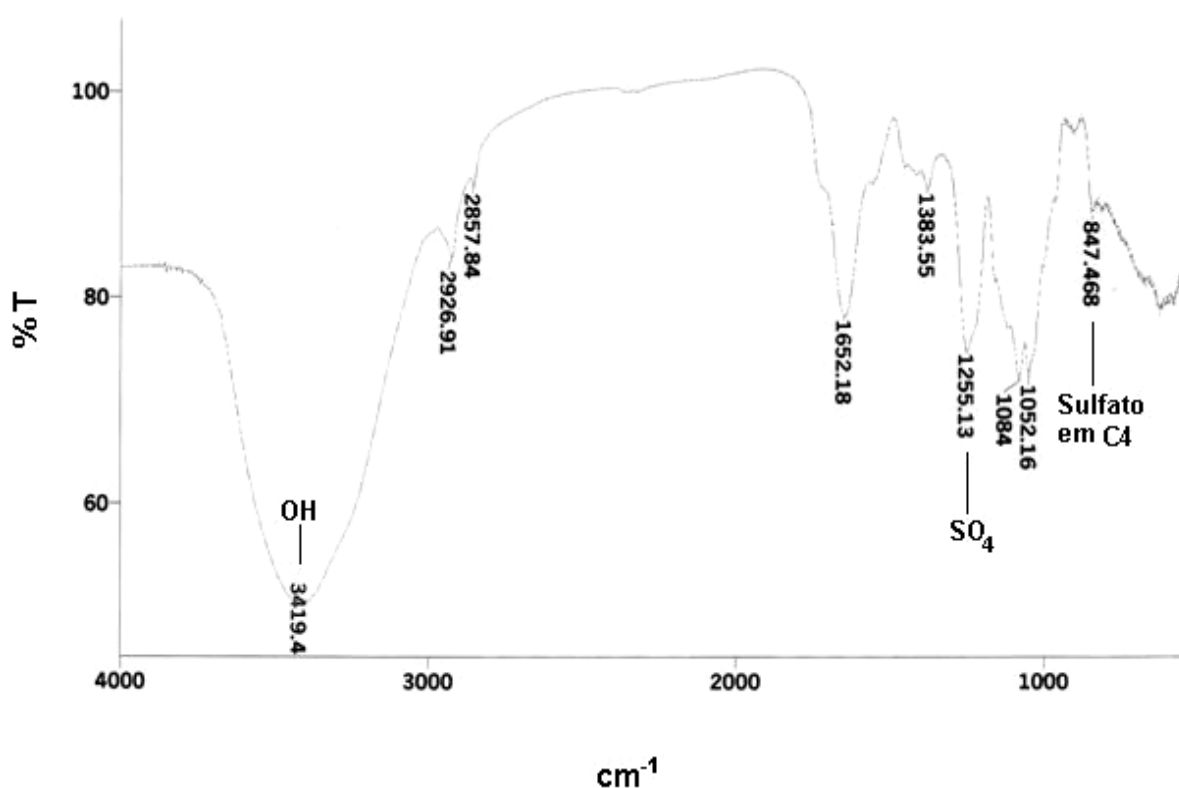


Figura 9: Espectroscopia de Infravermelho da fração F1,5 extraída de *P. gymnospora*.

4.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DA FRAÇÃO F1,5

O espectro de ^1H da fração F1,5 (Figura 10) apresenta características consistentes com a presença de unidades de α -L-fucose. Os prótons anoméricos

aparecem na região de 5,2 ppm, enquanto que os sinais para o grupamento metil são encontrados na região entre 1,33 e 1,32 ppm. Sinais apresentados a 4,31 ppm foram atribuídos a β -D-xilose.

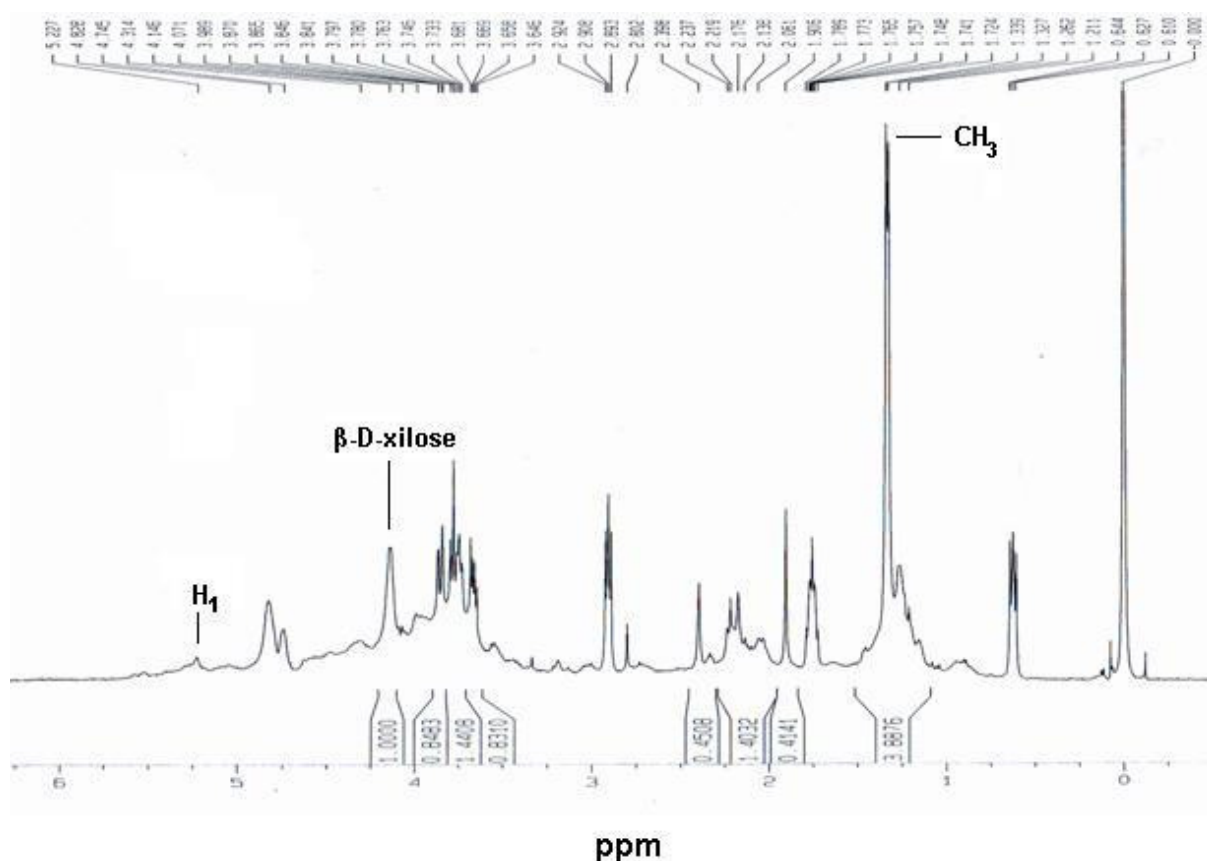


Figura 10: Espectroscopia de RMN de ^1H da fração F1,5 de *P. gymnospora*.

