



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

JAILMA ALMEIDA DE LIMA

**ANÁLISE TOXICOLÓGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE UMA
FUCANA ANTITROMBÓTICA DA ALGA MARROM
*Spatoglossum schröderi***

**NATAL-RN
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JAILMA ALMEIDA DE LIMA

**ANÁLISE TOXICOLÓGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE UMA
FUCANA ANTITROMBÓTICA DA ALGA MARROM
*Spatoglossum schröderi***

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: Hugo Alexandre de Oliveira Rocha.

**NATAL-RN
2009**

Divisão de Serviços Técnicos

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

Lima, Jailma Almeida de.

Análise toxicológica *in vitro* e *in vivo* de uma fucana antitrombótica da alga marrom *Spatoglossum schröderi* Jailma Almeida de Lima. – Natal, RN, 2009.

79 f.

Orientador: Hugo Alexandre de Oliveira Rocha.

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. Fucana – Dissertação. 3. Toxicidade. I. Rocha, Hugo Alexandre de Oliveira. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 582.272(043.3)

JAILMA ALMEIDA DE LIMA

**ANÁLISE TOXICOLÓGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE UMA FUCANA
ANTITROMBÓTICA DA ALGA MARROM *Spatoglossum schröderi***

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.

Aprovada em: 18/06/2009

Banca Examinadora



Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha

Departamento de Bioquímica - CB (UFRN)
Orientador



Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias

Departamento de Engenharia de Pesca - (UFC)
1º Examinador



Dr. Edda Lisboa Leite

Departamento de Bioquímica - CB (UFRN)
2º Examinador

DEDICO ESTA OBRA

A DEUS,
pela minha existência e por mais uma batalha vencida.
Grande é sua bondade e misericórdia.

Aos meus pais,
pelo apoio e amor incondicional.

Ao prof. Hugo Alexandre Rocha,
querido amigo e grande orientador.
Obrigada pela oportunidade, pelo companheirismo e pela paciência.
A ti o meu eterno agradecimento.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Programa de Mestrado em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte pelas condições necessárias ao desenvolvimento deste trabalho, e a CAPES pelo financiamento desta pesquisa.

Agradeço novamente ao meu orientador Prof. Dr. Hugo Alexandre, pela oportunidade oferecida, pela atenção e auxílio prestados durante a pesquisa.

À Prof. Dra. Edda Lisboa Leite, pela colaboração e carinho. Muito obrigada pelas palavras de apoio e em que me acompanhou.

Aos professores do Programa pelos ensinamentos fornecidos, bem como aos membros da banca da minha qualificação, as Professoras Suely Ferreira Chavante, Sílvia Bastistuzzo de Medeiros e Giuliana Andrade Souza pela colaboração e sugestões prestadas.

A professora Naisandra, pela disposição, pela competência e pela alegria de viver. Muito obrigada por ter me acompanhado em diversos experimentos, por ter perdido datas comemorativas pra me ajudar nos ensaios, mas muito obrigada por ter me ajudado e conhecer outros laboratórios e me ensinado muito. O meu eterno agradecimento e enorme gratidão.

A Lurdinha, pessoa batalhadora, de uma humildade e sabedoria enorme. Você é uma pessoa especial e que ensinou muito, não só a parte laboratorial, mas principalmente sobre a vida. Sou muito grata pelos seus ensinamentos e pelos momentos "Felizes" que compartilhamos. Muito obrigada por tudo.

Ao professor Carlos Eduardo Moura (Cadu) pela ajuda nos experimentos e com os ratos.

A professora Telma Maria A. Lemos que sempre me tirou diversas dúvidas e sempre me atendeu quando necessitei. Muito obrigada pela análise do sangue dos meus ratos.

Aos técnicos de laboratório Creuza, Itamar e Marcos e à secretária da pós-graduação Margarita Alexandre Mavromatis, pela ajuda e orientação prestadas. Como também aos secretários do Departamento Rogério e Selma.

Agradeço também aos funcionários Jonas e Ângela (DBQ), Raimundo e Rose (DBF), Carmem e Gizélia (DBGM).

Aos meus amigos de laboratório, pela colaboração e ajuda nos meus experimentos e também em tudo que precisei: Mariana, Sara, Dayanne (e Helena, mais uma integrante Biopol), Nednaldo, Leandro, Diego (Popó), Ruth, Kaline (e Maria Luiza, outra integrante Biopol), Ana Karinne (donana), Edjane, Arthur, Érika, Rafael, Leonardo, Gabriel, Railson, Cinthia, Sayonara, Raniere, Joanna e Ivan.

Agradeço a Mariana e Sara, por terem sido as primeiras a me incentivarem a vir para a Bioquímica, além de sempre me apoiarem e participarem na minha vida. Muito obrigada amigas vocês são demais e muito importantes para mim, estarão sempre no meu coração!!!

A Dayanne por me compreender e por sempre ter uma palavra amiga, tenho por ti um enorme carinho. Fico muito feliz por ter acompanhado seu crescimento na pesquisa, mas principalmente como pessoa, tenho certeza que serás uma Mãe linda.

A Nednaldo por ser sempre solidário, prestativo e acima de tudo um grande amigo. És um grande homem, muito obrigada pela ajuda nos experimentos e em tudo que precisei.

A Leandro, meu amigo de turma, parceiro em todos os momentos. Considero-te como um irmão. Muito obrigada pela força e pelo incentivo. E desejo-te uma vida de muita paz e uma família bastante feliz e numerosa.

A Ruth (Luth Luth), uma amigona, linda, simpática e embora todo mundo tire sarro de você, és muito querida...tudo fica mais alegre quando você está presente. Muito obrigada pelo brigadeirão e por tudo.

A Diego (Popó), a pessoa mais criativa e que dá jeito a quase tudo no laboratório... além é claro de ser o homem mais perspicaz e observador que conheço. Uma pessoa 10, engraçado, bem humorado, conta piada como ninguém e que sabe ser sério no momento adequado. Você é o cara !!! Muito obrigada pela ajuda em muitos experimentos.

A Kaline, por confiar em mim, pelas palavras de incentivo, pelo carinho, por ser esse doce de pessoa e por ter nos dado Malu. Você fez parte da minha graduação desde o primeiro dia de aula, foi você quem me recepcionou com Cleysyan. Muito obrigada por tudo.

A Ana Karinne (donana) pelas conversas pelas manhãs ao som de Enya, pela apoio, pelos conselhos e por sempre estar presente mesmo longe. Muito obrigada Donana pela companhia.

A Edjane pela pessoa responsável e exemplo de profissional. Seu trabalho foi diferencial e serviu como modelo para muitos outros, inclusive o meu, já que trabalhamos com a fucana A. Muito obrigada Ed, você é show!!!

A Leonardo, entramos na mesma semana no laboratório, e foi meu parceiro na limpeza das algas, limpamos muitas no início...mas embora você tenha dito que eu não goste de ICs, hoje estou muito mais feliz por você ser um mestrando, tenho certeza que você crescerá ainda mais na pesquisa.

A Rafael, muito gente fina, você é um doce... nunca vi pessoa tão calma e serena. És uma pessoa formidável, valeu Rafitcho.

A Gabriel (Gabritcho), o nosso soneca, que sempre está disposto a ajudar e nunca nega um pedido de ninguém...muito obrigada por tudo.

A Arthur, que me ajudou em tudo, em muitos experimentos, e que é um rapaz generoso, bondoso e muito competente. Fico feliz por você fazer parte do grupo e por ter crescido tão rapidamente na pesquisa ...espero que consigamos obter êxito nas etapas seguintes, e que você possa conseguir obter o que desejas. Muito obrigada pela ajuda.

A Érika, por sempre estar disposta a ajudar a todos e pelos biscoitos de aveia e mel. Espero que possas ficar mais tempo no laboratório. Você é um amor de pessoa. Muito obrigada mesmo.

A Sayonara (Sayô) embora tenha nos deixado, você é alguém muito especial e que faz muita falta. Muito obrigada por tudo.

A Cinthia (soja caju) ...no início não éramos tão próximas, mas ao longo do tempo vi que eras uma pessoa muito legal. Obrigada pelas resenhas você deixa o laboratório muito mais alegre.

A Raniere, meu parceiro de almoços às 17h da tarde... somos pessoas com bastante reserva de glicogênio. Você é um rapaz privilegiado pela autenticidade e opinião própria. Obrigada por tudo.

A Joanna, embora tenha entrado recentemente, por ser um doce de pessoa.

A Ivan, meu ex-vizinho, e o primeiro aluno que fez parte do BIOPOL, ele foi o primogênito. Obrigada pelos conselhos.

Aos meus amigos de mestrado Leandro, Lígia Rejane, Katrine, Sheyla e Cleysyvan. Obrigada pela compreensão, companheirismo e pela amizade de todos vocês e por termos sido a turma mais bacana do DBQ.

Aos meus amigos do DBQ Roberta Godone, Marília, Cibele, Monique, Aurila Bay, Elaine, Paulo Ricardo, Virgínia, Norberto, Manuella (Manu). Aos meus amigos do DMOR e DMP Danielle, Hillkéia, Camila, Divana. As minhas amigas do DBEZ Gabi, Milena, Bianca e Carol. Aos meus amigos de graduação, em especial Gideão, Aleksandra, Lígia Carrascoza, Robéria e Edilza.

Aos amigos dos laboratórios LAMA e do LBMG. Conheci pessoas maravilhosas e que me ajudaram bastante no desenvolvimento de algumas técnicas: Thiago, Nilmara, Edson, Marcos Felipe, Daniel, Julianne, Jana, Denise e especialmente a Fábio e a Bia que foram os que me acompanharam mais intensamente. O meu muito obrigada a todos!!!

Meus agradecimentos ao prof. Magdi Aloufa, meu primeiro orientador, bem como aos amigos que fiz no laboratório de Biotecnologia Vegetal, da UFRN, pelo companheirismo, orientação e principalmente pelos momentos felizes em todas as festinhas: Kléptura, Vanessa Mosca, Marianne, Vivianne, Eutália, Kelly, Alessandra, Najara, Yonara, Nilana, André, Rose, Simone, Dorinha, Raniele, Enock.

Agradeço, de forma especial, àqueles que contribuíram de forma diferencial para minha formação como pessoa: aos meus grandes amigos e amigas Joanna D'arc (e Joyce que acompanhamos seu crescimento), Sara, Mariana Santana, Christier e Railson, vocês foram uma das melhores conquistas, todos vocês são formidáveis e pessoas muito especiais pra mim. Muito obrigada por me aturarem e me aceitarem como sou. Muito obrigada do fundo do coração.

E um agradecimento especial a Susana Moreira, a minha mais nova amiga. Uma portuguesa com certeza !!! Tive a oportunidade de conhecê-la e aprender muito (desde o funcionamento do timer além de muitas outras coisas). Você é uma pessoa simples e doce, e que compartilhou comigo muitas momentos legais e ensinamentos que nunca vou esquecer...muito obrigada do fundo do coração. Espero que possas voltar...ou que eu aprenda a nadar!! Tu és giro.

Ao final de mais esta etapa, são muitas as pessoas a quem gostaria de agradecer, mas poderá ser que ao longo dos agradecimentos a memória possa esquecer de uma ou outra pessoa, mas que não as tornam menos importantes!!!

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem
momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis
e pessoas incomparáveis”.

(Fernando Pessoa)

RESUMO

Fucana é um termo usado para denominar uma família de polissacarídeos sulfatados ricos em L-fucose. São extraídos principalmente da matriz extracelular de algas marrons e equinodermas. A alga marrom *Spatoglossum schröderi* (Dictyotaceae) possui três heterofucanas nomeadas de fucanas A, B e C. Tem sido proposto o uso de fucanas como alternativas para anticoagulantes. Nosso grupo de pesquisa extraiu uma heterofucana não anticoagulante da alga *S. schröderi* que tem uma elevada atividade antitrombótica *in vivo*. No entanto, a sua toxicidade *in vitro* e *in vivo* ainda não foi determinada. Para os resultados obtidos na toxicidade *in vitro*, observou-se que a fucana A nas concentrações de 20, 500 e 1000 µg/placa não mostram atividade mutagênica em teste Kado (Microsuspensão) utilizando as cepas bacterianas TA97a, TA98, TA100 e TA102, com e sem S9. No ensaio do cometa a presença da fucana A não provocou nenhum efeito genotóxico nas concentrações testadas de 20, 500 e 1000 µg/mL. Não houve dano no DNA dessas células, como evidenciado pelo *tail length* e *tail moment*, sendo semelhantes ao encontrado para o controle negativo. A fucana A da alga *Spatoglossum schröderi* quando administrada nos animais durante o período de dois meses, não provocou alteração dos parâmetros hematológicos, bioquímicos, morfologia e tamanho dos órgãos analisados. Esse teste não demonstrou que a fucana, na dose que apresenta atividade antitrombótica, apresenta toxicidade. Os dados do trabalho indicam que esta fucana é um composto com potencial farmacológico que não apresenta toxicidade, esse fato da segurança para que testes futuros com esse polímero sejam realizados, inclusive testes em humanos.

ABSTRACT

Fucan is a term used to denominate a family of sulfated polysaccharides rich in L-fucose. They are extracted mainly from the extracellular matrix of brown algae and echinoderms. The brown alga *Spatoglossum schröderi* (Dictyotaceae) has three heterofucans named A, B and C. Our research group have been extracted non anticoagulant heterofucan from *S. schröderi* which possess antithrombotic activity *in vivo*. However, their toxicity *in vitro* and *in vivo* has not yet been determined. For the results in toxicity *in vitro*, we observed that the fucan A at 20, 500 and 1000 µg/plate showed no mutagenic activity in Kado test (Microsuspension), when the bacterial strains TA97a, TA98, TA100 and TA102, with and without S9 were used. The comet assay showed that fucan A (from 20 to 1000 µg/mL) did not cause any genotoxic effect on CHO cells. There was no damage to the DNA of these cells, as evidenced by the tail length and tail moment, which were similar to that found for the negative control. The fucan A from *S. schröderi* was administered at 20 µg/g of rat (dose which it showed high antithrombotic activity) during two months. After that, the animals were killed and examined. The data showed that fucan A did not cause any change in biochemistry and hematological parameters, as well as, in the morphology and size of the rat's organs analyzed. In conclusion, this study indicates that fucan is a compound with potential pharmacological that has no toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da fucana A da alga marrom <i>S. schröderi</i>	22
Figura 2. Foto da alga marrom <i>Spatoglossum schröderi</i>	31
Figura 3. Microscopia de fluorescência dos nucleóides de células de ovário de hamster (CHO) submetidas ao ensaio cometa.....	40
Figura 4. Rendimento das frações da cromatografia de troca iônica.....	47
Figura 5. Comportamento eletroforético das frações eluídas na cromatografia em coluna de troca iônica (obtida da fração F0.6) da alga <i>S. schröderi</i>	48
Figura 6. Viabilidade celular de células CHO (ovário de hamster chinês).....	50
Figura 7. Avaliação do ensaio cometa em células CHO através da análise dos parâmetros <i>tail length</i> e <i>tail moment</i>	51
Figura 8. Microscopia de fluorescência dos nucleóides de células de ovário de hamster (CHO) submetidas ao ensaio cometa.....	52
Figura 9. Curva de toxicidade com a <i>Salmonella</i> TA98 utilizando diferentes concentrações de fucana A.....	53
Figura 10. Ganho de peso percentual dos ratos Wistar tratados com fucana A e dos ratos do grupo controle.....	55
Figura 11. Peso dos órgãos dos animais tratados e do grupo controle.....	56
Figura 12. Fotomicroscopia óptica de tecido hepático (aumento de 10x) e renal (aumento de 40x) de rato submetido à administração de fucana A e solução salina.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fucanas encontradas em Phaeophyceae entre os anos de 1960 e 1980.....	18
Tabela 2. Algumas das atividades farmacológicas atribuídas as fucanas de algas.....	20
Tabela 3. Atividade antitrombótica da fucana A da alga <i>S. schröderi</i>	23
Tabela 4. Características genéticas das linhagens de <i>S. typhimurium</i> utilizadas teste de Kado.....	41
Tabela 5. Controles positivos utilizados neste ensaio para as linhagens <i>S. typhimurium</i> com e sem ativação metabólica.....	42
Tabela 6. Composição química dos polissacarídeos ácidos da alga <i>Spatoglossum schröderi</i>	49
Tabela 7. Sinais encontrados nos espectros de infravermelho da Fucana A da alga <i>Spatoglossum schröderi</i> e os grupos funcionais a eles atribuídos.....	49
Tabela 8. Avaliação mutagênica da fucana A extraída da alga marrom <i>S. schröderi</i> com o teste de Kado com diferentes cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> na ausência e presença de ativação metabólica (S9).....	54
Tabela 9. Parâmetros bioquímicos do sangue dos ratos Wistar.....	58
Tabela 10. Parâmetros hematológicos dos ratos Wistar.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

CTV	Brometo de cetiltrimetilamônio (Cetavlon)
+S9	Com Ativação Metabólica
-S9	Sem Ativação Metabólica
2-AA	2 Aminoantraceno
4-NQO	4 nitroquinolina -1-óxido
Alb	Albumina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
bio-	Auxotrofia para à biotina
C-4	Carbono 4
CHCM	Hemoglobina corpuscular média
CHO	Célula de ovário de hamster Chinês
Cr	Creatinina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
F0.5	Fração precipitada com 0,5 volumes de acetona
F0.6	Fração precipitada com 0,6 volumes de acetona
F0.7	Fração precipitada com 0,7 volumes de acetona
F0.9	Fração precipitada com 0,9 volumes de acetona
F1.1	Fração precipitada com 1,1 volumes de acetona
F1.3	Fração precipitada com 1,3 volumes de acetona
F2.0	Fração precipitada com 2,0 volumes de acetona
Fuc A	Fucana A
GGT	γ -glutamil transferase
HCl	Ácido clorídico
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HCT	Células de Adenocarcinoma de Cólon Humano
HE	Hematoxilina-eosina
Hep	Heparina
his	Mutação responsável pela síntese da histidina
KBr	Brometo de potássio
LMWH	Heparina de baixo peso molecular
Mili-Q	Água ultra pura
Min.	Minutos
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetros

PA	Para análise
PDA	Tampão 1,3 diamino propano acetato
pH	Potencial de hidrogênio
rfa	Mutação que modificam a permeabilidade da membrana de lipopolissacarídeo
RM	Razão de Mutagenicidade
RNA	Ácido ribonucléico
RPM	Rotações por minuto
SCGE	Single Cell Gel Eletrophoresis
T. Bil.	Bilirrubina total
TC	Colesterol total
TFPI	Inibidor do fator tecidual
top-agar	Agar de superfície
TP	Proteína total
uvrB	Mutação causada pela deleção do gene de reparo de excisão
V	Volts
V/cm	Volts por centímetro
VCM	Volume corpuscular médio
Vol.	Volume

SUMÁRIO

Página

RESUMO	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	Xi
LISTA DE ABREVIATURAS/ SIGLAS.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Fucanas.....	16
1.1.1. Fucana A.....	21
1.2. Toxicidade.....	25
1.2.1. Toxicidade de polissacarídeos e seus monômeros.....	26
1.2.2. Toxicidade de polissacarídeos de algas.....	27
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. Objetivo geral.....	30
2.2. Objetivos específicos.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. Material Biológico.....	31
3.1.1. Alga marinha marrom <i>Spatoglossum schröderi</i>	31
3.1.2. Animais experimentais e condições do biotério.....	32
3.2. Outros materiais.....	32
3.2.1. Reagentes.....	32
3.2.2. Equipamentos.....	33
3.3. Extração e purificação da fucana A.....	34
3.3.1. Obtenção do pó cetônico.....	34
3.3.2. Proteólise.....	35
3.3.3. Fracionamento com acetona.....	35
3.3.4. Cromatografia em coluna de troca iônica.....	35
3.3.5. Eletroforese em gel de agarose.....	36
3.4. Análises químicas.....	37
3.4.1. Ácidos urônicos.....	37
3.4.2. Fucose.....	37
3.4.3. Xilose.....	37
3.4.4. Açúcares totais.....	38
3.4.5. Sulfato.....	38
3.4.6. Proteínas.....	38
3.4.7. Espectroscopia de infravermelho.....	38
3.5. Toxicidade <i>in vitro</i>	38
3.5.1. Ensaio de cometa.....	38
3.5.1.1. Cultura de células.....	38
3.5.1.2. Viabilidade Celular.....	39
3.5.1.3. Ensaio.....	39
3.5.2. Teste de Kado (Ensaio de microsuspenção com Salmonella).....	40
3.5.2.1. Linhagens bacterianas utilizadas.....	40
3.5.2.2. Controles positivos e negativos do teste de Kado.....	41
3.5.2.3. Curva de toxicidade.....	42
3.5.2.4. Ensaio.....	43
3.6. Toxicidade <i>in vivo</i>	44
3.6.1. Estudo da toxicidade em ratos.....	44
3.6.2. Observações comportamentais.....	44
3.6.3. Análises hematológicas e bioquímicas.....	45
3.6.4. Necropsia e análise histológica.....	45
3.7. Análise estatística.....	46

4. RESULTADOS.....	47
4.1. Cromatografia em coluna de troca iônica da F0.6.....	47
4.2. Eletroforese em gel de agarose das frações da troca iônica.....	47
4.3. Análises químicas.....	48
4.4. Toxicidade <i>in vitro</i>	50
4.4.1. Viabilidade celular.....	50
4.4.2. Ensaio de cometa.....	50
4.4.3. Curva de toxicidade.....	52
4.4.4. Teste de Kado.....	53
4.5. Estudo de toxicidade <i>in vivo</i>	54
4.5.1. Peso corporal.....	54
4.5.2. Observações comportamentais.....	55
4.5.3. Análise macroscópica e histológica dos órgãos internos dos animais...	55
4.5.4. Parâmetros bioquímicos e hematológicos.....	57
5. DISCUSSÃO.....	59
6. CONCLUSÕES.....	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXO.....	78

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fucanas

As algas marinhas (Chlorophyceae, Rhodophyceae e Phaeophyceae) são encontradas em abundância no litoral brasileiro, especialmente no litoral Nordeste. Os polissacarídeos de algas marinhas são substâncias naturalmente ativas, possuindo importantes aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e biotecnológica (PENGZHAN et al., 2003). Neste contexto têm-se as Phaeophyceae ou algas marrons, que são excelentes fontes de polissacarídeos sulfatados denominados de fucanas.

