



Jean-Luc Gesztesi

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo candidato Jean-Luc Gesztesi e aprovada pela Comissão Julgadora.

M. E. Luiza

21/12/90

**AÇÃO DE ÉSTERES DE SACAROSE EM CULTURA DE
TECIDO**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Edwiges Hoffmann

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para obtenção do grau de MESTRE EM CIÊNCIAS

30/9/100899

G335a

13145/BC

CAMPINAS, 1990.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Ao meu pai "in memoriam",
à minha mãe e meu irmão.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Edwiges Hoffmann, pela orientação, apoio e assistência durante a execução deste trabalho.

Ao Lourenço Chiari, da Johnson & Johnson pela amizade e incentivo na realização desta tese. Agradeço também ao Dr. Philippe J.M. Pommez que me propiciou condições para que este trabalho se concretizasse.

À Cláudia de Lourdes Soraggi, pela contribuição efetiva na realização desta tese, além da amizade e da enorme paciência.

Aos meus colegas de laboratório da Johnson & Johnson e os colegas da Unicamp.

CONTEUDO

I INTRODUÇÃO

- I.1. Objetivos.
- I.2. Estrutura e propriedades dos ésteres de sacarose.
- I.3. Produção e aplicação dos ésteres de sacarose.
- I.4. Justificativas e propostas do trabalho.
- I.5. Ensaio de Citotoxicidade.

II MATERIAIS E MÉTODOS

II.1. Reagentes e Soluções

II.1.a. Reagentes

- II.1.a.1. Estearatos de sacarose.
- II.1.a.2. Separação, purificação e análise dos ésteres de sacarose.
- II.1.a.3. Cultura de tecidos.
- II.1.a.4. Surfactantes.
- II.1.a.5. Meios de cultura.

II.1.b. Preparo das soluções

- II.1.b.1. Tampão fosfato salina (PBS-A)
- II.1.b.2. Tampão fosfato salina contendo cálcio (PBS- Ca^{++}).
- II.1.b.3. Solução de tripsina 0,1%.
- II.1.b.4. Meio de lise celular.
- II.1.b.5. Solução de Azul de Tripan.
- II.1.b.6. Preparação de Ficoll-Hypaque.
- II.1.b.7. Sistema de solventes (SIS) para os estearatos de sacarose.
- II.1.b.8. Solubilização dos estearatos de sacarose (MES e DES).

II.1.c. Preparo dos meios de cultura

- II.1.c.1. Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM).
- II.1.c.2. Meio RPMI-1640.
- II.1.c.3. Meio mínimo de Eagle (MEM).

II.2. Métodos.

II.2.a. Métodos químicos.

- II.2.a.1. Separação e purificação dos estearatos de sacarose com baixo grau de esterificação (mono e diésteres).
- II.2.a.2. Métodos de análise dos estearatos de sacarose purificados ou não em coluna cromatográfica.

II.2.b. Métodos biológicos

II.2.b.1. Cultura de células: origem, obtenção e manutenção das células em cultura.

- II.2.b.1.a. Hemácias humanas.
- II.2.b.1.b. Linfócitos humanos.
- II.2.b.1.c. Fibroblastos.
 - II.2.b.1.c.1. Origem das células.
 - II.2.b.1.c.2. Manutenção das culturas fibroblásticas.
 - II.2.b.1.c.3. Estocagem das linhagens celulares.

II.2.b.2. Métodos de avaliação dos efeitos biológicos.

- II.2.b.2.a. Detecção das alterações morfológicas em fibroblastos cultivados.
- II.2.b.2.b. Determinação dos efeitos de amostras testes na viabilidade de linfócitos humanos.
- II.2.b.2.c. Efeito de amostras testes sobre a adesão e integridade celular de fibroblastos em cultura.
- II.2.b.2.d. Determinação dos efeitos de compostos sobre a proliferação celular de fibroblastos em cultura.
- II.2.b.2.e. Determinação de curvas de sobrevivência de fibroblastos em cultura.
- II.2.b.2.f. Determinação da ação hemolítica em eritrócitos humanos por amostras testes.
- II.2.b.2.g. Determinação da taxa de captação de Uridina (Udr) por fibroblastos em cultura exposto à amostras testes.

III RESULTADOS

III.1. Estudos Químicos

- III.1.a. Separação e purificação dos ésteres de sacarose.
- III.1.b. Análise e identificação dos compostos A e B.

III.2. Estudos biológicos

- III.2.a. Detecção das alterações morfológicas em fibroblastos indizadas por estearatos de sacarose.
- III.2.b. Determinação da viabilidade celular de linfócitos expostos a agentes tensoativos.
- III.2.c. Determinação dos efeitos dos estearatos de sacarose sobre a adesão e integridade celular de fibroblastos em cultura.
- III.2.d. Determinação dos efeitos de ésteres de sacarose na proliferação celular de fibroblastos.
- III.2.e. Determinação da curva de sobrevivência de fibroblastos V-79 tratados com monoéster de sacarose purificado.
- III.2.f. Determinação da ação do MES ao nível da membrana celular.
 - III.2.f.a. Determinação da ação hemolítica de MES.
- III.2.g. Determinação da taxa de captação de Uridina (Udr) por fibroblastos.
 - III.2.g.1. Padronização da técnica.
 - III.2.g.2. Efeito de ésteres de sacarose e de outros surfactantes na captação de Urd por fibroblastos V-79 em cultura.

IV DISCUSSÃO

VI SUMÁRIO

VII SUMMARY

VIII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

INTRODUÇÃO

I.1. - OBJETIVOS

Ésteres de sacarose são glicolipídeos sintéticos, obtidos por esterificação de ácidos graxos e sacarose (Osipow e col., 1956). Devido às suas propriedades surfactantes e emulsificantes, estes compostos despertaram o interesse mundial, principalmente da indústria alimentícia e cosmética (Walker, 1984; Desai, 1990).

Embora as preparações industriais de ésteres de sacarose sejam consideradas atóxicas (Walker, 1984), despertaram a nossa atenção os relatos de suas atividades inibitórias sobre o crescimento de células leucêmicas (Ikekawa e col., 1979) e de uma variedade de fungos (Marshall e Bullerman, 1986). Isto nos levou a investigar as atividades de dois compostos modelos de ésteres de sacarose, o monoestearato de sacarose (MES) e o diestearato de sacarose (DES), em culturas de células de mamíferos.

Constituíram os objetivos principais deste trabalho as seguintes proposições:

- 1) Purificar os derivados mono e diestearato de sacarose a

partir de uma preparação industrial de estearato de sacarose, e, caracterizá-los quimicamente.

2) Avaliar a citotoxicidade destes compostos em culturas de fibroblastos de mamíferos e em linfócitos humanos.

3) Investigar as ações destes sucroderivados ao nível da membrana de células fibroblásticas e de eritrócitos humanos.

4) Estudar o papel do sêro fetal bovino nos efeitos citotóxicos e líticos causados pelo derivado monoesterificado.

5) Estabelecer uma possível relação entre as estruturas dos estearatos de sacarose e seus efeitos em células de mamíferos.

I.2. - Estrutura e propriedades dos Ésteres de Sacarose

Ácidos graxos esterificados a açúcares formam uma vasta família de compostos químicos, denominada, genericamente, de glicolipídeos. Os ácidos graxos esterificantes podem variar quanto ao tamanho da cadeia carbônica, sendo os mais comuns os ácidos graxos saturados: o ácido láurico (C_{12}), o ácido mirístico (C_{14}), o ácido palmítico (C_{16}), e o ácido esteárico (C_{18}). Pode-se também obter a sacarose esterificada com ácidos graxos insaturados (por exemplo, o ácido oléico - $C_{18:H}$ -) e ácidos graxos ramificados.

Quando ácidos graxos (ou ésteres metílicos de ácidos graxos) reagem com a sacarose, podem ser formados vários derivados. Já que a sacarose possui na sua estrutura (figura 1) oito hidroxilas potencialmente reativas, podem ser obtidos compostos onde a sacarose seja esterificada com uma única molécula de ácido graxo (formando o derivado monoesterificado) ou com mais moléculas (formando derivados di-, tri-, ... octasubstituídos).

A sacarose (β -d-frutofuranosil α -d-glicopiranosídeo) é um dissacarídeo não redutor (figura 1) que pode ser empregada como uma matéria-prima de importância na indústria química (Sheppard e Lipinsky, 1977; Khan, 1977; Bobalek, 1977).

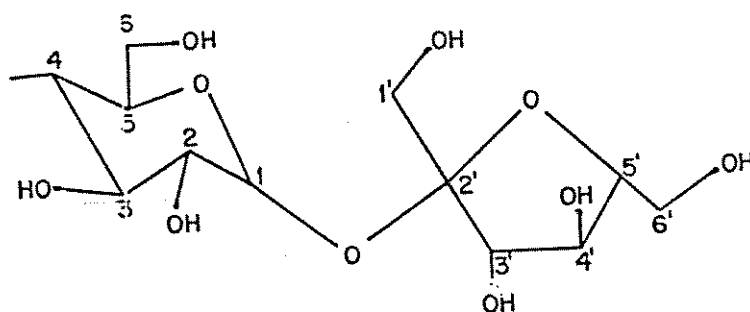


Figura 1.- Molécula de Sacarose. A molécula apresenta hidroxilas primárias ($C_{1'}$, $C_{6'}$ e C_6) e hidroxilas secundárias (C_2 , C_3 , $C_{3'}$, C_4 e $C_{4'}$) passíveis de serem esterificadas.

Devido ao fato da reação de esterificação empregada na obtenção de ésteres graxos de sacarose ser inespecífica, todas as hidroxilas, ao menos teoricamente, podem ser ocupadas por moléculas de ácidos graxos. Independentemente das condições empregadas (concentração dos reagentes, tempo de reação, etc), o produto resultante da reação entre a sacarose e ácido graxo (ou seu éster metílico) será sempre uma mistura, por vezes extremamente complexa, de compostos com diferentes graus de esterificação (Jaspers e col., 1987).

No entanto, algumas das hidroxilas da sacarose, classificadas como hidroxilas primárias, diferem das outras (denominadas de hidroxilas secundárias) quanto à sua reatividade. As hidroxilas primárias, na figura 1, estão assinaladas nas posições 6, 6' e 1'. Segundo Lemieux e McInnes (1962), ao identificar e caracterizar a composição de monomiristato de sacarose, as posições preferenciais de esterificação são as hidroxilas primárias 6, 6', 1'. Seguindo este mesmo raciocínio, o derivado diéster de sacarose, apresentaria igualmente as suas esterificações preferencialmente nas hidroxilas primárias.

Além desta mistura complexa de derivados com graus variados de esterificação, uma grande variedade de isômeros de posição podem ser obtidos. Assim, embora a sacarose monoesterificada a um determinado ácido graxo, apresente preferencialmente os derivados 6, 6' e 1' substituídos, as outras hidroxilas podem ser

eventualmente substituídas. Tal possibilidade, ao menos teoricamente, pode levar à formação de oito derivados diferentes, todos isômeros de posição. Na tabela 1, apresentam-se todas as possibilidades de isomeria de posição em função dos derivados ésteres de sacarose possíveis de serem sintetizados.

Tabela 1.- Número de isômeros possíveis para os diferentes ésteres de sacarose.

COMPOSTO	NUMERO DE ISOMEROS POSSÍVEIS
MONOESTER DE SACAROSE	8
DIESTER DE SACAROSE	28
TRIESTER DE SACAROSE	56
TETRAESTER DE SACAROSE	70
PENTAESTER DE SACAROSE	56
HEXAESTER DE SACAROSE	28
HEPTAESTER DE SACAROSE	8
OCTAESTER DE SACAROSE	1

De acordo com as posições preferenciais de esterificação, os derivados monoesterificados podem apresentar as estruturas mostradas na figura 2. Na figura 3 mostra-se uma das estruturas

mais prováveis do derivado diesterificado (6,6' diestearato de sacarose).

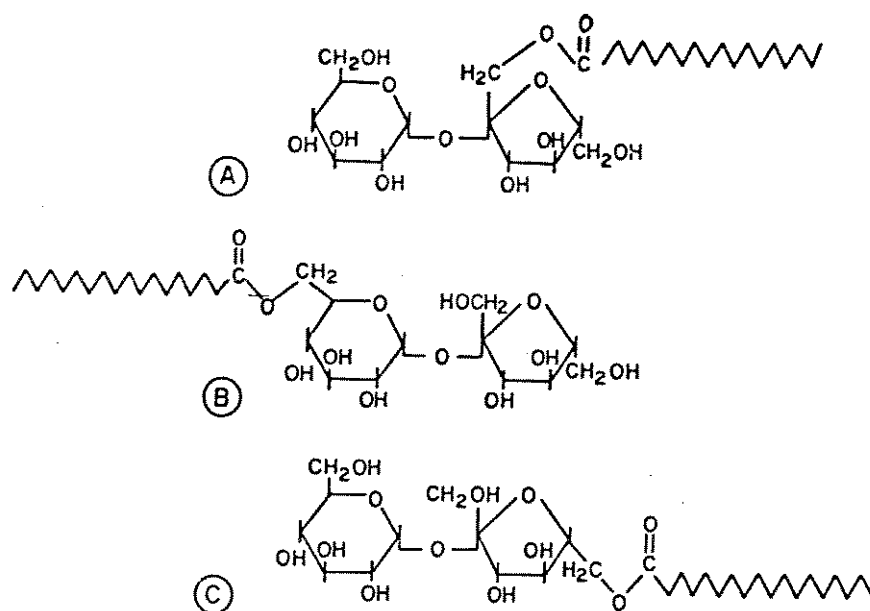


Figura 2.- Estruturas moleculares mais prováveis do monoéster de sacarose. Estrutura a: 1'-monoestearato de sacarose, b: 6-monoestearato de sacarose e c: 6'-monoestearato de sacarose.

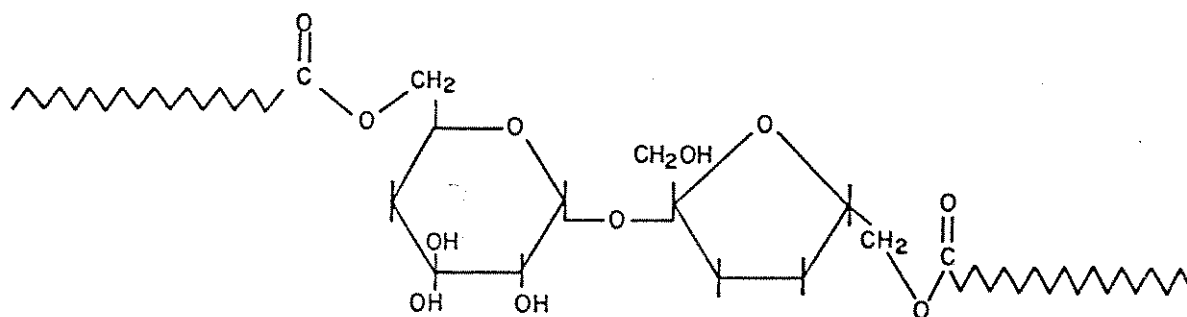


Figura 3.- Estrutura molecular mais provável do diestearato de sacarose. A estrutura apresentada é a do 6,6' diéster de sacarose.

Conforme pode-se ver nas figuras 2 e 3, os compostos representados, independentemente da posição de esterificação, apresentam duas porções distintas: uma região hidrofóbica (devido à cadeia carbônica do ácido graxo) e uma região hidrofílica (devido aos grupamentos hidroxilas da sacarose). Compostos químicos com estas características são denominados de anfifílicos e, como consequência desta natureza dual, apresentam propriedades de tenso-atividade. Os agentes ativos em superfícies podem ser classificados em surfactantes do tipo aniônico, catiônico, anfotéricos ou não iônicos de acordo com a estrutura química que apresentam. Assim, surfactantes com estrutura geral $R-X^-$ (onde R=região hidrofóbica e X é a cabeça polar) são classificados como aniônicos; compostos do tipo $R-Y^+$ pertencem ao grupo dos catiônicos. Compostos anfotéricos apresentam duas cabeças polares, contendo cargas opostas ($^+Y-R-X^-$). Finalmente, os compostos com cabeça polar sem carga, com uma estrutura geral RX, são classificados como sendo surfactantes não iônicos. Baseado nesta classificação, os derivados mono e diésteres de sacarose são considerados como agentes tenso-ativos do tipo não iônico.

O fato de agentes surfactantes possuírem duas regiões distintas faz com estes compostos sejam, em maior ou menor grau, solúveis tanto em água quanto em óleo. Raramente a solubilidade do surfactante é igual nas duas fases. Para o caso de surfactantes foi criado um índice, o balanço hidrofílico-lipofílico (HLB), que mostra a razão de solubilidade em água/óleo (Wilkinson e Moore,

1987). O índice, que constitui uma ferramenta muito utilizada por formuladores, mostra que os compostos com baixo índice de HLB apresentam uma tendência lipofílica maior que hidrofílica; inversamente, nos compostos possuindo um HLB alto, a tendência hidrofílica será predominante.

Assim, ésteres de sacarose com diferentes graus de esterificação, irão apresentar diferentes valores de HLB, variando numa faixa ampla, de 1 à 20 (Walker, 1984). No caso dos ésteres de sacarose, podemos classificar os produtos em dois grandes subgrupos:

a) Ésteres de Sacarose com alto HLB - Este grupo é constituído pelos derivados mono, di e triesterificados;

b) Ésteres de Sacarose com baixo HLB - Este grupo é constituído principalmente pelos derivados poliesterificados (contendo 4 à 8 substituições).

De acordo com os valores de HLB, isto é, de acordo com o grau de esterificação da sacarose, os compostos irão apresentar diferentes propriedades, com diferentes aplicações industriais. Ésteres de sacarose pouco substituídos (1 à 2 esterificações apenas) são bons agentes emulsificantes, podendo ter aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica-cosmética e de detergentes. Já os compostos contendo 4 ou mais esterificações (derivados poliesterificados) apresentam propriedades características de lipídeos, com a vantagem de não serem absorvidas pelo organismo

(Jandacek, 1982; Mattson e Volpenhein, 1972). Contrariamente aos derivados poliesterificados, os derivados pouco substituídos, são hidrolizados no trato intestinal (Akoh e Swanson, 1990).

I.3. - Produção e Aplicação dos Ésteres de Sacarose

Devido à grande aplicabilidade que os ésteres de sacarose possuem, estes glicolipídeos tem despertado a atenção de vários segmentos industriais. Um dos fatores decisivos é o fato destes compostos poderem ser sintetizados a partir de matérias primas renováveis (Desai, 1990; Sheppard e Lipinsky, 1977). Tal aspecto torna especialmente atraente sua síntese em países como o Brasil, onde existe abundância de sacarose, oriunda da cana de açúcar, e grande disponibilidade de matérias primas gordurosas, tanto de origem animal quanto vegetal.

O interesse pelos ésteres de sacarose tomou impulso na década de 60, após a publicação do primeiro método de síntese em escala industrial (Osipow e col., 1956). Apesar do seu grande potencial, a aplicação dos ésteres de sacarose ficou restrita por longos anos, devido ao problema da contaminação com dimetilformamida. Esta era empregada como solvente na reação da esterificação e apresentava efeitos tóxicos nas preparações (Walker, 1984; Desai, 1985). A remoção de dimetilformamida do produto final é de difícil execução e cara.

Posteriormente, novos métodos de síntese foram desenvolvidos, no intuito de se contornar o emprego de solventes orgânicos tóxicos. Desta forma, Osipow e Rosenblatt (1967) publicaram um processo de síntese de ésteres de sacarose, no qual não era necessário o emprego de solventes orgânicos. Mais tarde, processos de síntese de ésteres de carboidratos, em meios isentos de solventes orgânicos foram descritos (Parker e col., 1977; Feuge e col., 1970; Ferrenbach, 1985; Akoh e Swanson, 1989a e b, 1990).

Estas novas metodologias foram responsáveis pela renovação do interesse na produção e na aplicação industrial dos ésteres de sacarose na década de 70. Desta forma, os ésteres de sacarose são atualmente intensamente produzidos no Japão e em países da Europa (Nakamura e col., 1986). No Brasil, há relatos de estudos de sua produção, na Unidade de Programa de Sucroquímica do INT (Nakamura e col., 1986 e Falcone e col., 1987).

No que diz respeito aos ésteres de sacarose poliesterificados, que apresentam baixos valores HLB, só mais recentemente foi despertado o interesse da sua aplicação na indústria de alimentos, como uma inovação em termos da utilização como óleo ou gordura cosmetíveis. Estes derivados apresentam como vantagem o fato de serem considerados não calóricos (Haumann, 1986; LaBarge, 1988; Akoh e Swanson, 1990). Os poliésteres de sacarose apresentam propriedades similares às gorduras, como os tradicionais triglicérides (Nolen e col., 1987). Contrariamente aos

triglicérides, os poliésteres de sacarose não são digeríveis por enzimas pancreáticas ou intestinais (Jandacek, 1982; Mattson e Volpenhein, 1972; Akoh e Swanson, 1990), não sendo conseqüentemente, absorvidos, contribuindo desta forma para uma diminuição calórica na dieta. Outra vantagem da substituição de gorduras comuns por poliésteres de sacarose, é a constatação de que estes últimos causam uma diminuição do nível plasmático de colesterol (Fallat e col., 1976; Glueck e col., 1983).

Já os ésteres de sacarose pouco substituídos, com valores altos de HLB, tem sido amplamente utilizados em produtos de consumo, tanto ao nível da indústria alimentícia (Walker, 1984), cosmética (Desai, 1990), farmacêutica (Walker, 1984) e de detergentes (Falcone e col., 1987). No Japão, o país pioneiro na utilização dos ésteres de sacarose, os ésteres de sacarose com HLB em torno de 10 a 16 (altos teores em derivados mono e diesterificados), tem sido extensivamente utilizados na indústria de alimentos (Walker, 1984). A aplicação para estes derivados é igualmente permitida em países da Comunidade Européia.