4.4 VIABILIDADE CELULAR EX VIVO DA FRAÇÃO F1,5

Após 3 h de tratamento *in vivo* com a fração F1,5 não ocorreu nenhuma alteração extremamente significativa ($P < 0,001$) na viabilidade das células presentes na cavidade peritoneal dos camundongos quando utilizadas diferentes doses (10-50 mg/Kg) da fração de fucana (Gráfico 2).

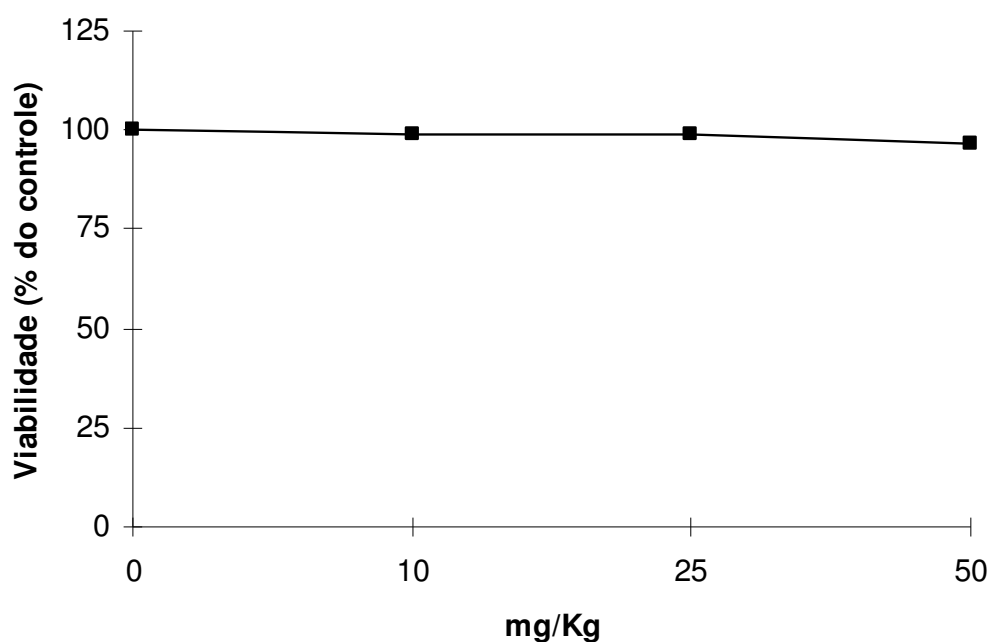


Gráfico 2: Efeito ex vivo da fração F1,5 sobre a viabilidade celular⁵.

4.5 EFEITO *IN VITRO* DA FRAÇÃO F1,5 NA VIABILIDADE CELULAR

Para determinar o efeito citotóxico da fração F1,5 sobre macrófagos foi realizada a incubação destes por 24 ou 48h com diferentes concentrações da fucana. Após o tempo de incubação foi observada uma redução significativa ($P < 0,001$) no número de células dos grupos tratados com baixas concentrações de fucana (125 e 250 $\mu\text{g/mL}$) em relação ao controle. Já para uma concentração mais alta (500 $\mu\text{g/mL}$) esse efeito não foi observado (Gráfico 3).

⁵ Após 3 h de tratamento as células da cavidade peritoneal dos camundongos foram coletadas em tampão PBS (pH 7,4). No grupo controle foi utilizado solução salina a 0,9%. A viabilidade celular foi determinada pela técnica de exclusão de Azul de tripan. A porcentagem de células viáveis foi determinada a partir da contagem diferencial realizada em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio de luz. Os valores representam a média $\pm$ DP.

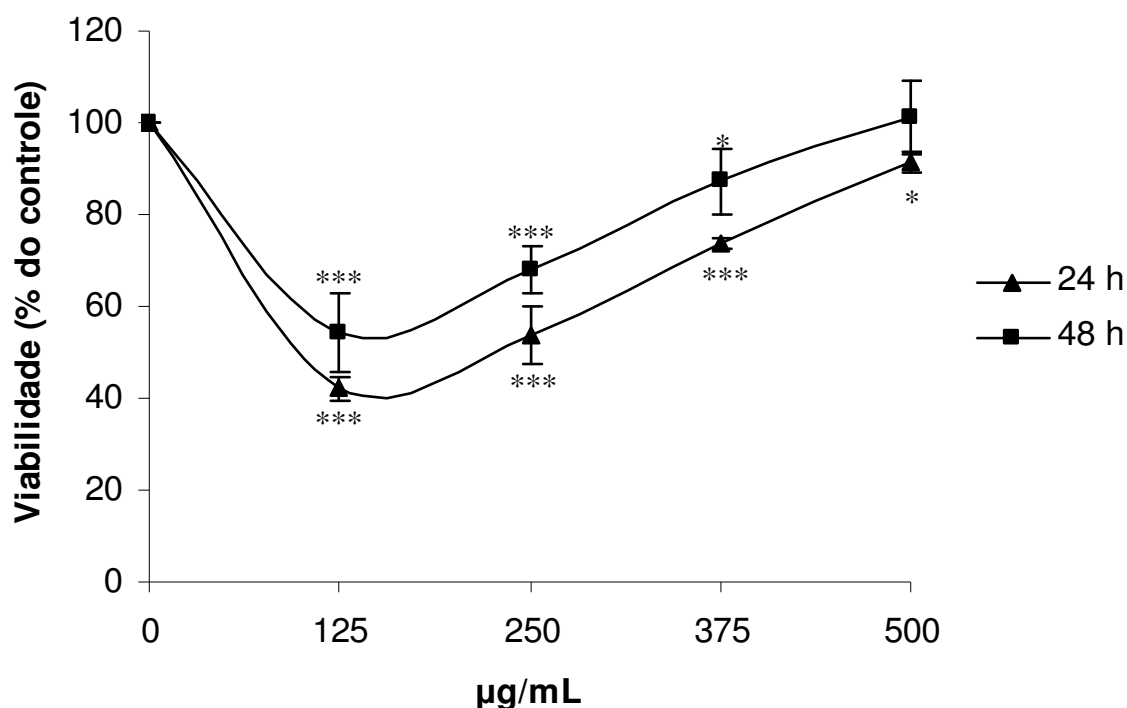


Gráfico 3: Ensaio colorimétrico com MTT⁶.