Fucana é um termo utilizado para denominar uma família de polissacarídeos sulfatados cujo açúcar mais representativo é a L-fucose sulfatada. São encontradas em algas marrons, localizadas nos tecidos intracelulares ou matriz mucilagenosa (LEITE et al., 1998; ROCHA et al., 2006; BARROSO et al., 2008;), e em equinodermas (MOURÃO, 2007). O seu caráter altamente higroscópico tem como finalidade proteger a alga da desidratação quando submetida a longos períodos de exposição ao sol durante as marés baixas. A natureza mucilagenosa destes compostos também parece contribuir para tornar a alga suficientemente flexível, para crescer em ambiente líquido e, rígida, para permanecer estendida, de forma a melhor captar a luz e os nutrientes existentes (PERCIVAL & MCDOWELL, 1967).

Levando em consideração sua heterogeneidade, as fucanas foram classificadas com base nos seus açúcares constituintes em homofucanas e heterofucanas (BERTEAU & MULLOY, 2003). As homofucanas são polímeros contendo mais de 90% de L-fucose, enquanto que as heterofucanas, além de L-fucose sulfatada, apresentam outros açúcares neutros e ácidos urônicos. Uma característica interessante é que todas as fucoses precisam ser necessariamente sulfatadas. O termo fucoidan também pode ser usado para definir heterofucanas, embora algumas vezes, os termos fucana e fucoidan sejam empregados como sinônimos (ROCHA et al., 2006).

Os estudos iniciais sobre fucanas foram realizados por Kylin (1913; 1915) com as algas *Laminaria digitata*, *Fucus vesiculosus* e *Ascophyllum nodosum*, porém, só em 1931 é que foi demonstrada a presença de grupos sulfato nos

monômeros de fucose (BIRD & HAAS, 1931). Já o entendimento das características químico-estruturais desses compostos só veio se intensificar a partir dos anos 50 do século passado (KLOAREG & QUATRANO, 1988).

Um conhecimento estrutural inicial relevante sobre a estrutura das fucanas foi obtido através de trabalhos realizados por Conchie e Percival (1950) com *Fucus vesiculosus*. Suas análises químicas mostraram que os teores de fucose e sulfato eram, respectivamente, 38% e 32,8%. Exaustivas metilações produziram 3-O-metil-fucose (60%), 3,4-di-O-metil-fucose (20%) e fucose livre (20%). A estabilidade do grupamento sulfato ao tratamento com álcalis foi um indicativo de sua ligação em C-4, pois apenas 10% dos sulfatos foram lábeis a esse tratamento.

Esses dados indicam a existência de um polímero com ligação do tipo α -(1 \rightarrow 2) entre as fucoses sulfatadas no C-4. A forte rotação negativa, $[\alpha]_D -115^\circ$, do polissacarídeo seria um grande indicativo da presença de ligações do tipo α devendo ser considerada também a possibilidade de ligações α -(1 \rightarrow 3) fucose-4 sulfato, nos pontos de ramificação. Os autores não possuíam evidências com relação às posições da xilose, ácido glucurônico e galactose no polissacarídeo. Na verdade, vários trabalhos desse período consideraram esses monossacarídeos como impurezas difíceis de serem eliminadas durante o processo de obtenção dos homopolímeros de fucoses sulfatadas (CONCHIE & PERCIVAL, 1950; PERCIVAL & ROSS, 1950; BLACK et al., 1952; SPRINGER et al. 1957; COTÉ, 1959).

Devido à dificuldade de se extrair homofucanas de algas, cresceu a idéia de que as mucilagens sulfatadas das Phaeophyceae eram formadas por várias fucanas heterogêneas e que, portanto, esses compostos constituíam uma família de polissacarídeos complexos cuja principal característica era a presença da L-fucose (QUILLET, 1961). A partir de então, vários foram os relatos da presença de heterofucanas em algas marinhas. Na tabela 1 está sumarizado os principais resultados obtidos durante o período compreendido entre os anos de 1960 e 1980.

Tabela 1. Fucanas encontradas em Phaeophyceae entre os anos de 1960 e 1980.

Ordem	Gênero	Fucoidans*	Xilofucoglucuronanas	Glucuronogalactofucanas e/ou glucuronofucogalactanas
<i>Ectocarpales</i>	<i>Ectocarpus</i>		+	
	<i>Sorocarpus</i>	+	+	
<i>Chordariales</i>	<i>Chorda</i>	+		+
	<i>Heterochordaria</i>	+		
	<i>Leathesia</i>	+		
	<i>Nemacystus</i>	+		
	<i>Sphaerotrichia</i>	+		
	<i>Tinocladia</i>	+		
<i>Desmarestiales</i>	<i>Desmarestia</i>	+	+	+
<i>Dictyosiphonales</i>	<i>Asperococcus</i>			+
<i>Seytosiphonales</i>	<i>Colpomenia</i>			+
	<i>Scytosiphon</i>	+	+	
<i>Sphacelariales</i>	<i>Stypocaulon</i>			+
<i>Dictyotales</i>	<i>Dictyopeteris</i>	+	+	
	<i>Dictyota</i>		+	
	<i>Padina</i>	+	+	
	<i>Taonia</i>			+
<i>Laminariales</i>	<i>Alaria</i>		+	
	<i>Ecklonia</i>	+		
	<i>Eisenia</i>	+	+	
	<i>Kjellmaniella</i>	+	+	
	<i>Laminaria</i>	+		
	<i>Lessonia</i>	+	+	
	<i>Macrocystis</i>	+		
	<i>Nereocystis</i>	+		
	<i>Undaria</i>		+	+
	<i>Ascophyllum</i>	+	+	+
<i>Fucales</i>	<i>Bifurcaria</i>	+	+	
	<i>Fucus</i>	+	+	
	<i>Halidrys</i>	+		
	<i>Himanthalia</i>	+	+	
	<i>Hizikia</i>		+	
	<i>Pelvetia</i>	+	+	
	<i>Sargassum</i>		+	+
	<i>Turbinaria</i>	+	+	

Adaptado de Kloareg & Quatrano (1988). *Esses trabalhos não foram específicos quanto à composição ou a purificação dos compostos, por isso neste trabalho resolveu-se utilizar o termo fucoidan.

Esses trabalhos indicaram que muitas xilofucoglucuronanas têm como característica comum uma estrutura central de ácidos glucurônicos, ao qual se ligam principalmente a ramificações formadas por 4-O-fucose-xilose e 3-O-xilose-fucose-4-sulfato (KLOAREG & QUATRANO, 1988). Entretanto, devido à heterogeneidade desses compostos, variações em torno dessa estrutura são bastante comuns. Como exemplo, pode-se citar Abdel-Fattah et al. (1974) que mostraram uma fucana de *Sargassum linifolium* constituída por uma estrutura central formada por ácido β -D-glucurônico e β -D-manose e ramificações

compostas de galactose-6-sulfato e 3,6-dissulfato, além das fucoses. Hussein et al. (1980) extraíram uma fucana da alga *Padina pavonia*, que além dos resíduos de β -D-glucurônico e β -D-manose em sua estrutura central, apresentava também, resíduos de β -D-glicose.

As glucuronogalactofucanas e as glucuronofucogalactanas apresentaram como características mais marcantes a presença de galactose terminal ou ligada de forma 1,3 aos outros monossacarídeos, não sendo observada a presença de seqüências de homogalactanas (PERCIVAL & YOUNG, 1974; HUSSEIN, 1975; MORY et al., 1982). Contudo, uma fucana da alga *A. nodosum* mostrou-se constituída de uma estrutura central de D-galactose (1 \rightarrow 4) com ramificações em C2 de fucose-3- e 2-sulfato e ocasionalmente ácido glucurônico (MEDCALF et al., 1977).

Nos últimos anos, a maioria dos trabalhos publicados sobre fucanas se deteve nas atividades farmacológicas daquelas que apresentavam características estruturais mais conhecidas, como, os fucoidans de *A. nodosum* e *F. vesiculosus*, ou que apresentassem atividade anticoagulante. Os trabalhos demonstrando estrutura de novas fucanas se tornaram mais raros (BILAN et al., 2008).

Uma análise dos trabalhos realizados nesses últimos anos revela que a falta de uma regularidade estrutural mais rigorosa e as altas massas moleculares apresentadas pelas fucanas foram as principais dificuldades encontradas para as determinações de todas as características estruturais desses polissacarídeos.

Mesmo técnicas modernas de estudos estruturais, como ressonância magnética nuclear de alto campo, não foram possíveis de elucidar estão no limite de suas capacidades (MULLOY et al., 2000; CHEVOLOT et al., 2001; BILAN et al. 2008). Portanto, uma completa descrição das estruturas primárias da maioria das fucanas ainda não está disponível. A utilização de fucanas de baixa massa molecular poderia ser uma saída para a obtenção de fucanas menos complexas estruturalmente e com atividades farmacológicas semelhantes as fucanas de alta massa molecular (BERTEAU & MULLOY, 2003).

Estudos com fucanas de algas demonstraram que suas estruturas são muito complexas e que variam de espécie para espécie e às vezes em diferentes partes da mesma alga (DIETRICH et al., 1995; ALVES, 2000). A grande complexidade na estrutura das fucanas está relacionada às muitas possibilidades

de ligações entre os diferentes monossacarídeos e as possíveis distribuições dos grupos sulfato. Isso faz com que os mesmos homopolímeros apresentem estruturas complexas, ou seja, cada fucana pode apresentar uma conformação estrutural única, e, portanto, possuir atividades farmacológicas distintas ou mais potentes do que outras fucanas ou outros compostos já descritos (ROCHA, 2002).

As fucanas têm sido avaliadas com relação a diversas atividades farmacológicas através de diferentes modelos experimentais (Tabela 2). O grande interesse pelas fucanas pode estar relacionado com o fato de que alguns desses compostos guardam semelhanças farmacológicas com a heparina.

Tabela 2. Algumas das atividades farmacológicas atribuídas as fucanas de algas.

Atividade	Alga	Referências
Angiogênica	<i>Fucus vesiculosus</i>	MATSUBARA et al., 2005; SOEDA et al., 2000
Anti complemento	<i>Laminaria cichorioide</i> , <i>Laminaria japonica</i> , <i>Fucus evanescens</i> <i>Ascophyllum nodosum</i>	BLONDIN et al., 1994; BOISSON-VIDAL et al., 2007; ZVYAGINTSEVA et al., 2000
Anti migratória	<i>F. vesiculosus</i> , <i>A. nodosum</i>	GIRAUX et al., 1998; SOEDA, et al., 2000
Antiadesiva	<i>A. nodosum</i> , <i>Laminaria brasiliensis</i> , <i>Spatoglossum schröderi</i> , <i>Sargassum stenophyllum</i>	LIU; HAROUN-BOUHEDJA; BOISSON-VIDAL, 2000; ROCHA et al., 2001
Anticoagulante	<i>A. nodosum</i> , <i>Ecklonia kurome</i> , <i>Eisenia bicyclis</i> , <i>Dictyota menstrualis</i> , <i>Padina gynospora</i>	ALBUQUERQUE et al., 2004; HAROUN-BOUHEDJA et al., 2000; NISHINO et al., 1991a; SILVA et al., 2005
Antioxidante	<i>F. vesiculosus</i> ; <i>L. japonica</i>	RUPEREZ; AHRAZEM; LEAL, 2002; WANG et al., 2008
Antiproliferativa	<i>A. nodosum</i>	ELLOUALI et al., 1993; ELLOUALI; BOISSON-VIDAL; JOZEFONVISCZ, 1994
Antitrombótico	<i>A. nodosum</i> , <i>S. schroederi</i>	BARROSO et al., 2008; MAURAY et al., 1998; ROCHA et al., 2005b
Antitumoral	<i>A. nodosum</i> , <i>Sargassum thumbergii</i> , <i>E. bicyclis</i>	QUEIROZ et al., 2006; RIOU et al., 1996; USUI; ASARI; MIZUNO, 1980; ZHUANG et al., 1995
Anti-úlceras	<i>Cladosiphon okamuranus</i>	NAGAOKA et al., 2000; SHIBATA et al., 2000; SHIBATA et al., 2001
Antiviral	<i>Sargassum horneri</i> , <i>Cystoseira indica</i>	HAYASHI, 2008; HOSHINO et al., 1998; MANDAL et al., 2007
Antimetastático	<i>F. vesiculosus</i>	COOMBE et al., 1987

Bloqueio de ligação célula-célula via selectina	<i>F. vesiculosus</i>	TEIXEIRA; ROSSI; HELLEWELL, 1996
Bloqueio de ligação espermatozoide-epitélio do oviducto	<i>F. vesiculosus</i>	SUAREZ et al., 1998
Estímulo de síntese de heparan antitrombótico	<i>S. schröderi</i>	BARROSO, et al., 2008; ROCHA et al., 2005a
Fibrinolítica	<i>E. kurome, F. vesiculosus</i>	DOCTOR; HILL; JACKSON, 1995; NISHINO et al., 2000
Impedir a rolagem de leucócitos	<i>F. vesiculosus</i>	SHIMAOKA et al., 1996
Modificação da síntese de FN e trombospodina	<i>F. vesiculosus</i>	VISCHER; BUDDECKE, 1991

Extraído de Costa, 2008.

1.1.1. Fucana A

Dietrich e colaboradores (DIETRICH et al., 1995) trabalhando com *Padina gymnospora*, *Dictyota mertensis* e *Sargassum vulgare* demonstraram que cada alga possuía pelo menos três fucanas sulfatadas com padrões de migração eletroforética característicos. Essas fucanas foram denominadas, por ordem crescente de mobilidade eletroforética, em bandas A, B e C. Cada fucana apresentou características estruturais singulares, tanto em relação as três fucanas da mesma alga quanto em relação às fucanas das diferentes espécies de algas marrons.

Nosso grupo demonstrou que a alga *Spatoglossum schröderi* também possui três fucanas na sua composição que foram denominadas de fucanas A, B e C. Essas fucanas foram capazes de estimular a síntese de heparam sulfato (HS) por células endoteliais (LEITE et al., 1998). Essa propriedade ainda não tinha sido descrita para fucanas. Também, foi observado que as fucanas de *S. schröderi* não possuíam atividade anticoagulante *in vitro*. Esse dado levou a seguinte hipótese, se essas fucanas não possuem atividade anticoagulante, mas são capazes de estimular a síntese de heparam sulfato antitrombótico (HS) por células endoteliais, elas podem apresentar uma atividade antitrombótica indireta *in vivo*. E, portanto, ser um potencial fármaco antitrombótico por apresentar, dentre algumas características próprias, um mecanismo de ação diferente daquele apresentado pela heparina.

Posteriormente, demonstrou-se que a fucana B de *S. schröderi* apresentou atividade antitrombótica *in vivo* sem apresentar atividade anticoagulante *in vitro*. (ROCHA et al., 2005b). Contudo, a fucana A dessa mesma alga, que corresponde a 80% das fucanas sintetizadas pela alga, não foi avaliada. Assim, a fucana A de *S. schröderi* foi avaliada com relação a sua atividade antitrombótica *in vivo*.

Essa fucana foi caracterizada por Leite et al. (1998) através de técnicas de metilação, ressonância magnética nuclear, espectroscopia de infravermelho e hidrólises ácida e enzimática. Foi proposto que essa fucana (21 KDa) é composta por uma cadeia central formada por ácido glucurônico com ligações do tipo β (1 \rightarrow 3) substituídos em C4 por trissacarídeos de α -L-fucoses (1 \rightarrow 3) ligados. Algumas são substituídas no carbono C4 por grupos sulfatos e no C2 por dissacarídeos constituídos de β (1 \rightarrow 4) de xilose, sendo assim denominada de xilofucoglucuronana (Figura 1).

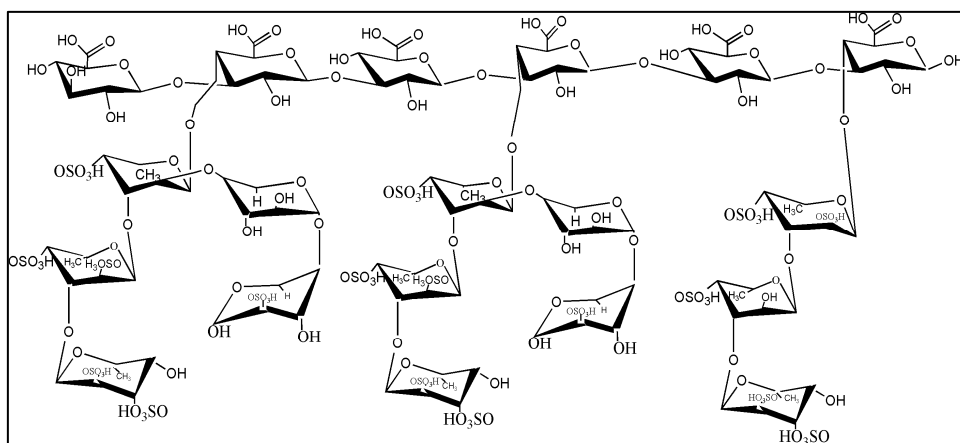


Figura 1. Estrutura da fucana A da alga marrom *S. schröderi* (Leite et al., 1998).

Barroso et al. (2008) ao trabalhar com a fucana A da alga *S. schröderi*, observaram que esta não apresentava atividade anticoagulante em vários ensaios *in vitro*. Este foi um resultado surpreendente considerando o conteúdo de sulfato dos polissacarídeos. Possivelmente, a presença de unidades de xilose não sulfatada, nas regiões terminais não reduzidas encontradas nas ramificações deste polissacarídeo poderia impedir a interação da fucana com cofatores da coagulação e suas proteases alvo.

Quando a fucana A foi testada em um modelo experimental de trombose em ratos, após administração intravenosa, não foi observado nenhuma atividade antitrombótica. Porém, 8 horas após a injeção intravenosa e até mesmo 24 horas após essa administração, a fucana A mostrou significativa atividade antitrombótica, sendo observado um efeito dose-dependente alcançando a saturação ao redor de 20 $\mu\text{g/g}$ de peso de rato. A fucana A também apresentou um efeito tempo-dependente, alcançando a saturação por volta de 16 horas após a sua administração.

Esses autores também demonstraram que a fucana A também possuía atividade antitrombótica quando administrada por outras vias (subcutânea, intramuscular e intraperitoneal). A massa necessária para se ter o efeito antirombótico foi semelhante em todas as vias utilizadas (20 $\mu\text{g/g}$ de peso de rato). A única exceção foi observada pela via oral, a qual não mostrou nenhuma atividade antitrombótica (Tabela 3) (BARROSO et al., 2008).

Tabela 3. Atividade antitrombótica da fucana A da alga *S. schröderi*.

Via de administração	Fucana A	Peso do trombo
Oral	1 $\mu\text{g/g}$	12,0 mg \pm 0,5
	10 $\mu\text{g/g}$	10,5 mg \pm 0,7
	20 $\mu\text{g/g}$	11,9 mg \pm 0,3
Subcutâneo	1 $\mu\text{g/g}$	12,0 mg \pm 0,3
	10 $\mu\text{g/g}$	6,5 mg \pm 0,6 *
	20 $\mu\text{g/g}$	0,0 mg *
Intramuscular	1 $\mu\text{g/g}$	11,5 mg \pm 0,4
	10 $\mu\text{g/g}$	8,5 mg \pm 0,6 *
	20 $\mu\text{g/g}$	0,0 mg
Intraperitoneal	1 $\mu\text{g/g}$	11,2 mg \pm 0,7
	10 $\mu\text{g/g}$	5,8 mg \pm 0,9 *
	20 $\mu\text{g/g}$	0,0 mg *
Intravenoso	1 $\mu\text{g/g}$	11,8 mg \pm 0,5
	10 $\mu\text{g/g}$	6,3 mg \pm 0,3 *
	20 $\mu\text{g/g}$	0,0 mg

* $p < 0,001$ vs o controle. Extraído de Barroso et al. (2008)

A fucana A também não mostrou qualquer efeito sobre a agregação plaquetária quando comparados com outros componentes, como ADP, colágeno e fucoidan de *F. vesiculosus* (BARROSO et al., 2008).