Os empregos mais comumente citados para os derivados mono e diésteres de sacarose na indústria alimentícia incluem a sua introdução em produtos de consumo diário tais como margarinas, pães, bolachas, chocolate, gomas de mascar, sorvetes, molhos, cremes, etc (DK ester - Boletim Técnico, 1982). O consumo dos ésteres de sacarose foi analisado pelo Comitê de Aditivos

Alimentares da Organização Mundial da Saúde, que estabeleceu como permitido, o consumo humano de 10 mg de ésteres de sacarose por dia. Na indústria farmacêutica os monoésteres e diésteres de sacarose podem ser empregados na solubilização e dispersão de agentes farmacologicamente ativos, na formulação de emulsões farmacêuticas, como dispersante de vitaminas lipossolúveis, etc (Walker, 1984; DK ester, Boletim Técnico, 1982). No campo cosmético, os mono e diésteres de sacarose (derivados com maior aplicabilidade), podem ser empregados na confecção de emulsões do tipo água em óleo ou em emulsões óleo em água, para a obtenção de cremes, loções, shampoos, cremes condicionantes, pastas dentifrícias, etc (Desai e Lowicki, 1985; Desai, 1990).

A enorme quantidade de patentes depositadas nos últimos 20 anos, mostra outros empregos dos mono e diésteres de sacarose, em campos tão variados como na indústria de tintas e vernizes, na agricultura, e outros.

Esta extensa lista de possíveis empregos de monoésteres e diésteres de sacarose, mostra que nenhum outro agente tenso-ativo apresenta uma versatilidade tão grande de uso quanto os ésteres de sacarose (Nakamura e col., 1986).

Além da versatilidade de uso, os ésteres de sacarose com baixo grau de esterificação, apresentam vantagens sobre outros surfactantes do tipo não iônico e aniônico, de largo emprego na

indústria cosmética:

1) A principal vantagem do uso de ésteres de sacarose refere-se à sua inocuidade.

a) estes sucroderivados são considerados atóxicos para humanos e animais (Walker, 1984). Além disso, em comparação aos compostos lauril sulfato de sódio e de seus derivados etoxilados, os ésteres de sacarose, não apresentam contaminação pelo agente tóxico dioxana (Desai, 1990);

b) Os ésteres de sacarose não são compostos alergênicos (Desai e Lowicki, 1985);

c) Estes sucroderivados apresentam boa compatibilidade com a pele: não removem completamente a camada cutânea de lipídeos e não alteram o pH da pele (Desai e Lowicki, 1985);

d) Os ésteres de sacarose tendem a reduzir o potencial agressivo de outros surfactantes (Goldemberg, 1978; Desai, 1990).

2) Outra vantagem de importância ecológica é o fato destes compostos serem facilmente biodegradáveis, tanto em condições anaeróbicas quanto em condições aeróbicas (Falcone e col., 1987).

3) Mais recentemente, constatou-se uma outra vantagem dos monoésteres de sacarose, como detergentes suaves: a propriedade de manterem a integridade de proteínas intrínsecas de membranas biológicas, como a rodopsina (Abran e col., 1989). Esta propriedade destaca os monoésteres de sacarose como detergentes biológicos por

excelência, uma vez que podem ser utilizados na extração de proteínas, sem causar danos à sua estrutura, fato que geralmente ocorre quando outros surfactantes são empregados (Womack e col., 1983; Abran e col., 1989).

Os produtos encontrados no comércio consistem de sacarose esterificada com uma mistura de 30% de ácido palmítico e 70% de ácido esteárico (DK ester, Boletim Técnico, 1982; Sucrose esters - Croda, Boletim Técnico, 1985). Embora existam produtos comerciais enriquecidos em monoésteres, estes apresentam sempre uma significativa contaminação com derivados com maior grau de esterificação, principalmente em di e triésteres (Jaspers e col., 1987). Não existem, infelizmente, compostos monoesterificados e diesterificados puros no comércio, sendo raras as informações relativas às propriedades físico-químicas de compostos quimicamente definidos. Só muito recentemente foram determinados os parâmetros físico-químicos que caracterizam a propriedade de surfactância de uma série comercial de ésteres de sacarose (Donnelly e Bu'Lock, 1988). Tal fato mostra de maneira evidente a necessidade da realização de estudo aprofundados com derivados puros e quimicamente definidos.

I.4. - Justificativas e Propostas do Trabalho

O grande potencial de aplicação dos ésteres de sacarose,

aliado à disponibilidade de matéria prima no país, despertaram o interesse de algumas empresas e Instituições de Pesquisa, no sentido de desenvolver estudos para a viabilização de sua produção nacional. Destacam-se, neste sentido, os esforços do Instituto Nacional de Tecnologia (INT), bem como os da Johnson & Johnson (Planta Química de Sumaré, SP). Visando desenvolver estudos sobre as atividades biológicas de estearatos de sacarose, a Johnson & Johnson, estabeleceu um Convênio com o Laboratório de Cultura de Tecido do Depto. de Bioquímica - Instituto de Biologia, UNICAMP, (Convênio 213-1, 1984), através do qual este projeto teve início.

A determinação das atividades biológicas de ésteres de sacarose industriais torna obrigatória uma fase prévia de purificação e caracterização química dos componentes das misturas sintetizadas. Para tal, desenvolvemos métodos de separação das frações contendo mono-, di-, tri-, e poliestearatos de sacarose e identificamos as amostras quimicamente.

Em termos da atividade biológica dos estearatos de sacarose, chamou a nossa atenção os relatos sobre as suas atividades antitumorais (Nishikawa e col., 1977a e 1977b; Ikekawa e col, 1979) e antifúngicas (Marshall e Bullerman, 1986). Uma conclusão interessante destes estudos foi a constatação de que estas atividades estavam relacionadas com o conteúdo de monoéster de sacarose presente na preparação industrial. Tal observação é evidenciada por:

a) a verificação de uma relação direta entre o aumento da concentração do monoestearato de sacarose da preparação e o aumento da atividade inibitória do crescimento de tumores ascíticos de Ehrlich (Nishikawa e col., 1977b);

b) a verificação de uma relação inversa entre o índice HLB e a dose inibitória de 50% (ID_{50}) do crescimento de células leucêmicas de camundongo (Ikekawa e col., 1979), ou seja, de uma maior atividade inibitória em função do conteúdo de monoestearato de sacarose;

c) a constatação de que a atividade inibitória de uma série de estearatos de sacarose sobre o crescimento de uma variedade de fungos também era maior nas preparações ricas em monoestearato de sacarose (Marshall e Bullerman, 1986).

Estas observações apontam para uma direção comum: a propriedade dos produtos ricos em monoestearato de sacarose de inibirem o crescimento celular. Essa propriedade constitui um indicador da ação citotóxica de um composto. Essa constatação nos colocou diante de uma questão paradoxal: produtos considerados atóxicos pela "World Health Organization" como os estearatos de sacarose, apresentavam uma atividade citotóxica, relacionada com a composição da mistura, principalmente no que diz respeito ao conteúdo de monoestearato de sacarose. Isto nos levou levantar a hipótese que alguns ésteres de sacarose poderiam apresentar atividade tóxica *in vitro* mas não *in vivo*, despertando o nosso interesse para a investigação e a busca de explicações para este

paradoxo. Torna-se, por outro lado, importante ressaltar que os estudos acima citados não abordaram a questão da citotoxicidade dos estearatos de sacarose de maneira sistemática, abrangente e conclusiva, não empregaram compostos puros e nem investigaram seu efeito em células normais de mamíferos.

Em vista disto, nos propusemos a investigar de maneira sistemática, a possível ação citotóxica do monoestearato de sacarose purificado, em culturas de células de mamíferos. Interessou-nos também, verificar a influência da introdução de uma segunda esterificação na molécula de sacarose, nos efeitos observados, visando estabelecer uma possível relação entre estrutura e propriedades dos estearatos de sacarose. Para tal efetuamos, inicialmente, a separação e a purificação do monoestearato de sacarose (MES) e do diestearato de sacarose (DES), a partir de uma mistura industrial de estearatos de sacarose. As amostras purificadas foram caracterizadas quimicamente. Devido a capacidade surfactante destes compostos, interessou-nos também investigar suas atividades a nível da membrana celular. Finalmente, interessou-nos estudar a influência do sêro fetal bovino nos efeitos observados, visando mimetizar *in vitro*, condições mais próximas daquelas *in vivo*.

Dado o enfoque deste trabalho na avaliação da atividade tóxica de compostos químicos em modelos *in vitro*, consideramos importante apresentar algumas considerações sobre o interesse e a validade dos

ensaios toxicológicos *in vitro*.

I.5. - Ensaios de Citotoxicidade

Como decorrência do desenvolvimento industrial e tecnológico, a cada ano milhares de novos compostos químicos são introduzidos no mercado. Previamente à liberação no mercado, cada um destes compostos é submetido a testes para a determinação do seu potencial de risco genético e toxicológico. Como a maior parte destes testes são realizados com animais, verificou-se, conseqüentemente, um aumento progressivo do consumo de animais de laboratório. Nos E.U.A. por exemplo, os grupos de defesa de animais estimam que este número ultrapassa os 70 milhões ao ano (Klausner, 1987, Rowan e Goldberg, 1985). Esse consumo elevado de animais experimentais levantou uma questão de natureza ética, que resultou na ascensão de movimentos populares em defesa dos animais (Goldberg e Frazier, 1989). Além dos problemas éticos, os testes com animais tem sido questionados também do ponto de vista técnico e econômico (Klausner, 1987; Goldberg e Frazier, 1989).

Os problemas de natureza técnica consistem no fato dos resultados de testes toxicológicos obtidos com animais serem inexatos e de difícil reprodutibilidade (Klausner, 1987). Os problemas econômicos referem-se aos custos elevados dos ensaios com animais, devido à necessidade de manutenção de biotérios e à longa

duração de alguns testes.

Os problemas de natureza ética tornaram-se mais agudos recentemente, com o advento e o crescimento dos movimentos ativistas de proteção dos animais, particularmente em países desenvolvidos (Rowan e Goldberg, 1985). Dentre os testes mais atacados pelos ativistas situam-se os testes de toxicidade aguda (que provocam a morte de cerca de 50% dos animais utilizados) e o teste de irritação ocular de Draize. Ambos os testes, desenvolvidos há mais de 40 anos, empregam grande número de animais, tem sido criticados como sendo cruéis, e às vezes, inexatos (Klausner, 1987; Weil e Scala, 1971, Bosshard, 1985).

Todos estes problemas levaram a comunidade científica a procurar métodos alternativos para os testes toxicológicos (Goldberg e Frazier, 1989). São considerados métodos alternativos técnicas que acarretam a substituição, ou a redução do número de animais ou ainda sejam mais refinadas, no sentido de reduzir o sofrimento dos animais. Este conjunto de requisitos é conhecido como a lei dos três Rs (Replacement, reduction, refinement) (Rowan e Goldberg, 1985, Klausner, 1987). Os testes alternativos devem também levar em conta a rapidez de execução, a reprodutibilidade dos resultados, o baixo custo dos ensaios alternativos e, obviamente, uma boa correlação *in vitro* e *in vivo*.

Os testes alternativos mais promissores na atualidade, são os

que empregam culturas de células e culturas organotípicas (Rowan e Goldberg, 1985; Goldberg e Frazier, 1989; Klausner, 1987; Ekwall, 1980; Tardiff, 1978; Stark e col., 1986). Com o desenvolvimento da tecnologia de culturas celulares nos últimos 20 anos, é atualmente possível cultivar praticamente todos os tipos de células animais e humanas, mesmo as células diferenciadas, existindo uma grande variedade de linhagens disponíveis em banco de células.

A possibilidade de se trabalhar com linhagens estabelecidas, de vida permanente em cultura (Adolphe e Barlowatz-Meinon, 1988) veio solucionar o problema da reprodutibilidade dos experimentos, uma vez que se pode utilizar uma mesma população de células por um tempo longo. Além de resolver os problemas éticos e técnicos, os ensaios com culturas de células são, ainda, vantajosos pela rapidez de obtenção das respostas e pelo baixo custo (Stark e col., 1986).

Devido a estes fatores, uma enorme variedade de testes empregando culturas celulares com o objetivo de acessar o potencial citotóxico de compostos químicos tem sido descrita nos últimos anos (Klausner, 1987; Stark e col., 1986; Goldberg e Frazier, 1989).

Os resultados dos diversos testes citotóxicos tem mostrado, de maneira geral, uma boa correlação com os resultados obtidos *in vivo* (Stark e col., 1986; Ekwall, 1980), demonstrando assim seu potencial como alternativa metodológica. Restrições de correlação são observadas com substâncias tóxicas que atuam ao nível do

sistema nervoso central. Mesmo assim, se recomenda a utilização de testes *in vitro* como uma etapa primária de monitoramento (Ekwall, 1980).

Um dos pontos críticos para o desenvolvimento de testes citotóxicos é a escolha do tipo celular a ser submetido aos vários ensaios *in vitro* (Stark e col., 1986). Assim, culturas primárias de células derivadas de tecidos humanos ou animais retém, ao menos inicialmente, muitas das funções complexas e sistemas bioquímicos presentes no organismo inteiro. Já as linhagens celulares estabelecidas podem ser clonadas para fornecer populações mais homogêneas e tem como vantagem o fato de poderem ser cultivadas indefinidamente (Stark e col., 1986). De qualquer maneira, a seleção de um sistema celular para o uso em ensaios citotóxicos requer reprodutibilidade e, dependendo do caso, da retenção de funções metabólicas complexas, o que possibilita a avaliação de efeitos biológicos específicos. O primeiro atributo citado, a reprodutibilidade, pode ser adequadamente alcançado com as linhagens celulares estabelecidas, enquanto que o segundo atributo, a retenção de funções metabólicas complexas, pode ser obtido com o emprego de culturas primárias (Stark e col., 1986).

Outro aspecto de importância é a escolha dos indicadores biológicos a serem monitorados (Rheinhardt e col., 1985). Obviamente, o efeito biológico a ser monitorado é mais significativo, se responder a um amplo espectro de agentes

químicos. Normalmente, a morte celular é facilmente monitorada, embora trate-se de um fenômeno do tipo tudo ou nada. Outros monitoramentos biológicos mais específicos podem ser seguidos, como por exemplo, a inativação de um determinado sistema enzimático. De maneira ideal, o efeito biológico a ser seguido deve ser sensível a uma vasta gama de agentes tóxicos e fornecer respostas mesmo em doses subletais (Strak e col., 1986). Por exemplo, o efeito inibitório de substâncias sobre o crescimento celular apresenta as características acima reportadas, podendo ser evidenciado mesmo em doses subletais (Stark e col., 1986). Em termos de segurança de uma avaliação toxicológica se recomenda, geralmente, a introdução de uma bateria de ensaios, com o monitoramento de vários parâmetros diferentes (Stark e col., 1986).

Particularmente, no que diz respeito aos detergentes, compostos largamente empregados em produtos de consumo diário, um grande esforço tem sido efetuado no desenvolvimento de testes citotóxicos visando substituir o teste de irritação ocular, realizados em coelhos (Draize e col., 1944). Com este objetivo particular, diversos testes *in vitro*, empregando culturas celulares, foram desenvolvidos na última década (Klausner, 1987; Rowan e Goldberg, 1985). Estes testes mostraram uma correlação aceitável com os resultados obtidos no teste de Draize. Embora a literatura recente mostre a viabilidade na avaliação da atividade tóxica de detergentes *in vitro*, sejam eles do tipo aniônico, catiônico, anfotéricos ou não iônicos, não há dados sobre a

citotoxicidade dos ésteres de sacarose em células cultivadas in vitro.

Em vista do exposto acima, a avaliação da citotoxicidade dos estearatos de sacarose com baixo grau esterificação foi realizada em diversos tipos celulares no sentido de caracterizar os efeitos em células, empregando-se diferentes parâmetros indicadores de efeitos tóxicos. Os tipos celulares empregados no estudos dos efeitos biológicos dos sucroderivados foram: células eritrocíticas de origem humana, culturas primárias de fibroblastos da derme humana, culturas primárias de linfócitos humanos e, culturas de células estabelecidas, de origem humana (linhagem fibroblástica VA-13) e animal (fibroblastos V-79, oriunda de hamster chinês). Esta última linhagem apresenta a vantagem de ser facilmente mantida em laboratório e exibir uma rápida proliferação in vitro, tendo sido já utilizada na avaliação de efeitos citotóxicos de outros detergentes (Tachon e col., 1989). Por isso, a maioria de nossos experimentos foram realizados com essa linhagem.

Os vários parâmetros de citotoxicidade por nós avaliados foram:

- a) alteração da morfologia celular;
- b) perda da viabilidade celular;
- c) perda da adesão celular;
- d) inibição do crescimento celular;

- e) capacidade de sobrevivência celular;
- f) capacidade de romper membranas de hemácias e,
- g) integridade funcional de membranas de fibroblastos.

Além disso, buscando trabalhar em condições experimentais mais próximas dos modelos *in vivo*, interessou-nos realizar alguns ensaios em meio contendo 10% de soro fetal bovino. Constatamos, porém, na literatura relatos sobre a interferência do soro nos resultados de ensaios toxicológicos *in vitro*, particularmente para os detergentes (Kabara, 1979). Este fato nos levou a determinar a possível influência do soro fetal bovino no efeito letal do MES para as células fibroblásticas V-79 e no efeito lítico em eritrócitos humanos.

II - MATERIAIS E MÉTODOS

II.1. - REAGENTES E SOLUÇÕES

II.1.a. - Reagentes

II.1.a.1. - Estearatos de Sacarose.

Os produtos da reação entre a sacarose e uma mistura de estearato (70%) e palmitato de metila (30%) foram sintetizados na Johnson & Johnson do Brasil Ind. e Com. (Planta Química, Sumaré, S.P.) via um processo isento de solventes orgânicos tóxicos. O produto obtido foi denominado de Estearato de Sacarose Industrial (ES-1), devido ao fato do ácido graxo predominante ser o ácido esteárico. As características físico-químicas (índice de saponificação, índice de hidroxila, índice de acidez, ponto de fusão e o teor de açúcar não reagido) foram determinadas (Relatório Interno J&J). As análises efetuadas mostraram que o produto ES-1 apresentava como componentes principais os derivados mono e diestearatos de sacarose. Para os estudos da ação biológica, estes estearatos foram previamente separados e purificados de outros derivados com maior grau de esterificação.

II.1.a.2. - Separação, purificação e análise dos ésteres de sacarose.

Os solventes orgânicos utilizados foram de grau analítico, da E. Merck, Brasil. A sílica Gel G-60 (tamanho de partícula entre 0,063-0,200 mm) para as cromatografias em coluna e as cromatofolhas de sílica Gel G-60, para as cromatografias em camada delgada (CCD) e o indicador de fluorescência F 254, foram da E. Merck, Darmstadt, Alemanha, assim como os reagentes antrona e sacarose. Da Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA foram obtidos rodamina 6G, o estearato de metila. As amostras de estearatos de sacarose Fl0 e Fl10, utilizados como padrão, foram procedentes da Croda Inc., New York, EUA.

II.1.a.3. - Cultura de Tecidos

Cloreto de sódio, cloreto de potássio, bicarbonato de sódio e etileno diaminotetraacetato de sódio (EDTA) provieram da Reagen, São Paulo, Brasil. Fosfato monobásico de potássio, fosfato dibásico de sódio heptahidratado e glicerol, da Ecibra, São Paulo, Brasil. Cloreto de cálcio, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, ácido tricloroacético, sacarose, álcool etílico, cristal violeta (azul de genciana) foram obtidos da E. Merck, Brasil. Da Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA: Tris(hidroximetil)aminometano e Azul de Tripan;

Ficoll 400, da Pharmacia, Upsalla, Suécia; diatrizoato de sódio à 25% + diatrizoato de Meglumina à 50% (Hypaque M) da CEME, Brasília, Brasil. Lique mine (heparina sódica - 5000 UI), da Roche, Rio de Janeiro, Brasil. Tripsina, da Difco, Detroit, EUA. Dimetilsulfóxido, da Aldrich, Milwaukee, EUA. Álcool alílico, da Carlo Erba, Milão, Itália. ^{14}C -Uridina (atividade específica de 0,5 $\mu\text{Ci/nMol}$), da New England Nuclear, Boston, EUA. Cocktail de cintilação líquida Insta-Gel, da United Technologies Packard, Down Grove, EUA.

II.1.a.4. - Surfactantes

Dodecil Sulfato de sódio (SDS), monooleato de polioxietileno de sorbitan (Tween 80), monoestearato de polioxietileno de sorbitan (Tween 60), monoestearato de sorbitan (Span 60) e octilfenoxi polietoxietanol (Triton X-100) foram provenientes da Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA. Solução de Brij 35 (23-lauril éter de polioxietileno) da Technicon, New York, EUA.

II.1.a.5. - Meios de Cultura

Meio Eagle modificado por Dulbecco, com glutamina (DMEM), meio mínimo de Eagle com glutamina (MEM), meio RPMI-1640 foram obtidos da Flow Lab., McLean, EUA. O soro fetal bovino (SBF), da Cultilab, Campinas, Brasil. Antibióticos (penicilina e estreptomicina) foram obtidos da Laborclin, Pinhais, Brasil. Os filtros Millipore (0,22

µm de diâmetro) foram empregados na esterilização dos meios de cultura.

II.1.b. - Preparo das Soluções

II.1.b.1. - Tampão Fosfato Salina (PBS-A)

Cloreto de sódio (137 mM), cloreto de potássio (2,68 mM), fosfato dibásico de sódio (8 mM) e fosfato monobásico de potássio (1,5 mM) foram dissolvidos em 1 litro de água deionizada. O pH final estava entre pH = 7,2-7,4. A solução foi esterilizada em autoclave (calor úmido).

II.1.b.2. - Tampão Fosfato Salina contendo Cálcio (PBS- Ca^{++})

Para a obtenção deste tampão, além dos sais usados na preparação do tampão PBS-A, foi acrescentado 1 mM de cloreto de cálcio; o pH da solução foi medido (pH = 7,2 - 7,4). A esterilização foi efetuada por ultrafiltração.

II.1.b.3. - Solução de Tripsina 0,1%

Sob suave agitação foram dissolvidos 0,25 g de tripsina em 250 ml de solução de PBS-A contendo 10 mM de EDTA (pH = 7.2-7.4). A solução foi esterilizada por ultrafiltração e estocada a -20°C.

II.1.b.4. - Meio de Lise Celular

Culturas celulares de fibroblastos foram lisadas por meio de uma solução contendo hidróxido de sódio (0,3 M), cloreto de sódio (0,1 M) e EDTA (0,01 M) em água deionizada ou então por meio de uma solução aquosa de NaOH 0,5 M.

II.1.b.5. - Solução de Azul de Tripan

200 mg de corante Azul de Tripan foram dissolvidos em 100 ml de tampão fosfato salina (PBS-A). A solução foi filtrada e estocada a cerca de 5 °C.