4.6 EFEITO *IN VITRO* DA FRAÇÃO F1,5 NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Os níveis de nitrito presentes nos sobrenadantes das culturas foram mensurados após 24 ou 48 h de incubação com a fração F1,5 nas concentrações testadas (125, 250, 375 e 500 µg/mL). Os resultados mostrados no gráfico 4 expressam a quantidade de ON produzido em relação ao número de células. Pode ser observado um aumento significativo ($P < 0,001$), em relação ao controle, na produção de nitrito após 24 ou 48 h quando utilizados 125 µg/mL de amostra. Efeito oposto foi observado para as concentrações de 375 e 500 µg/mL. Quando compara-

⁶ Cerca de 2×10^5 células/ poço foram mantidas em 100µL de meio RPMI 1640 por 24 ou 48h. Após esse período foi adicionado 10µL de MTT (5mg/mL em PBS) em cada poço e feito incubação durante 4h a 37 °C em presença de 5% de CO₂. Posteriormente adicionou-se 100µL de HCl 0,04N em isopropanol e após 10 minutos as microplacas foram lidas no comprimento de onda de 540 nm. Neste ensaio foi utilizada a fração F1,5 nas concentrações de 125, 250, 375 e 500 µg/mL. Os valores representam a média $\pm$ DP. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ vs controle.

se concentrações semelhantes em tempos diferentes observa-se que tanto no controle como em baixas concentrações (125 e 250 $\mu\text{g/mL}$) ocorre um aumento na produção de ON após 48 de incubação. Esses dados sugerem um efeito bifuncional da fração F1,5 em relação a produção de óxido nítrico, visto que em baixas concentrações ocorre um aumento na produção de ON e em altas concentrações ocorre uma diminuição.

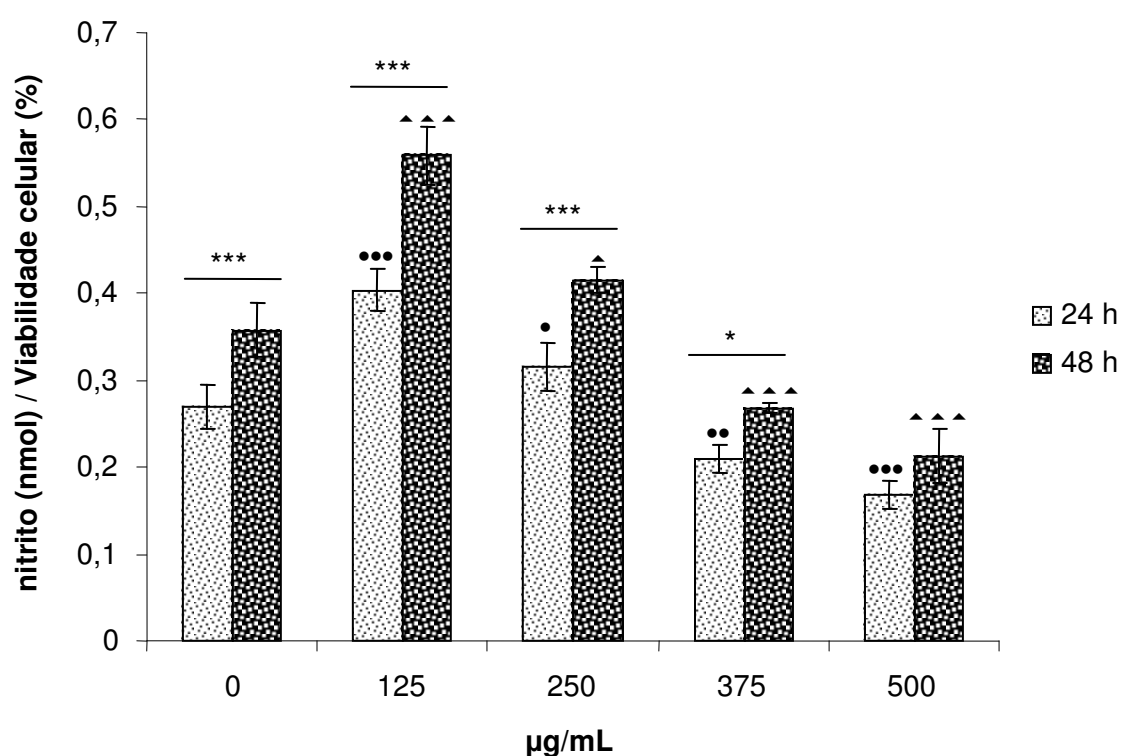


Gráfico 4: Determinação da concentração de ON por macrófagos tratados com a fração F1,5⁷.

⁷ Macrófagos aderentes (2×10^5 células/poço) foram incubados com meio de cultura contendo as concentrações indicadas de fucanas a 37 °C em presença de 5% de CO_2 . Após 24 ou 48h, 100 μL do sobrenadante foram incubados com 100 μL do reagente de Griess para determinação da produção de ON. Após 10 minutos a absorbância foi medida em 540nm. A concentração de ON foi determinada utilizando uma curva padrão de NaNO_2 . Os valores representam a média $\pm$ DP. • Diferença significativa em relação ao controle no tempo 24 h (• $p < 0,05$; •• $p < 0,01$; ••• $p < 0,001$); ^ Diferença significativa em relação ao controle no tempo 48 h (^ $p < 0,05$; ^^ $p < 0,01$; ^^ ^ $p < 0,001$); * Diferença significativa entre concentrações iguais em relação ao tempo (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.7 AÇÃO ANTIINFLAMATÓRIA DA FRAÇÃO F1,5

Para verificar a ação da fração F1,5 frente ao processo inflamatório utilizou-se o experimento da peritonite induzida por tioglicolato de sódio. Neste experimento é induzido um processo inflamatório agudo utilizando-se um irritante químico (tioglicolato de sódio) e posteriormente é feita a quantificação do número total de leucócitos no líquido peritoneal. O grupo controle negativo foi tratado com solução salina e o grupo controle positivo foi tratado com tioglicolato de sódio a 3%. A peritonite aguda induzida por tioglicolato de sódio foi caracterizada por um aumento no número de leucócitos na cavidade peritoneal de (240 células/mm³) para (2840 células/mm³).