Para se verificar o estímulo da síntese de heparan sulfato, células endoteliais foram colocadas na presença e na ausência de fucana A e de outros polissacarídeos sulfatados (heparan sulfato, heparina, condroitim 4-sulfato, condroitim 6-sulfato, dermatan sulfato e o fucoidan da alga *F. vesiculosus*). Foi observado que apenas a heparina e a fucana A estimulavam a síntese de heparan sulfato, sendo 2 vezes maior do que a quantidade de heparan sulfato liberado no meio pelas células controle. O condroitin 4-sulfato e 6-sulfato, dermatan sulfato, fucoidan e o heparan sulfato não causaram aumento na quantidade de heparan sulfato presente no meio (BARROSO et al., 2008).

Várias fucanas possuem atividade antitrombótica *in vivo*. Uma fucana da alga *Ascophyllum nodosum* exibe atividade antitrombótica após 10 minutos de sua administração, com 1,8 µg/g, dose que faz com ela iniba em 80% formação de trombo induzida por Xa (MAURAY et al., 1995). Millet et al. (1999) mostraram que fucanas (20 µg/g) de baixo peso molecular dessa mesma alga inibem a formação de trombo após 2 horas da administração subcutânea. Essa atividade se manteve estável durante 4 horas, mas desapareceu após 8 horas. Contudo, todas essas fucanas apresentam atividade anticoagulante *in vitro*, o que justifica apresentarem atividade antitrombótica *in vivo* como também o fato dessa desaparecer depois de poucas horas.

A fucana A por outro lado não apresentou atividade antitrombótica poucos minutos após a sua administração. Só veio apresentar atividade mensurável por volta de 4 horas após a sua administração. Porém essa atividade se manteve constante por várias horas da sua administração. Acredita-se que essa atividade antitrombótica da fucana A se mostra diferente das outras fucanas porque ela precisa estimular a síntese de um composto antitrombótico, no caso um heparan antitrombótico (BARROSO et al., 2008). Esta propriedade é rara e só foi observada para poucos compostos (NADER et al., 2004; ROCHA et al., 2005) o que dá a fucana A um grande potencial como composto antitrombótico.

1.2. Toxicidade

A avaliação de segurança de inúmeras moléculas depende principalmente dos resultados obtidos através de testes de toxicidade *in vivo* e *in vitro*. São testes que identificam os possíveis efeitos adversos da exposição a agentes químicos ou ambientais, desenvolvendo as relações de dose-resposta que possam elucidar a gravidade dos efeitos associados com a conhecida exposição, para poder prever os efeitos a exposição humana (CTTAEA, 2006; BENFORD, 2008).

Esses ensaios normalmente são realizados de acordo com protocolos padrão de agências reguladoras que definem os diversos tipos de testes a serem realizados. Uma dessas agências, a OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), sugere alguns tipos de testes toxicológicos que devem ser utilizados (dependendo do objetivo do experimento); os quais podemos citar: toxicidade aguda, subcrônica e crônica, e testes de genotoxicidade (OECD, 1998).

Nos estudos de toxicidade aguda, subcrônica e crônica o tempo de exposição à substância a ser testada é um dos parâmetros de análise mais relevantes. Para a toxicidade aguda, a dosagem da substância pode ser única ou múltipla e administrada por qualquer via em um curto período de tempo, normalmente durante 24 horas. Na toxicidade subcrônica, as exposições são diárias e repetidas, também por qualquer via, durante aproximadamente 10% do tempo de vida do animal ou por alguns meses. Enquanto que, para a toxicidade crônica as exposições são por um período longo de tempo, geralmente durante toda a vida do animal ou cerca de 80% do tempo de vida (PIMENTEL et al., 2006).

Os testes de genotoxicidade, por sua vez, fornecem informações quanto ao risco de dano ao DNA provocados pelos agentes tóxicos. De posse deste conhecimento, podem-se propor medidas de controle, prevenção ou até mesmo proibição do uso de substâncias químicas avaliadas, resultando em melhor qualidade de vida representando um novo aspecto de estudo na ciência genética, contribuindo para o manejo adequado de diversos produtos que representam risco à saúde humana e animal em geral (EPA, 1986; ROLL, 2005; BAJPAYEE et al., 2005).

Dentre os inúmeros testes de triagem feitos para se detectar efeitos genotóxicos, podemos citar o teste do cometa (SINGH et al., 1988) e o teste de Kado (KADO et al., 1983). O teste do cometa, na sua versão alcalina, detecta quebras de fita simples e sítios álcali-lábeis no DNA de células individuais. Tal detecção é possível porque ocorre uma migração do DNA do núcleo, que é proporcional aos danos sofridos por ele, e a imagem obtida com esta migração se assemelha a um cometa, por isso a denominação do teste (SPEIT & HARTMANN, 1999). Já o teste de Kado, que é uma modificação do teste de Ames clássico, avalia se determinado composto químico ou misturas complexas induzem mutações no genoma dessa bactéria pela reversão do fenótipo histidina negativo (*his* -) para histidina (*his*+), na presença ou ausência de sistemas metabólicos de ativação (fração microssomal S9) utilizando diferentes linhagens da bactéria *Salmonella typhimurium* (KADO et al., 1983; MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

1.2.1. Toxicidade de polissacarídeos e seus monômeros

Estudos de toxicidade de polissacarídeos não são tão abundantes, mas a maioria mostra que esses compostos são atóxicos.

Trabalhos com a gentiobiose, por exemplo, carboidrato extraído da fruta gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) não demonstraram mutagenicidade através do teste de Ames com as cepas TA98 e TA100 com e sem S9 (OZAKI et al., 2002). O mesmo foi observado para a oligofrutose (família de oligossacarídeos derivados da hidrólise da inulina) utilizando as cepas TA98, TA100, TA1535 e TA1537, inclusive na dose máxima testada de 5000 µg/placa (BOYLE et al., 2008).

Segundo LINA et al. (2002) a isomaltulose, um dissacarídeo de ocorrência natural (mel, cana-de-açúcar, etc) também não apresentou mutagenicidade com o teste de Ames com as cepas TA1535, TA98, TA100, TA1537 e TA1538 em quatro diferentes doses utilizadas (100 a 4000 µg/placa) na presença e ausência de ativação metabólica.

Xantanas, heteropolissacarídeo produzido por bactérias do gênero *Xanthomonas*, são bastante utilizadas na indústria alimentícia. Ensaio de cometa demonstraram que elas não produziram danos em DNA em células sanguíneas de camundongos que receberam esses compostos oralmente por 24 e 48 horas.

Os grupos receberam as xantanas 1, 2 e 3 (cepa 06, 24 e comercial, respectivamente) em uma solução aquosa a 1% (m/v) na dose de 0,1µg/g de massa corpórea de cada animal (ROLL, 2005).

Trabalhos com monossacarídeos como a D-xilose (IMAZAWA et al., 1999), D-ribose (GRIFFITHS et al., 2007) e mananas de *Saccharomyces cerevisiae* (KRIZKOVA et al., 2006) também não mostraram atividade mutagênica e genotóxica desses compostos.

Por sua vez, os polissacarídeos encontrados em fungos também têm sido testados para verificação de ações tóxicas, pois esses polissacarídeos apresentam inúmeras atividades biológicas importantes. Como por exemplo, o extrato aquoso rico em polissacarídeo do fungo *Agaricus blazei* (cogumelo do sol) que através dos ensaios de micronúcleo e aberração cromossomal em células CHO e HCT não demonstraram ação genotóxica, pelo contrário, mostraram que esses extratos possuem capacidade protetora contra danos no material genético (BELLINI et al., 2006).

Esses resultados passam uma visão de que polissacarídeos apresentam baixa toxicidade. Entretanto, alguns trabalhos mostram que polissacarídeos e monossacarídeos não são tão atóxicos como se pensava anteriormente. Pesquisas com a sacarose (na concentração de 13,45%), por exemplo, mostraram que este aumenta o nível de *background* de mutações somáticas no epitélio do cólon de ratos (HANSEN et al., 2008; MOLLER et al., 2003; DRAGSTED et al., 2002; GIOVANNUCCI, 2001), indicando que mesmo alguns açúcares comuns apresentam potencial genotóxico.

1.2.2. Toxicidade de polissacarídeos de algas

Apesar de serem atribuídas diversas atividades biológicas de polissacarídeos de algas desde meados da década de 30 do século passado (KLOAREG e QUATRANO, 1988) estudos de toxicidade desses compostos foram escassos e indicavam que esses polímeros não apresentavam toxicidade mesmo em concentrações elevadas. Contudo, estudos mais recentes apontaram para a toxicidade desses polímeros algais, como por exemplo, o trabalho de Barga et al. (2006). Neste trabalho demonstrou-se aumento dos níveis de quebra de fitas

simples de DNA em leucócitos de trutas arco-íris que foram expostas a 0,5% de extratos aquosos da alga vermelha *Polysiphonia fucoides*. Extratos aquosos de algas são ricos em polissacarídeos sulfatados. Contudo, os autores do trabalho não realizam estudos químicos que confirmassem ou não a presença desses polímeros no extrato utilizado.

Apenas no ano de 2008 é que foram publicados dois trabalhos que demonstraram a toxicidade de polissacarídeos algais: polissacarídeos sulfatados da alga vermelha *Champia feldmannii* quando administradas baixas doses (20 µg/g de animal) em camundongos Swiss pela via oral durante sete dias consecutivos, provocaram mudanças morfológicas e histológicas no fígado e nos rins dos animais tratados (LINS et al., 2009); e ácidos algínicos da alga marrom *Sargassum vulgare* induziram necrose no epitélio de túbulos renais de ratos tratados pela administração oral nas concentrações de 50 e 100 µg/g de alginato. Entretanto esses efeitos foram reversíveis (SOUSA et al., 2007; 2008).

Por outro lado, estudos recentes também mostram que extratos ricos em polissacarídeos e polissacarídeos de outras algas não possuem toxicidade. Aliás, alguns dados mostram até um efeito contrário, como por exemplo, uma atividade antimutagênica foi detectada no extrato polissacarídico da alga vermelha *Porphyra tenera* quando se expôs *Salmonella typhimurium* (TA1535/pSK 1002) a um mutágeno concomitantemente com o extrato (OKAI et al., 1996).

Estudos com fucanas têm demonstrado até agora que estes polissacarídeos não são tóxicos. Segundo Gamal-Eldeen et al. (2009) extratos ricos em polissacarídeo (10 µg/mL) da alga marrom *Sargassum latifolium* inibiram a indução de danos no DNA, medido através do ensaio cometa com linfócitos humanos.

Trabalhos com fucanas de *Fucus vesiculosus* (ZARAGOZA et al., 2008), *Cladosiphon okamuranus* (GIDEON & RENGASAMY, 2008) e *Laminaria japonica* (LI et al., 2005) demonstraram que esses polímeros, mesmo em concentrações muito altas (2.000 µg/g de animal) não apresentavam toxicidade *in vivo* quando administrados em ratos em ensaios de toxicidade aguda para as duas primeiras algas, e aguda e subcrônica para a *L. japonica*.

Os dados publicados até o momento referente a polissacarídeos de algas demonstram que esses polímeros podem ser tóxicos ou não. Esses polímeros são descritos com potencial farmacológico e/ou biotecnológico. Para esse

potencial se concretizar vários estudos precisam ser realizados, dentre eles estudos de toxicidade desses polímeros.

Dentre os polissacarídeos de algas com esse potencial farmacológico/biotecnológico, tem-se a fucana A, objeto de estudo desta dissertação, que possui um alto potencial como composto antitrombótico (BARROSO et al., 2008). Contudo, nenhuma avaliação toxicológica deste polímero foi relatada para prover dados necessários para avaliação de risco à saúde e possíveis efeitos de sua exposição. Essa avaliação se faz necessária para que se caminhe em direção a uma possível utilização da fucana A como fármaco.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar a toxicidade da fucana A da alga marrom *Spatoglossum schröderi* através de testes *in vitro* e *in vivo*.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar e purificar a fucana A da *S. schröderi* utilizando uma metodologia já desenvolvida pelo nosso grupo;
- Avaliar o potencial genotóxico da fucana A através dos testes de cometa com células de ovário de hamster (CHO);
- Avaliar o potencial mutagênico da fucana A através do teste de Kado com linhagens de *Salmonella typhimurium*;
- Avaliar parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos que indiquem a presença de toxicidade *in vivo*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material Biológico

3.1.1. Alga marinha marrom *Spatoglossum schröderi*

Classe *Phaeophyceae*

Ordem *Dictyotales*

Família *Dictyotaceae*

Gênero *Spatoglossum*

Spatoglossum schröderi (C. Agardh) Kützing, 1859



Figura 2. Alga marrom *Spatoglossum schröderi* (Foto: Nednaldo Dantas dos Santos).

A alga marrom da espécie *S. schröderi* (Figura 2) foi coletada em marés baixas entre 0,0-0,2 m a uma temperatura entre 28-30°C na praia de Búzios no município de Parnamirim (litoral sul do Rio Grande do Norte) situada à 20 Km de Natal. A alga foi acondicionada em sacos de polietileno, levada ao laboratório (BIOPOL – Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais) no mesmo dia da coleta, lavada em água corrente, examinada cuidadosamente para que ficasse livre de epífitas, inclusões calcárias e sais. Esta alga foi posta para secar em estufa aerada a 45°C e em seguida, triturada, pesada e guardada em frascos hermeticamente fechados.

3.1.2. Animais experimentais e condições do biotério

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*). Os animais pesavam entre 250 a 300 g e separados em grupos controle e tratado (n=6). Os ratos foram fornecidos pelo Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRN (Natal, RN). Estes animais foram mantidos em ciclo de 12 horas de claro/escuro, temperatura entre $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ com ração e água a vontade durante o período dos experimentos. A utilização destes animais obedeceu a princípios éticos e metodológicos aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL, UFRN) sob o protocolo – 082/07 (ver anexo).

3.2. Outros materiais

3.2.1. Reagentes

- 1,3 diamino propano acetato, da Aldrich Chemical Co. Inc. (Milwake, WI, EUA);
- 2-aminoantraceno, 4-nitroquinolina-1-óxido, azida sódica, azul de tripan, azul de toluidina, vermelho de cresol, coomasie blue R 250, brometo de etídio, cloreto de magnésio, cloreto de potássio, D-biotina, D-glucose-6-fosfato de sódio, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenodiamino tetracetato (EDTA), Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato de sódio, L-histidina monohidratada, tetraciclina, β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (β -NADP), tris(hidroximetil)aminometano, xilose, L-fucose, D-xilose, D-galactose, D-manose, D-glucose, D-arabinose, D-ramnose, ácido D-glucurônico, ácido D-galacturônico, heparam sulfato, condroitim sulfato, dermatam sulfato oriundos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA);
- Acetona, metanol, etanol, da Qeel (São Paulo – SP);
- Ácido acético, cloreto de sódio, eosina azul de metileno, hematoxilina e paraformaldeído PA foram obtidos da VETEC (Rio de Janeiro – RJ);
- Ácido cítrico, ácido sulfúrico, ácido clorídrico, cloreto de sódio, sulfato de magnésio, fosfato de potássio dibásico anidro, fosfato de sódio

- dibásico, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio e amônia, glicose da Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Agarose Low-Melting (Nucleic Acid Recovery/Molecular Biology Grade) da Fisher BioReagents (Reino Unido);
 - Agarose, adquirida da Bio Agency (São Paulo – SP);
 - Álcool 96º, da Sertanejo (Dix Sept Rosado – RN);
 - Bacto Agar Difco. (Difco, USA);
 - Meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Médium) da Cutilab, (Campinas-SP, Brasil);
 - Fosfato de potássio bibásico anidro P.A. (K_2HPO_4) da Synth (Diadema-SP, Brasil);
 - Kensol (Cloridrato de xilazina - 10ml) e Vetanarcol (Cloridrato de ketamina - 50ml) da König S.A. (Buenos Aires, Argentina);
 - Nutrient Broth No. 2- Oxoid da Oxoid Ltd (Hampshire - England);
 - Parafina pura. Biotec (São Paulo, SP)
 - Resina de troca iônica Lewatite adquirida da Bayer. (Olimpia, São Paulo, Brasil);
 - Triton X-100. (USB-Corporation. Cleveland, USA).

Todos os demais materiais e reagentes utilizados foram da melhor qualidade disponível.

3.2.2. Equipamentos

- Agitador de tubos mod. AP 56, Autoclave vertical, Contador de colônias CP 600-Plus da Phoenix Ltda (Araraquara, SP, Brasil);
- Balanças, Bomba de Vácuo, Estufa com circulação e renovação de ar/TE 394/2, Incubadora (Shaker)/TE 420 da TECNAL (Piracicaba, SP, Brasil);
- Banho-Maria de temperatura constante da FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil);
- Banho-seco. Thermolyne. Dryi-Bath. Barnstead. Thermolyne – 2555.

- BIOPLUS 2000. Analisador bioquímico semi-automático modelo BIO-2000 (São Paulo, SP).
- Bombas peristálticas Microperpex S modelo 2232 da LKB (Bromma, Suécia);
- 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);
- Destilador de água MA-270 da Marconi Ltda (Piracicaba, SP, Brasil);
- Espectrofotômetro da FEMTO Ltda (São Paulo, SP, Brasil);
- Estufa da Odontobrás Ltda. (Ribeirão Preto, SP, Brasil);
- Fluxo laminar vertical. VECO (Campinas, SP-Brasil);
- Fontes de corrente contínua da BioAgency Biotecnologia Ltda. (São Paulo, SP, Brasil);
- Horiba ABX Micros 60. Analisador hematológico. GMI, Inc. (Ramsey, Minnesota, USA);
- Incubadora de CO₂ Thermoforma (São Paulo, SP-Brasil);
- Medidor de pH da PHS-3B da PHTEK (Japão);
- Microscópio Invertido NIKON Eclipse TE300;
- Microondas Panasonic
- Micrótomo, modelo 820, da América Optical Company (New York, EUA);
- Purificador de água Milli-Q® Water System da Millipore Corp. (Bedford, MA, USA);
- Câmara de Neubauer. Improved.

3.3. Extração e purificação da fucana A

3.3.1. Obtenção do pó cetônico

A alga utilizada neste trabalho foi submetida à despigmentação e delipidação, com a adição de quatro volumes de acetona PA. Esta solução ficou à temperatura ambiente durante o período de 24 horas. Posteriormente, a mistura foi decantada e o resíduo colocado para secar. Esse resíduo, denominado de “pó cetônico”, foi utilizado em seguida na proteólise.

3.3.2. Proteólise

Para a realização desta etapa, foram adicionados dois volumes de NaCl 0.25M ao pó cetônico (aprox.100 g) e seu pH ajustado para 8,0 com NaOH. A este material foi adicionada a enzima proteolítica prozima (15 mg por grama de pó cetônico). Esta suspensão permaneceu em banho-maria a 60°C durante um período de 16 horas. Depois, este foi filtrado e o sobrenadante submetido a uma centrifugação (10.000 x g, durante 15 minutos à 4°C). Após a centrifugação, o sobrenadante, que contém todos os polissacarídeos solúveis foi denominado de extrato bruto de polissacarídeos.

3.3.3. Fracionamento com acetona

O extrato bruto de polissacarídeos foi fracionado com volumes crescentes de acetona, obtendo-se as frações polissacarídicas. Os valores de acetona adicionados foram determinados pela turvação da solução, que caracteriza a precipitação de polissacarídeos devido à adição desse solvente apolar. Adicionou-se 0,5 volumes de acetona, sob agitação leve, necessário para que se visualizasse uma turvação da solução, essa solução foi mantida em repouso a 4°C durante 18 horas, o precipitado foi coletado por centrifugação a 10000 x g por 15 minutos a 4°C e seco a pressão reduzida.

Esse procedimento foi repetido até que não se visualizasse mais a formação de precipitado, obtendo-se deste modo as seguintes frações denominadas de: F0.5, F0.6, F0.7, F0.9, F1.1, F1.3 e F2.0, que correspondem, às frações precipitadas com 0.5, 0.6, 0.7, 0.9, 1.1, 1.3, 2.0 volumes de acetona, respectivamente.