II.1.b.6. - Preparação de Ficoll-Hypaque

Em 12 ml de solução aquosa de Ficoll a 10% ($d = 1,076 \text{ g/l}$) foram adicionados 5 ml de Hypaque previamente diluído a 32,8% em água bidestilada. Após a homogeneização, a solução de Ficoll-Hypaque foi esterilizada em autoclave. As soluções estéreis de Ficoll-Hypaque foram mantidas a baixa temperatura e protegidas da luz.

II.1.b.7. - Sistema de solventes (SIS) para os estearatos de sacarose

Para as amostras testes de monoestearato de sacarose (MES) e

diestearato de sacarose (DES), compostos que apresentam baixa solubilidade em água ou em tampões fisiológicos, foi desenvolvido um sistema de solventes, composto de glicerol:Tween 80:Tampão Tris-Sacarose (Tris 0,01 M e sacarose 0,25 M, pH = 7,5), na proporção de 5:1:4 (por volume). A mistura foi esterilizada por ultrafiltração.

II.1.b.8. - Solubilização dos estearatos de sacarose (MES e DES)

Em todos os ensaios biológicos, os estearatos de sacarose foram dissolvidos como a seguir. As soluções estoques dos estearatos de sacarose (250 mg dos compostos em 1 ml do sistema de solvente SIS) foram obtidas com agitação e aquecimento a 60-70 °C. Diluições 1:10, 1:100 e 1:1000 foram posteriormente efetuadas em tampões PBS-A ou PBS-Ca⁺⁺, em condições de esterilidade.

II.1.c. - Preparo dos Meios de Cultura

II.1.c.1. - Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)

A mistura dos componentes (13,45 g) foi dissolvida em 800 ml de água deionizada. Após a homogeneização, foram agregados 1,2 g de NaHCO₃ e antibióticos (para uma concentração final de 100 UI/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina). O pH do meio foi medido (pH = 7,2-7,4). O volume foi então completado para 1000 ml e a solução foi esterilizada por ultrafiltração. O meio de cultura foi

estocado a baixa temperatura. Para a confecção das culturas celulares, este meio foi posteriormente suplementado com 10% de soro fetal bovino (DMEM + 10% SFB), denominado aqui como sendo meio completo. Quando necessário o meio DMEM foi também suplementado com a adição de 20% de SFB (DMEM + 20% SFB).

II.1.c.2. - Meio RPMI-1640

A mistura dos componentes (10,38 g) foi preparada e esterilizada conforme descrito no item II.1.c.1.

II.1.c.3. - Meio Mínimo de Eagle (MEM)

O meio MEM foi obtido seguindo a mesma metodologia (ver itens II.1.c.1 e 2).

II.2.- MÉTODOS

II.2.a.- Métodos Químicos

II.2.a.1. - Separação e purificação dos estearatos de sacarose com baixo grau de esterificação (mono e diésteres)

O produto da reação ES-1, contendo compostos com diferentes graus de esterificação, foi separado por meio de colunas cromatográficas (42 cm x 2,4 cm) usando-se 80 g sílica gel G-60, previamente ativada (120 °C por 2 horas). Cerca de 4 g de estearatos de sacarose (ES-I, preparação industrial com predominância de derivados mono e disubstituídos), sintetizados de acordo com o item II.1.a.1, foram dissolvidos em pequeno volume de clorofórmio-metanol 95:5 (v/v), a quente, e aplicados no topo da coluna. A eluição dos compostos foi efetuada aumentando-se, paulatinamente, de 2,5 em 2,5% a concentração de metanol em clorofórmio, até atingir a proporção de clorofórmio-metanol 85:15 (v/v); a seguir, foi efetuada uma eluição com clorofórmio-metanol 80:20 (v/v) e, finalmente com metanol puro. Os solventes foram eliminados por evaporação e cada fração obtida foi pesada e posteriormente analisada por meio de cromatografia em camada delgada (fase móvel: clorofórmio-metanol-ácido acético-agua na proporção de 79:11:8:2, por volume). As análises mostraram a presença de compostos com diferentes mobilidades cromatográficas.

Entre estes compostos, duas frações de estearatos de sacarose, com Rfs inferiores à 0,5, foram denominadas de composto A e B.

II.2.a.2. - Métodos de análises dos estearatos de sacarose purificados ou não em coluna cromatográfica

O teor, a composição e o grau de substituição dos estearatos de sacarose purificados foram determinados utilizando-se uma metodologia similar ao descrito na literatura (Nakamura e col., 1986). Resumidamente, 500 µg das frações purificadas em coluna cromatográfica, denominadas compostos A e B, foram separadas por meio de cromatografia em camada delgada (fase móvel: clorofórmio-metanol-água-ácido acético na proporção de 79:11:2:8, por volume). Após a revelação dos compostos com rodamina 6G, o teor de sacarose foi determinado raspando-se cuidadosamente faixas de 0.5 cm (na origem), de 3.4 cm (até o $R_f = 0.4$) e de 5 cm até o fronte dos cromatogramas. Os teores respectivos de sacarose esterificada foram determinados colorimetricamente, pelo método de antrona (solução de 0,2% de antrona em ácido sulfúrico) conforme descrito anteriormente por Dreywood (1946) e Morse (1947). Após 20 minutos em banho a 60 °C, procedeu-se à leitura a 625 nm e o teor de sacarose em cada faixa foi calculado. Os compostos purificados A e B foram posteriormente analisados por meio de espectrometria infravermelha num aparelho Perkin-Elmer, modelo 283.

II.2.b. - Métodos biológicos

II.2.b.1 - Cultura de células: origem, obtenção e manutenção das células em cultura

II.2.b.1.a. - Hemácias humanas

Cerca de 10 - 15 ml de sangue humano periférico de doadores saudáveis foram coletados em frascos heparinizados (100 U/ml). Tubos contendo 5 ml de sangue heparinizado foram centrifugados a 5 °C, 1000 x g, por 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante (plasma) foram adicionados 2,5 ml de NaCl 0,9% aos precipitados (eritrócitos). As células foram homogenizadas suavemente e recentrifugadas nas mesmas condições descritas e os sobrenadantes novamente descartados. A lavagem das hemácias foi repetida por mais duas vezes, seguindo este mesmo procedimento. Finalmente, à preparação de hemácias foram acrescentados 3 ml de NaCl 0,9%. A mistura foi então centrifugada a 2000 x g, 5 °C, por um período de 10 minutos. Após a remoção do sobrenadante, foi adicionado igual volume de salina fisiológica ao precipitado celular, para a obtenção da papa de hemácias (hematócrito de 50%). Nos experimentos da ação biológica dos estearatos de sacarose foi utilizado um "pool" de papas de hemácias provenientes de 5 doadores, preparado misturando-se iguais volumes de papa de hemácias. O "pool" de hemácias foi mantido à 5 °C, por um período máximo de 48 horas. A maior parte dos ensaios foi efetuada nas primeiras 24 horas.

II.2.b.1.b - Linfócitos humanos

Para a separação dos linfócitos de outros elementos celulares foi utilizado o método descrito por Boyun (1968). Resumidamente, alíquotas de 10 ml de sangue humano periférico heparinizado, obtido de doadores saudáveis, foram centrifugados a 500 x g por um período de 8 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e imediatamente diluído volume à volume com o meio mínimo de Eagle (MEM). Cerca de 3 ml de plasma diluído foram cuidadosamente aplicados sobre 2,5 ml de Ficoll-Hypaque, tomando-se o cuidado de não misturar as duas fases. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos, a 500 x g, na temperatura de 18 °C. A nuvem de linfócitos, depositada na interface do Ficoll-Hypaque e do plasma diluído, foi cuidadosamente removida com uma pipeta Pasteur siliconizada. Os linfócitos assim separados foram posteriormente lavados por duas vezes, com pequenos volumes de meio (MEM ou RPMI-1640). Finalmente, a preparação celular foi suspensa em volume conhecido de meio, as células totais contadas e a percentagem das células viáveis determinadas pelo método de Azul de Tripan (ver procedimento II.2.b.2.b.).

II.2.b.1.c. - Fibroblastos

II.2.b.1.c.1. - Origem das Células

No presente estudo foram utilizados três tipos de células

fibroblásticas.

- as culturas primárias de fibroblastos humanos diplóides, oriundas da pele humana de doadores normais, foram gentilmente cedidas pela Dra. Christine Hackel, do Departamento de Genética Médica, Instituto de Biologia da UNICAMP.

- a linhagem estabelecida VA-13, foi derivada a partir de fibroblastos diplóides de pulmão humano (WI-38), transformados por vírus SV-40 (Simian Virus 40).

- a linhagem estabelecida V-79, oriunda de fibroblastos diplóides de pulmão de hamster chinês, primeiramente isolada por Ford e Yerganian (1958).

Estas duas últimas linhagens celulares foram gentilmente doadas pelo Dr. Rogério Meneghini, do Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da USP.

II.2.b.1.c.2. - Manutenção das culturas fibroblásticas

As células foram rotineiramente cultivadas em placas de Petri de vidro em meio de cultura completo, ou seja: meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células cresceram na forma de monocamadas, aderidas ao fundo da placa, sendo mantidas a 37 °C, em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂. As culturas de fibroblastos, em densidade de confluência, foram subcultivadas após lavagem das células com tampão PBS-A e mediante tratamento

enzimático com tripsina, por um curto espaço de tempo (1 a 2 minutos), à temperatura ambiente. Ao fim deste tempo, o tratamento com tripsina foi bloqueado com a adição de meio de cultura completo (DMEM + 10% SFB). As células individualizadas em suspensão foram então homogeneizadas, contadas em câmara de Neubauer e, finalmente semeadas em baixa densidade celular em outras placas de Petri.

II.2.b.1.c.3. - Estocagem das linhagens celulares

As linhagens celulares foram criopreservadas em nitrogênio líquido. Para tal, às suspensões de células fibroblásticas individualizadas foram adicionados meio completo (DMEM + 10% SFB), na presença de dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado como agente criopreservante. As células foram acondicionadas em frascos adequados e estéreis. O processo de resfriamento foi efetuado de maneira controlada, numa diminuição da temperatura de 1 a 3 °C/min.

Quando necessário, os estoques celulares criopreservados foram descongelados. As ampolas foram removidas do nitrogênio líquido e imediatamente colocadas em banho à 37 °C. A suspensão celular assim descongelada foi transferida para uma placa de Petri, contendo o meio de cultura DMEM, na presença de 20% de SFB. Após a adesão celular (que normalmente ocorre entre 6 a 8 horas após plaqueamento), o meio de cultura foi trocado por meio fresco e as células foram cultivadas nas condições padrão, isto é, em meio completo, 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂, até atingirem

a densidade de confluência. As culturas foram então rotineiramente subcultivadas conforme descrito anteriormente.

II.2.b.2.- Métodos de avaliação dos efeitos biológicos

II.2.b.2.a. - Detecção das alterações morfológicas em fibroblastos cultivados

As culturas de fibroblastos V-79, utilizadas nos experimentos delineados para a observação de eventuais alterações morfológicas induzidas por amostras testes, foram preparadas a partir de culturas estoques, conforme descrito nos itens anteriores. Desta forma, culturas contendo 3×10^5 células/placa de 5 cm de diametro foram efetuadas e, cultivadas por um periodo de 36-48 horas, nas condições padrão já descritas, até atingirem uma densidade de semi-confluência. O meio de cultura foi removido e as culturas lavadas 2 vezes com tampão PBS-A. As células foram então expostas às amostras testes. Os estearatos de sacarose purificados foram solubilizados com a ajuda do sistema de solventes (SIS) e posteriormente diluídos em tampão PBS-A ou PBS- Ca^{++} , numa concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$. O tempo de exposição foi de até 30 minutos, a 37 °C. As alterações morfológicas induzidas pelo tratamento em função do tempo de exposição foram observadas microscopicamente (Microscópio invertido Nikkon, modelo Diaphot) e microfotografadas, (acoplando-se ao microscópio uma camara fotografica Nikkon FT-21), com aumentos de 100 vezes ou 200 vezes.

Posteriormente, culturas de fibroblastos VA-13 e de fibroblastos humanos normais (FHN) foram tratadas de maneira análoga, para a detecção de alterações morfológicas induzidas pelo tratamento com 50 µg/ml de monoestearato de sacarose purificado.

II.2.b.2.b. - Determinação dos efeitos de amostras testes na viabilidade de linfócitos humanos

Para a determinação da viabilidade celular, os linfócitos humanos isolados e recém purificados (2×10^6 células/ensaio), foram incubados por 30 minutos, 37 °C, em 0.5 ml de meio RPMI-1640 contendo os compostos testes. A alteração na viabilidade celular foi determinada, imediatamente após a incubação, pelo método de exclusão do corante Azul de Tripan. Após a contagem do número total de células linfocíticas, foram contados os linfócitos que incorporaram o corante Azul de Tripan, considerados inviabilizados por não serem mais capazes de excluir tal corante. A percentagem de células inviabilizadas pelos diferentes tratamentos foi calculada. Os linfócitos não expostos aos agentes testes (controles) apresentaram uma viabilidade celular de $\geq 95\%$

II.2.b.2.c. - Efeito de amostras testes sobre a adesão e integridade celular de fibroblasto em cultura

Culturas estoques das linhagens celulares VA-13 e V-79 foram tripsinizadas e semeadas em placas de 5 cm de diâmetro, em alta

densidade celular ($0,7 - 1,0 \times 10^6$ células/placa), em meio completo. As culturas fibroblásticas foram incubadas normalmente por um período de 24 horas, tempo este suficiente para a recuperação do tratamento com tripsina e para a completa fixação celular ao substrato de vidro. O meio de cultura foi removido e as células lavadas com tampão PBS- Ca^{++} . As culturas foram, a seguir, tratadas com as amostras testes, por um período de 30 minutos, a 37 °C. Ao cabo deste tempo, os meios de exposição foram coletados e as células remanescentes nas placas foram lisadas em meio alcalino (0,3 M NaOH, 0,1M NaCl e 0,01M EDTA), por 1 hora, 37 °C. Para a caracterização da indução de lise celular decorrente dos tratamentos, foi determinada a absorbância em 260 nm (ácidos nucleicos) e 280 nm (proteínas) nos meios de exposição coletados e nos lisados das culturas celulares.

Na investigação dos efeitos de diferentes doses de MES, DES e outros agentes surfactantes, um outro procedimento foi utilizado. Culturas de fibroblastos em fase exponencial foram expostos aos agentes testes por 30 minutos, dissolvidos em tampão PBS- Ca^{++} , nas condições usuais. O meio de tratamento foi removido, as culturas lavadas 2 vezes com tampão PBS- Ca^{++} e reeincubadas com meio fresco por 30 minutos. Ao final, o meio foi removido, as culturas lavadas 3 vezes com tampão PBS- Ca^{++} e, finalmente, as culturas foram lisadas. A massa celular foi estimada espectrofotometricamente ($A_{260 \text{ nm}}$).

II.2.b.2.d. - Determinação dos efeitos de compostos sobre a proliferação celular de fibroblastos em cultura

Culturas de fibroblastos VA-13 ($2,2 \times 10^5$ células/placa) foram preparadas em placas de Petri com 5 cm de diametro e cultivadas em meio completo, nas condições normais, por um período de 6-8 horas. A seguir, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com tampão PBS- Ca^{++} e tratadas, por 30 minutos, 37°C , com os compostos de interesse incorporados no mesmo tampão empregado na lavagem das células. Os meios de tratamento foram removidos das culturas, as células lavadas 2 vezes com o mesmo tampão. Finalmente foi adicionado meio completo (DMEM + 10% SFB) nas culturas e o cultivo foi efetuado por um período de 66 horas, nas condições normais de temperatura e atmosfera gasosa. O crescimento celular relativo foi obtido via a determinação da absorbância em 260 nm dos lisados das culturas tratadas e não tratadas, no tempo 0 (imediatamente após a exposição das células) e no tempo 66 horas:

$$\frac{A_{260 \text{ nm}} \text{ das culturas tratadas após 66 horas}}{A_{260 \text{ nm}} \text{ das culturas controle no tempo 0 horas.}}$$

II.2.b.2.e. - Determinação de curvas de sobrevivência de fibroblastos em cultura

As culturas de fibroblastos V-79 utilizadas neste experimento

foram preparadas de acordo com os métodos anteriormente descritos. A suspensão celular, obtida após a tripsinização, foi contada em câmara de Neubauer, e diluída sucessivamente, em meio de cultura DMEM suplementado com 20% de SFB, até atingir uma densidade final de cerca de 150-250 células/ml. Em placas de Petri (5 cm de diametro), já contendo 1 ml de meio suplementado com 20% de SFB, foram inoculados 1 ml da suspensão celular em baixa densidade. Após um período de incubação das culturas por 12 horas, nas condições padrão, o meio de cultura foi removido e as culturas expostas a diferentes tratamentos, por 30 minutos, a 37 °C. Num tipo de tratamento, as culturas celulares foram expostas às amostras testes, solubilizadas com SIS e dissolvidas em PBS-Ca⁺⁺; no outro procedimento, as culturas celulares foram expostas às amostras testes solubilizadas em SIS e dissolvidas em PBS-Ca⁺⁺ contendo 10% de soro fetal bovino. Após o período de exposição, nas duas condições, os meios de tratamentos foram removidos e as culturas lavadas com PBS-Ca⁺⁺ e cultivadas a 37 °C, em atmosfera de 5 % de CO₂, na presença de meio DMEM suplementado com 20% de SFB, por um período de 7 dias. A seguir, as culturas foram fixadas com uma solução 10% de formol e, finalmente, coradas com cristal violeta 1%. As colônias celulares, contendo no mínimo 50 células cada, formadas a partir de células sobreviventes ao tratamento, foram contadas com o auxílio de uma lupa estereoscópica Zeiss. O número de colônias formadas em culturas não tratadas (controle) dividido pelo número de células semeadas foi definido como sendo eficiência de plaqueamento ($\geq 75\%$ nos experimentos efetuados). A taxa de

sobrevivência das células submetidas a um determinado tratamento foi expressa em termos percentuais, em relação ao número de colônias sobreviventes nas culturas controles (não tratadas).

II.2.b.2.f. Determinação da ação hemolítica em eritrócitos humanos por amostras testes

Em cada preparação de eritrócitos humanos utilizados nos experimentos de hemólise foi determinada, previamente, uma curva de resistência osmótica. Esta curva foi obtida após a incubação das hemácias em soluções salinas com diferentes concentrações (de 0,1% à 0,9% de NaCl). A determinação da percentagem de lise em cada um dos ensaios seguiu a metodologia descrita abaixo.

Para a detecção dos efeitos hemolíticos dos compostos estudados foi empregado o método clássico de hemólise: 50 µl do "pool" de papa de hemácias foram introduzidos em tubos de hemólise contendo 2,5 ml de salina fisiológica (0,9% NaCl), na presença ou não de compostos testes nela dissolvidos. A suspensão celular foi homogeneizada suavemente. A incubação foi efetuada por um período de 15 minutos, a 37 °C. Ao término deste período, os tubos foram centrifugados a 2000 x g, por 10 minutos, 4 °C, para a sedimentação dos debris celulares e dos eritrócitos íntegros. A quantificação da hemólise foi avaliada pela determinação do conteúdo de hemoglobina liberada no sobrenadante, via leitura espectrofotométrica em 576 nm. Os valores percentuais de hemólise induzidos pelos diferentes

tratamentos foram calculados a partir dos valores de 100 % de hemólise (obtidos dos lisados totais de hemácias em 0,1% de NaCl).

II.2.b.2.g. - Determinação da taxa de captação de Uridina (Udr) por fibroblastos em cultura expostos a amostras testes

A técnica da determinação da taxa de captação de Udr por fibroblastos em cultura foi primeiramente descrita em 1984 por Shopsis & Sathe (1984) e adaptada por nós. As modificações introduzidas dizem respeito à linhagem celular utilizada (linhagem V-79 ao invés da linhagem 3T3) e às condições de exposição aos agentes estudados (30 minutos, em tampão PBS-A, ao invés de 4 horas, em meio de cultura completo). Resumidamente, o método para a determinação da taxa de captação de Uridina foi o seguinte:

Células fibroblásticas V-79, obtidas de culturas estoques, foram distribuídas em placas de plástico descartáveis, de 35 mm de diametro, numa densidade de $2,5 \times 10^4$ células/placa, em 2 ml de meio de cultura completo. As células foram então cultivadas por um período de 72 horas, nas condições usuais de temperatura e de atmosfera gasosa. A seguir, quando as culturas celulares se encontravam em fase exponencial de crescimento, o meio de cultura foi removido, as células lavadas com PBS- Ca^{++} e expostas às amostras testes. O tratamento (em duplicata ou triplicata) foi efetuado com o agente de interesse, dissolvido em 1 ml de tampão PBS- Ca^{++} , por 30 minutos, 37 °C. Após a exposição e a remoção das amostras

testes, as culturas foram novamente lavadas, por duas vezes, com o mesmo tampão anteriormente referido. A seguir, foram adicionados às culturas, meio fresco (0,5 ml/placa) contendo ^{14}C -Uridina (^{14}C -Urd = 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$) e as culturas foram reeincubadas por mais 30 minutos, nas condições padrão. O meio completo contendo o isótopo foi então removido e as células novamente lavadas, por 3 vezes, com tampão PBS- Ca^{++} . As culturas foram finalmente lisadas em meio alcalino (0,7 ml de NaOH 0,5 M/placa) por 1 hora a 37 °C. A atividade do isótopo presente nos lisados celulares foi determinada aplicando-se alíquotas de 100 μl (em duplicata), neutralizadas com HCl 1N, diretamente em frascos de cintilação, na presença de Insta-Gel (5 ml de Insta-Gel/frasco); a determinação da radioatividade foi efetuada em contador de cintilação líquida, Beckman, modelo LS-100. O restante dos lisados celulares foi usado para a medida da absorbância em 260 nm, parametro este correlacionado com a massa celular presente no lisado. A taxa de captação de Urd foi expressa como a quantidade de radioatividade captada (em cpm) por unidade de absorbância a 260 nm.

III - RESULTADOS

III.1. - ESTUDOS QUÍMICOS

III.1.a. - Separação e purificação dos ésteres de sacarose

O isolamento e purificação dos ésteres de sacarose, a partir de amostras de sacarose esterificada industrial (ES-1), foi efetuado em colunas cromatográficas de Silica Gel G-60, conforme o procedimento descrito em Materiais e Métodos. As soluções de clorofórmio-metanol empregadas e o esquema de eluição utilizado estão apresentados na tabela 2.