Neste experimento foram utilizadas doses de 10, 25 e 50 mg/Kg. Os resultados obtidos podem ser observados no gráfico 5, a qual demonstra uma diminuição do influxo leucocitário significativa ($P < 0,001$) do grupo teste em relação ao controle positivo, quando utilizados 10 e 25mg/Kg de amostra. Comparando-se essas duas concentrações entre si, não é observada diferença significativa ($P > 0,05$) entre elas, isto indica que a resposta obtida para as duas concentrações é similar. Aumentando a concentração de fucana não foi observada diferenças significativas ($P > 0,05$) em relação ao controle positivo. Desta forma, observou-se que a fração F1,5 apresenta atividade antiinflamatória quando utilizadas doses de 10 e 25 mg/Kg reduzindo em 56 e 39%, respectivamente, o influxo de leucócitos para o local da inflamação. Isto pode indicar que estes compostos atuam dificultando a migração dos leucócitos para o sítio da inflamação.

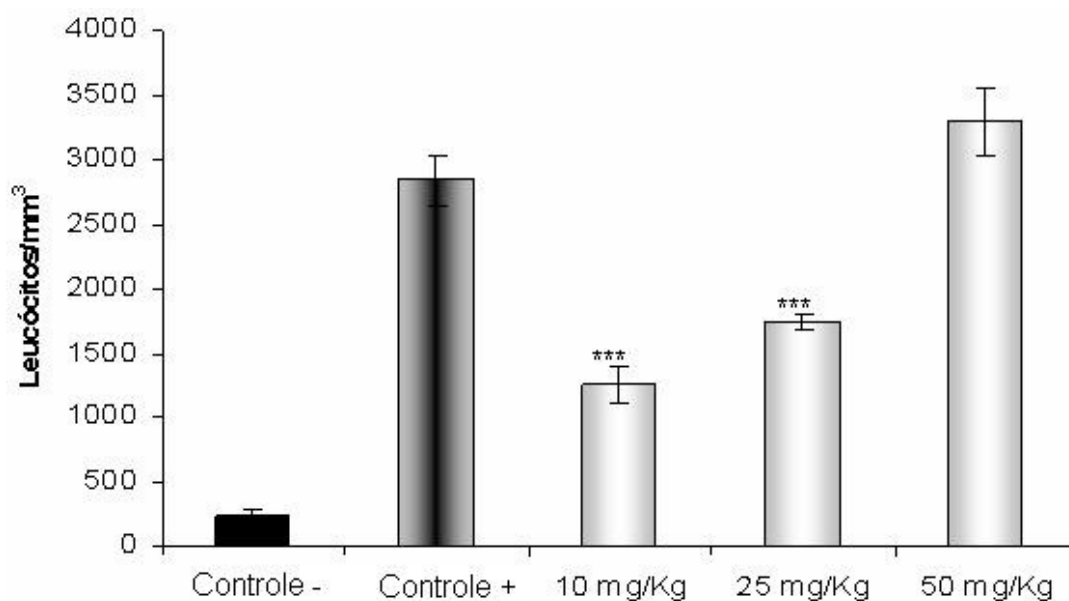


Gráfico 5: Efeito da fração F1,5 na migração dos leucócitos⁸.

⁸ O gráfico representa a comparação entre as médias do número de leucócitos do líquido peritoneal 3 horas após a administração intraperitoneal do tioglicolato de sódio. No grupo controle negativo foi injetado solução salina estéril 0,9%. Para os grupos controle positivo e experimental a solução de salina estéril ou polissacarídeos (10, 25 ou 50 mg/Kg) foram injetados 30 minutos antes da aplicação do tioglicolato de sódio. Os valores representam a média $\pm$ DP. *** $P < 0,001$ vs controle positivo.

5 DISCUSSÃO

Existe uma grande variedade de métodos utilizados para extração e fracionamento de fucanas de algas. Então, uma análise comparativa dos nossos resultados com os dados encontrados na literatura é difícil, pois dependendo da metodologia aplicada podem ocorrer variações nos polímeros. Neste trabalho, antecedendo o processo de extração, a alga *Padina gymnospora* foi tratada com acetona para promover a remoção de lipídeos e pigmentos. A extração foi realizada através de proteólise com a enzima maxatase para remoção de proteínas. O processo de fracionamento escolhido foi utilizando volumes crescentes de acetona, visto que, essa é uma metodologia de fácil execução e reprodutibilidade, além de ser pouco onerosa. Esse tipo de fracionamento vem sendo usado com bastante êxito no estudo de fucanas extraídas de algas da ordem Dictyotales (ALBUQUERQUE, 2005; QUEIROZ et al., 2006; ROCHA, 2002; SILVA, 2005;). Após fracionamento foram obtidas cinco frações de polissacarídeos (F0,3, F0,5, F1,1, F1,5 e F2,6). Quando submetidas à eletroforese em gel de agarose no tampão PDA todas as frações apresentaram metacromasia e mostraram mobilidades distintas, indicando a presença de diferentes frações de fucanas na alga marrom *Padina gymnospora*. As análises químicas das frações mostraram a presença de fucose e sulfato em todas as frações. Além disso, diferentes monossacarídeos em uma mesma fração foram encontrados, porém, quando as frações são comparadas entre si esses monossacarídeos mostram-se em proporções distintas. Então, diante desses resultados podemos afirmar que a alga em estudo possui diferentes populações de heterofucanas. Estudos anteriores indicam que a presença de heterofucanas são comuns em algas marrons pertencentes a ordem Dictyotales (ALBUQUERQUE,

2005; DIETRICH et al., 1995; LEITE et al., 1998; QUEIROZ, 2003; SILVA, 2005). Após essa caracterização química preliminar a fração F1,5 foi escolhida para estudos subseqüentes. Análise do espectro de IV e RMN dessa fração indicam a presença de unidades de α -L-fucose em sua estrutura.

O desenvolvimento de novos fármacos é um grande desafio para a ciência. A descoberta de compostos que exerçam sua função sem provocar efeitos adversos ao organismo a ser tratado será um grande achado. Muitos estudos têm sido realizados em relação à citotoxicidade de compostos candidatos a novos fármacos e para isso vêm se utilizando com freqüência a determinação da viabilidade celular como metodologia. Sendo assim, para verificar a presença ou não de efeito tóxico da fração F1,5 sobre as células, utilizou-se uma metodologia que mede a viabilidade celular baseando-se nas diferentes condições metabólicas das células, uma vez que a redução do MTT promove informações com relação a função mitocondrial. A escolha de macrófagos como o tipo celular a ser utilizado se deve ao fato de que essas células têm sido amplamente utilizadas em muitos testes de citotoxicidade por permitirem o mensuramento da resposta diretamente em cultura celular e por causa de sua habilidade de manter suas funções na presença de muitos agentes químicos diferentes (BARILE; DIERICKX; KRISTEN, 1994). Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a fração F1,5, quando utilizada em baixas concentrações, provoca morte celular. Porém, quando a concentração é aumentada esse efeito desaparece. Queiroz et al. (2006), em estudos com a alga marrom *Lobophora variegata*, encontrou resultados semelhantes para uma heterofucana presente nessa alga.