3.3.4. Cromatografia em coluna de troca iônica

A fração cetônica F0.6 (que contém fucana A) foi submetida à complexação com a resina de troca iônica Lewatite (10 mg de material para cada 1,0 mL de resina) e a eluição foi realizada passo a passo utilizando-se molaridades crescentes de NaCl, como descrito por Dietrich et al. (1995).

Foram coletadas frações, com volume total de três vezes o volume da resina, para cada molaridade de sal (0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0 e 3.0 M), as quais foram separadas pela ausência de positividade para o método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). O fluxo de coleta foi de 1 mL/min, sendo o volume de eluição igual para todas as molaridades coletadas.

As frações coletadas foram precipitadas com 2 volumes de metanol PA a 4°C e deixadas por 18 horas, sendo posteriormente, coletados por centrifugação a 10.000 x g, por 15 minutos e secos a pressão reduzida. As frações precipitadas com metanol e secas foram submetidas a eletroforese, com gel de agarose para visualização de sua mobilidade eletroforética segundo Leite et al. (1998) e Barroso et al. (2008).

3.3.5. Eletroforese em gel de agarose

O gel de agarose (0,6%) foi diluído em tampão 1,3 diamino propano acetato (PDA), e colocado sobre lâminas de vidro medindo 7,5 x 5,0 x 0,2 ou 7,5 x 10 x 0,2. Alíquotas de 5 µl das frações (50 µg) foram aplicadas em canaletas no gel e submetidas a uma corrente contínua de 5 V/cm durante uma hora, em uma cuba resfriada a 4°C (DIETRICH & DIETRICH, 1976).

Decorrido o tempo previsto de migração eletroforética, os compostos presentes nas frações foram precipitados no gel de agarose com Cetavlon 0,1% por um tempo mínimo de 2 horas, à temperatura ambiente.

Em seguida, o gel foi desidratado sob uma corrente de ar quente contínua, 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%.

A revelação das bandas polissacarídicas foi feita pela capacidade do azul de toluidina interagir com o sulfato presente nos polissacarídeos. Os compostos ricos em sulfato desenvolvem coloração roxa característica.

3.4. Análises químicas

Em cada análise química as frações e o padrão foram submetidos às mesmas condições experimentais, sendo realizada uma curva em cada análise (com os seus respectivos padrões) para efeito quantitativo.

3.4.1. Ácidos urônicos

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

3.4.2. Fucose

Os teores de fucose foram determinados de acordo com o método de Dische (1962) para 6-desoxi-oses, usando-se como padrão L-fucose. O período de aquecimento foi de 10 minutos e as leituras foram realizadas após 30 minutos à temperatura ambiente.

Para eliminar a interferência de ácidos urônicos e pentoses, foram realizadas leituras dicromáticas a 400 e 430 nm, sendo a concentração de fucose uma função linear.

3.4.3. Xilose

Os teores de xilose foram determinados por reação colorimétrica específica para aldo-pentoses propostas por Dische (1962), usando-se como padrão D-xilose. Foi utilizado o método do floroglucinol/ ácido acético/ HCl. Somente aldo-pentoses desenvolvem a cor púrpura, porém ácidos urônicos e hexoses podem contribuir para a absorção a 552 nm. Esta interferência foi eliminada por leituras dicromáticas a 552 e 510 nm.

3.4.4. Açúcares totais

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.

3.4.5. Sulfato

O sulfato total foi medido após hidrólise ácida (HCl, 6 horas, 100°C) e foi quantificado por turbidimetria pelo método da gelatina-bário (DODGSON; PRICE, 1962). Sulfato de sódio (1,0 mg/mL) foi empregado como padrão.

3.4.6. Proteínas

Foi determinada com o reagente Comassie Blue R segundo o método de Spector (1978), sendo a leitura realizada a 595 nm.

3.4.7. Espectroscopia de infravermelho

A espectroscopia de infravermelho foi realizada com um espectrômetro Perkin-Elmer de 4400 a 400 cm^{-1} . A fucana A (5 mg) foi analisada após secagem em aparelho de Abdenhalden sob a forma de pastilha de KBr contendo P_2O_5 a 60°C.

3.5. Toxicidade *in vitro*

3.5.1. Ensaio de cometa

3.5.1.1. Cultura de células

Células de ovário de hamster Chinês (CHO-K1) foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram mantidas em ambiente estéril a 5% de CO_2 . Após o estabelecimento da cultura celular, as células foram tratadas com a fucana A nas

concentrações de 20, 500 e 1000 µg/mL. Utilizou-se o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como controle positivo na concentração de 100 µM e água ultra pura (Mili-Q) como controle negativo, no mesmo volume das outras soluções teste. Após 24 horas de tratamento, as células foram colhidas, centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura. Cada tratamento foi feito em triplicata em placas de 24 poços.

3.5.1.2. Viabilidade Celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado com as células CHO, para todos os tratamentos, utilizando método de coloração de azul de tripan. O número de células vivas e de células mortas (coradas em azul) foi quantificado em Câmara de Neubauer.

3.5.1.3. Ensaio

O ensaio de cometa foi realizado em concordância com as premissas estabelecidas por Singh et al. (1988) e de acordo com o protocolo descrito por Tice et al. (2000) com algumas modificações.

Após o tratamento e colheita das células (descrito no item 3.5.1.1), 10 µL da suspensão celular, de cada tratamento, foram homogeneizados com 75 µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) a 0,5% e mantida a 37°C. A mistura foi distribuída sobre lâminas de microscopia, pré-gelatinizadas com agarose de ponto de fusão normal a 1,5%. As lâminas foram cobertas com lamínula e mantidas sob resfriamento a 4°C para solidificação do gel. Depois de 15 minutos, as lamínulas foram retiradas e as lâminas imersas em solução de lise gelada (2,5 M NaCl; 10 mM Tris; 100 mM EDTA; 1% de Triton X-100; 10% de DMSO) em recipiente protegido da luz por 24 horas e sob refrigeração (4°C), para lise das membranas celulares.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS gelado (4°C), dispostas na cuba de eletroforese e cobertas com tampão de eletroforese (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, a pH>13), sendo mantidas no escuro em banho de gelo por aproximadamente 20 minutos a 4°C para desnaturação alcalina do DNA. Em seguida, as lâminas foram submetidas à eletroforese a 300 mA, 25 V por 30

minutos, neutralizadas com tampão Tris-HCl 0,4 M (pH 7,5) e fixadas em etanol absoluto sendo posteriormente armazenadas em refrigerador.

As lâminas foram coradas no momento da análise com 50 μ L de brometo de etídio (20 μ g/mL) e cobertas com lamínulas. A leitura foi feita em microscópio de fluorescência (Nikon, modelo E600) com grau de excitação de fluorescência de 590 nm e aumento de 400 vezes.

Através de software específico para o ensaio cometa (Comet Assay IV) foram analisados 100 nucleóides por lâmina (três lâminas para cada tratamento) proveniente da parte central do gel; as bordas da lâmina, ao redor de bolhas de ar ou células apoptóticas não foram contabilizadas. O potencial genotóxico foi dado pela quantificação do *tail length* (extensão da cauda do cometa) e pelo *tail moment* (momento da cauda= Tail length x %Tail DNA). Quanto maior a cauda, maior o número de danos no genoma e maior o potencial genotóxico da substância teste (Figura 3).

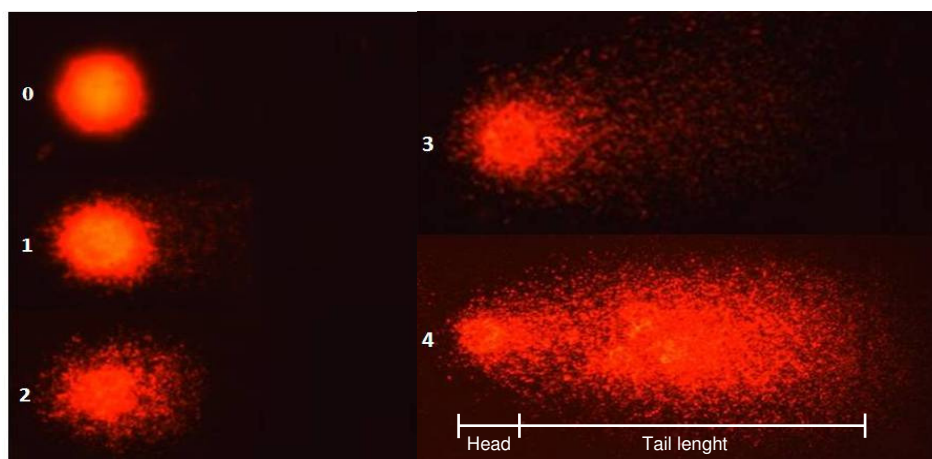


Figura 3. Microscopia de fluorescência dos nucleóides de células de ovário de hamster (CHO) submetidas ao ensaio cometa. Células com diferentes níveis de danos no DNA coradas com 50 μ L de brometo de etídio (20 μ g/mL). O nível 0 representa nucleóides sem danos; nível 1, com danos mínimos; nível 2 com danos médios; nível 3, com danos intensos e o nível 4, os nucleóides com o máximo de dano. (Aumento de 40x).

3.5.2. Teste de Kado (Ensaio de microssuspensão com *Salmonella*)

3.5.2.1. Linhagens bacterianas utilizadas

Foram utilizadas as linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, cedidas pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento

Ambiental de São Paulo, SP, Brasil). Os genótipos de todas as cepas bacterianas empregadas estão resumidos na Tabela 4. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Análise Mutagênica de Água (LAMA), UFRN, com a colaboração da Dra. Silvia Regina Batistuzzo de Medeiros.

As linhagens de *S. typhimurium* foram mantidas em microtubos à temperatura de -80°C para que se mantivessem inalteradas todas as suas características genéticas. As características de dependência da histidina, presença de mutação *rfa*, presença de deleção *uvrB*, presença de plasmídios de resistência e taxa de reversão espontânea foram checadas rotineiramente antes do preparo dos estoques para congelamento de acordo com Maron e Ames (1983) e Mortelmans e Zeiger (2000).

Tabela 4. Características genéticas das linhagens de *S. typhimurium* utilizadas teste de Kado.

Linhagens	Genótipo	Tipo de mutação	Referências
TA97a	<i>hisD6610</i> ¹ , <i>rfa</i> ² , Δ <i>uvrB</i> ³ , <i>bio</i> ⁻⁴ , pKM101 (Ap ^r) ⁵	deslocamento do quadro de leitura	(Maron e Ames, 1983)
TA98	<i>his D3052</i> , <i>rfa</i> , Δ <i>uvrB</i> , <i>bio</i> ⁻ , pKM101 (Ap ^r) ⁵	deslocamento do quadro de leitura	(Maron e Ames, 1983)
TA100	<i>his G46</i> , <i>rfa</i> , Δ <i>uvrB</i> , <i>bio</i> ⁻ , pKM101(Ap ^r) ⁵	Substituição de pares de base	(Maron e Ames, 1983)
TA102	<i>his G428</i> , <i>rfa</i> , pKM101 (Ap ^r , pAQ1, Tt ^r) ⁶	Substituições de pares de base	(Maron e Ames, 1983)

¹ *his*: mutação responsável pela síntese da histidina

² *rfa*: permeabilidade da membrana de lipopolissacarídeo

³ Δ *uvrB*: deleção do gene *uvrB*

⁴ *bio*⁻: dependência à biotina

⁵ plasmídeo de resistência a ampicilina

⁶ plasmídeos de resistência a ampicilina e a tetraciclina

3.5.2.2. Controles positivo e negativo do teste de Kado

O ensaio é feito sempre com controles negativos e positivos, de forma a assegurar a capacidade de resposta da linhagem e a eficiência do sistema de ativação metabólica (MARON & AMES, 1983). O controle negativo foi o solvente

utilizado para dissolver as amostras (UMBUZEIRO & VARGAS, 2003). Neste experimento, o solvente utilizado foi água ultra pura autoclavada (Mili-Q). O volume do controle negativo foi o mesmo utilizado para as amostras teste. O controle negativo é necessário para estabelecer o número de colônias revertentes espontâneas (MARON & AMES, 1983).

Utilizam-se como controles positivos, compostos mutagênicos específicos para cada linhagem em concentrações definidas (MARON & AMES, 1983; UMBUZEIRO & VARGAS, 2003). A tabela 5 lista os controles positivos e suas respectivas concentrações, utilizadas para as linhagens de *Salmonella typhimurium* neste estudo.

Tabela 5. Controles positivos utilizados neste ensaio para as linhagens *S. typhimurium* com e sem ativação metabólica.

Ensaio	Mutágeno	Solvente	Concentração ($\mu\text{g/placa}$)	Linhagens
Sem ativação (+S9)	4-nitroquinolina 1 – óxido (4-NQO)	água ultra pura autoclavada (Mili-Q)	0,1	TA97a e TA98
	azida sódica	água ultra pura autoclavada (Mili-Q)	1,0	TA100
	Mitomicina C	água ultra pura autoclavada (Mili-Q)	0,5	TA102
Com ativação (+S9)	2-aminoantraceno (2-AA)	água ultra pura (Mili-Q)	0,1	TA97a,TA98, TA100 e TA102

3.5.2.3. Curva de toxicidade

A curva de toxicidade deve ser realizada anteriormente aos ensaios de Ames ou Kado para determinação de concentrações citotóxicas (DL_{50}), e partir delas selecionar concentrações inferiores. Este resultado possibilita identificar quais as concentrações serão mais viáveis (taxa de sobrevivência bacteriana), visto que se for tóxico o resultado de mutagênese pode ser interpretado de forma

incorreta. A curva deste trabalho foi feita utilizando a cepa TA98 (apresenta maior sensibilidade aos agentes dentre as linhagens utilizadas no teste de Kado) em quatro diluições (2×10^{-5} , 2×10^{-6} , 2×10^{-7} e 2×10^{-8} bactérias/mL) e quatro concentrações da fucana A (20, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/placa}$).

3.5.2.4. Ensaio

O ensaio de Kado foi realizado utilizando o protocolo de microsuspenção desenvolvido por Kado et al. (1983), com algumas modificações.

Com auxílio de alça de inoculação, pequena quantidade da cultura estoque congelada foram semeadas em 20 mL de caldo nutriente (Oxoid n. 2) e incubadas por 16-18 horas a 37°C com agitação constante (180 RPM) para que elas atingissem aproximadamente uma densidade de 2×10^9 bactérias/mL. Após esse período de crescimento, a cultura bacteriana foi concentrada por centrifugação a $4000 \times g$ a 4°C durante 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso em 4 mL de tampão fosfato de sódio 0,015 M (pH 7,4).

Após este procedimento, foram adicionados em tubos de ensaio 50 μL dessa suspensão bacteriana, acrescidos novamente de 50 μL de tampão fosfato de sódio 0,015M ou mistura S9 (fração microssomal S9) e 5 μL de cada concentração de fucana A (utiliza-se também o mesmo volume para os controles positivo e negativo). A mistura foi incubada a 37°C por 90 minutos, sem agitação.

Após esse período de incubação, 2,5 mL top-agar (0,6% ágar, 0,6% de NaCl, 0,5% histidina, biotina 0,05 mM, pH 7,4 e a 45°C) foi adicionado aos tubos e, a nova mistura, foi vertida em placas de Petri contendo ágar mínimo (1,5% ágar, 50 mL de Vogel-Bonner 50x e 2% de glicose). As placas de Petri foram incubadas a 37°C por 66 horas, e as colônias revertentes para *his*⁺ foram contadas.

Pela análise da curva de toxicidade, as concentrações utilizadas não provocaram morte das bactérias. Com base nisso, para o teste de kado foram utilizadas concentrações maiores de fucana A (500 e 1000 $\mu\text{g/placa}$), exceto para a concentração de 20 $\mu\text{g/placa}$. Os ensaios com fucana foram feitos em triplicata e os controles positivo e negativo em quintuplicata. Os resultados foram expressos através da média de revertentes por placa e pela razão de mutagenicidade (RM).

$$RM = E/C$$

Onde,

E = número de colônias revertentes da placa teste

C = número de colônias revertentes na placa do controle negativo.

Se o RM for maior ou igual a 2 tem-se que a amostra testada é mutagênica.

$$RM \geq 2$$

3.6. Toxicidade *in vivo*

Além da avaliação toxicológica *in vitro* da fucana A, também foram realizados ensaios toxicológicos *in vivo*. Escolheu-se realizar ensaios de toxicidade subcrônica (dois meses) administrando apenas 20 µg/g por animal.

3.6.1. Estudo da toxicidade em ratos

Foram utilizados 12 ratos Wistar randomicamente divididos em: grupo controle e grupo tratado, ambos com 6 animais (machos) em cada grupo. Ao grupo tratado foi administrado fucana A para a dose de 20µg/g de peso do animal, pela via subcutânea, sendo ministrada uma única dose diária, por um período de 2 meses (62 dias). Essa dose foi escolhida por ser aquela em que essa fucana apresenta atividade antitrombótica *in vivo* segundo Barroso et al. (2008). Os ratos do grupo controle foram tratados com solução salina (0,09%) nas mesmas condições que as utilizadas para o grupo tratado. Após cada administração das soluções, os ratos, em ambos os grupos, foram observados para detecção de sinais clínicos ou sinais anormais de comportamento e pesados uma vez por semana.

3.6.2. Observações comportamentais

Todos os animais foram observados durante os 62 dias de experimento (duas vezes diariamente) para verificação de mortalidade. As observações foram feitas com os ratos dentro das gaiolas e todos os resultados anormais foram

registrados. Os parâmetros que serviram como observações foram: mudanças na pele, olhos e mucosas, ocorrência de secreções e excreções; atividades autônomas, como por exemplo, lacrimação, ereção dos pêlos, respiração anormal, comportamento agressivo, automutilação e disfunção motora.

3.6.3. Análises hematológicas e bioquímicas

Após o período de experimentação relatado em 3.6.1, os animais foram anestesiados e amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca para posteriores análises. A análise hematológica foi realizada utilizando um analisador automático hematologia (Horiba ABX Micros 60) e foram mensurados os seguintes parâmetros: hematócrito, hemoglobina, hemácias, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração hemoglobina corpuscular média (CHCM), leucócitos e plaquetas. Os parâmetros bioquímicos, medidos com um analisador bioquímico automatizado (BIOPLUS 2000), foram: proteína total (TP), albumina (Alb), bilirrubina total (T. Bil), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), γ -glutamil transferase (GGT), colesterol total (TC), uréia, creatinina (Cr) e glicose.

3.6.4. Necropsia e análise histológica

Após a coleta do sangue descrita no item 3.6.3 foi realizada a eutanásia dos animais através da administração de doses elevadas de anestésicos (Ketamina e xilazina - 87mg/Kg e 13mg/Kg, respectivamente). Os tecidos e órgãos foram examinados macroscopicamente em busca de anomalias visíveis. Posteriormente, cérebro, timo, pulmões, coração, baço, fígado, rins, testículos e próstata de todos os animais do grupo controle e tratado foram retirados, pesados e fixados em paraformaldeído tamponado. Após 24 horas, os aparatos foram embebidos em parafina, seccionadas (5 μ m de diâmetro), colocados em lâminas de vidro, e corados com hematoxilina e eosina. As lâminas foram examinadas através de microscopia óptica (objetivas de 20, 40 e 100x).

3.7. Análise estatística

Os resultados numéricos foram expressos em média aritmética (\pm erro-padrão). A análise estatística foi feita comparando o grupo teste (fucana A) com o grupo controle para cada tratamento usando o teste de Mann-Whitney. Diferença de $P < 0,05$ foi considerada significativa. Para os dados que apresentaram distribuição normal ou (Gaussiana), como o teste de Kado e o ensaio cometa, foi utilizado o teste ANOVA com post-hoc de Tukey - Kramer para comparações múltiplas. Diferenças significativas foram aceitas com $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Cromatografia em coluna de troca iônica da F0.6

A fração cetônica F0.6 após submetida a cromatografia de troca iônica (como descrita no item 3.3 de Materiais e Métodos) foi quantificado para verificação do rendimento (Figura 4). A fração 1.0M foi a que apresentou o maior rendimento, seguida das frações 3.0M e 1.5M.