Todos os eluatos foram analisados em cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica Gel G-60, com a fase móvel clorofórmio-metanol-ácido acético-água, na proporção de 79:11:8:2, por volume. Desta análise foram observadas as frações cujos R_f s eram inferiores a 0,5. Assim, o material eluído com clorofórmio-metanol 87,5:12,5 (v/v), nas frações 13 - 19 (que perfaziam cerca de 12% da amostra cromatografada), apresentou uma única mancha em cromatografia em camada delgada (CCD), e foi denominado composto A, com um $R_f = 0,36$; as frações de número 21-28, eluídas da coluna cromatográfica com

clorofórmio-metanol 85:15 (v/v) apresentaram, nesta mesma análise, uma única mancha, cujo Rf foi de 0,12. Este composto foi denominado de composto B (figura 4) e perfazia cerca de 22% do total da amostra cromatografada.

Em termos de Rfs, os resultados obtidos são similares aos descritos na literatura para o diestearato de sacarose (Composto A) e para o monoestearato de sacarose (Composto B) (Nakamura e col., 1986; Donnely & Bu'Lock, 1988).

Tabela 2.- Esquema de eluição utilizado na separação dos estearatos de sacarose por cromatografia em coluna.

VOLUME (ml)	SOLVENTE ELUIDOR (volume/volume)	VOLUME COLETADO (ml)	FRAÇÃO NÚMERO
400	CHCl ₃ -MeOH 95:5	100	1 - 4
400	CHCl ₃ -MeOH 92,5:7,5	100	5 - 8
400	CHCl ₃ -MeOH 90:10	100	9 - 12
400	CHCl ₃ -MeOH 87,5:12,5	50	13 - 20
400	CHCl ₃ -MeOH 85:15	50	21 - 28
400	CHCl ₃ -MeOH 80:20	50	29 - 36
400	MeOH	400	37

CHCl₃ = clorofórmio; MeOH = metanol.

As condições da cromatografia em coluna estão descritas no item II.2.a.1.

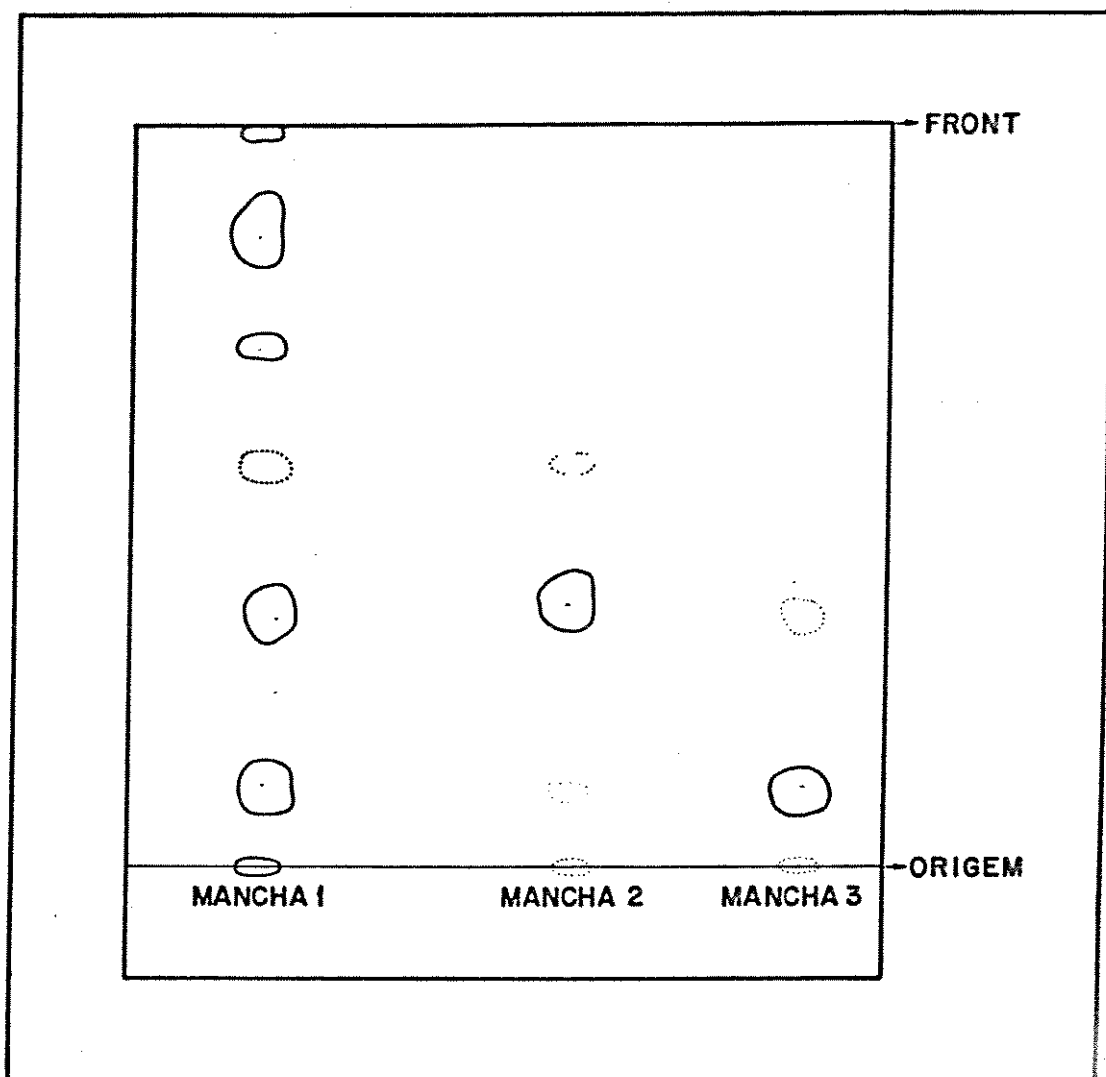


Figura 4.- Cromatograma dos estearatos de sacarose. Amostras contendo 500 µg de frações eluídas da coluna cromatográfica (item III.1.a) e da amostra ES-1 (item II.1.a.1) foram aplicadas em cromatoplaças de Silica Gel 60. A mancha 1 corresponde à preparação de estearatos de sacarose industrial (ES-I); a mancha 2 representa o composto A e a terceira corresponde ao composto B. Fase móvel: clorofórmio-metanol-ácido acético-água, na proporção de 79:11:8:2, por volume.

III.1.b - Análise e identificação dos compostos A e B

Os compostos A e B foram analisados através de seus espectros infravermelhos. A figura 5 mostra o espectro infravermelho obtido com o composto A e a figura 6 mostra o espectro infravermelho obtido com o composto A e B, na região de $4000 - 2000 \text{ cm}^{-1}$.

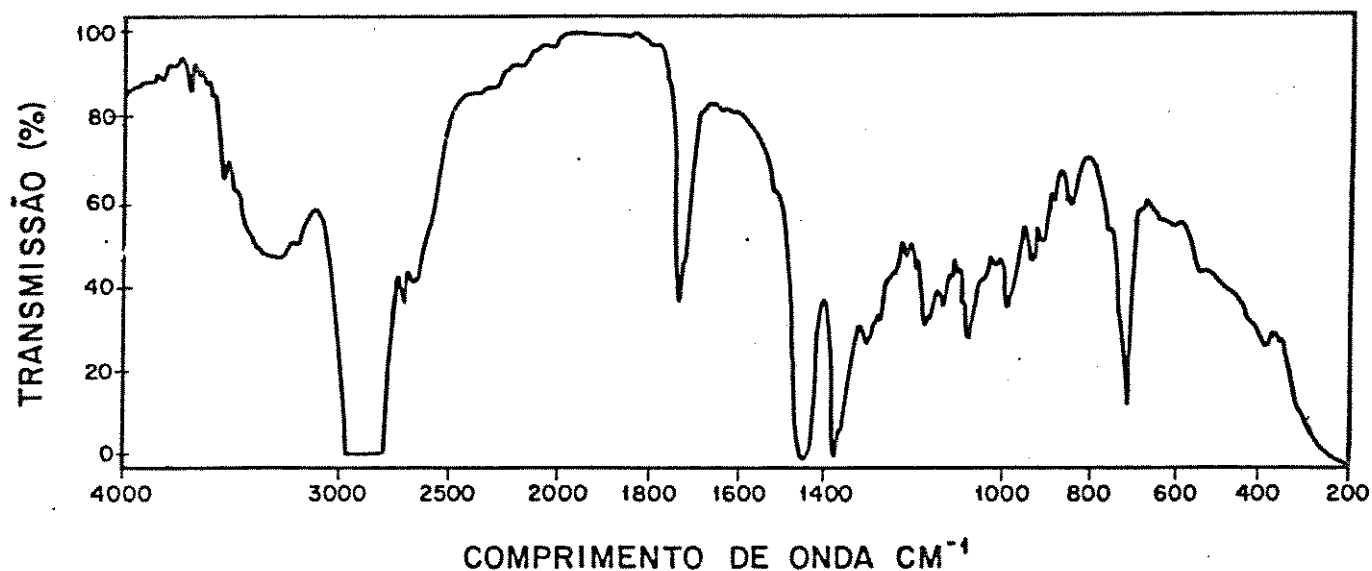


Figura 5.- Espectro infravermelho do Composto A, purificado em coluna cromatográfica, conforme descrito no item II.2.a.2.

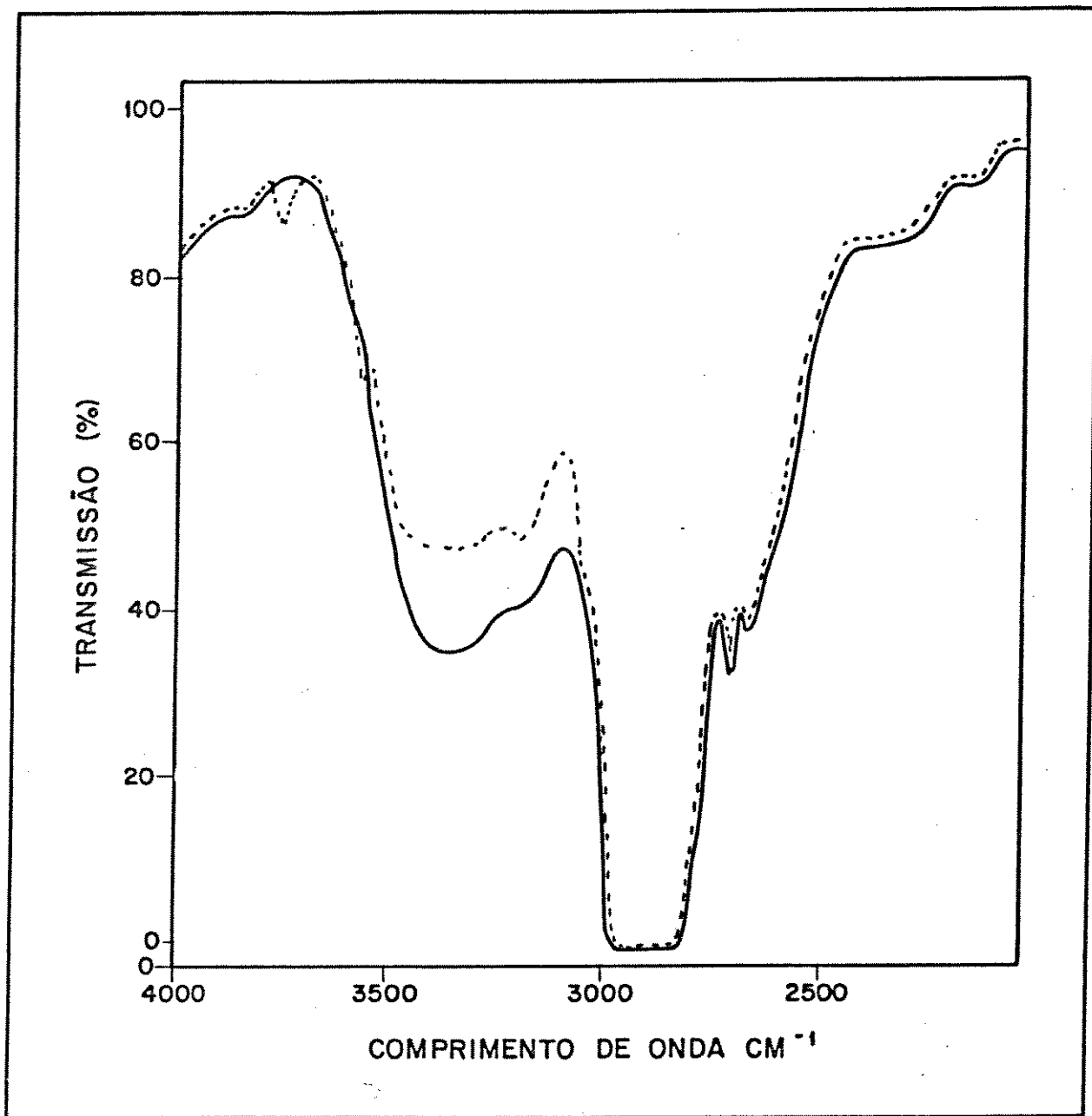


Figura 6.- Espectro infravermelho do Composto B (—) e A (-----) purificados por meio de cromatografia em coluna. Detalhe do espectro na região de 4000 - 2000 cm^{-1} .

Os compostos A e B purificados por meio de cromatografia em coluna apresentaram espectros com perfil característico de ésteres. Os espectros foram interpretados como a seguir: a banda em 3350 - 3500 cm^{-1} representa grupamentos hidroxilas; a banda entre 3000 - 2850 cm^{-1} devido à estiramento C-H em grupamentos $\text{CH}_2\text{-CH}_3$; 1730 cm^{-1} , representa a absorção de C=O de grupamento éster; 1460 cm^{-1} é devido à deformação C-H em $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ e a banda a 1380 cm^{-1} representa a deformação C-H em CH_3 . As absorções entre 1200 e 900 cm^{-1} foram interpretadas como absorções características de açúcares (Silva, 1978).

A única diferença notável obtida nos espectros infravermelhos dos compostos A e B referiu-se à região assinalada em 3350 cm^{-1} : o composto A exibe uma transmissão de aproximadamente 47% e o composto B exibe, na mesma região, uma transmissão de 36%. Tal resultado sugere diferentes conteúdos de grupamentos OH nos dois compostos purificados: o espectro infravermelho do composto A indica um conteúdo menor de hidroxilas não esterificadas, correspondendo ao derivado diesterificado, ao passo que o espectro do composto B indica um maior índice de hidroxilas livres, correspondendo ao derivado monoesterificado.

Outra análise efetuada foi a determinação do teor de sacarose dos compostos purificados. Para tal, foi determinado previamente uma curva de calibração de dosagem de sacarose pelo método de antrona - ácido sulfúrico, nas condições cromatográficas.

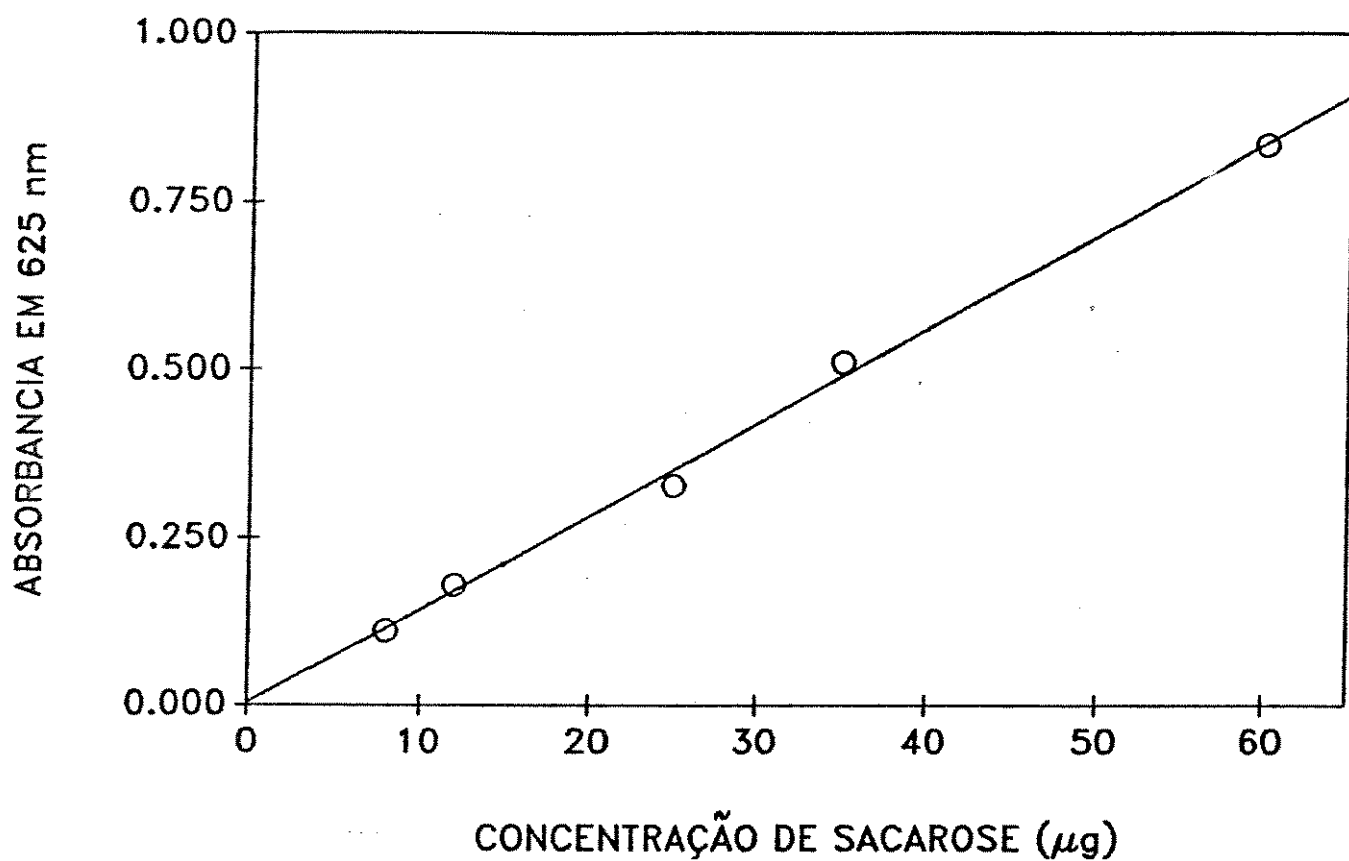


Figura 7.- Dosagem de sacarose pelo método de antrona ácido sulfúrico conforme descrito no item II.2.a.2.

Os resultados obtidos estão apresentados na figura 7.

Para a determinação do teor de sacarose presente nos compostos A e B purificados em cromatografia em coluna, 500 µg de cada um destes compostos foram cromatografados em CCD e reagidos com antrona ácido sulfúrico conforme o descrito no item II.2.a.2. O teor de sacarose combinada em cada um dos compostos analisados foi determinado colorimetricamente. O conteúdo de sacarose em cada uma das frações foi calculado em função do peso molecular do éster de sacarose correspondente à faixa removida da cromatoplaça. Os resultados estão apresentados na tabela 3.

A partir dos cálculos teóricos do conteúdo de sacarose no composto A, que em CCD exibiu um R_f atribuído ao diestearato de sacarose, e a partir da quantificação de sacarose presente nesta fração, os resultados encontrados mostram que este composto apresenta um teor de pureza por volta de 95%. As principais contaminações encontradas foram compostos tri e poliesterificados, perfazendo um total de 4%. De maneira análoga, o composto B mostrou um grau de pureza de 93%, com 3,5% de contaminação por diestearato de sacarose.

Embora o método de separação cromatográfico não possa separar os ésteres de sacarose em função do tamanho da cadeia carbônica dos ácidos esterificantes, as frações purificadas foram consideradas

como sendo estearatos de sacarose. Baseado no conjunto de resultados obtidos, os compostos A e B purificados por cromatografia em coluna, serão, daqui por diante, referidos, respectivamente, como diestearato de sacarose (DES) e monoestearato de sacarose (MES).

Tabela 3.- Composição das frações A e B purificadas (valores em %).

FAIXAS REMOVIDAS DA CCD (VALORES EM Rfs)	PRODUTO ES-1 (%)	COMPOSTO A (%)	COMPOSTO B (%)
0,00 - 0,03	4,5	0,4	1,5
0,03 - 0,19	44,6	0,4	93,3
0,19 - 0,40	19,4	95,2	3,5
0,40 - 0,69	16,0	2,0	1,2
0,69 - 1,00	15,5	2,0	0,5

Composto ES-1 = preparação industrial de estearato de sacarose. Os teores de açúcares encontrados nos compostos A e B purificados em coluna, comparativamente à amostra industrial de estearato de sacarose (ES-1), foram determinados. Foram aplicados 500 µg de cada um dos compostos e cromatografados em CCD. A seguir, faixas do cromatogramas foram raspadas e a sacarose presente foi quantificada espectrofotometricamente pelo método de antrona ácido sulfúrico, conforme descrito no item II.2.a.2. Os cálculos foram efetuados comparando-se os valores teóricos nos derivados em função dos valores encontrados.