O NO é um importante mediador do processo inflamatório. Ele é uma molécula que rapidamente é transformada em nitrito e nitrato, por esse motivo esses

parâmetros são freqüentemente utilizados para monitorar a sua produção (DI ROSA et al., 1996). Neste trabalho observou-se uma redução na produção de NO em presença de altas concentrações de fucanas. Entretanto, foi observado um efeito bifuncional deste polissacarídeo uma vez que baixas concentrações estimulam a produção de NO. Quando se compara os resultados referentes à viabilidade celular *in vitro* com os obtidos para o ON podemos observar que em baixas concentrações ocorre uma diminuição na viabilidade celular e um aumento na produção de NO. Já quando utilizadas altas concentrações de fucana ocorre um efeito oposto. Alguns trabalhos descrevem que baixas concentrações de NO protege os macrófagos de morte celular (LI et al., 1999; TSAI; LEE, 1998), enquanto produção excessiva de NO causa morte celular (MACHIAVELLI et al., 2007). Isso pode explicar o efeito duplo da fração F1,5 sobre a viabilidade das células. Recentemente, Yang et al. (2006) mostrou pela primeira vez que baixas concentrações de uma fucana extraída da alga *Laminaria japonica* tem diminuído a produção de NO por macrófagos, enquanto altas concentrações inibem a liberação dessa molécula. Esse efeito seria devido a supressão seletiva da ativação do ativador de proteína 1 (AP-1), o qual está associado com a inibição da produção de NO. Porém, maiores estudos deverão ser realizados para esclarecer a forma de ação de heterofucanas de *Padina gymnospora* na liberação de NO.

Como os resultados *in vitro* mostraram que dependendo da concentração a fração F1,5 poderia ser tóxica para as células, testamos, *ex vivo*, o efeito desta fração sobre a viabilidade celular. Os experimentos foram realizados sob as mesmas condições daqueles utilizados durante o experimento de ação antiinflamatória. Os resultados observados mostram que a fração F1,5, nas concentrações testadas, não

afetou a viabilidade celular, sendo assim, apesar de ter mostrado um efeito tóxico nos experimentos *in vitro* esse efeito não influenciou os resultados *ex vivo*.

Neutrófilos e o seu processo de adesão e migração têm sido implicados em causar a patogênese do tecido em síndromes inflamatórias (FUJISHIMA; AIKAWA, 1995; KORTHUIS; ANDERSON; GRANGER, 1994). Então, a interferência específica com passos definidos do recrutamento de leucócitos pode resultar em efeitos antiinflamatórios (BOEHNCKE; SCHÖN, 2003). O uso de compostos que afetem a função das selectinas pode ser efetivo em impedir a migração leucocitária e reduzir a injúria. Por isso, diversas pesquisas vêm sendo realizadas com compostos análogos do ligante fisiológico para as selectinas, sLe^x (BOEHNCKE; SCHÖN, 2003).

Dentre os polímeros naturais capazes de interagir com L- e P-selectina que vêm atraindo a atenção dos pesquisadores podemos destacar os polissacarídeos sulfatados presentes em algas marrons. Estudos demonstram que o fucoidan, uma homofucana extraída da alga marrom *Fucus vesiculosus*, inibe de uma maneira dose-dependente, mas não especificamente, a rolagem (LEY et al., 1993) e migração (OSTERGAARD, et al., 2000) dos leucócitos para o sítio inflamatório. Este polímero também é capaz de diminuir a injúria em modelos de inflamação provocada por agentes não infecciosos (LINNEMANN et al., 2000). A inibição da migração leucocitária (para o sítio da inflamação) já foi observada quando a inflamação foi induzida por produtos bacterianos (ANGSTWURM et al., 1995; GRANERT et al., 1994), estímulo químico (OSTERGAARD, et al., 2000) ou isquemia (KUBES; JUTILA; PAYNE, 1995). Como a ação de homofucanas é devido a interação desses polissacarídeos com P- e L-selectinas e, conseqüentemente, inibição da rolagem dos leucócitos para o sítio inflamatório, acredita-se que a ação de heterofucanas

ocorre de uma forma semelhante. Preobrazhenskaya et al. (1997) e Ushakova et al. (1999) demonstraram que um fucoidan da alga *Laminaria saccharina* interage com L- e P-selectinas e diminui o escape de neutrófilos para a cavidade abdominal e a indução de peritonite aguda. Estudos em nosso grupo de pesquisa mostraram que heterofucanas extraídas das algas *Lobophora variegata* e *Dictyota menstrualis* (Dictyotales) também inibem a rolagem dos leucócitos durante o processo de peritonite aguda (ALBUQUERQUE, 2005; MEDEIROS, 2003). Porém, devido aos poucos dados na literatura com heterofucanas de Dictyotales em bloquear a migração leucocitária para o sítio inflamatório nós verificamos a ação da fração F1,5 frente ao processo inflamatório. O experimento utilizado é baseado em estudos de Wang et al. (2002), de acordo com seu trabalho quando o tioglicolato é injetado dentro da cavidade peritoneal de ratos provoca uma inflamação aguda e infiltração de neutrófilos dependente de L- e P-selectina. Os resultados obtidos para a fração F1,5 indicam que a alga marrom *Padina gymnospora* possui uma heterofucana com ação antiinflamatória que age de uma maneira dose não dependente.

Embora seja difícil definir como as fucanas estão envolvidas na resposta biológica, alguns estudos têm demonstrado que suas características estruturais como grau e sulfatação e presença de α -L-fucose influenciam na sua interação com leucócitos (BERTEAU; MULLOY, 2003). Cumashi et al. (2007) estudando fucoidans extraídos de diferentes algas mostrou que todos os polissacarídeos testados inibiam o extravasamento leucocitário para o interior da cavidade peritoneal durante o processo de peritonite aguda em modelos utilizando ratos. Porém, nesse estudo foi observado que não existe uma relação direta entre a atividade antiinflamatória e o conteúdo de monossacarídeos ou sulfato, bem como outros parâmetros presentes na cadeia principal desses compostos como, por exemplo, ramificações. Para os

autores a ação antiinflamatória desses compostos se deve ao fato de que alguma estrutura presente nas fucanas mimetizam o sLe^x, ligante natural das selectinas.

6 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia utilizada foram obtidas cinco populações de fucanas diferentes.

A fração F1,5 apresentou um perfil eletroforético pouco polidisperso em relação as demais frações. Análises químicas desta fração indicam que se trata de uma heterofucana.