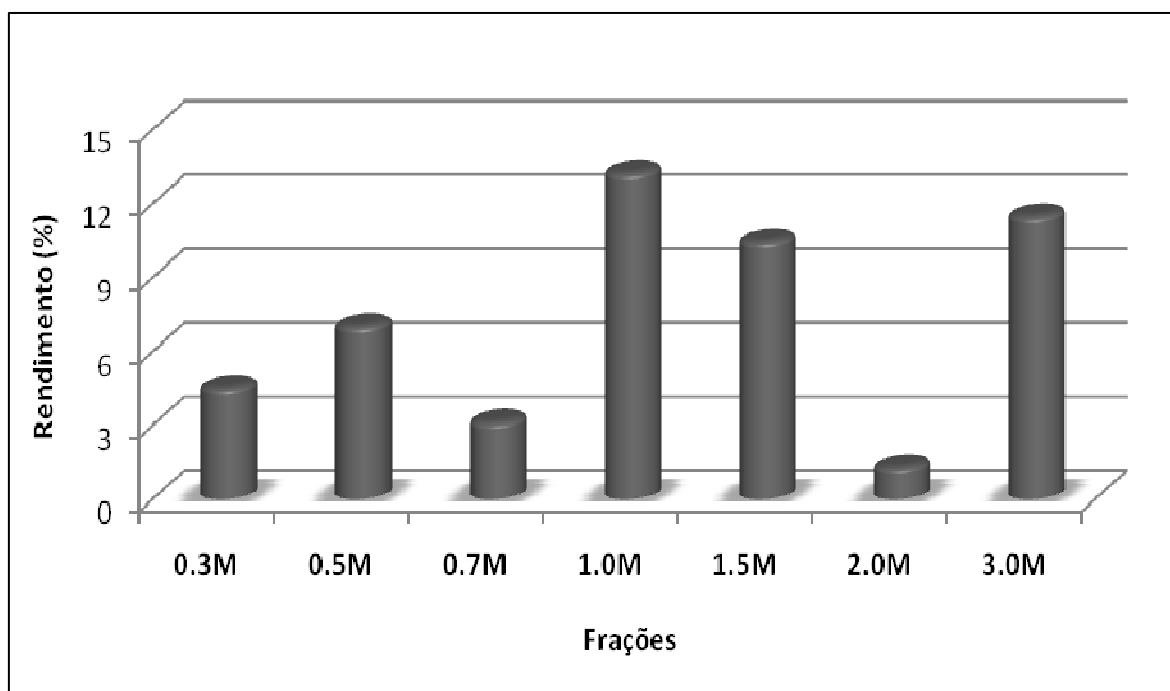


Figura 4. Rendimento das frações da cromatografia de troca iônica. As frações foram eluídas pelo sistema passo a passo com molaridades crescentes de NaCl (0.3 a 3.0M). O valor de 100% corresponde à soma das massas de todas as frações.

4.2. Eletroforese em gel de agarose das frações da troca iônica

As frações obtidas da cromatografia de troca iônica foram submetidas à eletroforese em gel de agarose em tampão PDA (Figura 5). A fração 0.3M apresentou uma banda com mobilidade eletroforética semelhante à fucana A. Provavelmente a presença dessa banda se deu devido o excesso de material que foi aplicado à coluna, já que essa fração corresponde ao material não complexado. A fração 0.5M apresentou a fucana A, mas também apresentou uma banda de maior mobilidade que se coloriu em rosa. Essa banda surgiu

devido a grande quantidade de ácido algínico presente nessa fração. As frações 2.0M e 3.0M apresentaram-se contaminadas pelas fucana B e C.

Na figura 5 abaixo, verifica-se que as frações 0.7M, 1.0M e 1.5M possuem a presença da fucana A em todas elas. Contudo, a fração 0.7M mostrou-se contaminada por alginatos. Apesar das frações 1.0M e 1.5M apresentarem compostos com migração eletroforética semelhante, apenas a fração 1.0M foi utilizada nos experimentos posteriores, pois essa foi eluída com a mesma concentração de sal que a fucana A da alga *S. schroederi* por Leite et al. (1998).

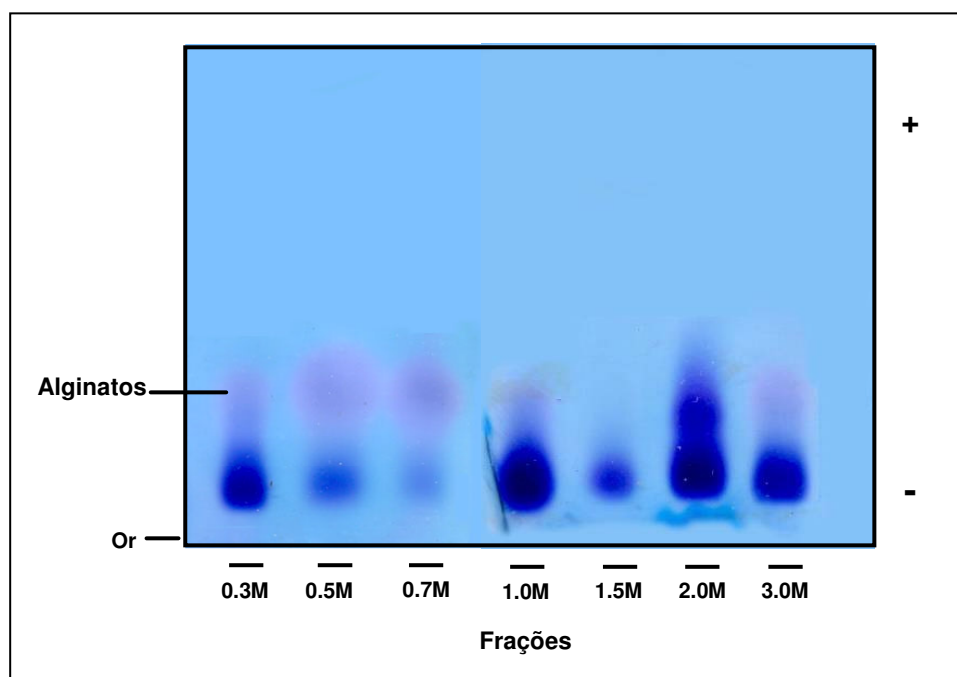


Figura 5. Comportamento eletroforético das frações eluídas na cromatografia em coluna de troca iônica (obtida da fração F0.6) da alga *S. schroederi*. Alíquotas de 5 μ l (50 μ g) das frações provenientes da cromatografia foram aplicadas em lâminas de agarose em tampão PDA 0,05 M, pH 9,0. Após precipitação com CETAVLON as lâminas foram coradas com azul de toluidina. Or. Origem

4.3. Análises químicas

Para se confirmar a identidade da fucana A obtida nesse trabalho em relação com aquela publicada por Leite et al. (1998), ela foi analisada com relação aos seus constituintes monossacarídeos e sulfato. Na tabela 6 resumem-se os dados das análises químicas realizadas. Em uma comparação feita com os dados mostrados nesta tabela, verifica-se que a relação molar dos constituintes da

fucana A obtida neste trabalho apresenta grande semelhança com àquela descrita por Leite et al. (1998). Não foi observada contaminação protéica.

Tabela 6. Composição química dos polissacarídeos ácidos da alga *Spatoglossum schröderi*

Compostos	Relação molar			
	Fucose	Xilose	Ácido urônico	Sulfato
0.6 vol	1,00	0,64	4,00	1,28
1,0 M (fucana A)	1,00	0,32	0,60	1,40
Fucana A *	1,00	0,35	0,55	1,50

0.6 vol – Fração polissacarídica precipitada com 0,6 volumes de acetona

1.0 M – Fucana A eluída da cromatografia de troca iônica com 1,0 M NaCl

*Composição química da fucana A determinada por Leite et al. (1998)

Não foi possível detectar a presença de proteína na fucana A em até 100 mg/mL

Um outro teste para confirmar que a fucana A obtida neste trabalho era composto descrito por Leite et al. (1998) foi a análise de espectroscopia de infravermelho. Na tabela 7 observam-se os sinais identificados para a fucana A. Estes foram semelhantes àqueles descritos por Leite et al. (1998) para a fucana A.

Tabela 7. Sinais encontrados nos espectros de infravermelho da Fucana A da alga *Spatoglossum schröderi* e os grupos funcionais a eles atribuídos.

Dados desse trabalho (cm ⁻¹)	Dados de Leite et al., 1998 (cm ⁻¹)	Grupos funcionais
3410	3406	Hidroxila (O-H)
2913	2922	Grupo metil (C-H)
1641	1640	Grupo carboxila (H-C= O)
852	852	Presença de sulfato na posição C-4 da L-fucose

4.4. Toxicidade *in vitro*

4.4.1. Viabilidade celular

Os resultados obtidos para a viabilidade celular das células foram acima de 87% para os controles positivo e negativo, como também para as três concentrações de fucana A utilizadas (Figura 6). Este ensaio não apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos teste. Este experimento nos prediz que as células CHO utilizadas no ensaio cometa estavam viáveis e em quantidade adequada.

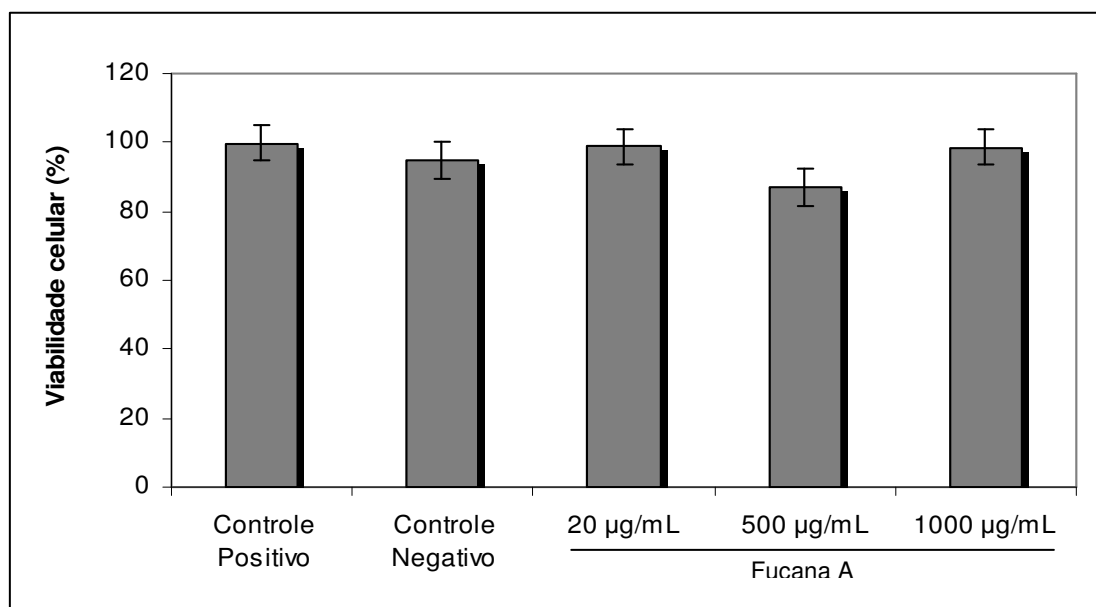


Figura 6. Viabilidade celular de células CHO (ovário de hamster chinês). A viabilidade foi verificada após tratamento com as três concentrações de fucana A, o controle positivo (H_2O_2 , 100mM) e o controle negativo (água ultra pura). Todos os resultados são uma média de três amostras \pm erro-padrão. Não houve diferença estatística em relação ao controle negativo ($P < 0,05$).

4.4.2. Ensaio de cometa

As figuras 7 e 8 mostram os efeitos de tratamento com fucana em relação perfil de migração de DNA no ensaio de cometa em células CHO. Os parâmetros analisados foram o *tail length* (comprimento da cauda) e *tail moment* (momento da cauda). O *tail length* foi tido como o principal parâmetro de genotoxicidade/mutagenicidade, ou seja, quanto maior a cauda, maior o número

de danos no genoma e maior o potencial genotóxico do composto avaliado. A análise dos resultados obtidos mostrou que não houve diferenças significativas ($P < 0,05$) para o *tail length* e o *tail moment* entre as três concentrações de fucana A utilizadas e o controle negativo.

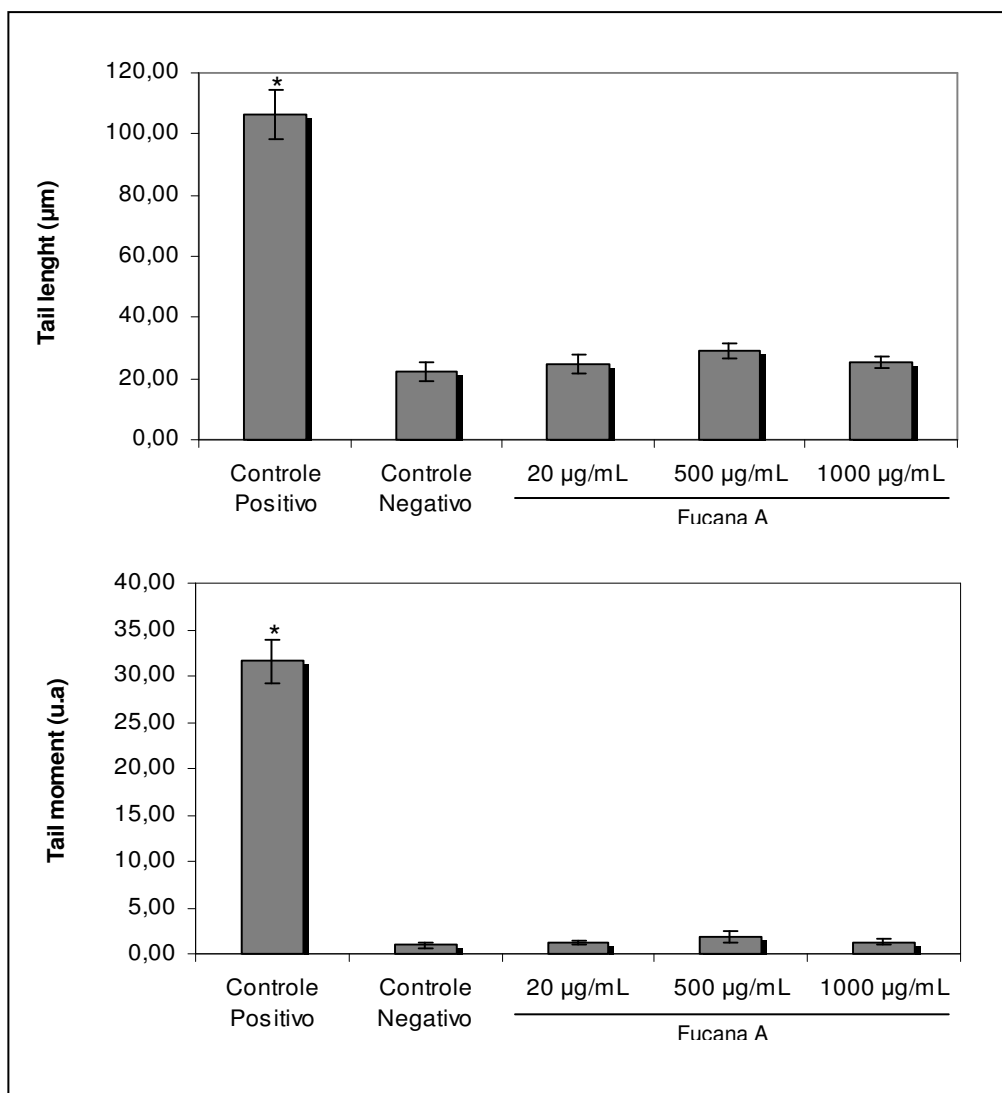


Figura 7. Avaliação do ensaio cometa em células CHO através da análise dos parâmetros *tail length* e *tail moment*. As células foram expostas a 100 mM de H₂O₂ para controle positivo e água ultra pura para o controle negativo. Todos os resultados são uma média de três amostras \pm erro-padrão. *Diferença estatística em relação ao controle negativo ($P < 0,05$).

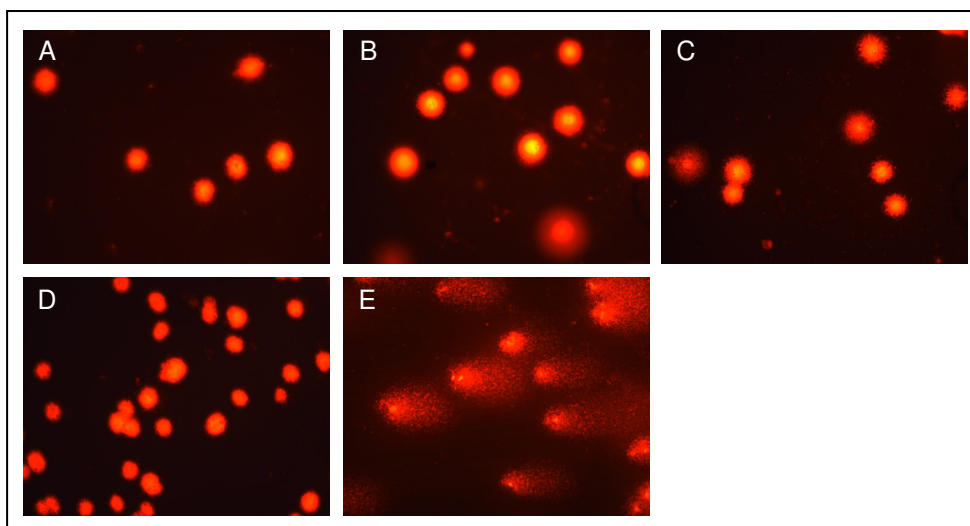


Figura 8. Microscopia de fluorescência dos nucleóides de células de ovário de hamster (CHO) submetidas ao ensaio cometa. A) Células tratadas a fucana A na concentração de 20 µg/mL; B) com 500 µg/mL de fucana A; C) com 1000 µg/mL de fucana A; D) Controle negativo (células tratadas com água ultra pura) e E) Controle positivo (células tratadas a 100 mM de H₂O₂) . Os nucleóides foram corados com 50 µL de brometo de etídio (20 µg/mL). Aumento de 40x.

4.4.3. Curva de toxicidade

O resultado obtido com a curva de toxicidade mostra que as quatro concentrações de fucana A não apresentaram sinais de toxicidade (Figura 9), e com base nisto, foram escolhidas duas concentrações mais elevadas da fucana A (500 e 1000 µg/placa) para o teste de Kado. A concentração de 20µg/placa de fucana A foi mantida, pois é a concentração de interesse para determinação de mutagenicidade.

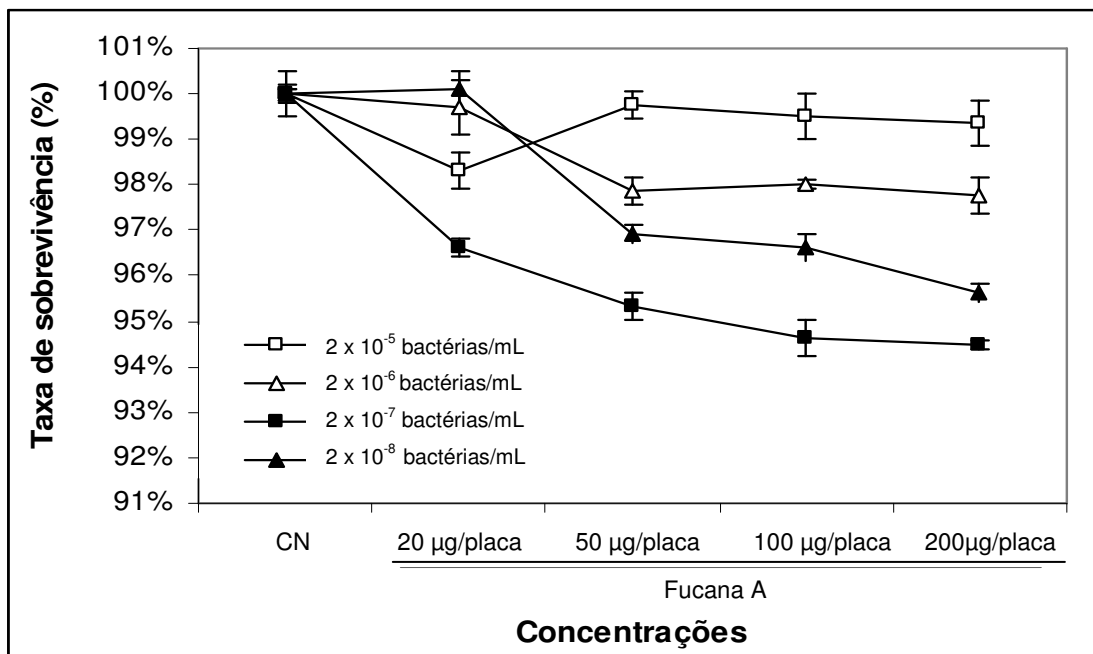


Figura 9. Curva de toxicidade com a *Salmonella* TA98 utilizando diferentes concentrações de fucana A. Foi utilizado água ultra pura para o controle negativo (CN). Todos os resultados são uma média de três amostras \pm erro-padrão.

4.4.4. Teste de Kado

Para verificar a possível ação mutagênica da fucana A extraída da alga *S. schröderi* foram utilizadas quatro cepas da linhagem bacteriana *Salmonella typhimurium* (TA97a, TA98, TA100 e TA102). O ensaio foi realizado na ausência e na presença de um sistema de ativação metabólica (fração S9) para verificar se a fucana A necessitava ser metabolizada para se tornar mutagênica (ação indireta).

Os dados obtidos para as quatro linhagens testadas com e sem fração S9 estão dispostos na tabela 8. Os resultados obtidos não mostraram mutagenicidade para a fucana A desta alga, pois não houve diferenças significativas entre as concentrações testadas e seus respectivos controles negativos. A razão de mutagenicidade (RM) entre os testes e o controle negativo também corroboram este fato, já que foram inferiores a dois com as três concentrações de fucana A testadas.