III.2. - ESTUDOS BIOLÓGICOS

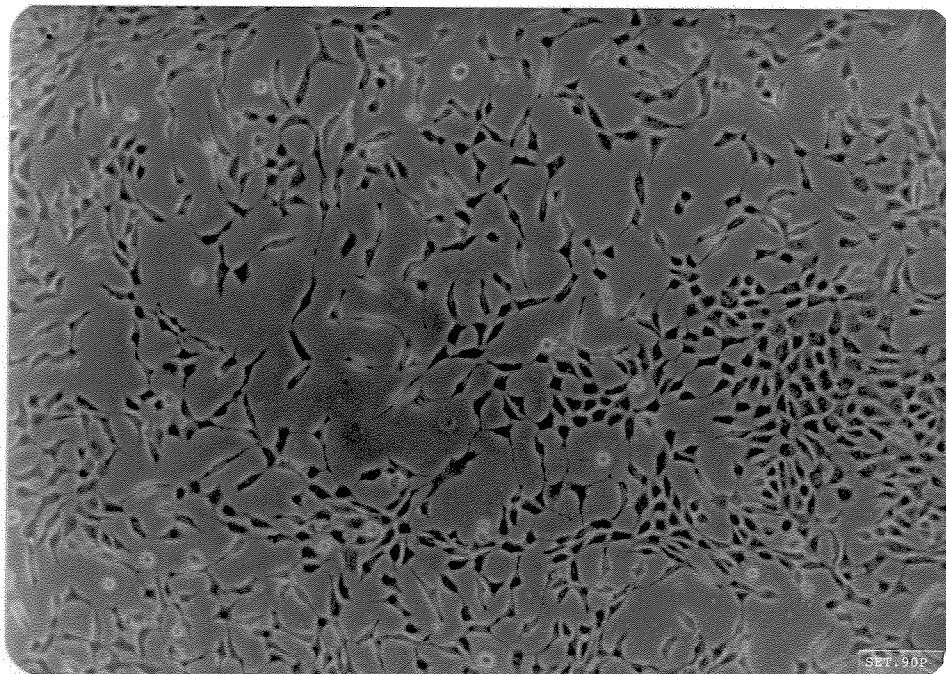
III.2.a - Detecção das alterações morfológicas em fibroblastos induzidas por estearatos de sacarose

A morfologia celular, o metabolismo celular e as características de crescimento celular são expressões gerais do estado normal das células (Adolphe & Barlovartz-Meinon, 1988). Desta forma, a observação de alterações morfológicas de células em cultura expostas à agentes químicos, constitui-se num teste simples e indicador do potencial agressivo que os agentes possuem. Estas alterações morfológicas decorrentes de tratamentos com substâncias citotóxicas podem ser caracterizadas pela perda da forma celular típica ou pelo surgimento de granulosidades citoplasmáticas e de microvacúolos. Agentes citotóxicos podem ainda provocar outros eventos observáveis por microscopia ótica, como o destacamento das células do substrato no qual estão aderidas e, finalmente causar a ruptura celular.

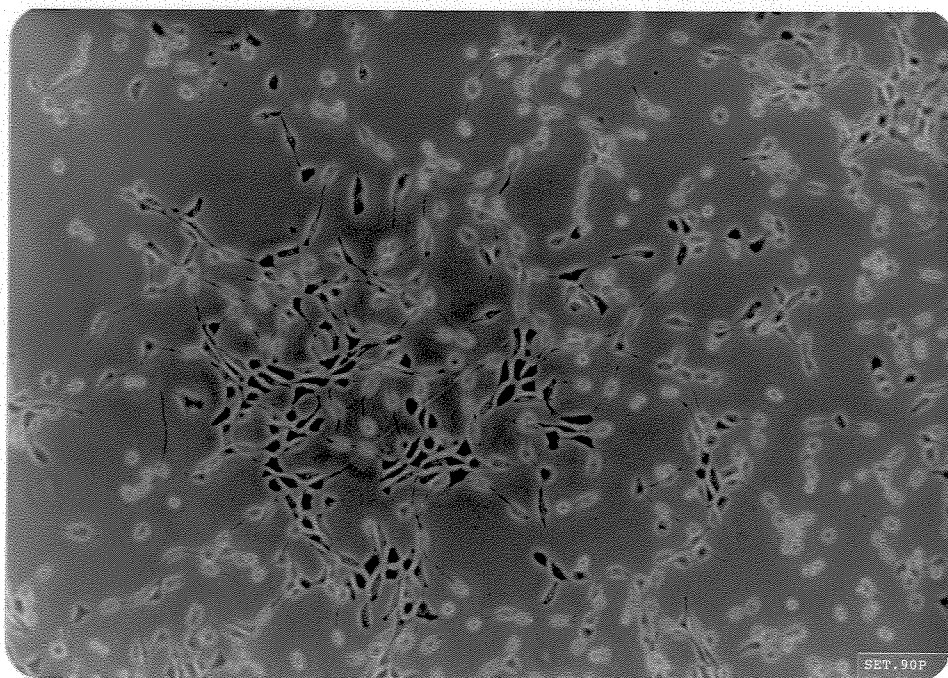
Com o intuito de constatar os eventuais efeitos que os esteratos de sacarose apresentam sobre a morfologia celular, culturas de fibroblastos da linhagem V-79, oriunda de hamster chinês, foram tratadas com 50 µg/ml de (MES), ou com 50 µg/ml de (DES). As culturas controle foram expostas ao tampão PBS-Ca⁺⁺ e a igual volume do sistema de solventes (SIS) empregado para a solubilização destes ésteres de sacarose (glicerol = 0,01% e Tween

80 = 0,002%). Após o tratamento, as culturas foram observadas ao microscópio e microfotografadas para a detecção de eventuais alterações morfológicas induzidas pelos tratamentos. A microfotografia 1, mostra a cultura de fibroblastos V-79 após 30 minutos de exposição ao tampão PBS-Ca⁺⁺. Este tratamento não causa alterações detectáveis na morfologia celular. As microfotografias 2 e 3 mostram os efeitos do tratamento com MES, ao cabo de 1 minuto e ao término de 30 minutos, respectivamente. Pode-se observar que após 1 minuto de exposição as células já apresentam modificações na morfologia, adquirindo uma forma arredondada. Ao cabo de 30 minutos (microfotografia 3), a maioria das células tem o aspecto de células não viáveis. A microfotografia 4 exhibe os efeitos do tratamento com DES, após 30 minutos de exposição, na morfologia de fibroblastos V-79. Comparando-se as microfotografias 1 e 4 pode-se constatar que o tratamento com DES não foi capaz de alterar a morfologia característica dos fibroblastos em cultura. As células redondas e birrefringentes nesta fotografia são provavelmente devido a presença de células pré mitóticas.

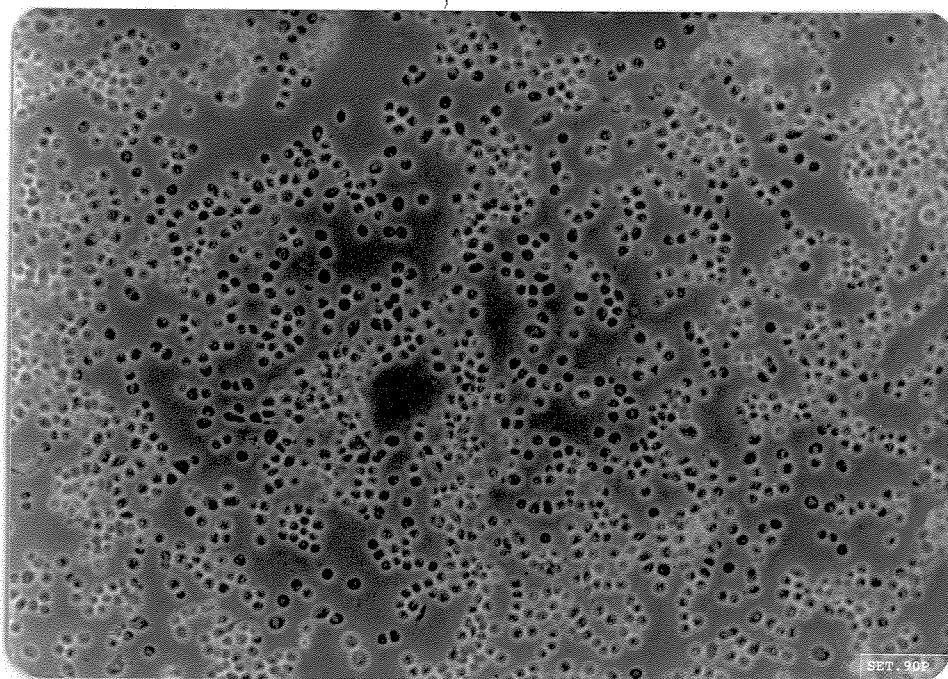
Os efeitos do MES sobre a morfologia celular foram igualmente investigados numa outra linhagem estabelecida, a linhagem celular VA-13, oriunda de fibroblastos diplóides de pulmão humano e transformados pelo vírus SV-40. As alterações morfológicas induzidas pelo tratamento foram registradas após 10 e 30 minutos, comparativamente a culturas controle (não expostas), ou frente à culturas expostas apenas ao sistema de solventes, na mesma



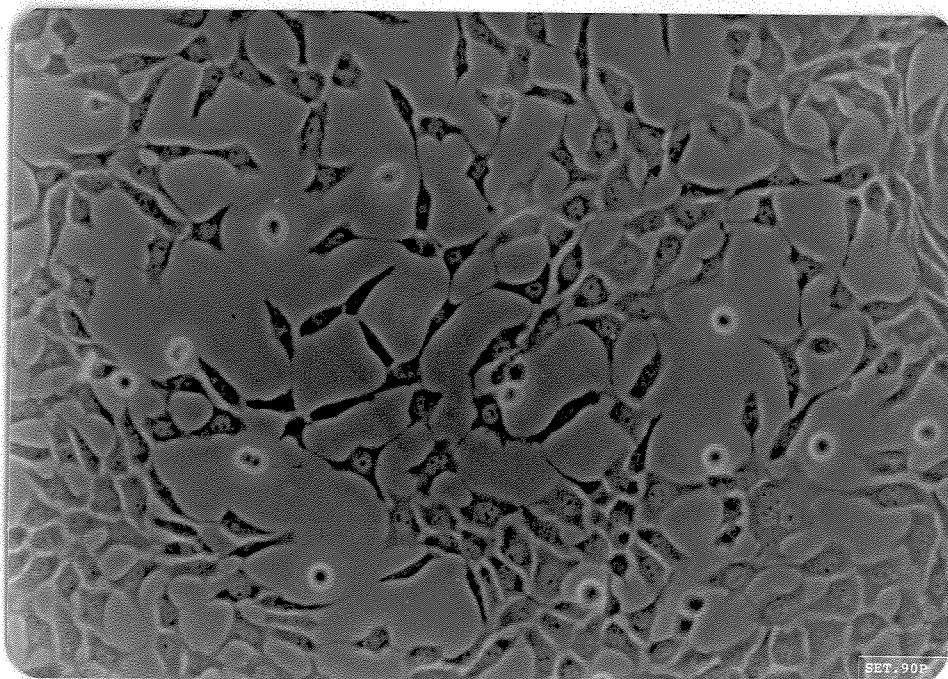
Microfotografia 1.- Culturas de fibroblastos V-79 após 30 minutos de exposição ao tampão PBS- Ca^{++} (aumento de 100 x), como descrito no item II.2.b.2.a.



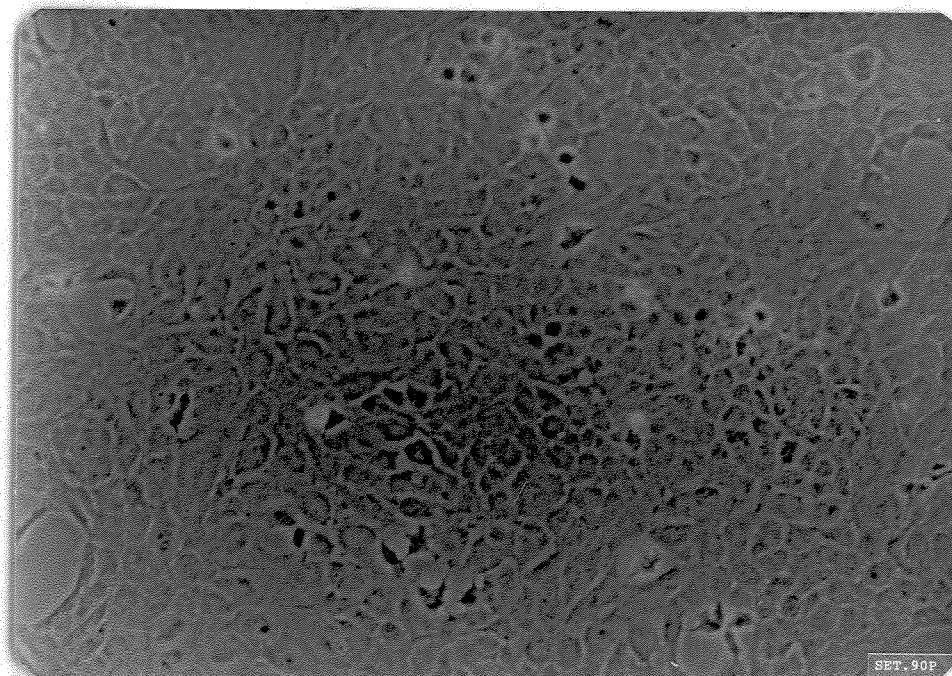
Microfotografia 2.- Culturas de fibroblastos V-79 após 1 minuto de exposição ao MES (50 $\mu\text{g/ml}$). Aumento de 100 x. As culturas foram fotografadas como na microfotografia 1.



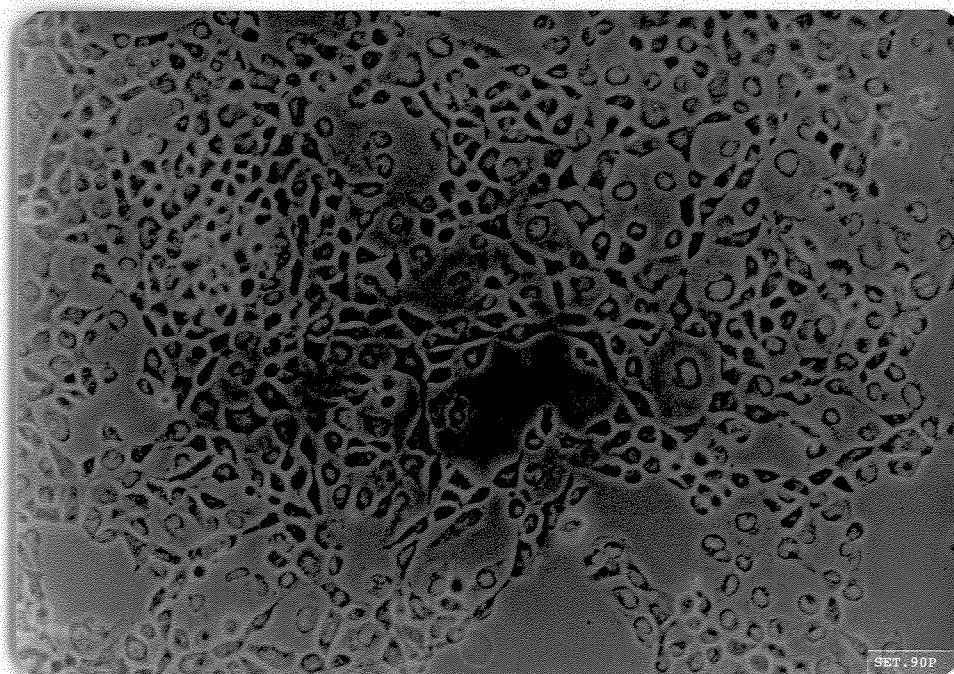
Microfotografia 3.- Culturas de fibroblastos V-79, expostas à 50 µg/ml de MES por 30 minutos (aumento 100 x), como descrito na microfotografia 1.



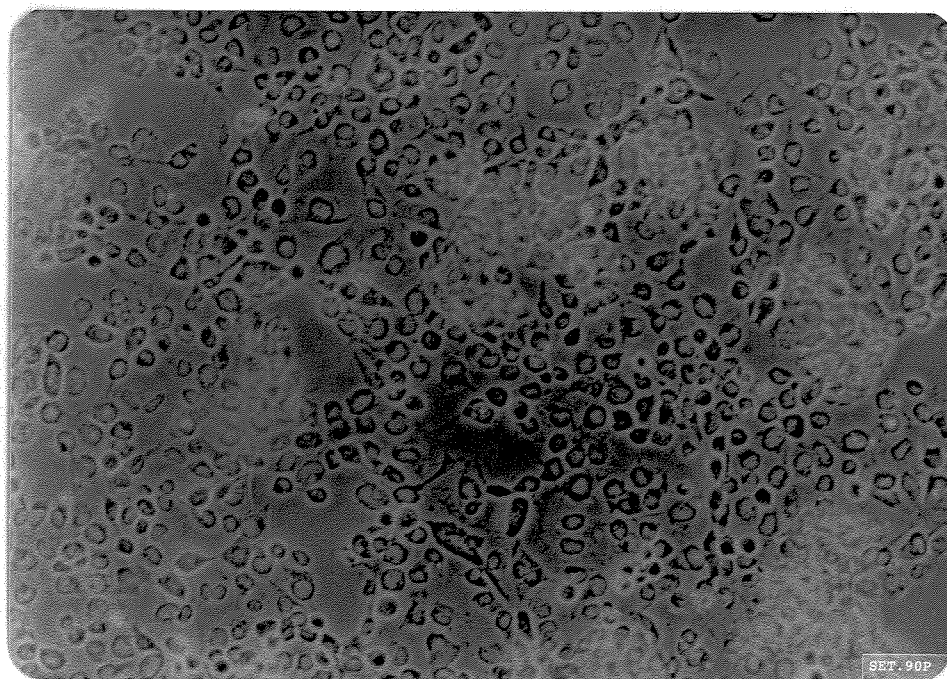
Microfotografia 4.- Culturas de fibroblastos V-79, expostas por 30 minutos à 50 µg/ml de DES (aumento de 200 x), como descrito na microfotografia 1.



Microfotografia 5.- Culturas de fibroblastos VA-13 após 30 minutos de exposição ao sistema de solventes (SIS) do MES. A fotografia foi efetuada conforme descrito na microfotografia 1 (aumento 100 x).



Microfotografia 6.- Culturas de fibroblastos VA-13 expostos à 50 µg/ml de MES, por 10 minutos (aumento 100 x), de acordo com o descrito na microfotografia 1.



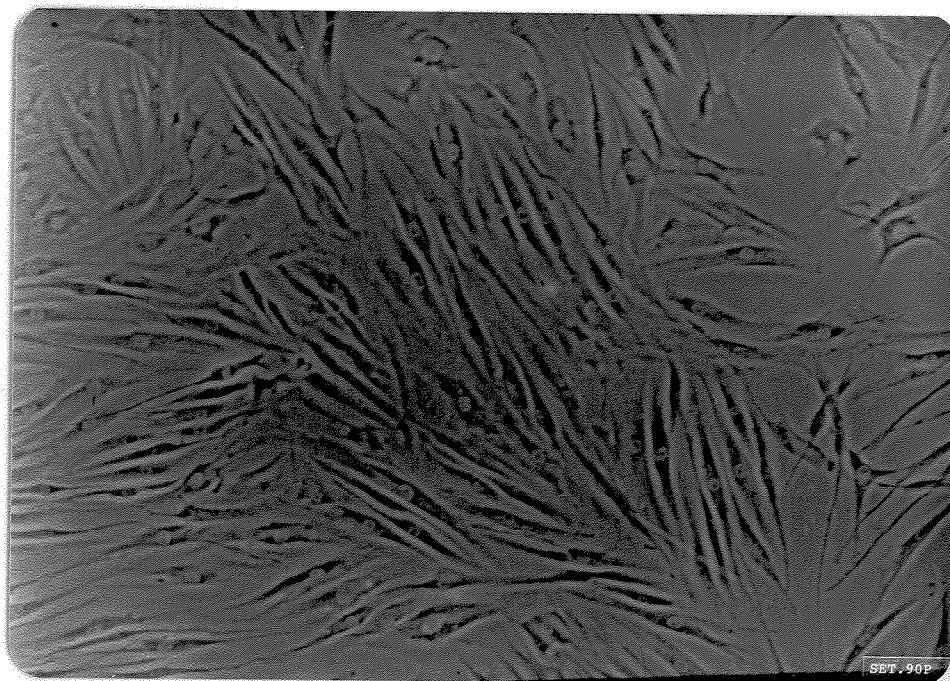
Microfotografia 7.- Culturas de fibroblastos VA-13 expostos à 50 µg/ml de MES, por 30 minutos (aumento 100 x), de acordo com o descrito na microfotografia 1.

proporção utilizada para a solubilização do MES. Os resultados estão apresentados nas microfotografias 5, 6 e 7.

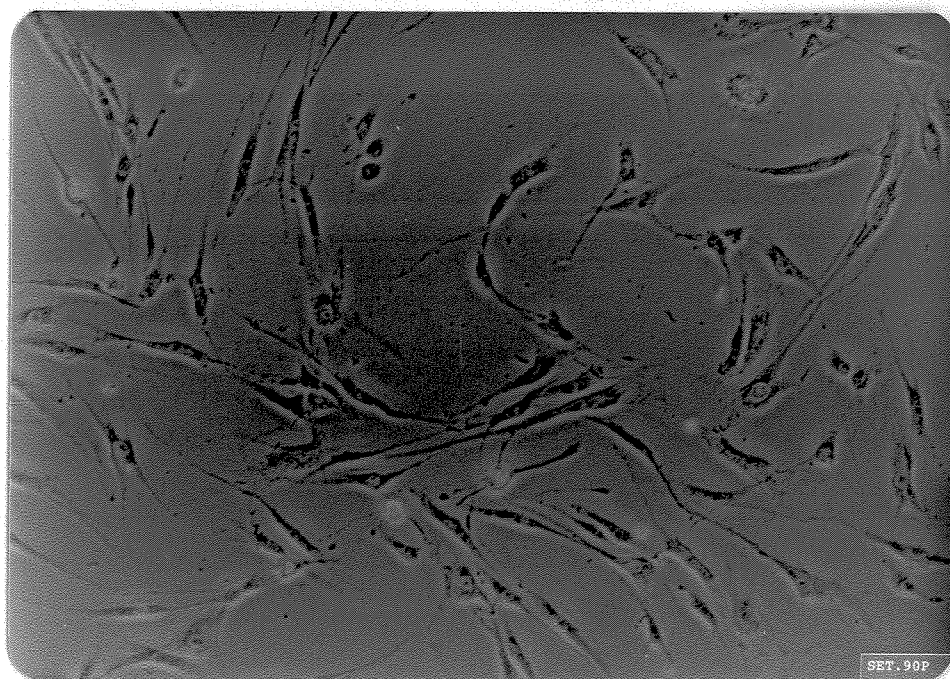
O resultado do tratamento de células fibroblásticas VA-13 com o sistema de solventes empregado para a solubilização dos ésteres de sacarose está apresentado na microfotografia 5. Neste tratamento as células apresentam uma morfologia celular característica similar às culturas não expostas (dado não exibido). Os efeitos do tratamento com 50 µg/ml de MES na morfologia celular de fibroblastos VA-13, após 10 e 30 minutos, são apresentados na

microfotografias 6 e 7 respectivamente. Como decorrência deste tratamento, pode-se constatar que após 10 minutos de exposição (microfotografia 6), a morfologia celular está alterada de maneira significativa. As células apresentam-se arredondadas, os núcleos estão com evidente aumento de volume, ocupando praticamente todo o espaço celular e, com a presença de microvacuolização. Ao término de 30 minutos de tratamento, as alterações morfológicas são mais profundas e generalizadas. Os núcleos apresentam-se em destaque, de maneira análoga ao que ocorre em casos de lise da membrana celular (microfotografia 7).