A fração F1,5 apresentou um efeito bifuncional em ensaios *in vitro* de viabilidade celular e produção de óxido nítrico. Porém, esta fração não mostrou nenhum efeito tóxico em experimentos *ex vivo*.

A fração F1,5 apresentou atividade antiinflamatória reduzindo a migração dos leucócitos, nas doses de 10 e 25 mg/Kg de peso do animal.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. O. Macrophages. **Methods Enzymol.**, v. 58, p. 494-506, 1979.
- ALBUQUERQUE, I. R. L. **Purificação e caracterização parcial de uma Fucana C de *Dictyota menstrualis* e estudo do seu efeito antiinflamatório e nociceptivo.** 81p. Dissertação (Mestrado em bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.
- ALVES, L. G. **Polissacarídeos presentes no folíolo, talo e flutuador da alga *Sargassum vulgare*.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2000.
- ALWAYN, I. P. et al. Inhibition of platelet aggregation in baboons: therapeutic implications for xenotransplantation. **Xenotransplantation**, v. 7, p. 247-257, 2000.
- ANDRADE, L. R. et al. Ultrastructure of acidic polysaccharides from the cell walls of brown algae. **J. Struct. Biol.**, v. 145, p. 216-225, 2004.
- ANGSTWURM, K. et al. Fucoidin, a polysaccharide inhibiting leukocyte rolling, attenuates inflammatory responses in experimental pneumococcal meningitis in rats. **Neurosci. Lett.**, v. 191, p. 1-4, 1995.
- BARILE, F. A.; DIERICKX, P. J.; KRISTEN, U. In vitro cytotoxicity testing for prediction of acute human toxicity. **Cell Biology and Toxicology**, v. 10, p. 155-162, 1994.
- BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. 1424-1437, 1996.
- BENEVIDES et al. Proximate analysis, toxic and antinutritional factors of ten brazilian marine algae. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 10, p. 31, 1998.
- BERTEAU, O.; MULLOY, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. **Glycobiology**, v. 13, p. 29-40, 2003.
- BEVILACQUA, M. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 767-804, 1993.
- BEVILACQUA, M. P.; NELSON, R. M. Selectins. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 379, 1993.
- BILAN, M. I. et al. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C. Ag. **Carboh. Res.**, v. 337, p. 719-730, 2002.
- _____. et al. A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus*. **Carbohydr. Res.**, v. 339, p. 511-517, 2004.

_____. et al. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus serratus*. **Carbohydr. Res.**, v. 341, p. 238-245, 2006.

BIRD, G. M.; HAAS, P. Nature of the cell wall constituents of *Laminaria* spp. **Biochem. J.**, v. 25, p. 403, 1931.

BOEHNCKE, W.; SCHÖN, M. P. Interfering with leukocyte rolling: a promising therapeutic approach in inflammatory skin disorders? **Trends in Pharmacological sciences**, v. 24, p. 49-52, 2003.

BOKOCH, G. M. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. **Blood**, v. 86, p. 1649 – 1660, 1995.

BUTCHIER, E. C. Leucocyte-endothelial cell recognition: three or more steps to diversity and sensitivity. **Cell**, v. 67, p. 1033, 1991.

CARLOS, T. M.; HARLAN, J. M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood**, v. 84, p. 2068, 1994.

CASSATELA, M. A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunology Today**, v. 16, p. 21-26, 1995.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cir. Bras.**, v. 17, p. 417-423, 2002.

CHANDIA et al. Carbohydrates from the sequential extraction of *Lessonia vadosa* (Phaeophyta). **Carbohydr. Polym.**, v. 47, p. 81-87, 2001.

CHEVOLOT, L. et al. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. **Carbohydr. Res.**, v. 330, p. 529-535, 2001.

CHOI, E. M.; KOO, S.J.; HWANG, J. K; Immune cell stimulating activity of mucopolysaccharide isolated from yam (*Dioscorea batatas*). **J. Ethnopharmacol.**, v. 91, p. 1- 6, 2004.

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

COTRAN, R. S. et al. **Robbins Pathologic basis of Disease**. 6 ed. Saunders Company, 1999.

CUMASHI, A. et al. A comparative study of the antiinflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology**, v. 17, p. 541-552, 2007.

DAVIES, M. G.; FULTON, G. J.; HAGEN, P. O. Clinical biology of nitric oxide. **Br. J. Surg.**, v. 82, p. 1598-1610, 1995.

DEKKER, L. V.; SEGAL, A. W. Signals to move cells. **Science**, v. 287, p. 982-985, 2000.

DI ROSA, M. et al. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 54, p. 229-238, 1996.

DIETRICH, C. P. et al. A new approach for the characterization of polysaccharides from algae: presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. **Plant Science**, v. 108, p. 143-153, 1995.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Anal. biochem.**, v. 70, p. 645-647, 1976.

DISCHE, Z. A new specific color reaction of hexuronic acids. **J. Biol. Chem.**, v. 167, p. 189, 1974.

_____. Color reactions of 6-Deoxy and 3-6-Dideoxioses. In: Whistler, R. L.; Wolfrom, M. L. **Methods of Carbohydrate Chemistry**, vol. 11, Academic press, p. 501-503, 1962.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochem. J.**, v. 84, p. 106-110, 1962.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.**, v. 75, p. 125-131, 1995.

DUARTE, M. E. R. et al. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Carbohyd. Res.**, v. 333, p. 281-293, 2001.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350 -356, 1956.

DURING, J. et al. Anticoagulant fucoidan fractions from *Fucus vesiculosus* induce platelet activation in vitro. **Thrombosis Research**, v. 85, p. 479-491, 1997.

FUJISHIMA, S.; AIKAWA, N. Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation. **Intensive Care Med.**, v. 21, p. 277-285, 1995.

GABOURY, J. et al. Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. **Am. J. Physiol.**, v. 265, p. 862-867, 1993.

GALLIN, J. I.; GOLDSTEIN, I. M.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: basic principles and clinical correlates**. 2. ed. New York: Raven Press, 1982

GRANERT, C. et al. Inhibition of leukocyte rolling with polysaccharide fucoidin prevents pleocytosis in experimental meningitis in the rabbit. **J. Clin. Invest.**, v. 93, p. 929-936, 1994.