Tabela 8. Avaliação mutagênica da fucana A extraída da alga marrom *S. schöederi* com o teste de Kado com diferentes cepas de *Salmonella typhimurium* na ausência e presença de ativação metabólica (S9).

- S9								
	TA97a		TA98		TA100		TA102	
Concentrações	Rev./placa	RM	Rev./placa	RM	Rev./placa	RM	Rev./placa	RM
Controle positivo	639,75 ± 6,14	4,03	258,40 ± 2,66	7,18	2427,60 ± 96,77	11,98	1173,50 ± 95,91	7,45
Controle negativo	158,75 ± 25,51	1,00	36,00 ± 7,02	1,00	202,60 ± 13,39	1,00	157,50 ± 11,96	1,00
20 µg/placa	60,67 ± 3,76 *	0,38	29,00 ± 5,29	0,81	54,00 ± 1,16	0,27	69,00 ± 10,02	0,44
500 µg/placa	60,50 ± 6,50 *	0,38	32,00 ± 3,22	0,89	86,00 ± 2,00	0,42	118,67 ± 9,14	0,75
1000 µg/placa	59,00 ± 3,22 *	0,37	37,00 ± 1,73	1,03	74,00 ± 2,31	0,37	97,67 ± 7,22	0,62
+ S9								
	TA97a		TA98		TA100		TA102	
Concentrações	Rev./placa	RM	Rev./placa	RM	Rev./placa	RM	Rev./placa	RM
Controle positivo	1451,00 ± 90,74	9,38	466,20 ± 25,13	6,81	2543,50 ± 82,92	5,57	483,40 ± 15,84	5,07
Controle negativo	154,67 ± 21,07	1,00	68,50 ± 13,57	1,00	456,40 ± 16,30	1,00	95,40 ± 12,88	1,00
20 µg/placa	94,67 ± 2,60	0,61	64,00 ± 2,31	0,93	465,67 ± 31,50	1,02	71,67 ± 8,21	0,75
500 µg/placa	95,67 ± 6,84	0,62	66,67 ± 14,97	0,97	458,33 ± 4,67	1,00	99,00 ± 0,58	1,04
1000 µg/placa	98,00 ± 2,00	0,63	76,67 ± 6,44	1,12	452,67 ± 15,30	0,99	100,67 ± 9,94	1,06

Os dados são expressos em números de colônias revertentes a *his+*/ placa. Média dos ensaios ± erro-padrão. Controles positivos sem S9 foram utilizados 4NQO (0,1µg/placa) para as cepas TA97a e TA98, azida sódica (1,0 µg/placa) para a TA100 e mitomicina C (0,5 µg/placa) para a TA102. Para os controles positivos com S9 foi usado 2-AA (0,1 µg/placa) para todas as cepas – TA97a, 98, 100 e 102.

RM: Razão de mutagenicidade.(n° de colônias revertentes do teste / n° colônias do controle negativo).

* P< 0.05 diferente significativamente em relação ao controle negativo de cada linhagem bacteriana. As diferenças significativas foram realizadas pelo teste de ANOVA com post-hoc de Tukey-Kramer.

4.5. Estudo de toxicidade *in vivo*

4.5.1. Peso corporal

Na figura 10 mostra-se o ganho de peso (em porcentagem) dos animais controle e tratados com a fucana A durante 62 dias. Há um ganho de peso de forma contínua e crescente durante esse período. Outro fato interessante é que não há diferença significativa entre o ganho de peso dos animais tratados em comparação com os ratos do grupo controle.

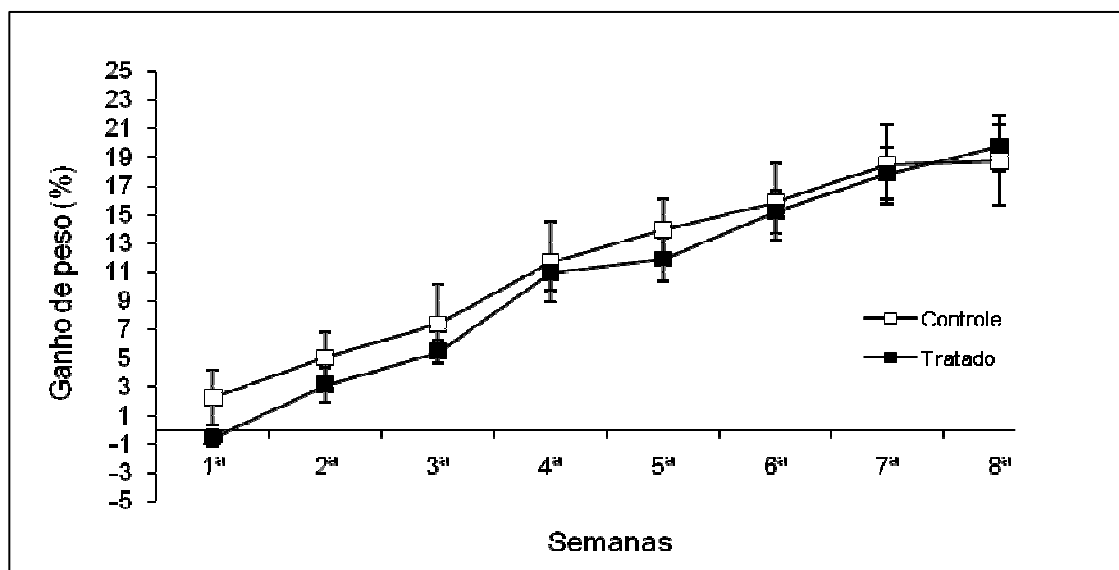


Figura 10. Ganho de peso percentual dos ratos Wistar tratados com fucana A e dos ratos do grupo controle. Foram administradas fucana (20 μ g/g de animal) ou solução salina (grupo controle) diariamente por 62 dias. Os animais foram pesados a cada sete dias (n=6, por grupo). Os dados são expressos como média \pm erro-padrão. Não houve diferença significativa em relação ao controle com $P < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney.

4.5.2. Observações comportamentais

A análise comportamental dos ratos durante os 62 dias de experimento, não demonstrou alterações relevantes em nenhum dos padrões comportamentais (descrito no tópico 3.6.2 em Matérias e métodos). Ambos os grupos, tratado e controle, tiveram comportamentos semelhantes com relação a todas as atividades autônomas ou não. Da mesma forma, durante todo o período do experimento os animais apresentaram-se saudáveis visualmente.

4.5.3. Análise macroscópica e histológica dos órgãos internos dos animais

Após eutanasiados e necropsiados, todos os órgãos foram em seguida pesados. A figura 11 mostra o peso dos órgãos dos ratos, do grupo tratado e controle (solução salina). Nota-se que não houve diferenças significativas entre o peso dos diferentes órgãos e nem foram observadas alterações na morfologia dos mesmos.

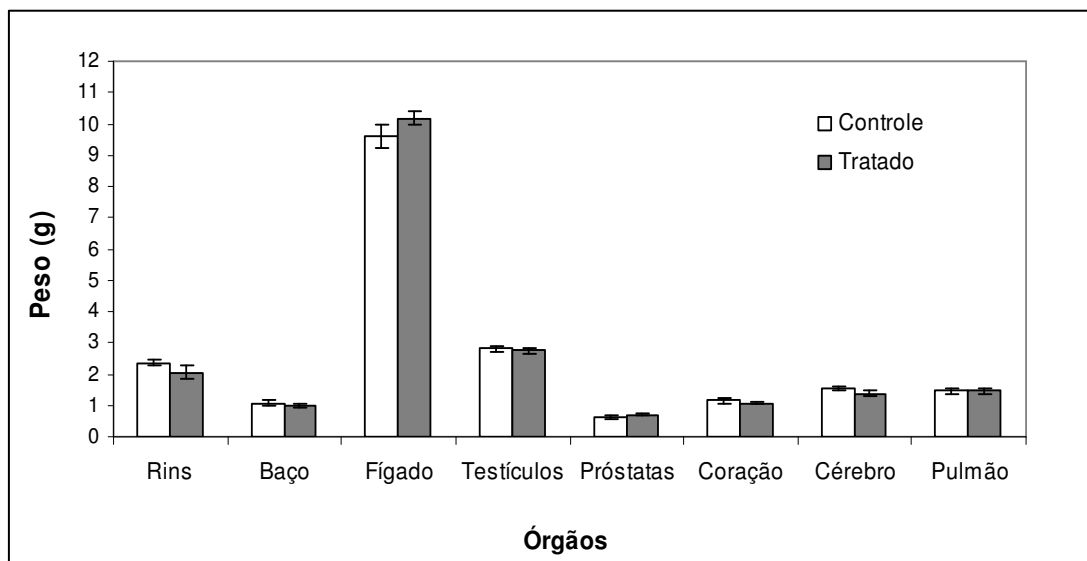


Figura 11. Peso dos órgãos dos animais tratados e do grupo controle. n=6, por grupo. Os dados são expressos como média \pm erro-padrão. Não houve diferença significativa em relação ao controle com $p < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney.

Após inspeção macroscópica, os tecidos foram fixados, cortados e corados com hematoxilina-eosina (HE) para observação de possíveis lesões em microscopia óptica.

As análises histológicas dos órgãos foram realizadas a fim de verificar, a presença ou não, de alguma anormalidade na morfologia das células e tecidos. O observado foi que nenhuma alteração morfológica em escala microscópica foi identificada nos órgãos analisados.

Na figura 12 observam-se lâminas histológicas do fígado e rins de ratos dos grupos controle e tratado. Quando se compara as lâminas oriundas desses dois grupos não se verifica nenhuma diferença morfológica entre eles. Dados semelhantes foram observados quando se compararam lâminas dos demais órgãos do grupo controle com seus correspondentes oriundas do grupo tratado.

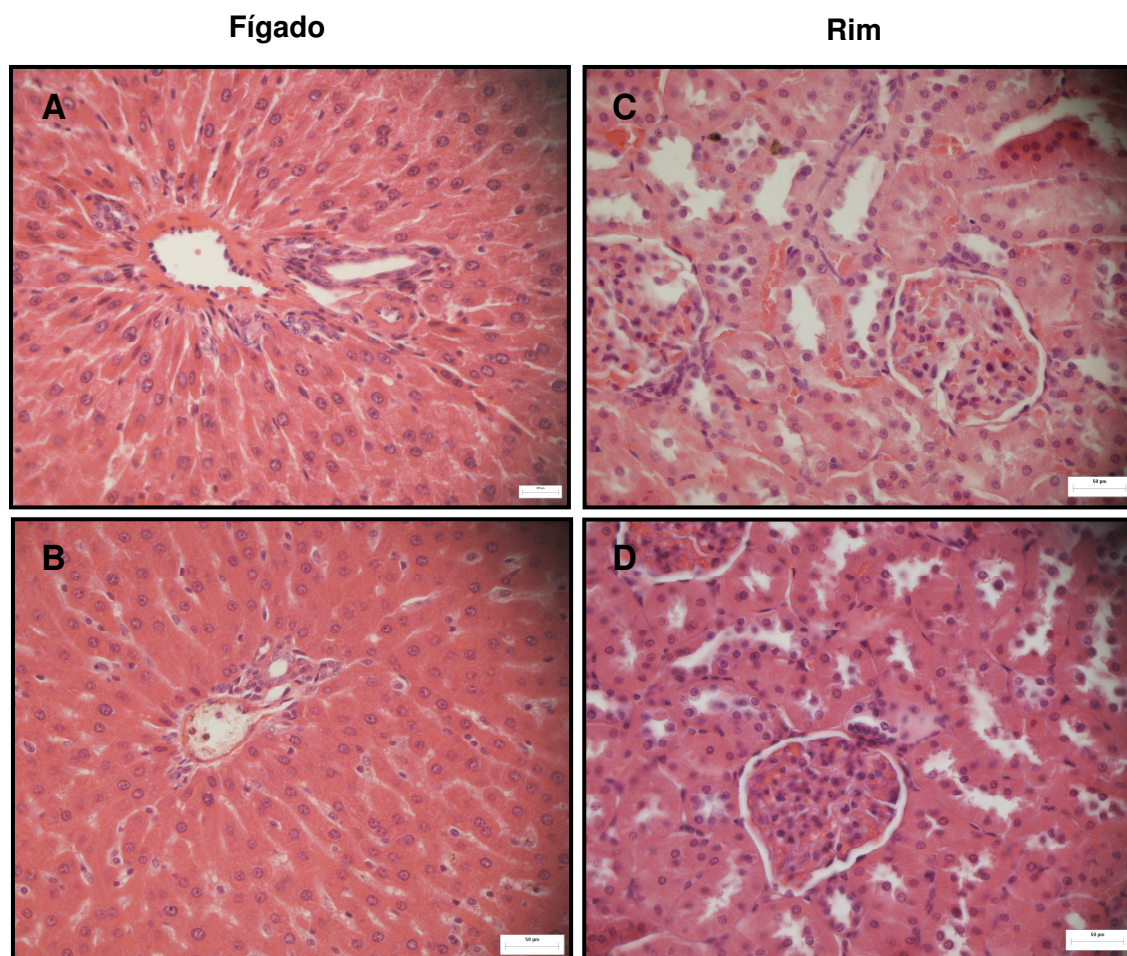


Figura 12. Fotomicroscopia óptica de tecido hepático (aumento de 10x) e renal (aumento de 40x) de rato submetido à administração de fucana A e solução salina. Fígado: A) tratado com solução salina (soro fisiológico 0,09%) e B) tratado com fucana A (20µg/g de animal). Rins: C) tratado com solução salina (soro fisiológico 0,09%) e D) tratado com fucana A (20µg/g de animal).

4.5.4. Parâmetros bioquímicos e hematológicos

Os resultados do estudo da toxicidade da fucana A foram observados através das análises bioquímica e hematológica do sangue de ratos, os quais são apresentados nas tabelas 9 e 10, respectivamente.

Na análise bioquímica foram observados que os valores para uréia (30,51%), glicose (25,80%), aspartato aminotransferase (AST) (22,46%) e o colesterol total com (21,27%) apresentaram uma tendência de aumento em comparação ao grupo controle. Contudo, quando esses dados foram analisados estatisticamente não se identificou diferença significativa ($P < 0,05$) para nenhum dos valores analisados.

Tabela 9. Parâmetros bioquímicos do sangue dos ratos Wistar.

Parâmetros	Controle (Salina 0,9%)	Tratado com Fuc A (20µg/g)	Limites
Glicose (mg/dL)	193,83 ± 17,41	243,83 ± 11,54	150 – 260
Uréia (mg/dL)	39,33 ± 3,77	51,33 ± 3,53	26 – 52
Creatinina (mg/dL)	0,75 ± 0,10	0,81 ± 0,12	0,5 – 1,1
AST (U/L)	123,17 ± 6,88	150,83 ± 12,81	97 – 147
ALT (U/L)	82,33 ± 6,92	86,67 ± 8,07	56 – 100
GGT (U/L)	2,50 ± 0,76	2,00 ± 0,37	1 – 6
Prot. Totais (g/L)	6,10 ± 0,39	5,27 ± 0,20	5 – 7,3
Albumina (g/L)	2,22 ± 0,21	2,12 ± 0,05	1,3 – 2,7
Globulina (g/L)	3,88 ± 0,36	3,02 ± 0,16	2,7 – 4,9
Coolest. Total (mg/dL)	57,17 ± 6,05	69,33 ± 1,26	40 – 77
Bilirr. Total (mg/dL)	1,73 ± 0,17	1,87 ± 0,17	1,3 – 2,2

(n=6, por grupo), dados expressos como média ± erro-padrão.

Não houve diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Mann-Whitney. Abreviações: AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; GGT, γ-glutamil transferase; Prot. Totais, proteínas totais; Bilirr. Total, bilirrubina total.

Limites: Correspondem ao menor e maior valores individuais obtidos em cada dosagem.

Em relação aos parâmetros hematológicos (Tabela 10) não foram detectadas alterações estatisticamente significativas entre os parâmetros analisados.

Tabela 10. Parâmetros hematológicos dos ratos Wistar.

Parâmetros	Controle (Salina 0,9%)	Tratado com Fuc A (20µg/g)	Limites
Hematócrito (%)	42,08 ± 1,45	36,90 ± 1,77	37,2 – 46,6
Hemoglobina (g/dL)	13,95 ± 0,43	12,60 ± 0,61	12,2 – 15
Hemácias (milhões/mm ³)	5,92 ± 0,06	6,07 ± 0,21	5,7 – 6,1
VCM (fl)	50,17 ± 1,47	50,83 ± 0,31	44 – 54
HCM (PG)	16,57 ± 0,66	16,32 ± 1,67	14,2 – 19
CHCM (g/dL)	33,13 ± 0,40	35,42 ± 0,44	32,3 – 35
Leucócitos (mil/mm ³)	7,38 ± 0,72	4,92 ± 1,10	5,8 – 10
Plaquetas (mil/mm ³)	418,67 ± 24,74	456,33 ± 65,37	340 – 520

(n=6, por grupo), dados expressos como média ± erro-padrão.

Não houve diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Mann-Whitney. Abreviações: VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração hemoglobina corpuscular média.

Limites: Correspondem ao menor e maior valores individuais obtidos em cada dosagem.

5. DISCUSSÃO

As fucanas de algas vêm sendo estudadas desde o início do século 20 (KYLIM 1913; 1915) e são hoje, os polissacarídeos sulfatados de origem não animal mais estudados. Contudo, esse grupo de polissacarídeos tem se mostrado de difícil análise e muitos detalhes de suas características estruturais ainda não foram reveladas (BILAN et al., 2008). Todavia, os estudos com as fucanas continuam a prosseguir devido a grande quantidade de atividades farmacológicas atribuídas a elas (Tabela 2) e, também, devido à possibilidade de se encontrar novos usos para esses compostos.

Existe uma grande variedade de metodologias descritas na literatura que são utilizadas nos processos de extração e purificação de fucanas de algas marrons (KLOAREG & QUATRANO, 1988; BOISSON-VIDAL et al. 1995; PEREIRA et al. 1999; BERTEAU & MULLOY, 2003; MOURÃO, 2007). Contudo, uma análise crítica dessas metodologias demonstra que elas não se diferenciam muito nas técnicas que são utilizadas, mas se diferenciam principalmente na ordem em que essas técnicas são utilizadas. Por outro lado, não há relatos que demonstrem uma maior eficácia de uma metodologia em detrimento de outra. Esse fato ocorre devido principalmente as características estruturais das fucanas que estão sendo purificadas. Como as fucanas são polissacarídeos estruturalmente complexos, elas não apresentam um padrão estrutural definido e que, portanto exigem das metodologias adaptações que se adequem as suas características, para que essas metodologias se tornem mais eficazes.

O nosso grupo vem estudando fucanas de alga desde o início da década passada e durante esse período, utilizando uma metodologia aplicada a caracterização de GAGs (DIETRICH et al., 1985), demonstrou-se que as algas *Dyctiota mertensis*, *Padina gymnospora*, *Sargassum vulgare* (FARIAS, 1993; DIETRICH et al., 1995) e *Spatoglossum schroederi* (LEITE et al., 1998) apresentavam, cada uma, três populações distintas de fucanas, denominadas atualmente de fucanas A, B e C. Com o uso dessa metodologia purificou-se a fucana A da *S. schroederi*, e propôs-se a sua estrutura (LEITE et al., 1998). Todavia, não se obteve sucesso em purificar outras fucanas.

No ano de 1998 foi introduzida a precipitação diferencial com volumes crescentes de acetona como passo inicial a metodologia descrita por Dietrich et al. (1985) para a purificação das fucanas de algas marrons. Com a introdução desse passo conseguiu-se a purificação das fucanas B (ROCHA et al., 2005a) e C (ROCHA et al., 2005b) da *S. schroederi*, a fucana A de *P. gymnospora* (SILVA et al., 2005), as fucanas A (ALVES, 2006) e C (ALBUQUERQUE et al., 2004) de *Dyctiota menstrualis*, e a fucana B de *Lobophora variegata* (QUEIROZ et al., 2006; MEDEIROS et al., 2008). A precipitação com acetona promove a concentração da fucana que se pretende estudar em uma fração, separando-a das demais fucanas, assim quando essa fração passa por outro passo de purificação, como cromatografia de troca iônica, tem-se a purificação da fucana mais facilmente. Fato que não acontece quando se usa a troca iônica primeiro (ROCHA et al., 2005).

A fucana A da *S. schroederi* não tinha sido ainda purificada dessa forma, quando Barroso et al. (2008) utilizando a precipitação com acetona como passo inicial, obtiveram a fucana A dessa alga. Testes químicos e físico-químicos mostraram que a fucana A obtida por Barroso et al. (2008) era similar àquela obtida por Leite et al. (1998).