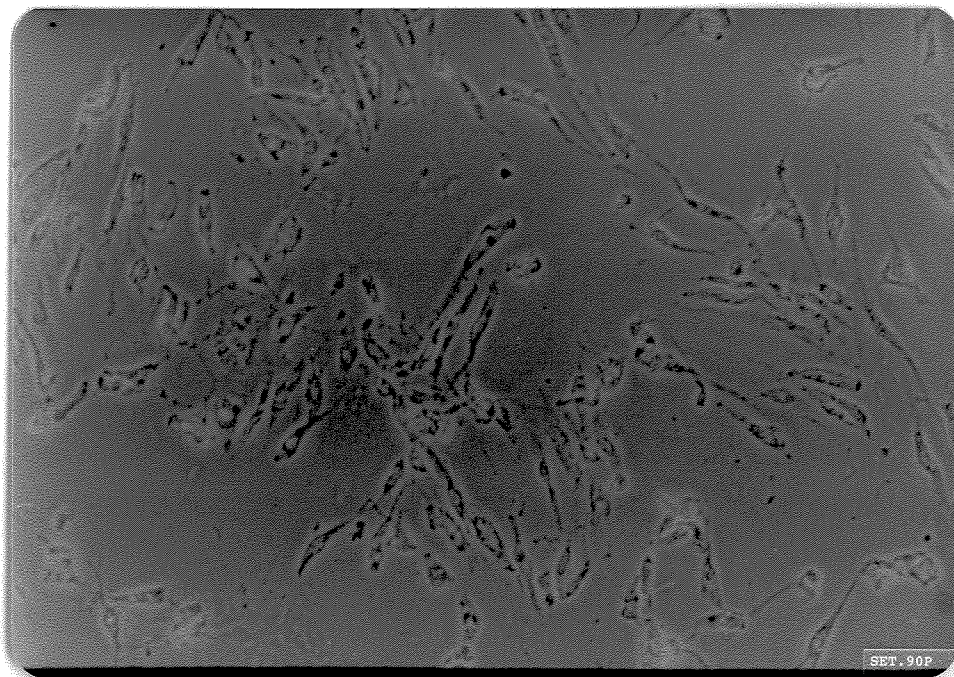
Neste mesmo estudo, procuramos igualmente investigar os efeitos que o tratamento com monoéster de sacarose (MES) provocaria em culturas primárias de fibroblastos oriundos da pele humana. Após 10 ou 30 minutos de exposição com 50 µg/ml deste composto, as culturas foram observadas microscopicamente e microfotografadas (microfotografias 9 e 10). As culturas controle foram expostas apenas ao tampão PBS-Ca⁺⁺ (microfotografia 8) ou ao sistema de solventes (SIS), na mesma proporção empregada nos ensaios com MES (glicerol = 0,01% e Tween 80 = 0,002%).



Microfotografia 8.- Cultura primária de fibroblastos, oriundos da pele, expostos por 30 minutos à PBS- Ca^{++} (aumento 100 x), conforme descrito na microfotografia 1.



Microfotografia 9.- Cultura de fibroblastos humanos após tratamento com 50 $\mu\text{g/ml}$ de MES, por 10 minutos (aumento 100 x), conforme descrito na microfotografia 1.



Microfotografia 10.- Cultura de fibroblastos humanos após tratamento com 50 µg/ml de MES, por 30 minutos (aumento 100 x), conforme descrito na microfotografia 1.

A morfologia celular característica encontrada nas culturas primárias de fibroblastos oriundos da derme humana está apresentada na microfotografia 8. O efeito do tratamento com MES neste tipo de fibroblastos mostra, que após 10 minutos de exposição, já se observam alterações da morfologia celular, com a perda do aspecto de agulha, característicos deste tipo de fibroblastos (microfotografia 9). Os efeitos, ao cabo de 30 minutos são profundos: perda completa da arquitetura celular e formação de "fantasmas" celulares (microfotografia 10). A exposição ao SIS não determinou alterações na morfologia dos fibroblastos (dado não apresentado).

Os resultados obtidos evidenciam, portanto, que o MES é capaz

de induzir alterações profundas na morfologia de fibroblastos, tanto em linhagens estabelecidas como em culturas primárias. Esses resultados constituem o primeiro indicador da citotoxicidade do MES para células de mamíferos. Devido às propriedades surfactantes do MES, é possível supor que a membrana celular constituiria o alvo primordial da ação exibida por este composto. Estes dados nos levaram a buscar novas evidências da ação citotóxica do MES e a estabelecer comparações com agentes cuja ação ao nível de membrana é conhecida.

III.2.b. - Determinação da viabilidade celular de linfócitos expostos a agentes tensoativos

A determinação da viabilidade celular é um importante parâmetro em investigações que utilizam sistemas celulares. A perda da viabilidade celular representa um dano irreversível, prévio à completa destruição celular. Uma das maneiras mais comumente empregadas para a determinação da viabilidade celular é o teste de exclusão de corantes, particularmente o teste de exclusão de Azul de Tripan. Neste método, as células danificadas tornam-se permeáveis ao corante, em contraposição às células viáveis, que retêm a capacidade de excluir este corante. Interessou-nos, por isso, verificar o efeito do MES sobre a viabilidade de linfócitos humanos, em comparação com outros agentes tensoativos do tipo não iônico (Tween 80, Tween 60 e Span 60).

Numa primeira etapa, os linfócitos humanos recém isolados de indivíduos saudáveis foram tratados com os agentes especificados na tabela 3, numa dose de 250 µg/ml, em ensaios contendo 2×10^6 células. Foram utilizados como controle o meio RPMI-1640, o sistema de solventes (SIS) e o estearato de metila (ES). Após 30 minutos de exposição, contaram-se as células totais e as células inviabilizadas, estas coradas pelo Azul de Tripán. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 4.

Os resultados obtidos mostraram que, tanto nos controles experimentais como em todos os tratamentos efetuados, excetuando-se a exposição a MES, a viabilidade dos linfócitos humanos foi $\geq 95\%$, não se detectando, portanto, nenhuma perda significativa na viabilidade celular. Por outro lado, a contagem do número total de células presentes após 30 minutos não evidenciou perda celular (a média do número de células totais nos ensaios foi de 106 ± 12). Entretanto, o tratamento com MES forneceu resultados completamente diferentes dos controles experimentais e dos tratamentos efetuados com outros surfactantes não iônicos. Primeiramente, o número total de células presentes após a exposição estava drasticamente reduzido: apenas 35% das células foram contadas após a exposição, sugerindo, desta forma, que o tratamento induziu uma ruptura celular de 65% dos linfócitos. Por outro lado, as células remanescentes ao tratamento com MES, apresentaram um alto grau de inviabilização (78% de inviabilidade nas células remanescentes). Em relação ao número total de células ensaiadas, apenas 7,5% dos

linfócitos apresentavam viabilidade após 30 minutos de exposição.

Tal resultado, obtido numa dose relativamente alta (5 vezes maior do que a empregada nos ensaios de alteração morfológica de fibroblastos), levou-nos à investigação dos efeitos causados por doses menores de MES, tanto no número total de células quanto no número de células inviabilizadas (figura 8). Os resultados obtidos mostram que o tratamento de linfócitos humanos com MES causa uma redução progressiva da viabilidade e do número de células remanescentes após o tratamento. A exposição a 75 µg/ml de MES é suficiente para determinar cerca de 30% de perda e causar a inviabilização de 75% dos linfócitos. Doses superiores a 75 µg/ml promoveram uma maior extensão de perda, sem contudo, aumentar a taxa de inviabilidade.

Conclui-se, desta forma, o MES é tóxico para linfócitos humanos. Os resultados apresentados, além de evidenciar a grande perda da viabilidade celular, mostram igualmente que MES provoca uma intensa lise celular.

Tabela 4.- Viabilidade de linfócitos humanos expostos a agentes tensoativos.

TRATAMENTO	NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS	NÚMERO DE CÉLULAS INVIÁVEIS	% DE CÉLULAS VIÁVEIS
Controle	108	0	100
SIS	114	1	99,1
ES	122	3	97,5
SPAN 60	105	4	96,2
TWEEN 60	103	0	100
TWEEN 80	85	0	100
MES	37	29	21,6

Os linfócitos humanos recém purificados foram incubados por 30 minutos, a 37 °C, em 0,5 ml de meio RPMI 1640 contendo os agentes MES purificado, sistema de solventes (SIS), estearato de metila (ES), Span 60, Tween 80 e Tween 60, todos na concentração de 250 µg/ml. A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão de Azul de Tripan. Os valores representam a média de duas contagens, todas com erros inferiores a 10%. A composição de solventes nos ensaios era de 0,01% (v/v) de Tween 80 e 0,05% (v/v) de glicerol. Controle: células expostas apenas ao meio RPMI-1640. O teste foi realizado conforme o descrito no item II.2.b.2.b.

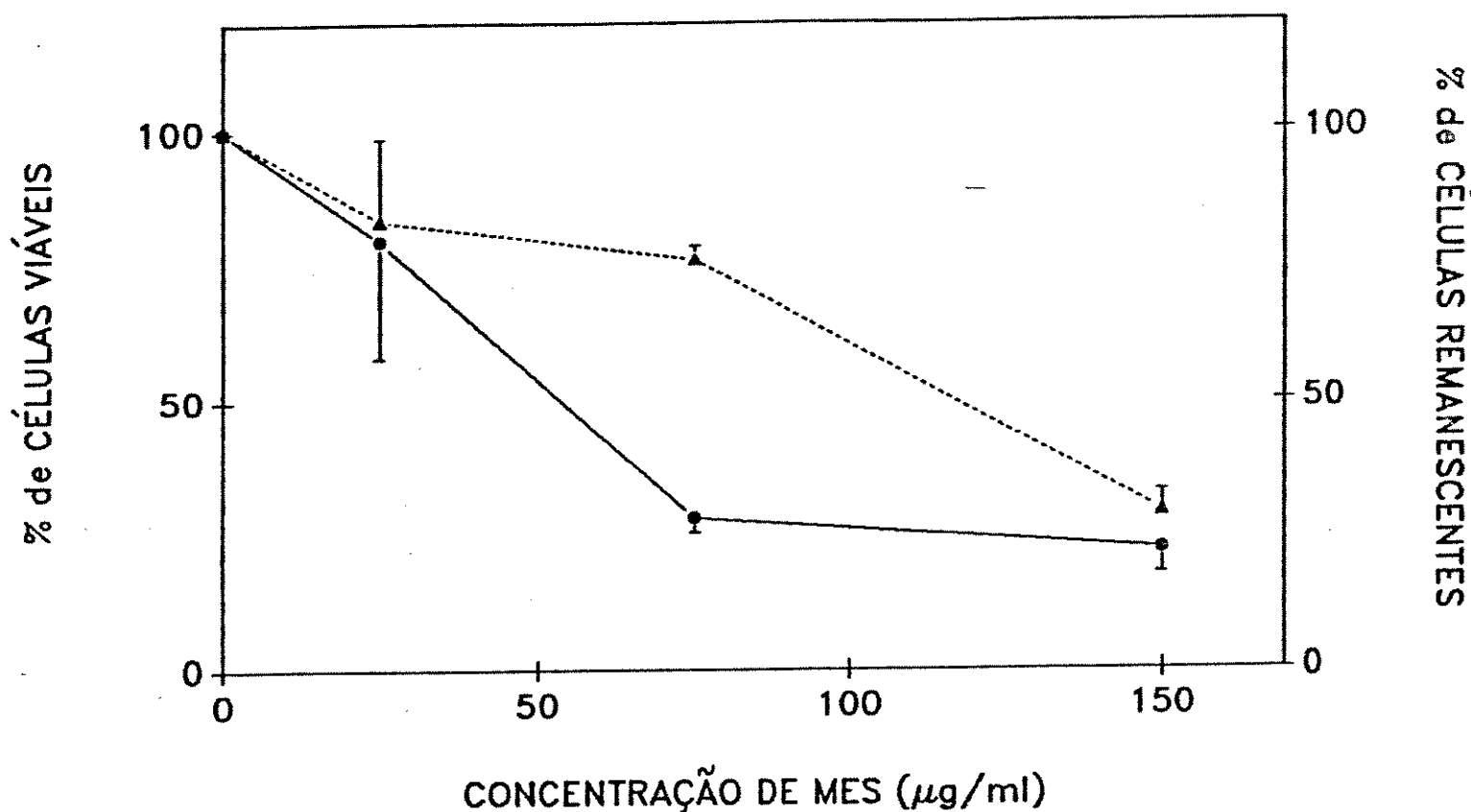


Figura 8.- Viabilidade de linfócitos humanos tratados com MES. Os linfócitos humanos do sangue periférico foram expostos a diferentes concentrações de MES, em ensaios de 0,5 ml contendo o mesmo número de células, a 37 °C, por 30 minutos. Após o tratamento determinou-se a viabilidade celular (•————•) pela capacidade de exclusão de Azul de Tripan e contou-se o número total de células remanescentes nos ensaios (—————), como o descrito no item II.2.b.2.b. 100% de células remanescentes = $3,3 \times 10^5$ células por ensaio.

III.2.c - Determinação dos efeitos dos estearatos de sacarose sobre a adesão e integridade celular de fibroblastos em cultura

Os resultados anteriores mostraram claramente que o MES causa a ruptura de linfócitos humanos. Em células fibroblásticas, as alterações morfológicas observadas (principalmente na linhagem VA-13) indicam a ocorrência de lise celular. Isso nos levou a realizar experimentos, visando quantificar o fenômeno de lise em fibroblastos, através da liberação de macromoléculas no meio de incubação. Igualmente procuramos comparar neste ensaio, os efeitos que uma segunda esterificação na molécula de sacarose (DES) poderia causar na lise celular.

Culturas de células fibroblásticas V-79, em densidade de semi-confluência, foram expostas a 50 µg/ml de MES ou DES, por um período de 30 minutos, a 37 °C. Após o tratamento, o meio de incubação foi centrifugado e a quantificação do material nucleico e protéico, solúvel ou não, foi obtido espectrofotometricamente (A_{260} e $A_{280\text{ nm}}$, respectivamente). As células remanescentes após o tratamento foram lisadas e a determinação das absorbâncias foi efetuada como anteriormente. A tabela 5 sumariza os resultados encontrados. A lise celular foi calculada como valores percentuais, em relação aos valores encontrados nas culturas não tratadas.

Os resultados obtidos mostram que a redução das absorbâncias nas células remanescentes (CR) das culturas tratadas com MES (50 µg/ml) foram acompanhadas pelo aumento das absorbâncias nos meios de tratamento. Para os cálculos do desaparecimento de células decorrentes dos tratamentos efetuados, a massa celular perdida foi calculada em função da $A_{260\text{ nm}}$ encontrada em CR de culturas não expostas em função da $A_{260\text{ nm}}$ em CR de culturas tratadas. O mesmo cálculo foi efetuado com os dados obtidos em $A_{260\text{ nm}}$. Baseados nisto, a massa celular remanescente após o tratamento por MES foi determinada em $61.5 \pm 5.5\%$, indicando uma perda de adesão celular estimada em aproximadamente 40%. Nos outros tratamentos efetuados, este resultado não foi constatado. Comparativamente à ação do MES, o derivado diesterificado (DES) mostrou uma ausência de efeitos significativos sobre a adesão celular e a indução de lise celular.

A fim de se confirmar o efeito lítico do MES em outra linhagem celular, a VA-13 de origem humana, o mesmo protocolo experimental foi executado e os resultados mostraram que, similarmente ao observado com células de hamster, o MES mostrou uma potente ação lítica sobre as células humanas, determinando a ruptura de 60% das células (dados não apresentados).

Tabela 5.- Efeito dos estearatos de sacarose sobre a adesão e integridade celular de fibroblastos V-79.

TRATAMENTO	FRAÇÃO	A _{260 nm}	A _{280 nm}
PBS-Ca ⁺⁺	SB-MT	0,020	0,023
SIS	SB-MT	0,025	0,025
50 µg/ml MES	SB-MT	0,245	0,135
50 µg/ml DES	SB-MT	0,045	0,043
PBS-Ca ⁺⁺	PPT-MT	0,035	0,043
SIS	PPT-MT	0,020	0,033
50 µg/ml MES	PPT-MT	0,103	0,078
50 µg/ml DES	PPT-MT	0,065	0,058
PBS-Ca ⁺⁺	CR	1,725	0,945
SIS	CR	1,690	0,900
50 µg/ml MES	CR	0,965	0,630
50 µg/ml DES	CR	1,675	0,910

Fibroblastos V-79 foram expostos por 30 minutos, a 37 °C, a 50 µg/ml de MES ou DES, em tampão fisiológico. Os meios de tratamento foram coletados e centrifugados (5000g/2 min) e o conteúdo de ácidos nucleicos e de proteínas foi estimado (A_{260 nm} e A_{280 nm}, respectivamente) nos sobrenadantes (SB-MT). Os sedimentos (PPT-MT) foram lisados em meio alcalino, e as absorvâncias, nestes dois comprimentos de onda, foram determinadas. As células remanescentes (CR) nas placas de cultura foram lisadas em meio alcalino. A absorvância dos lisados foi estimada em 260 nm e 280 nm, conforme descrito no item II.2.b.2.c. Os dados apresentados são a média de duas determinações. Leituras abaixo de 0.050 apresentam desvios em torno de 50%. Leitura acima deste valor apresentam desvios em torno de 5%.

A seguir, estendemos o estudo do efeito lítico do MES em células V-79, determinando o seu efeito em diferentes doses. Para isso, culturas de fibroblastos V-79 em fase exponencial do crescimento foram expostas à diferentes concentrações de MES purificado, por 30 minutos, a 37 °C e tratadas como descrito em II.2.b.2.c. Ao final, as células presentes na cultura foram lisadas em meio alcalino e a massa celular foi estimada através da determinação da absorbância em 260 nm. A percentagem de perda celular foi calculada em relação às culturas controle, não expostas ao MES. Os resultados mostram que o MES exerce seus efeitos líticos sobre os fibroblastos V-79, de uma maneira dependente da dose (figura 9). Desta forma, o tratamento com 12,5 µg/ml induziu uma perda de aproximadamente 24% das células; doses superiores (25 e 50 µg/ml), provocaram perda de 46% e 83%, respectivamente.

Empregando este mesmo ensaio, foram efetuados tratamentos com DES e com outros agentes surfactantes, no intuito de se observar os seus eventuais efeitos na adesão e lise celular (tabela 6). Os resultados obtidos mostram que a sacarose diesterificada não apresentou nenhuma ação lítica, em concentrações de até 1000 µg/ml, contrastando, desta forma, com o composto monoesterificado.

No que diz respeito aos outros agentes surfactantes testados, apenas o Triton X-100 e o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) causaram perdas celulares consideráveis. Ambos os agentes surfactantes produziram cerca de 40% de lise celular, na concentração de 50

µg/ml.

Sumarizando os resultados obtidos, concluimos que:

- MES produz uma intensa lise celular, numa faixa de dose entre 25 e 50 µg/ml em fibroblastos V-79 e VA-13.
- A introdução de uma segunda molécula de ácido esteárico na sacarose, formando o derivado diesterificado (DES), resulta na perda da atividade lítica deste composto.
- Comparativamente a outros agentes surfactantes aqui estudados, o MES apresenta o maior poder agressivo para células fibroblásticas.

III.2.d. - Determinação dos efeitos de ésteres de sacarose na proliferação celular de fibroblastos

Devido à toxicidade que o monoéster de sacarose exibiu, tanto em fibroblastos quanto em linfócitos humanos, procuramos investigar a seguir, sua ação citostática em fibroblastos em cultura.

O efeito do MES sobre o crescimento celular foi avaliado através da determinação do incremento da população celular depois de um período de cultivo, após o tratamento. A população foi quantificada pela medida da absorbância dos lisados celulares a 260 nm, parâmetro esse diretamente correlacionado com o número de

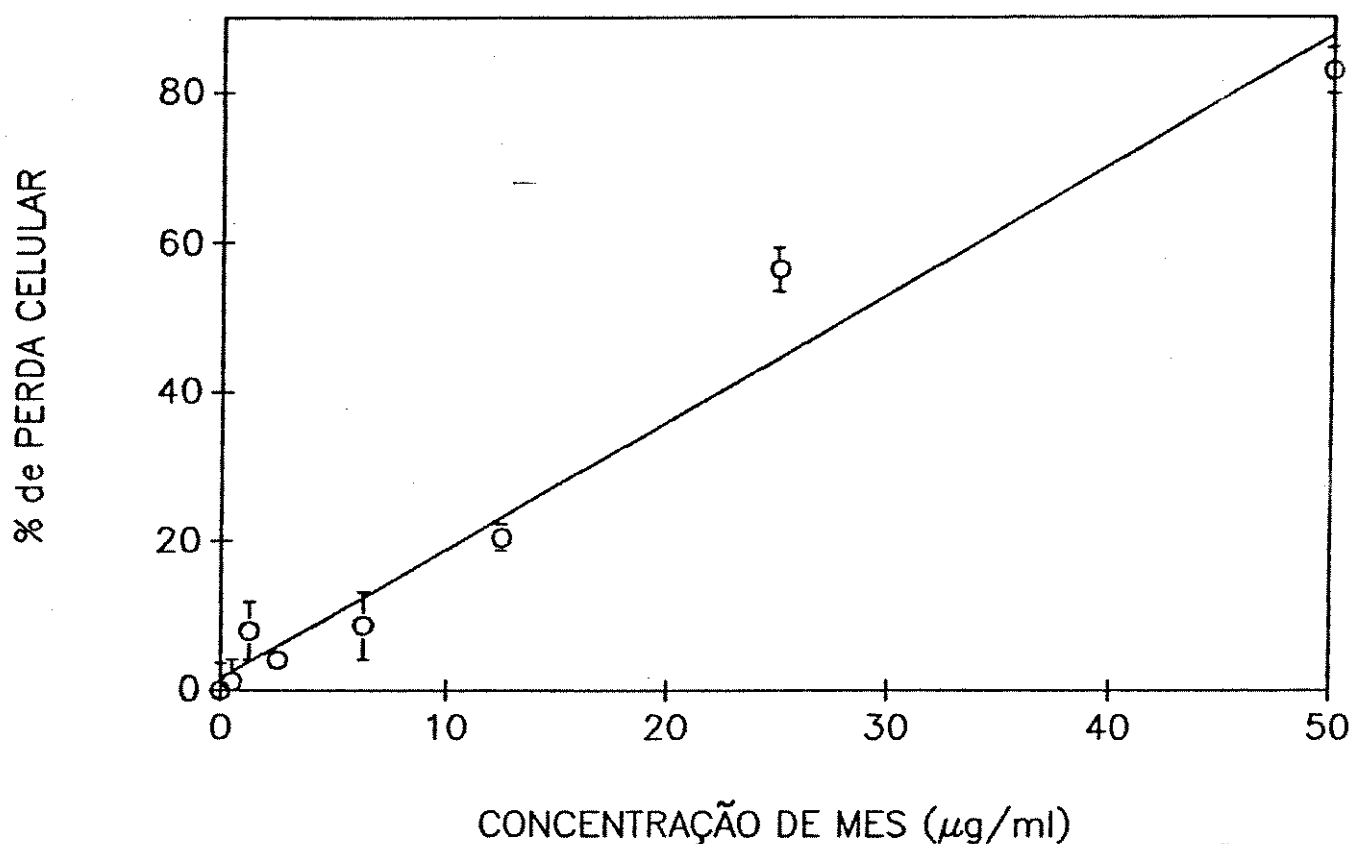


Figura 9.- Efeito de MES purificado sobre a adesão e lise de fibroblastos V-79 em função da dose. Cerca de $2,5 \times 10^4$ células/placa (35 mm de diâmetro) foram cultivadas em meio completo, nas condições normais de temperatura e atmosfera gasosa, por um período de 72 horas (fase exponencial de crescimento). O tratamento com diferentes concentrações de MES (0,5 à 50 µg/ml) foi efetuado por 30 minutos, 37 °C. As culturas foram então tratadas conforme o descrito em II.2.b.2.c. Finalmente, as células remanescentes foram lisadas (0,7 ml/placa com solução 0,5 M NaOH). A massa celular foi estimada por absorbância em 260 nm, conforme descrito no item II.2.b.2.c.