GRAUFFEL, V. et al. New natural polysaccharides with potent antithrombotic activity ; fucans from brown algae. **Biomaterials**, v. 10, p. 363-368, 1989.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

- KAKKAR, A. K.; LEFER, D. J. Leukocyte and endothelial adhesion molecule studies in knockout mice. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, p. 154-158, 2004.
- KANSAS, G. S. **Blood**, v. 88, p. 3259-3287, 1996.
- KHAN, A. I.; LANDIS, R. C.; MALHOTRA, R. L-selectin ligands in lymphoid tissues and models of inflammation. **Inflammation**, v.27, p. 265-280, 2003.
- KIECHELE, F. L.; MALINSKI, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology, and detection. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 100, p. 567-575, 1993.
- KLOAREG, B.; QUATRANO, R. S. Structure of cell wall of marine algae and ecophysiological function of matrix polysaccharides. **Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Ver.**, v. 26, p. 259-315, 1988.
- KORTHUIS, R. J.; ANDERSON, D. C.; GRANGER, D. N. Role of neutrophil-endothelial cell adhesion in inflammatory disorders. **J. Crit. Care**, v. 9, p. 47-71, 1994.
- KUBES, P.; JUTILA, M.; PAYNE, D. Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. **J. Clin. Invest.**, v. 95, p. 2510-2519, 1995.
- KUO, P. C.; SCHROEDER, R. A. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. **Ann. Surg.**, v. 221, p. 220-235, 1995.
- KYLIN, H. Biochemistry of sea algae. **Z. Physiol. Chem.**, v. 83, p. 171-197, 1913.
- KYLIN, H. Biochemistry of sea algae. **Z. Physiol. Chem.**, v. 94, p. 337-425, 1915.
- LARSEN, B.; HAUG, A. ; PAINTER, T. Sulphated polysaccharides in brown algae. The native state of fucoidan in *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. **Acta Chem. Scand.**, v. 24, p. 3339-3352, 1970.
- LASKY, L. A. Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. **Annu. Rev. Biochem**, v. 64, p. 113–139, 1995.
- LEITE, E. L. et al. Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schröderi*. **Plant Science**, v. 132, p. 215-228, 1998.
- LEY, K. et al. Fucoidin, but not yeast polyphosphomannan PPME, inhibits leukocyte rolling in venules of the rat mesentery. **Blood**, v. 81, p. 177-185, 1993.
- _____. TEDDER, T. F. Leukocyte interactions with vascular endothelium: new insights into selectin-mediated attachment and rolling. **J. Immunol.**, v. 155, p. 525-528, 1995.
- LI, J. et al. Nitric oxide suppresses apoptosis in a interrupting caspase activation and mitochondrial dysfunction in cultured hepatocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 17325-17333, 1999.

LI, N.; ZHANG, Q.; SONG, J. Toxicological evaluation of fucoidan extracted from *Laminaria japonica* in Wistar rats. **Food. Chem. Toxicol.**, v. 43, p. 421-426, 2005.

LINNEMANN et al. The effects of inhibiting leukocyte migration with fucoidin in a rat peritonitis model. **Intensive Care Med.**, v. 26, p. 1540-1546, 2000.

LOGEART, D. et al. Fucans, sulfated polysaccharides extracted from brown seaweeds, inhibit vascular smooth muscle cell proliferation. Comparison with heparin for antiproliferative activity, binding and internalization. **Eur. J. Cell. Biol.** v. 74, p. 376-384, 1997.

MABEAU et al. New seaweed based ingredients for the food industry. **Int. Food Ingrid.** v. 3, p. 38, 1992.

MACHIAVELLI, L.I. et al. Reactive oxygen species are key mediators of the nitric oxide apoptotic pathway in anterior pituitary cells. **Nitric Oxide**, v. 16, p. 237-246, 2007.

MACKAI, I. R.; ROSEN, F. S. T-cell function and migration. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 1020-1034, 2000.

MAJNO, G. Studies on inflammation II: the site of action of histamine and serotonin. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, v. 11, p. 571, 1961.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J.Biol.Chem.**, v. 268, p. 12231-12234, 1993.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 78, p. 927-930, 1994.

MC CULLY, M. E. A note on the structure of the cell wall of the brown alga *Fucus*. **Can. J. Bot.**, v. 43, p. 1001-1004, 1965.

MCEVER, R. P.; CUMMINGS, R. D. **J. Clin. Invest.**, v. 100, p. 485-491, 1997.

MCEVER, R. P.; MOORE, K. L.; CUMMINGS, R. D. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 11025-11028, 1995.

MEDEIROS, V. P. **Fucanas de *Fucus vesiculosus* e *Lobophora variegata*: investigação das propriedades antiinflamatória, anticoagulante e sua ação sobre a síntese de um heparam sulfato antitrombótico.** 105p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2003.

MELO, M. R. S. *et al.* Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydr. Polym.**, v. 49, p. 491-498, 2002.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p. 109-142, 1991.

- MORETÃO, M.P.; BUCHI, D. F. Analysis of IL-2, IFN-gama and TNF-alfa production, alfa3beta1 integrins and actin filaments distribution in peritoneal macrophages treated with homeopathic medicament. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 34, p. 255-263, 2002.
- MORRIS, S. M.; BILLIAR, T. R. New insights into regulation of inducible nitric oxide synthesis. **Am. J. Physiol.**, v. 266, p. 829-839, 1994.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MOURÃO, P. A. S.; PEREIRA, M. S. Searching for alternatives to heparin: sulfated fucans from marine invertebrates. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 9, p. 225-232, 1999.
- NAGAOKA, M. et al. Structural study of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* TOKIDA. **Glycoconjugate Journal**, v. 16, p. 19-26, 1999.
- NAGUNO, T.; NISHINO, T. Fucan sulfates and their anticoagulant activities. In: DUMITRI S. **Polysaccharides in Medicinal Applications**. New York/Basel: Marcel Dekker. 1996, p. 545-574.
- NARDELLA, A. et al. Anticoagulant low molecular weights fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weights fucans extracted from brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. **Carbohydr. Res.**, v. 289, p. 201-208, 1996.
- NEWTON, D. J.; SCOTT, J. E.; WHITEMAN, P. The estimation of acid glycosaminoglycan - alcian blue complexes eluted from electrophoretic strips. **Anal. Biochem.**, v. 62, p. 268 - 273, 1974.
- NISHINO, T. et al. Effects of a fucoidan on the activation of plasminogen by u-PA and t-PA. **Thromb. Res.**, v. 99, p. 623-634, 2000.
- NORMAN, E. K. et al. Sialyl Lewis^x (sLe^x) and sLe^x mimetic, cgp69669a, disrupt e-selectin-dependent leukocytes rolling in vivo. **Blood**, v. 91, p. 475-483, 1998.
- OSTERGAARD, C. et al. Inhibition of leukocyte entry into the brain by the selectin blocker fucoidin decreases interleukin-1 (IL-1) levels but increases IL-8 levels in cerebrospinal fluid during experimental pneumococcal meningitis in rabbits. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 3153-3157, 2000.
- PAINTER, T. J. Algal polysaccharides. In: G. O. Aspinall (Ed.) **The polysaccharides**. Academic Press. New York, v. 2, p. 195-285, 1983.
- PANIKKAR, R.; BRASCH, D. J. Biosynthetic implications of NMR analyses of alginate homo- and heteropolymers from New Zealand brown seaweeds. **Carbohydr. Res.** v. 300, p. 229-238, 1997.