Neste trabalho, aplicou-se a mesma metodologia utilizada por Barroso et al. (2008). Na figura 5 observa-se que a fucana A está presente em várias frações oriundas da cromatografia de troca iônica. Este fato não foi uma surpresa, pois Leite et al. (1998) tinham observado o mesmo comportamento da fucana A após cromatografia de troca iônica.

O material oriundo da cromatografia de troca iônica foi visualizado por eletroforese em gel de agarose (Figura 5) e foi constatado que a fração obtida com 0.7M de NaCl apresenta-se contaminada por ácido algínico. Este polímero é um outro tipo de polissacarídeo ácido sintetizado pelas algas marrons. Vários trabalhos relatam a contaminação de fucanas por ácidos algínicos e muitas são as metodologias proposta para se eliminar esse contaminante (HAUG & LARSEN, 1963; SMIDSRØD, 1970). Contudo, até o momento não foi proposto nenhuma metodologia eficaz para tal.

Por outro lado, as frações 1.0M e 1.5M apresentaram a fucana A livre de contaminantes visíveis na sua composição, todavia, apenas a fração 1.0M foi utilizada neste trabalho. Escolheu-se a fucana A eluída com 1.0M de NaCl, pois

foi com a fucana A eluída com essa mesma concentração que Leite et al. (1998) trabalharam. Os dados da composição química assim como os das análises de espectroscopia de infravermelho demonstraram que a fucana A obtida neste trabalho é essencialmente a mesma fucana A obtida por Leite et al. (1998) e, por conseguinte, Barroso et al. (2008).

Geralmente, as fucanas extraídas de algas encontram-se contaminadas com proteínas. Contudo, nenhum trabalho até o presente demonstrou se essas proteínas estão ou não ligadas covalentemente as fucanas. O que se verifica é que a variabilidade do teor protéico nas fucanas está relacionada com o método de extração e com a espécie de alga analisada. Hussein et al. (1980) encontraram em fucanas de *Padina povonia* um elevado teor de proteínas (67%) enquanto que Detrich et al. (1995) obtiveram para *Padina gymnospora* valores compreendidos entre 1,6-7,5%. Já as fucanas A, B e C de *Fucus vesiculosus* apresentaram, respectivamente, 0,24%, 0,16% e 87,4% (CARVALHO, 2001). Enquanto que Queiroz et al. (2006) obtiveram fucanas de *L. variegata* com no máximo 0,86% de contaminação protéica. Não foi possível detectar a presença de proteína na fucana A em até 100 mg/mL, o que leva a crer que esse composto não se encontra na alga como um glicoconjugado. Há trabalhos (HUSSEIN et al., 1980; ATHUKORALA et al., 2006) que apresentam protocolos de extração das fucanas de algas que se iniciam com o uso de apenas água a temperaturas elevadas (80 – 100°C). Contudo os valores de contaminação protéica sempre são elevados, fato que não ocorreu neste estudo, o que mostra a importância de se utilizar a proteólise para se eliminar a contaminação protéica.

Tendo em mãos a fucana A purificada e caracterizada, os ensaios *in vitro* foram realizados para verificação da toxicidade com os testes de Cometa e Kado. A utilização de ambos os testes foi devido a cada um deles proporcionar avaliações de danos diferentes no material genético. O ensaio cometa é um teste que indica genotoxicidade e mutagenicidade cromossômica; enquanto o teste de kado detecta mutações gênicas.

O ensaio de cometa mostrou que a fucana A não possui genotoxicidade mesmo quando testada nas concentrações mais elevadas (1000 µg/mL). Só há mais um trabalho na literatura que fez avaliação genotóxica e mutagênica de fucanas. No caso, avaliou-se o efeito de uma fucana da alga *Sargassum latifolium* (10µg/mL) frente a linfócitos humanos. Os resultados mostraram que essa fucana

não provocou danos no DNA das células (GAMAL-ELDEEN et al., 2009). Não há trabalhos que avaliaram a atividade genotóxica e mutagênica de polissacarídeos de outras algas. Há apenas um relato da avaliação de um extrato aquoso rico em polissacarídeos extraído da alga vermelha *Polysiphonia fucoides*. Neste trabalho avaliaram-se danos no DNA de leucócitos da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), que foram expostas a 0,5% de extrato da alga *P. fucoides*. Observou-se que o extrato aumentava os níveis de quebra de fitas simples do DNA, comparáveis ao induzido pela exposição *in vivo* a 20 mg/Kg de benzo(a)pireno (BAP). Contudo, os autores não demonstraram se esse efeito provinha dos polissacarídeos e/ou de outros componentes encontrados no extrato aquoso da alga (BARGA et al., 2006).

Em relação ao teste de Kado, não se identificou atividade mutagênica da fucana A, visto que, este polímero não foi capaz de ocasionar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura (TA97a e TA98) ou substituição de pares de base (TA100 e TA102).

Trabalhos que usaram o teste de cometa para avaliar polissacarídeos de outras fontes têm demonstrado que algumas dessas moléculas provocam dano no DNA de células (BARGA et al., 2006), enquanto outros não possuem nenhum efeito (ROLL, 2005; LEITE-SILVA et al., 2007; ANGELI et al., 2009), e há ainda polissacarídeos que agem protegendo células de danos no DNA provocados por agentes conhecidamente genotóxicos/mutagênicos (HEO et al., 2005). Já com relação a teste de Kado, não foi identificado na literatura outro trabalho que tenha feito tal análise com fucanas. Dados com gentiobiose (OZAKI et al., 2002) e oligofrutose (BOYLE et al. 2008) levam a crer que essas moléculas não são mutagênicas. Será que todos os polissacarídeos não são mutagênicos? Será que as fucanas devido a sua grande variabilidade estrutural não são mutagênicas? É ainda difícil responder essa pergunta por falta de dados.

Devido aos poucos estudos existentes sobre genotoxicidade e mutagenicidade de fucanas de algas fica impossível afirmar se esses compostos formam um grupo de moléculas com baixíssima toxicidade ou não. Vale a pena lembrar que algas marrons produzem fucanas que lhe são próprias, não sintetizadas por mais nenhum outro organismo. Estas fucanas apresentam características estruturais únicas e assim como podem possuir atividades

farmacológicas diferentes e/ou mais potentes do que outras fucanas, elas podem também apresentar atividades genotóxica/mutagênica dependente de suas características estruturais. Portanto, estudos com mais fucanas diferentes se fazem necessários para que se mostre que as fucanas são um grupo de moléculas com baixíssima toxicidade. Ou caso contrário, se possam criar bancos de dados que norteiem os pesquisadores sobre quais características estruturais são indicadoras de fucanas com capacidade de provocar danos de DNA.

Como os ensaios *in vitro* não indicaram nenhuma atividade tóxica (genotoxicidade/ mutagênica) provocada pela fucana A, ensaios para avaliação da toxicidade *in vivo* foram realizados em ratos.

Todos os parâmetros bioquímicos analisados possuem dois ou três biomarcadores representativos de cada função principal do organismo. Como por exemplo, uréia e creatinina são os marcadores da função renal, enquanto que as enzimas séricas alanina-aminotransferase (ALT), aspartato-aminotransferase (AST) e GGT (γ -glutamilttransferase) são os marcadores da função hepática.

Os valores de AST dos ratos tratados com fucana foram um pouco maiores daqueles observados para o controle. Não se encontrou uma justificativa plausível que explicasse o fato desse valor está mais aumentado nos ratos tratados. Contudo, esses valores não foram estatisticamente diferentes ($P < 0,05$) em relação a aqueles obtidos para o grupo controle. Valores um pouco mais elevados, mais não significativamente diferentes entre grupo controle e grupo tratado, foi encontrado por Li et al. (2005). Neste trabalho ratos foram tratados com uma fucana da alga *Laminaria japonica* e os valores para AST variaram de 136 U/L (controle) a 145 U/L (animais tratados). Por outro lado, os valores obtidos para atividade de ALT, outro marcador da função hepática, estão bastante aproximados entre os dois grupos.

Neste ensaio, embora os valores da quantificação da uréia tenham tido uma pequena elevação no grupo tratado em relação ao grupo controle, este não foi diferente estatisticamente ($P < 0,05$). Quando se tem quantidade elevada de uréia no sangue, este fato é correlacionado com o aumento do catabolismo protéico nos mamíferos e/ou com a conversão da amônia em uréia como resultado da síntese aumentada da enzima arginase envolvida na produção de uréia, o que faz com que o aumento da concentração de uréia sanguínea tenha correlação positiva com o aumento da concentração de proteínas totais

(HAGIWARA, 1982). Quando se observa os valores de proteínas totais apresentados na tabela 9, se verifica que esses valores, apesar de estatisticamente não diferentes, são menores nos ratos do grupo tratado com fucana do que do grupo controle. Contudo, os valores obtidos para o grupo tratado estão dentro da faixa dos valores de referência normais para ratos (4,7 – 8,15 g/dL) segundo Mitruka e Rawnsley (1977). Gideon e Rengasamy (2008) também não observaram elevações nos valores de uréia nem dos de proteínas totais para ratos tratados com uma heterofucana da alga *Cladosiphon okamuranus*. Portanto, conclui-se que a fucana A não influencia o catabolismo protéico.

As análises hematológicas não mostraram nenhuma alteração entre os ratos controle e os ratos tratados. Esse fato também foi observado quando ratos foram tratados com fucanas de *L. japonica* (LI et al., 2005) e *C. okamuranus* (GIDEON & RENGASAMY, 2008).

As análises histológicas representam uma ferramenta importante para identificação de prováveis efeitos tóxicos em nível celular de forma mais específica e objetiva. Todos os órgãos citados em métodos foram analisados, contudo, os tecidos hepático e renal foram os que obtiveram maior atenção; pois o fígado tem papel essencial no metabolismo dos nutrientes, na desintoxicação e excreção de metabólitos (TENNANT, 1997), e os rins funcionam como o maior órgão de excreção para eliminação de resíduos metabólicos do corpo (FINCO, 1997).

Realizados os estudos morfológicos com observação de lâminas para uma conclusão mais direcionada de uma possível hepatotoxicidade ou renotoxicidade induzida pela fucana A, o aspecto histológico dos dois tecidos, nos grupos controle e tratado (Figura 12), não se diferenciou, ou seja, não se observou alteração na morfologia ou estrutura das células ou do tecido, tais como: granulomas com presença de células gigantes, infiltrações por eosinófilos e alterações nos tecidos como o espessamento da membrana das células. Os demais órgãos também não demonstraram nenhuma anormalidade. Esse fato também foi observado quando ratos foram tratados com fucanas de *L. japonica* (LI et al., 2005) e *C. okamuranus* (GIDEON & RENGASAMY 2008).

Esses dados histológicos corroboram com aqueles obtidos nas análises bioquímicas e hematológicas do sangue, já que, na existência de alguma

alteração, esses seriam comprovados pela verificação de danos nos tecidos, o que neste trabalho, não foi verificado.

O aumento do crescimento relacionado ao ganho de peso dos ratos, conforme observado ao longo das semanas, e ganho de peso dos órgãos após a necropsia também não apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) em relação aos ratos controle. Foram obtidos dados semelhantes em outros trabalhos com polissacarídeos sulfatados de algas (LI et al.; 2005; ZARAGOZA et al., 2008; GIDEON & RENGASAMY, 2008).

Em suma, os dados *in vitro* e *in vivo* levam a afirmação de que a fucana A apresenta um efeito tóxico muito baixo, a ponto deste não poder ser identificado pelos ensaios realizados neste trabalho. Como também, levam a afirmação de que a fucana A é um composto seguro e que o seu estudo como composto antitrombótico pode ser levado adiante.

6. CONCLUSÕES

- Através do ensaio cometa, concluiu-se que a fucana A não induziu danos no DNA nas células CHO pela análise dos parâmetros: *tail length* (comprimento da cauda) e *tail moment* (momento da cauda) do cometa;
- Não foi detectada atividade mutagênica na fucana A através do teste de Kado, com ou sem ativação metabólica, nas três concentrações utilizadas: 20, 500 e 1000 µg/placa;
- A fucana A da alga marrom *Spatoglossum schröderi*, quando administrada em ratos durante um período de dois meses (62 dias), não induziu alterações significantes nos parâmetros bioquímicos e hematológicos do sangue, e morfológicos dos órgãos;
- Os dados obtidos indicam que a fucana A na dose que apresenta atividade antitrombótica (20 µg/g) não apresenta toxicidade *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATTAH, A. F.; HUSSEIN, M. M. D.; SALEM, H. M. Studies of the purification and some properties of sargassan, a sulphated heteropolysaccharide from *Sargassum linifolium*. **Carbohydr. Res.**, 33, p.9-17, 1974.

ALBUQUERQUE, I. R.; QUEIROZ, K. C.; ALVES, L. G.; SANTOS, E. A.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulant activity. **Braz J Med Biol Res.**, v. 37, n. 2, p.167-171, 2004.

ALVES, L. G. **Polissacarídeos ácidos presentes no folíolo, talo e flutuador da alga marinha *Sargassum vulgare***. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2000.

ANGELI, J. P. F.; RIBEIRO, L. R.; BELLINI, M. F.; MANTOVANI, M. S. β -Glucan extracted from the medicinal mushroom *Agaricus blazei* prevents the genotoxic effects of benzo[a]pyrene in the human hepatoma cell line HepG2. **Arch Toxicol.**, 83, p.81–86, 2009.

ATHUKORALA, Y.; KIM, K. N.; JEON, Y. J. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. **Food Chem Toxicol.**, v. 44, n. 7, p.1065-1074, 2006.

BAJPAYEE, M. PANDEY, A. K.; PARMAR, D.; DHAWAN, A. Current Status of Short-Term Tests for Evaluation of Genotoxicity, Mutagenicity, and Carcinogenicity of Environmental Chemicals and NCEs. **Toxicol Mech Methods**, v.15, p.155–180, 2005.

BARGA, I.D.; FRENZILLI, G.; SCARCELLI, V.; NIGRO, M.; MALMVÄRN, A.; ASPLUND, L.; FÖRLIN, L.; STURVE, J. Effects of algal extracts (*Polysiphonia fucooides*) on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A biomarker approach. **Mar Environ Res.**, 62, p.S283–S286, 2006.

BARROSO, E. M. A.; COSTA, L. S.; MEDEIROS, M. G. L.; CORDEIRO, S. L.; COSTA, M. S. S. P.; FRANCO, C. R.; NADER, H. B.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. A non-anticoagulant heterofucas has antithrombotic activity *in vivo*. **Planta Med.**, p.1-7, 2008.

BELLINI, M.F. ; ANGELI, J.P.F. ; MATUO, R. ; TEREZAN, A.P. ; RIBEIRO, L.R. ; MANTOVANI, M.S. Antigenotoxicity of *Agaricus blazei* mushroom organic and aqueous extracts in chromosomal aberration and cytokinesis block micronucleus assays in CHO-k1 and HTC cells. **Toxicol In Vitro**, 20, p.355–360, 2006.

BENFORD, D. Risk—What is it? **Toxicol Lett.**, v. 180, p. 68–71, 2008.

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**, 13, p.29R-40R, 2003.

BILAN, M. I.; VINOGRADOVA, E. V.; TSVETKOVA, E. A.; GRACHEV, A. A.; SHASHKOV, A. S.; NIFANTIEV, N. E.; USOV, A. I. A sulfated glucuronofucan containing both fucofuranose and fucopyranose residues from the brown alga *Chordaria agelliformis*. **Carbohydr Res.**, v. 343, p.2605–2612, 2008.

BIRD, G. M.; HAAS, P. The nature of the cell wall constituents of *Laminaria* spp. Mannuronic acid. **Biochem Jour.** v. 25, p. 403-411, 1931.

BLACK, W. A. P.; DEWAR, E. T.; WOODWARF, F.N. Manufacture of algal chemicals IV. Laboratory-scale isolation of fucoidin from brown marine algae. **J Sci Fd Agric.**, v. 4, n. 2, p. 85-91, 1952.

BLONDIN, C.; FISCHER, E.; BOISSON-VIDAL, C.; KAZATCHKINE, M. D.; JOZEFONVICZ, J. Inhibition of complement activation by natural sulfated polysaccharides (fucans) from brown seaweed. **Mol Immunol.** v. 31, n. 4, p. 247-253, 1994.

BOISSON-VIDAL, C.; HAROUN, F; ELLOUALI, M.; BLONDIN, C; FISCHER, A. M.; AGOSTINI, A.; JOZEFONVICZ J. Biological activities of polysaccharides from marine algae. **Drugs Future**, v. 20, p.1237-1249, 1995.

BOISSON-VIDAL, C.; ZEMANI, F.; CALIGIURI, G.; GALY-FAUROUX, I.; COLLIEC-JOUAULT, S.; HELLEY, D.; FISCHER, A. M. Neoangiogenesis induced by progenitor endothelial cells: effect of fucoidan from marine algae. **Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.**, v. 5, n. 1, p. 67-77, 2007.

BOYLE, F.G.; WRENN, J. M.; MARSH, B. B.; ANDERSON, W.I.; ANGELOSANTO, F.A.; MCCARTNEY, A.L.; LIEN, E. L. Safety evaluation of oligofructose: 13 Week rat study and *in vitro* mutagenicity. **Food Chem Toxicol.**, v. 46, n. 9, p. 3132-3139, 2008.

CARVALHO, L. C. M. **Efeitos de frações de fucanas de *Fucus vesiculosus* na proliferação celular.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2001.

CHEVOLOT, L.; MULLOY, B.; RATISKOL, J.; FOUCAULT, A.; COLIEC-JOUAULT S. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. **Carbohydr Res.**, v. 330, n. 4, 529 - 535, 2001.

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

COOMBE, D. R.; PARISH, C. R.; RAMSHAW, I. A.; SNOWDEN, J. M. Analysis of the inhibition of tumour metastasis by sulfated polysaccharides. **Int J Cancer.** v. 39, n. 1, p. 82-88, 1987.

COSTA, L. S. **Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Gracilaria caudata*.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

- COTÉ, R. M. Disaccharides from fucoidin. **J Chem Soc.**, 2248-2254, 1959.
- CTTAEA (Committee on Toxicity Testing and Assessment of Environmental Agents). Toxicity Testing for Assessment of Environmental Agents: Interim Report. **National Academy of Sciences**, p.270, 2006.
- DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Anal Biochem.**, v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.
- DIETRICH, C. P.; FARIAS, G. G. M.; ABREU, L. R. D.; LEITE, E. L.; SILVA, L. F.; NADER H. B. A new approach for 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.; PAIVA, J. F.; MORAES, C. T.; TAKAHASHI, H. K.; PORCIANOTTO, M.A; NADER, H.B. - Isolation and characterization of heparin with high anticoagulant activity from *Anomalocardia brasiliiana*. **Biochim Biophys Acta**, v. 843, p.1–7, 1985.
- DISCHE, Z. Color reactions of 6-Deoxy and 3-6-Dideoxioses. In: WHISTLER, R. L. & WOLFROM, M. L. **Methods in carbohydrate chemistry**, London Academic Press, v. 1, p. 501–503, 1962.
- DISCHE, Z. A new specific color reaction of hexuronic acids. **J Biol Chem.**, v. 167, p.189, 1974.
- DOCTOR, V. M.; HILL, C.; JACKSON, G. J. Effect of fucoidan during activation of human plasminogen. **Thromb Res.**, v. 79, n. 3, p. 237–247, 1995.
- DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochem J.**, 84, p.106–110, 1962.
- DRAGSTED, L. O.; DANESHVAR, B.; VOGEL, U.; AUTRUP, H. N.; WALLIN, H.; RISOM, L.; MOLLER, P.; MOLCK, A. M.; HANSEN, M.; POULSEN, H. E.; LOFT, S. A sucrose-rich diet induces mutations in the rat colon. **Cancer Res.**, v. 62, n. 15, p.4339–4345, 2002.
- DUBOIS M, GILLES KA, HAMILTON JK, REBERS PA, SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. **Anal Chem.**, 28, p.350–56, 1956.
- ELLOUALI, M.; BOISSON-VIDAL, C.; DURAND, P.; JOZEFONVICZ, J. Antitumor activity of low molecular weight fucans extracted from brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. **Anticancer Res.**, v. 13, n. 6A, p. 2011–2019, 1993
- ELLOUALI, M.; BOISSON-VIDAL, C.; JOZEFONVISCZ, J. Antiproliferative effect and interaction of fucans with cells. **Colloids Surf B: Biointerfaces.**, v. 2, n., p. 10, 1994.

EPA. **The Environment Protection Act**. 1986

FARIAS, G. G. M. **Uma nova abordagem para o estudo comparativo dos polissacarídeos de algas: classe Phaeophyceae**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1993.

FINCO, D. R. Kindney function. In: **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. eds. Academic Press, USA, 1997.

GAMAL-ELDEEN, A.M.; AHMED, E.F.; ABO-ZEID, M.A. *In vitro* cancer chemopreventive properties of polysaccharide extract from the brown alga, *Sargassum latifolium*. **Food Chem Toxicol.**, v. 47, n. 6, p.1378-1384, 2009.