Tabela 6.- Efeito de DES purificado e de agentes surfactantes na adesão e lise celular de fibroblastos V-79.

TRATAMENTO	DOSE ($\mu\text{g/ml}$)	% DE PERDA CELULAR
DES	≤ 1000	0,0
TWEEN 80	≤ 500	0,0
SPAN 60	365	0,0
	750	$10,9 \pm 6,5$
TRITON X-100	25	$9,4 \pm 2,7$
	50	$43,2 \pm 3,8$
	100	$61,7 \pm 2,7$
BRIJ 35	50	$4,4 \pm 0,5$
	100	$6,0 \pm 1,8$
SDS	10	$6,2 \pm 5,0$
	30	$9,3 \pm 0,8$
	50	$41,4 \pm 7,5$

As condições experimentais estão descritas na legenda da figura 9.

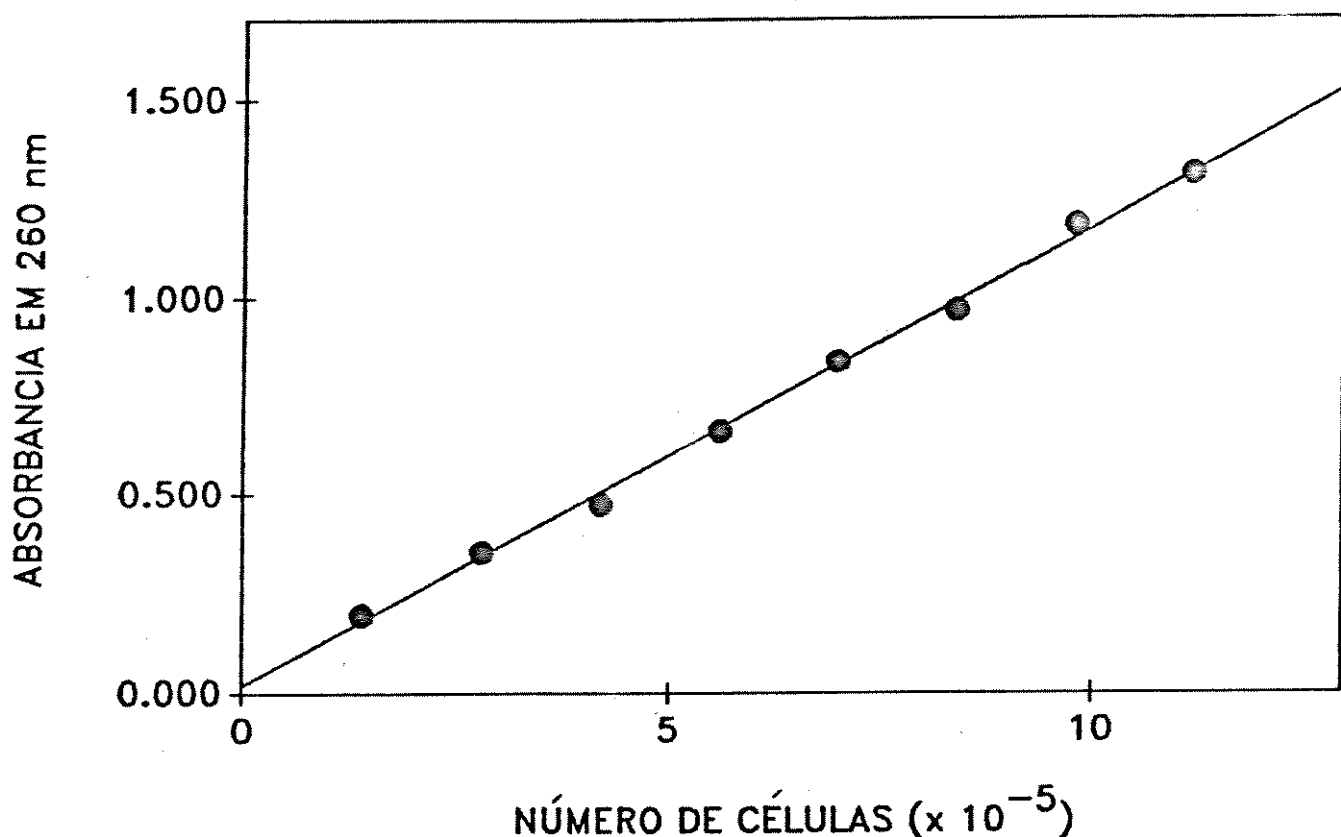


Figura 10.- Relação entre a absorbância dos lisados celulares a 260 nm e o número de células fibroblásticas. Uma cultura de fibroblastos de hamster chinês, linhagem V-79, foi tripsinizada e homogenizada para a completa individualização celular. A seguir o número de células foi contado em câmara de Neubauer. Aliquotas (triplicatas) contendo diferente número de células foram centrifugadas, lavadas em tampão fisiológico e o precipitado obtido foi lisado em meio alcalino, a 37 °C, por 1 hora. Os valores de absorbância ($A_{260\text{ nm}}$) dos lisados foi determinado. A reta, determinada por regressão linear, apresenta valores de inclinação = 0,161 e de intercepto = 0,01.

de células (figura 10).

O efeito do MES purificado sobre o crescimento de fibroblastos em cultura resultou numa intensa inibição da proliferação dos fibroblastos, de maneira dependente da dose (figura 11). Observamos também que a remoção do agente, na fase inicial do crescimento celular (figura 11), não restaura a capacidade reprodutiva celular, mostrando, desta forma, que os danos causados após 30 minutos de exposição ao MES determinam a inviabilidade reprodutiva dos fibroblastos.

Nas mesmas condições, o sistema de solventes (SIS), empregado na solubilização dos estearatos de sacarose, não foi capaz de afetar de modo significativo o crescimento celular (índice de proliferação médio = $2,82 \pm 0,32$). Culturas não expostas apresentaram um índice de proliferação calculado em 2,92. Resultados similares foram obtidos com os fibroblastos V-79 (dados não apresentados).

O estudo do eventual efeito do diestearato de sacarose purificado (DES) sobre a proliferação celular de fibroblastos em cultura também foi investigado. Como uma alternativa experimental, analisou-se o efeito de uma única concentração de DES, relativamente elevada (50 µg/ml), sobre a curva de crescimento de fibroblastos V-79. Para tal, culturas em baixa densidade celular foram expostas à 50 µg/ml de DES, ou a igual volume do SIS (sistema

de solventes), por um período de 30 minutos, a 37 °C e então, cultivadas em meio fresco por intervalos de tempo variados. Ao final de cada período, as culturas foram lisadas e a absorbância em 260 nm foi determinada. Os resultados estão apresentados na figura 12. Observa-se que tanto as culturas tratadas com DES ou seu sistema de solventes (SIS) não tiveram nenhuma diminuição nos índices de proliferação calculados. Pelo contrário, uma ligeira estimulação foi detectada nas culturas tratadas em relação as não tratadas (controles).

Os resultados obtidos na proliferação de fibroblastos tratados com ésteres de sacarose purificados mostram que o MES apresentou uma potente ação citostática, em doses reduzidas (1 a 2 µg/ml). Doses superiores a 2,7 µg/ml apresentaram um índice de proliferação inferior a 1 (valor este correspondente ao número inicial de células nas culturas). Contrariamente ao MES, o DES, mesmo em concentrações 50 vezes maior (50 µg/ml) não exibiu os efeitos citostáticos descritos para o MES.

III.2.e.- Determinação da curva de sobrevivência de fibroblastos V-79 tratados com monoéster de sacarose purificado

A maneira mais sensível para se investigar a ação letal de agentes xenobióticos baseia-se na sua capacidade de inibição do

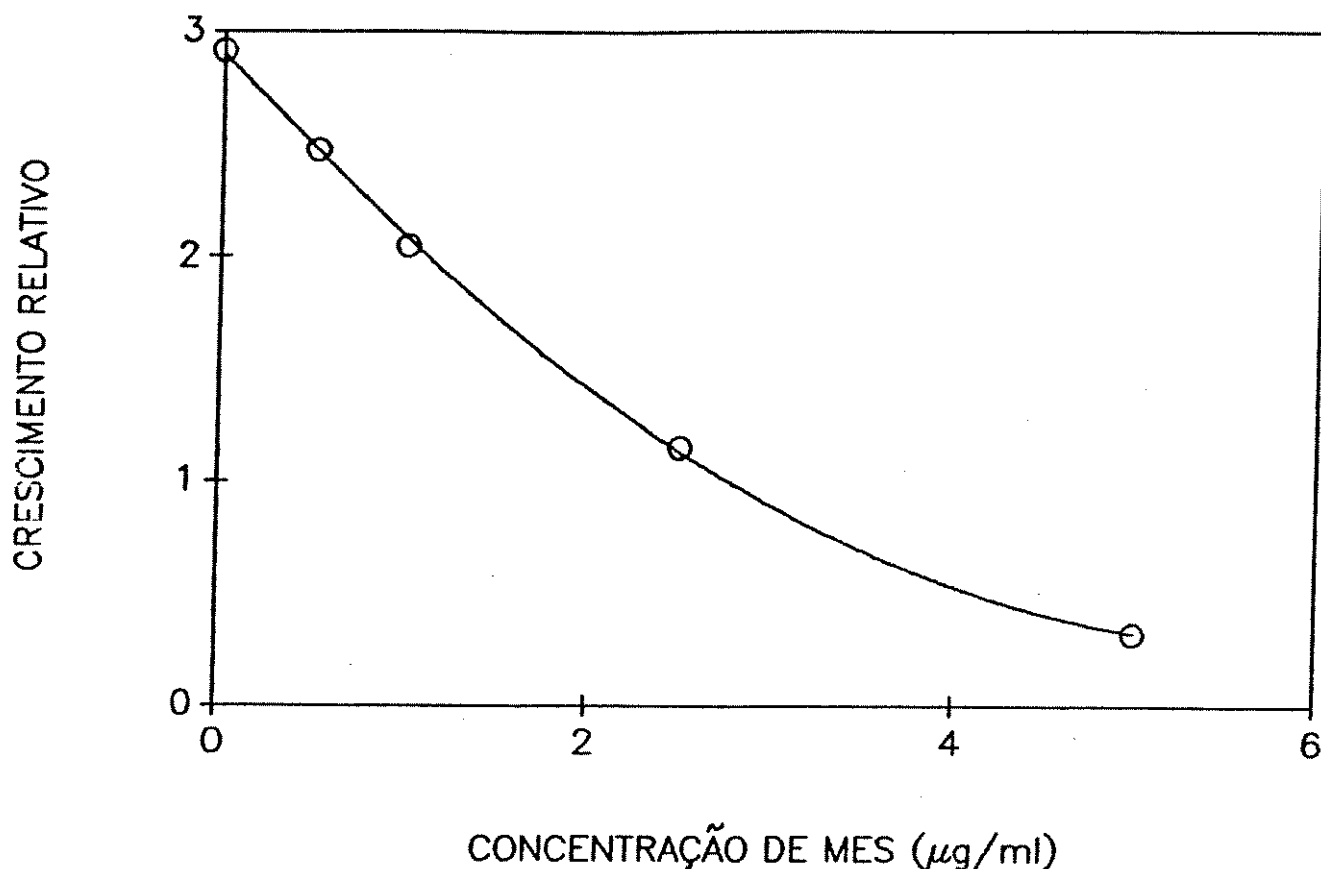


Figura 11.- Efeito do MES no crescimento celular de fibroblastos VA-13 em cultura. Células ($2,2 \times 10^5$ células/placa de 5 cm de diâmetro) foram tratadas com diferentes concentrações de MES purificado, em tampão PBS-A, por 30 minutos, 37°C , imediatamente após a fixação celular. Após a remoção dos agentes, as células foram cultivadas em meio completo, por 66 horas e, subsequentemente, lisadas em meio alcalino, para a determinação da $A_{260\text{ nm}}$, como descrito anteriormente. O crescimento relativo foi expresso como a razão entre as absorbâncias: $A_{260\text{ nm}}$ da cultura após 66 horas do tratamento/ $A_{260\text{ nm}}$ da cultura controle no tempo zero, conforme descrito no item II.2.b.2.d.

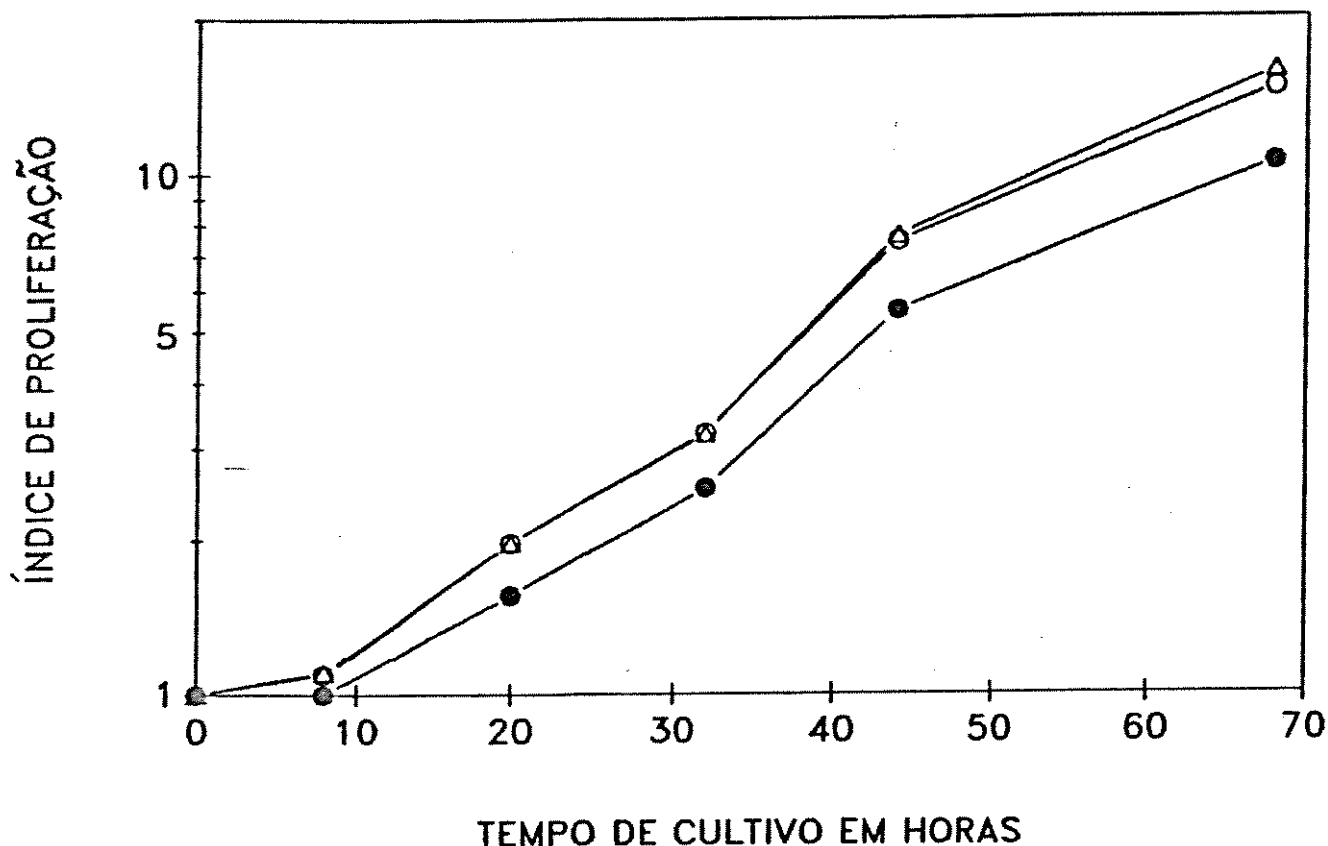


Figura 12.- Efeito do DES sobre a proliferação de fibroblastos V-79. Culturas em baixa densidade celular (2×10^4 células/placa de 5 cm diâmetro) foram cultivadas por 68 horas, nas condições usuais. Ao término deste tempo, o meio de cultivo foi removido e as culturas tratadas com 50 $\mu\text{g/ml}$ de DES (Δ — Δ) ou com igual volume do SIS (sistema de solvente) (o—o), por 30 minutos, 37 °C. Após o período de incubação, o meio de cultura foi renovado e as células foram cultivadas nos intervalos de tempo indicados. Ao final de cada intervalo, as massas celulares foram lisadas em meio alcalino, e a absorbância em 260 nm determinada. O índice de proliferação representa o número de vezes em que a população celular aumentou, em relação a culturas controle, no início do tratamento. O índice 1,0 corresponde a um valor de absorbância de 0,197. Cada ponto apresentado é o valor médio de 2 ensaios. A curva normal de crescimento de células V-79 está representada (•—•).

crescimento clonal das células. Através desta técnica é possível acessar o efeito de um dado tratamento na capacidade reprodutiva das células. Como decorrência dos danos causados pelo tratamento, as células não viáveis não são capazes de crescer formando colônias a partir de uma única célula. Um índice de sobrevivência pode ser estabelecido, em comparação à culturas controle, refletindo, desta forma, a atividade letal do agente.

Células V-79 individualizadas foram tratadas com diferentes doses de monoéster de sacarose purificado (MES) para a determinação do seu efeito letal. Após a remoção dos meios de tratamentos, as células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 20% de SBF, por 7 dias e, as colônias formadas foram fixadas e coradas com cristal violeta. A contagem do número de colônias de culturas controle (expostas apenas ao tampão fisiológico) foi efetuada, obtendo-se uma eficiência de plaqueamento de 95 %. Em paralelo, analisou-se o efeito da presença do soro fetal bovino (10%) durante a exposição das células ao MES. Os resultados obtidos nos tratamentos efetuados com diferentes doses de MES, bem como os resultados obtidos com o tratamento com igual quantidade de MES na presença de 10% de soro fetal bovino (MES+10%SBF) estão apresentados na figura 13.

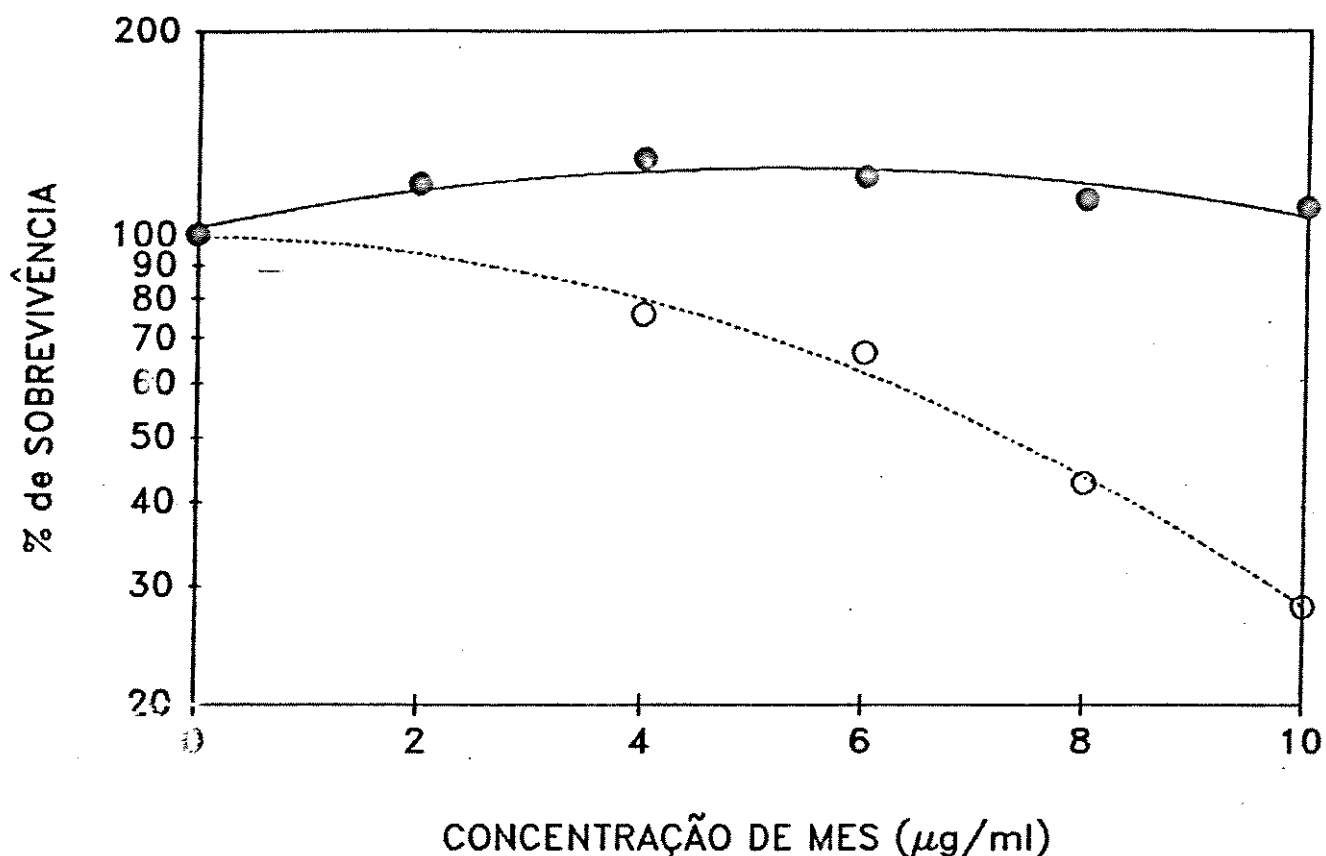


Figura 13.- Curvas de sobrevivência de células fibroblásticas V-79 expostos ao MES purificado isoladamente (o-----o) ou na presença de 10% de soro fetal bovino (•————•). Células individualizadas (265 células/placa de 5 cm de diametro), cultivadas por 12 horas, foram expostas (30 minutos, 37 °C) ao MES, nas concentrações acima, em PBS- Ca^{++} , contendo ou não 10% de SFB. Após o tratamento, as células foram crescidas em DMEM + 20% SFB, por 7 dias, nas condições usuais de temperatura e atmosfera. Ao final, as colônias sobreviventes foram contadas e a percentagem de sobrevivência determinada, em relação à culturas controle (expostas apenas ao tampão fisiológico), como descrito no item II.2.b.2.e. Os resultados refletem a média de duas determinações.