- PARKER, B. C. Significance of cell wall chemistry to phylogeny in algae. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 175, p. 417, 1970.
- PATANKAR, M. S. et al. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 21770, 1993.
- PAYNE, D.; KUBES, P. Nitric oxide donors reduce the rise in reperfusion-induced intestinal mucosal permeability. **Am. J. Physiol.**, v. 265, p.189-95,1993.
- PERCIVAL, E. G. V.; MC DOWELL, R. H. **Chemical enzymology of marine algal polysaccharides**. London, Academic Press, 1967, 219p.
- PEREIRA, F. E. L.; BOGLIOLO, L. Inflamações. In: **Patologia**. 2 ed. 1998. cap. 7, p.112-148,
- PEREZ-LORENZO, S.; LEVY-BENSHIMOL, A.; GOMEZ-ACEVEDO, S. Presencia de lectinas, taninos e inhibidores de proteasas em algas marinas de lãs costas venezolanas. **Acta Científica Venezolana**, v. 49, p. 141, 1998.
- POBER, J. S.; COTRAN, R. S. Overview: the role of endothelial cell in inflammation. **Transplantation**, v. 50, p. 537, 1990.
- PONCE, N. M. A. et al. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 153-165, 2003.
- PREOBRAZHENSKEYA, M. E. et al. Fucoidan inhibits leucocyte recruitment in a model peritoneal inflammation in rat and blocks interaction of P-selectin with its carbohydrate ligand. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 43, p. 443-451, 1997.
- QUEIROZ, K. C. S. **Estudos de polissacarídeos bioativos da alga marrom *Lobophora variegata***. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2003.
- _____. et al. Cytotoxicity effect of algal polysaccharides on HL60 cells. **Biochemistry (Moscow)**, v. 71, p. 1312-1315, 2006.
- RALTON, S. H. Nitric oxide and bone: what a gas! **Br. J. Rheumatol.**, v. 36, p. 831-838, 1997.
- RAMOS et al. Protein content and amino acid composition in some Brazilian marine algae species. **Physiol. Mol. Biol. Plants**, v. 4, p. 165, 1998.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHOM, S. E. **Biology of Plants**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1996, 738p.
- ROCHA, H. A. O. **Caracterização de uma fucana da alga *Spatoglossum schröederi* e análise de suas atividades antiadesivas, antimigratória, antiproliferativa e antitrombótica**. Tese (Doutorado em ciências) - Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, 2002.

- _____. **Extração e purificação de uma fucana da alga marinha *Spatoglossum schröederi***. Dissertação (Mestrado) - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1998.
- RORRER, G. L.; CHENEY, D. P. Bioprocess engineering of cell and tissues cultures for marine seaweeds. **Acquacultural engineering**, v. 32, p. 11-41, 2004.
- ROSEN, S. D.; BERTOZZI, C. R. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 6, p. 663-673, 1994.
- SCOTT, K. F.; BRYANT, K. J.; BIDGGOD, M. J. Functional coupling and diferential regulation of the phospholipase A2-cyclooxygenase pathways in inflammation. **Journal of leukocyte Biology**, v. 66, p. 535-541, 1999.
- SHANMUGAN, M.; MODY, K. H. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. **Current Science**, v. 79, p. 1672-1683, 2000.
- SILVA, T. M. A. et al. Characterization partial and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 523-533, 2005.
- SPECTOR, J. Refinement of the coomassie blue method of protein quantification: a simple and linear spectrophotometric assay of 0.5 to 50µg of protein. **Anal. Biochem.**, v. 86, p. 142-143, 1978.
- SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multi-step paradigm. **Cell**, v. 76, p. 301-314, 1994.
- _____. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. **Annu. Rev. of Physiol.**, v. 57, p. 827-872, 1995.
- TEVENS, A.; LOWE, J. **Patologia**. 2 ed. 1998.
- TAK, P. P. Expression of adhesion molecules in early rheumatoid synovial tissue. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 77, p. 236-242, 1995.
- TEDDER, T. F. et al. The selectins: vascular adhesion molecules. **FASEB J.**, v. 9, p. 866-873, 1995.
- TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P.; HARRISON, J. S. Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature**, v. 166, p. 444-445, 1950.
- TSAI, M.J.; LEE, E.H. Nitric oxide donors protect cultured rat astrocytes from 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced toxicity. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 24, p. 705-713, 1998.
- USHAKOVA, N. A. et al. Inhibitory activity of monomeric and polymeric selectin ligands. **Probl. Med. Chem.**, v. 45, p. 375-383, 1999.

- USOV et al. Polysaccharides of algae : 53.1 brown alga *Laminaria saccharina* (L.) Lam. as a source of fucoidan. **Russian J. Bioorganic Chem.**, v. 24, p.382-389, 1998.
- VARKE, A. Selectin ligands. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, p. 7390-7397, 1994.
- VERDRENGH, M.; ERLANDSSON-HARRIS, H.; TARKOWSKI, A. Role of selectins in experimental *Staphylococcus aureus*-induced arthritis. **Eur. J. Immunol.**, v. 30, p. 1606-1613, 2000.
- WALLUM, E.; STRENNBERG, K.; JENSSEN, D. **Understanding cell Toxicology: Principles and Practice**, New York: Ellis Horwood, 1990.
- WANG, L. et al. Heparin's anti-inflammatory effects require glucosamine 6-O-sulfation and are mediated by blockade of L- and P-selectins. **J. Clin. Invest.**, v. 110, p. 127-136, 2002.
- WILLIAMS, S. J.; DAVIES, G. J. Protein-Carbohydrate interactions: learning lessons from nature. **Trends in Biotechnology**, v. 19, p. 356-362, 2001.
- WONG, G. K. T.; MARSDEN, P. A. Nitric oxide synthases: regulation in disease. **Nephrol Dial Transplant**, v. 11, p. 215-220, 1996.
- XIE, X. et al. Inhibition of selectin-mediated cell adhesion and prevention of acute inflammation by nonanticoagulant sulfated saccharides: studies with carboxyl-reduced and sulfated heparin and trestatin a sulfate. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 34818-34825, 2000.
- YAN, Z. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase inhibits platelet adhesion and restores blood flow in the injured artery. **Circ. Res.**, v. 79, p. 38-44, 1996.
- YANG, J. W. et al. Bifunctional effects of fucoidan on the expression of inducible nitric oxide synthase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 346, p. 345-350, 2006.