GIDEON, T. P.; RENGASAMY, R. Toxicological Evaluation of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus*. **J Med Food.**, v.11, n.4, p.638–642, 2008

GIOVANNUCCI, E. Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. **J Nutr.**, v. 131 (Suppl. 11), p.3109S–3120S, 2001.

GRIFFITHS, J. C.; BORZELLECA, J. F.; CYR, J. ST. Sub-chronic (13-week) oral toxicity study with D-ribose in Wistar rats. **Food Chem Toxicol.**, v. 45, p.144–152, 2007.

HAGIWARA, M.K. Bioquímica clínica. In: BIRGEL, E.H.; BENESI, F.J. **Patologia clínica veterinária**. 2.ed. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, p.89–130. 1982.

HANSEN, M.; BAUNSGAARD, D.; AUTRUP, H.; VOGEL, U.B.; MØLLER, P.; LINDECORONA, R.; WALLIN, H.; POULSEN, H.E.; LOFT, S.; DRAGSTED, L. O. Sucrose, glucose and fructose have similar genotoxicity in the rat colon and affect the metabolome. **Food Chem Toxicol.**, v. 46, p.752–760, 2008.

HANSEN, M.; HALD, M.T.; AUTRUP, H.; VOGEL, U.; BORNHOLDT, J.; MOLLER, P.; MOLCK, A.M.; LINDECORONA, R.; POULSEN, H.E.; WALLIN, H.; LOFT, S.; DRAGSTED, L.O. Sucrose and IQ induced mutations in rat colon by independent mechanism. **Mutat Res.**, v. 554, p.279–286, 2004.

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

HAUG, A. AND LARSEN, B. The solubility of alginate at low pH. **Acta Chem Scand.**, v. 17, p. 1653–1662, 1963.

HAYASHI, T. Studies on evaluation of natural products for antiviral effects and their applications. **Yakugaku Zasshi.**, v. 128, n. 1, p. 61–79, 2008.

HEO, S.J.; PARK, E.J.; LEE, K.W.; JEON, Y. J. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. **Bioresour Technol.**, v. 96 p.1613–1623, 2005.

HOSHINO, T.; HAYASHI, T.; HAYASHI, K.; HAMADA, J.; LEE, J. B.; SANKAWA, U. An antivirally active sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri* (TURNER) C. AGARDH. **Biol Pharm Bull.** v. 21, n. 7, p. 730-734, 1998.

HUSSEIN, M. M. D. **Phytochemistry**, v. 14, p.1866-1869, 1975.

HUSSEIN, M. M. D.; MAGDEL-DIN, B.; ABDEL-AZIZ, A; SALEM, H. M. I. Some structural features of a new sulphated heteropolysacchride from *Padina pavonia*. **Phytochemistry**, v.19, p. 2133-2135, 1980.

IMAZAWA, T.; NISHIKAWA, A.; FURUKAWA, F.; IKEDA, T.; NAKAMURA, H.; MIYAUCHI, M.; HIROSE, M. A 13-week subchronic toxicity study of D-xylose in F344 rats. **Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku**, p. 115–118 (in Japanese), 1999.

KADO, N. Y.; LANGLEY, D.; EISENSTADT, E. A simple modification of the *Salmonella* liquid-incubation assay. **Mutat Res.**, v. 121, p. 25–32, 1983.

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.

KRIZKOVA, L.; ZITNANOVA, I.; MISLOVICOVA, D.; MASAROVA, J.; SASINKOVA, V.; DURACKOVA, Z.; KRAJCOVICA, J. Antioxidant and antimutagenic activity of mannan neoglycoconjugates: Mannan–human serum albumine and mannan–penicillin G acylase. **Mutat Res.**, v. 606, p.72–79, 2006.

KYLIN, H. Biochemistry of sea algae. Z. **Physiol Chem.**, v. 83, p.171–197, 1913.

KYLIN, H. Biochemistry of sea algae. Z. **Physiol Chem.**, 94, p.337–425, 1915.

LEITE, E. L.; MEDEIROS, M. G. L.; ROCHA, H. A. O.; FARIAS, G. G. M.; SILVA, L. F.; CHAVANTE, S. F.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Structure of a new fucan from the algae *spatoglossum schröderi*. **Plant science.**, v. 132, p.14, 1998.

LEITE-SILVA, C.; GUSMÃO, C. L. S.; TAKAHASHI, C. S. Genotoxic and antigenotoxic effects of *Fucus vesiculosus* extract on cultured human lymphocytes using the chromosome aberration and Comet assays. **Genet Mol Biol.**, v. 30, p.105–111, 2007.

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

LINA, B. A. R.; JONKER, D.; KOZIANOWSKI, G. Isomaltulose (Palatinose®): a review of biological and toxicological studies. **Food Chem Toxicol.**, v. 40, p.1375–1381, 2002.

LINS, K. O. A. L.; BEZERRA, D. P.; ALVES, A. P. N. N.; ALENCAR, N. M. N.; LIMA, M. W.; TORRES, V. M.; FARIAS, W. R. L.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the

red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). **J Appl Toxicol.**, v. 29, p. 20–26, 2009.

LIU, J. M.; HAROUN-BOUHEDJA, F.; BOISSON-VIDAL, C. Analysis of the *in vitro* inhibition of mammary adenocarcinoma cell adhesion by sulfated polysaccharides. **Anticancer Res.**, v. 20, n. 5A, p. 3265–3271, 2000.

MANDAL, P.; MATEU, C. G.; CHATTOPADHYAY, K.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; RAY, B. Structural features and antiviral activity of sulfated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica*. **Antivir Chem Chemother.**, v. 18, n. 3, p. 153–162, 2007.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutat Res.**, v. 113, p.173–215, 1983.

MATSUBARA, K.; XUE, C.; ZHAO, X.; MORI, M.; SUGAWARA, T.; HIRATA, T. Effects of middle molecular weight fucoidans on *in vitro* and *ex vivo* angiogenesis of endothelial cells. **Int J Mol Med.**, v. 15, n. 4, p. 695-699, 2005.

MAURAY S, STERNBERG C, THEVENIAUX J, MILLET J, SINQUIN C, TAPON-BRETAUDIÈRE J, et al. Venous antithrombotic and anticoagulant activities of a fucoidan fraction. **Thromb Haemost.**, v. 74, n.5, p.1280–1285, 1995.

MAURAY, S.; DE RAUCOURT, E.; TALBOT, J. C.; DACHARY-PRIGENT, J.; JOZEFOWICZ, M.; FISCHER, A. M. Mechanism of factor IXa inhibition by antithrombin in the presence of unfractionated and low molecular weight heparins and fucoidan. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1387, n. 1-2, p. 184-194, 1998.

MEDCALF, E. G.; WHITMEN, P.; LARSEN, B. Fucose-containing polysaccharides in the brown algae *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. **Carbohydr Res.**, v. 59, p.531–536, 1977.

MEDEIROS, V. P.; QUEIROZ, K. C. S.; CARDOSO, M. L.; MONTEIRO, G. R. G.; OLIVEIRA, F. W.; CHAVANTE, S. F.; GUIMARÃES, L. A.; ROCHA, H. A. O.; LEITE, E. L. Sulfated Galactofucan from *Lobophora variegata*: Anticoagulant and Anti-inflammatory Properties. **Biochemistry (Moscow)**, v. 73, n. 9, p.1018–1024, 2008.

MILLET, J.; JOUAULT, S. C.; MAURAY, S.; THEVENIAUX, J.; STERNBERG, C.; BOISSON-VIDAL, C. et al. Antithrombotic and coagulant activities a low molecular weight fucoidan by the subcutaneous route. **Thromb Haemost.**, v. 81, p.391–395, 1999.

MITRUKA, B. M.; RAWNSLEY, H. M. **Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals**. New York: Masson Publishing, 1977.

MOLLER, P.; HANSEN, M.; AUTRUP, H.; BORNHOLT, J.; VOGEL, U.; MOLCK, A. M.; WALLIN, H.; DRAGSTED, L. O.; RISOM, L.; POULSEN, H. E.; LOFT, S.

Dietary low-dose sucrose modulation of IQ-induced genotoxicity in the colon and liver of Big Blue rats. **Mutat Res.**, v. 527, p.91–97, 2003.

MORY, H.; NISIZIWA, K. Sugar constituents of sulfated polysaccharides from the fronds of *Sargassum ringgoldianum*. **Bull Jap Soc Sci Fish.**, v. 48, p.981–986, 1982.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutat Res.**, v. 455, p. 29–60, 2000.

MOURÃO, P. A. S. A carbohydrate-based mechanism of species recognition in sea urchin fertilization. **Braz J Med Biol Res.**, v. 40, p.5-17, 2007.

MULLOY B.; MOURÃO P. A. S.; GRAY E. Structure/function studies of anticoagulant sulfated polysaccharides using NMR. **J of Biotechnol.**, v. 77, p.123–135, 2000.

NADER, H. B.; LOPES, C. C.; ROCHA, H. A.; SANTOS, E. A.; DIETRICH, C. P. Heparins and heparinoids: occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic activities. **Curr Pharm Des.** v. 10, n. 9, p. 951–966, 2004.

NAGAOKA, M.; SHIBATA, H.; KIMURA-TAKAGI, I.; HASHIMOTO, S.; AIYAMA, R.; UEYAMA, S.; YOKOKURA, T. Anti-ulcer effects and biological activities of polysaccharides from marine algae. **Biofactors.**, v. 12, p. 267–274, 2000.

NISHINO, T.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H.; NAGUMO, T. An anticoagulant fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. **Phytochemistry.** v. 30, n. 2, p. 535–539, 1991a.

NISHINO, T.; YAMAUCHI, T.; HORIE, M.; NAGUMO, T.; SUZUKI, H. Effects of a fucoidan on the activation of plasminogen by u-PA and t-PA. **Thromb Res.**, v. 99, n. 6, p. 623–634, 2000.

OECD, 1998. Test guideline 408. Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **Organisation for Economic Cooperation & Development (OECD)**, Paris, France.

OKAI, Y.; HIGASHI-OKAI, K.; YANO, Y.; OTANI, S. Identification of antimutagenic substances in an extract of edible red alga, *Porphyra tenera* (Asadusa-nori). **Cancer Lett.**, v. 100, p.235–240, 1996.

OZAKI, A.; KITANO, M.; FURUSAWA, N.; YAMAGUCHI, H.; KURODA, K.; ENDO, G. Genotoxicity of gardenia yellow and its components. **Food Chem Toxicol.**, v. 40, p.1603–1610, 2002.

PENGZHAN, Y.; QUANBIN, Z.; NING, L.; ZUHONG, X.; YANMEI, W.; ZHI'EN, L. Polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and preliminary studies on their antihyperlipidemia activity. **J Appl Phycol.**, v. 15, p. 21–27, 2003.

PERCIVAL, E. G. V.; DOWELL, R. H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. **London: Academic Press.**, v. 219, p. 1967.

PERCIVAL, E. G. V.; ROSS, A. G. Fucoïdin – Part I. The isolation and purification of fucoïdin from brown seaweeds. **J Chem Soc.**, p.717–720, 1950.

PERCIVAL, E.; YOUNG, M. **Carbohydr Res.**, v. 32, p.195–201, 1974.

PEREIRA, M. S.; MULLOY, B.; MOURÃO, P.A. S. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. **J Biol Chem.**, v. 274, p.7656–7667, 1999.

PIMENTEL, L. C. F.; CHAVES, C. R.; FREIRE, L. A. A.; AFONSO, J. C. O inacreditável emprego de produtos químicos perigosos no passado. **Quim Nova**, v. 29, n.5, p.1138–1149, 2006.

QUEIROZ, K. C.; ASSIS, C. F.; MEDEIROS, V. P.; ROCHA, H. A.; AOYAMA, H.; FERREIRA, C. V.; LEITE, E. L. Cytotoxicity effect of algal polysaccharides on HL60 cells. **Biochemistry (Mosc.)**, v. 71, n. 12, p. 1312–1315, 2006.

QUILLET, M. The chemical composition of brown algae I. The non esterified sugars. **Colloq Intern Centre Natl Sci Paris.**, v. 103, p.145–156, 1961.

RIOU, D.; COLLIEG-JOUAULT, S.; PINGZON DU SEL, D.; BOSCH, S.; SIAVOSHIAN, S.; LE BERT, V.; TOMASONI, C.; SINQUIN, C.; DURAND, P.; ROUSSAKIS, C. Antitumor and antiproliferative effects of a fucan extracted from *Ascophyllum nodosum* against a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line. **Anticancer Res.**, v. 16, n. 3A, p. 1213–1218, 1996.

ROCHA, H. A.; FRANCO, C. R.; TRINDADE, E. S.; CARVALHO, L. C.; VEIGA, S. S.; LEITE, E. L.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. A fucan from the brown seaweed *Spatoglossum schroederi* inhibits Chinese hamster ovary cell adhesion to several extracellular matrix proteins. **Braz J Med Biol Res.**, v. 34, n. 5, p. 621–626, 2001.

ROCHA, H. A. O. **Caracterização de uma fucana da alga *Spatoglossum schroëderi* e análise de suas atividades anti-adesiva, antimigratória, antiproliferativa e antitrombótica.** Tese (Tese em Bioquímica) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2002.

ROCHA, H. A.; BEZERRA, L. C.; DE ALBUQUERQUE, I. R.; COSTA, L. S.; GUERRA, C. M.; DE ABREU, L. D.; NADER, H. B.; LEITE, E. L. A xylogalactofucan from the brown seaweed *Spatoglossum schröederi* stimulates the synthesis of an antithrombotic heparan sulfate from endothelial cells. **Planta Med.**, v. 71, n. 4, p. 379–381, 2005a.

ROCHA, H. A.; MORAES, F. A.; TRINDADE, E. S.; FRANCO, C. R.; TORQUATO, R. J.; VEIGA, S. S.; VALENTE, A. P.; MOURAO, P. A.; LEITE, E. L.; NADER, H. B.; DIETRICH, C. P. Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schröederi*. An ideal antithrombotic agent? **J Biol Chem.**, v. 280, n. 50, p. 41278–41288, 2005b.

ROCHA, H. A. O.; LEITE, E. L.; MEDEIROS, V. P.; LOPES, C. C.; NASCIMENTO, F. D.; TERSARIOL, I. L. S.; SAMPAIO, L. O.; NADER, H. B. Natural sulfated polysaccharides as antithrombotic compounds. Structural characteristics and effects on the coagulation cascade. In Carbohydrate Structure and Biological Function. **Kerala: Transworld Research Network**, 2006.

ROLL, R. J. **Avaliação da genotoxicidade das xantanas produzidas pelas cepas 06 e 24 de *Xanthomonas campestris* pv *pruni* através do ensaio cometa e teste de micronúcleos**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Agrícola) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas -RS, 2005.

SILVA, T. M.; ALVES, L. G.; DE QUEIROZ, K. C.; SANTOS, M. G.; MARQUES, C. T.; CHAVANTE, S. F.; ROCHA, H. A.; LEITE, E. L. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. **Braz J Med Biol Res.**, v. 38, n. 4, p. 523-533, 2005.

SHIMAOKA, M.; IKEDA, M.; IIDA, T.; TAENAKA, N.; YOSHIYA, I.; HONDA, T. Fucoidin, a potent inhibitor of leukocyte rolling, prevents neutrophil influx into phorbol-ester-induced inflammatory sites in rabbit lungs. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 153, n. 1, p. 307-311, 1996.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exper Cell Res.**, v. 175, p.184-191, 1988.

SMIDSRØD, O. Solution properties of alginate. **Carbohydr Res.**, v. 13, p.359-372, 1970.

SOEDA, S.; KOZAKO, T.; IWATA, K.; SHIMENO, H. Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells: its possible mechanism of action. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1497, n. 1, p. 127-134, 2000.

SOUSA, A. P. A.; BARBOSA, P. S. F.; TORRES, M. R.; MARTINS, A. M. C.; MARTINS, R. D.; ALVES, R. S.; SOUSA, D. F.; ALVES, C. D.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTEIRO, H. A. S. The renal effects of alginates isolated from brown seaweed *Sargassum vulgare*. **Appl Toxicol.**, v. 28, p.364-369, 2008.

SOUSA, A. P. A.; TORRES, M. R.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ROCHA FILHO, F. D.; ALVES, A. P. N. N.; COSTA-LOTUFO, L. V. *In vivo* growth-inhibition os sarcoma 180 tumor by alginates from brown *Sargassum vulgare*. **Carbohydr Polym.**, v. 69, p.7-13, 2007.

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.142-3, 1978.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single cell gel test), a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: HENDERSON,

D.S. ed. Methods in molecular biology: DNA repair protocols – eukariotic systems. **Totowa: Humana Press**, v. 113, p. 203 – 211, 1999.

SPRINGER, G. F.; WURZEL, H. A.; MC NEAL, G. M. Jr.; ANSELL, N. J.; DOUGHTY, M.F. Isolation of anticoagulant fractions from crude fucoidin. **Proc Soc Exptl Biol Med.**, v. 94, p. 404 – 409, 1957.

SUAREZ, S. S.; REVAH, I.; L. O, M.; KÖLLE, S. Bull sperm binding to oviductal epithelium is mediated by a Ca^{2++} -dependent lectin on sperm that recognizes lewis-a trisaccharide. **Biol Reprod.** v. 59, p. 6, 1998.

TEIXEIRA, M. M.; ROSSI, A. G.; HELLEWELL, P. G. Adhesion mechanisms involved in C5a-induced eosinophil homotypic aggregation. **J Leukoc Biol.**, v. 59, n. 3, p. 389–396, 1996.

TENNANT, B. C. Hepatic Function. In: Clinical Biochemistry of Domestic Animals. KANECO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. eds. **Academic Press**, USA, 1997.

TICE, R. R; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. The single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen.**, v. 35, p.206–221, 2000.

UMBUZEIRO, G. A.; VARGAS, V. M. F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Testes de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: Mutagênese Ambiental, Eds. RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Editor da ULBRA**, capítulo 4, p.81–112, 2003.

USUI, T.; ASARI, K.; MIZUNO, T. Isolation of highly purified fucoidan from *Eisenia bicyclis* and its anticoagulant and antitumor activities. **Agric Biol Chem.**, v. 44, p. 2, 1980.

VISCHER, P.; BUDDECKE, E. Different action of heparin and fucoidan on arterial smooth muscle cell proliferation and thrombospondin and fibronectin metabolism. **Eur J Cell Biol.**, v. 56, n. 2, p. 407–414, 1991.

WANG, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, Z.; LI, Z. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. **Int J Biol Macromol.**, v. 42, n. 2, p. 127–132, 2008.

ZARAGOZÁ, M. C.; LÓPEZ, D.; SÁIZ, M. P.; POQUET, M.; PÉREZ, J.; PUIG-PARELLADA, P.; MÀRMOL, F.; SIMONETTI, P.; GARDANA, C.; LERAT, Y.; BURTIN, P.; INISAN, C.; ROUSSEAU, I.; BESNARD, M.; MITJAVILA, M. Toxicity and antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of two *Fucus vesiculosus* extracts. **J Agric Food Chem.**, v. 56, p.7773 – 7780, 2008.

ZHUANG, C.; ITOH, H.; MIZUNO, T.; H, I. Antitumor active fucoidan from brown seaweed, umitoranoo *Sargassum thumbergii*. **Biotech Biochem.** v. 4, p. 5, 1995.

ZVYAGINTSEVA, T. N.; SHEVCHENKO, N. M.; NAZAROVA, I. V.; SCOBUN, A. S.; LUK'YANOV, P. A.; ELYAKOVA, L. A. Inhibition of complement activation by water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** v. 126, n. 3, p. 209-215, 2000.

ANEXO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
ONOFRE LOPES (CEP-HUOL)

CERTIFICADO


O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes (CEP-HUOL), divisão – Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais, analisou o projeto:

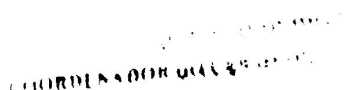
**Título: Verificação da toxicidade de uma fucana antitrombótica da alga marrom *Spatoglossum schroederi*.
Protocolo – 082/07.**

Pesquisador Responsável: Hugo Alexandre de O. Rocha.

Este projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, em reunião plenária do CEP-HUOL realizada no dia 31 de agosto de 2007. Toda e qualquer alteração no projeto/protocolo de pesquisa, assim como eventos adversos que venham a ocorrer deverão ser comunicados oficialmente e imediatamente ao CEP-HUOL. O relatório final do projeto ou a cópia de sua publicação deverá ser encaminhado ao CEP/HUOL após o término do estudo, conforme cronograma, com a respectiva cópia da toalha de rosto.

Natal, 31 de agosto de 2007.


Prof. Aldo da Cunha Medeiros
Coordenador do CEP-HUOL



Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes (CEP-HUOL) - Av. Nilo Peçanha 620,
Petrópolis, Natal-RN, 59.012-300. Fone: 84-32023719 Ramal 242. email:cep_huol@yahoo.com.br

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)