O composto MES purificado apresentou um efeito letal em função da dose. A dose que causa 50% de perda de sobrevivência é relativamente baixa e está em torno de 7,5 µg/ml. Por outro lado, quando as células individualizadas foram expostas ao MES na presença de 10% de soro fetal bovino o efeito letal do MES foi completamente abolido.

III.2.f. - Determinação da ação do MES ao nível da membrana celular.

Vários tipos de compostos químicos orgânicos podem apresentar fenômenos de perturbação da membrana celular e efeitos líticos e, esta capacidade em causar tais efeitos está associado a hidrofobicidade relativa do composto. Considerando que agentes surfactantes apresentam características hidrofóbicas e lipofílicas, desta forma, com potencial de atuação em membranas, interessou-nos estudar os efeitos de MES ao nível da integridade da membrana celular. Para isso, realizamos experimentos clássicos de hemólise em eritrócitos humanos e experimentos de captação de nucleotídeos radioativos em células fibroblásticas.

III.2.f.a. - Determinação da ação hemolítica de MES.

Na investigação da ação hemolítica dos mono e diestearatos de sacarose purificados (MES e DES, respectivamente), utilizaram-se

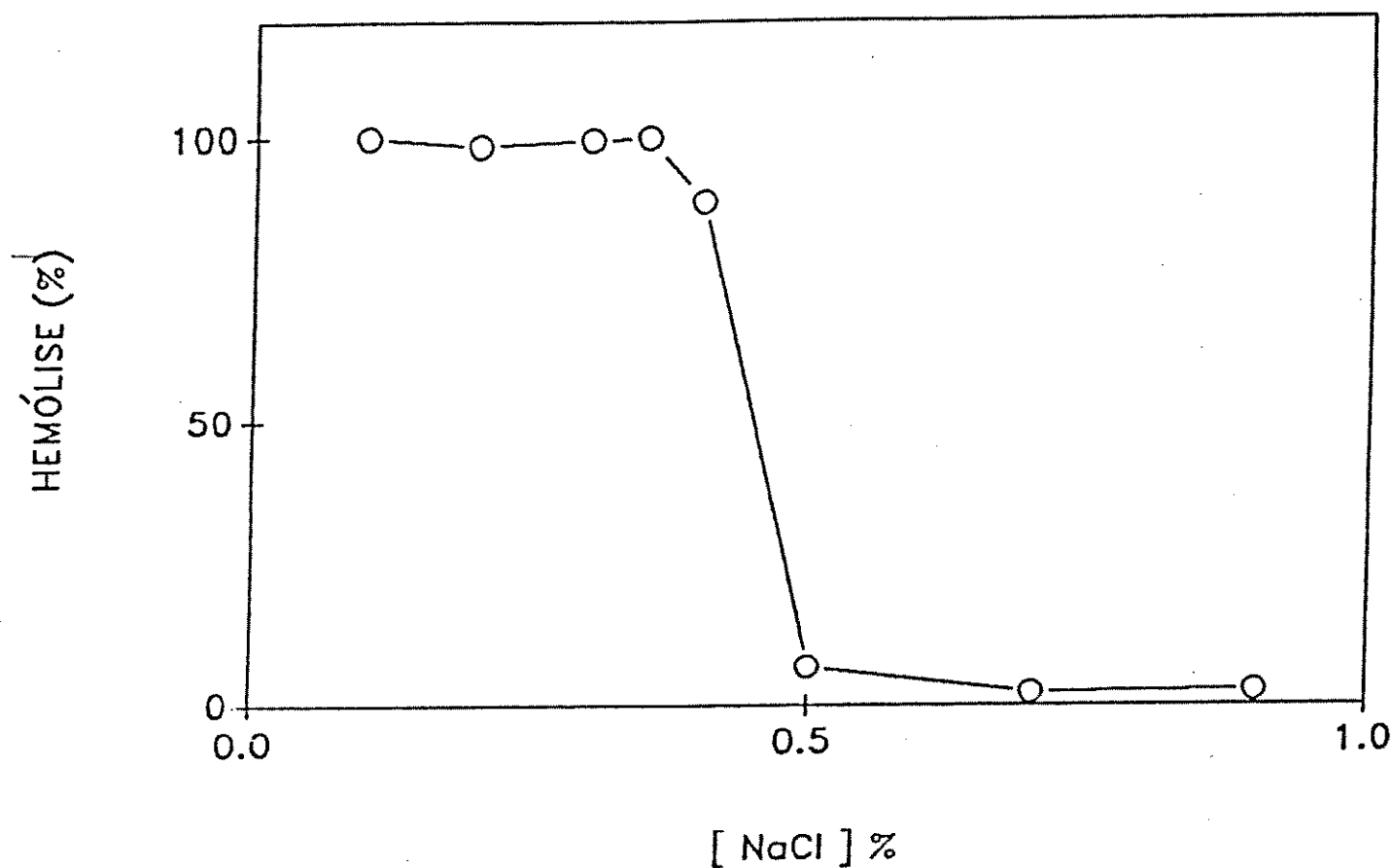


Figura 14.- Curva de resistência osmótica de preparações de hemácias humanas. Um pool de hemácias obtidas do sangue periférico de doadores saudáveis, foi preparado como descrito em Materiais e Métodos, item II.2.b.2.f. Os ensaios contendo 50 μ l de papa de hemácias foram incubados na presença de soluções salinas (0,1% - 0,9% de NaCl). Após a incubação por 30 minutos, a 37 °C, os ensaios foram centrifugados e a hemoglobina presente nos sobrenadantes foi avaliada espectrofotometricamente em 576 nm. O total de hemólise (100%) foi obtido incubando-se com NaCl 0,1%. Os pontos representam o valor médio de ensaios efetuados em triplicatas.

preparações de eritrócitos humanos na forma de "pools". As células foram previamente testadas determinando-se a curva de resistência osmótica, visando selecionar as preparações de hemácias que não apresentassem fragilidade osmótica (figura 14). O objetivo deste teste prévio é o de rejeitar preparações que mostrassem fragilidade osmótica, o que poderia influenciar os resultados deste ensaio frente aos compostos testes. Os resultados obtidos mostram que, em função do teor de NaCl, obtem-se uma curva sigmóide característica (ver figura 14). As preparações que apresentam índices de 50% de hemólise em soluções 0,45% de NaCl foram consideradas adequadas para os estudos. As preparações que apresentassem deslocamento no ponto de inflexão para a direita, isto é, que sofreriam hemólise em concentrações mais elevadas que 0,5% de solução salina, seriam rejeitadas para os testes a seguir.

Após a determinação da curva de resistência osmótica, determinou-se a ação hemolítica do MES e DES purificados, usando-se como referência um agente surfactante reconhecidamente hemolítico, o Triton X-100. Os ésteres de sacarose foram previamente dissolvidos no SIS e, diluídos em solução salina fisiológica (0,90%); o Triton X-100, por ser facilmente solúvel em salina, foi diretamente solubilizado em solução salina. Os resultados obtidos são apresentados na figura 15.

Pode-se constatar que o DES não foi capaz de causar hemólise significativa nas doses testadas (até 500 µg/ml). O Triton X-100

exibiu potencial hemolítico: a dose que causa 50% de hemólise (DH_{50}) foi calculada em 66 $\mu\text{g/ml}$. O MES mostrou efeito hemolítico em doses consideravelmente mais reduzidas e a sua DH_{50} foi calculada em 30 $\mu\text{g/ml}$.

Procuramos também investigar a ação hemolítica de MES purificado na presença ou ausência de 10% de soro fetal bovino (SFB). Neste protocolo, as hemácias foram incubadas com MES solubilizado como descrito anteriormente, em salina fisiológica, contendo ou não 10% de SFB. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 7. Pode-se constatar que SFB (10%) conferiu uma proteção contra os fortes efeitos hemolíticos do MES purificado.

III.2.g. - Determinação da taxa de captação de Uridina (Udr) por fibroblastos.

No intuito de se observar com maior refinamento os efeitos dos ésteres de sacarose na membrana plasmática determinou-se a taxa de captação de Uridina pelas células. Esse nucleosídeo é transportado para dentro da célula por meio de um mecanismo de difusão facilitada através da membrana, processo esse seguido de uma etapa limitante, envolvendo a fosforilação da uridina, para a formação de nucleotídeos (Rozengurt e col., 1978). A cinética de captação de Uridina é dependente da integridade da membrana celular e do seu metabolismo a nucleotídeos; assim, agentes que causam danos à

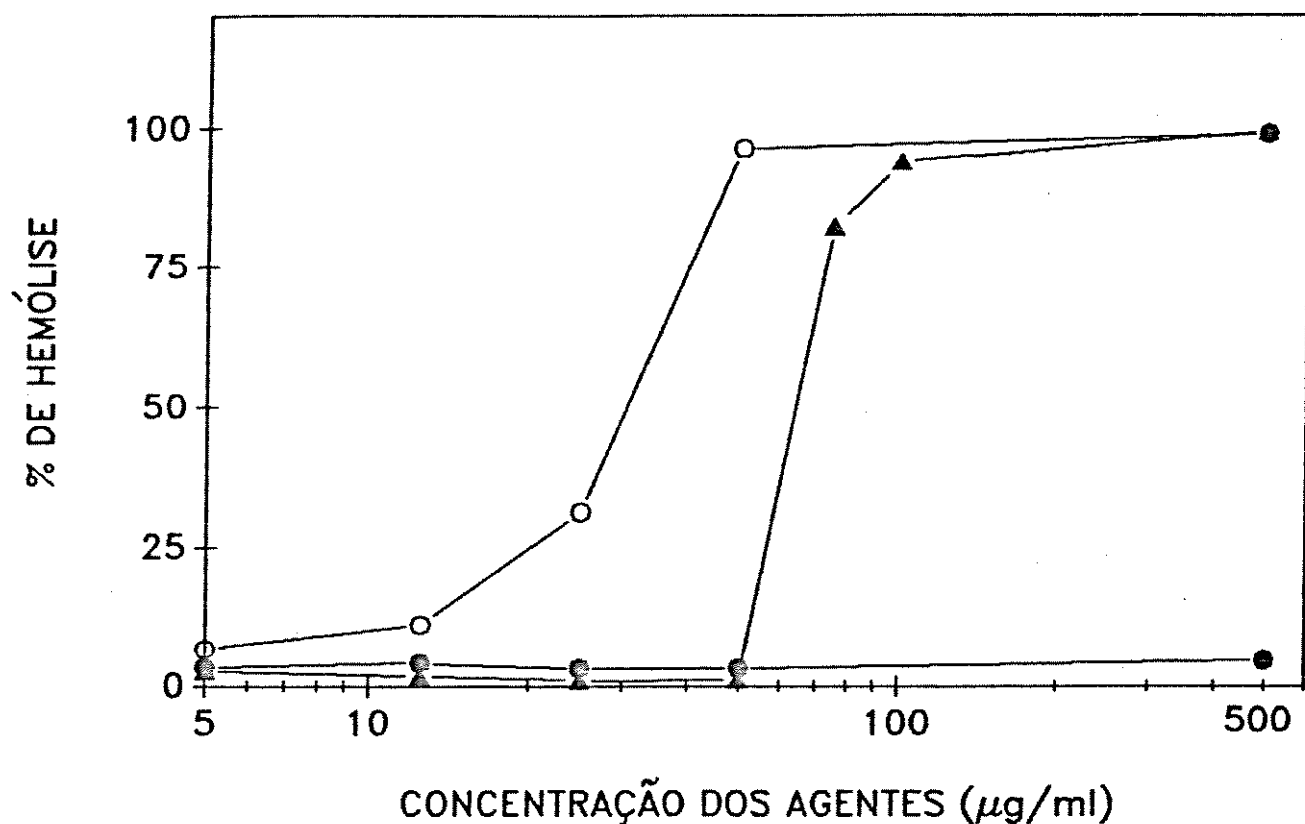


Figura 15.- Hemólise de eritrócitos humanos induzida por agentes tensoativos. Os ensaios foram realizados conforme descrito em Materiais e Métodos (II.2.b.2.f.) e a liberação de hemoglobina foi avaliada conforme anteriormente descrito, determinando-se a absorbância em 576 nm. O tratamento com diferentes concentrações de MES (o—o), DES (•—•) e Triton X-100 (▲—▲) são apresentados. Os valores plotados referem-se aos valores médios de triplicatas.

Tabela 7.- Efeito do SFB (soro fetal bovino) na taxa de hemólise produzida por MES purificado.

TRATAMENTO	% DE HEMÓLISE
NaCl 0,1%	100,0
NaCl 0,9%	0,5
MES 50 µg/ml	81,3
MES 50 µg/ml + 10% SFB	1,0

Os ensaios foram efetuados em triplicatas e as condições experimentais estão descritas nas legendas das figuras 14 e 15.

membrana celular, irão, conseqüentemente, causar um distúrbio na velocidade de captação deste nucleosídeo (Shopsis & Sathe, 1984).

III.2.g.1. - Padronização da técnica

A técnica da captação de Uridina por fibroblastos em cultura, inicialmente descrita por Shopsis & Sathe (1984) foi adaptada em nosso laboratório. As principais adaptações referem-se à linhagem de células fibroblásticas utilizada (V-79 em vez de 3T3) e às condições de incubação com o agente em estudo (dissolução em tampão fisiológico em vez de meio completo e a redução do tempo de exposição para 30 minutos, em vez de 4 horas).

Para a padronização da técnica nestas novas condições

experimentais foram utilizados dois compostos, conhecidos por causarem inibição da taxa de captação de Urd na linhagem de células fibroblástica de camundongo (linhagem 3T3). Desta forma, álcool alílico foi selecionado por apresentar um grande efeito inibitório na taxa de captação de Udr, segundo o grupo liderado por Shopsis (Borenfreund e col., 1983 e Shopsis e col., 1985). O outro composto escolhido foi o DMSO (dimetilsulfóxido), que, segundo estes autores, é um composto que causa uma pequena inibição na taxa de captação de Urd em fibroblastos 3T3. Os resultados obtidos com estes dois agentes testes são mostrados nas figura 16 e 17, respectivamente. Os dados mostram que as células tratadas com álcool alílico apresentam uma diminuição progressiva da taxa de captação de Urd em função da dose (figura 16). A curva é bifásica, mostrando um efeito mais intenso na faixa de concentração mais baixa (0,01 - 0,1M), e um aumento lento da inibição nas concentrações mais elevadas. A dose que determina 50% de inibição da captação de Urd (UI_{50}), corresponde a aproximadamente 0,065 M de álcool alílico. No caso do DMSO, observa-se uma inibição cuja intensidade aumenta diretamente com o aumento da dose (figura 17), não se observando efeito significativo em doses mais baixas (concentrações $\leq 0,2$ M). A UI_{50} , obtida por extrapolação do gráfico (figura 17) corresponde a 1.55 M.

II.2.g.2. - Efeito de ésteres de sacarose e de outros surfactantes na captação de Urd por fibroblastos V-79 em cultura

Os efeitos do MES e DES purificados sobre a captação de Urd por células V-79 foram determinados, seguindo-se o mesmo protocolo experimental e, os resultados obtidos estão representados nas figuras 18 e 19, respectivamente.

Os resultados obtidos mostram que o MES causa um intenso efeito inibitório na taxa de captação de Uridina por fibroblastos V-79, de maneira dependente da dose. A curva é bifásica, mostrando uma fase inicial de inibição proporcional a dose e, em doses superiores à 20 µg/ml uma diminuição progressiva da inibição na captação de Urd (figura 18). A dose de MES que determina uma diminuição de 50% na taxa de captação de Urd (UI_{50}) corresponde a 16,2 µg/ml. O composto DES purificado, por sua vez, não foi capaz de alterar de modo significativo a taxa de captação de Uridina (figura 19). Em paralelo, foi igualmente testado o efeito do SIS empregado na solubilização dos estearatos de sacarose. Concentrações elevadas de SIS provocam uma ligeira diminuição da taxa de captação de Urd (figura 19). Tal efeito na diminuição na captação de Urd não foi constatado quando DES estava presente no sistema (figura 19).

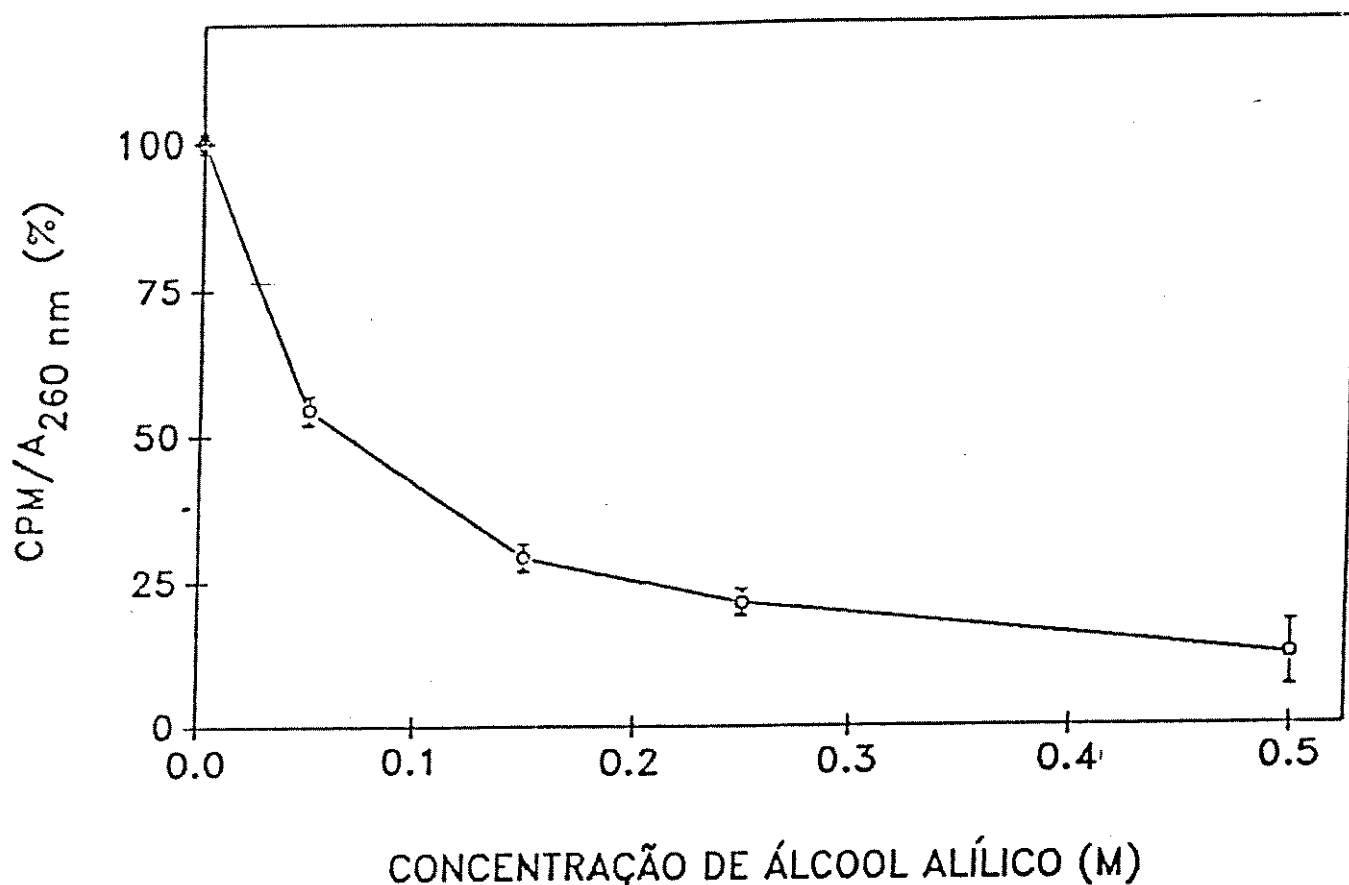


Figura 16.- Inibição da captação de Uridina por fibroblastos V-79 tratados com diferentes concentrações de álcool alílico. As células, em fase exponencial de crescimento foram expostas a concentrações do agente entre 0,05 - 0,5 M, em duplicata ou triplicata. Após a remoção do meio de tratamento, as culturas foram incubadas com meio completo (DMEM + 10% SFB) contendo ¹⁴C-Urd (0,2 µCi/ml) por 30 minutos, a 37 °C. A seguir, o meio foi removido, as culturas lavadas com tampão fisiológico e as células lisadas em meio alcalino. A taxa de captação de ¹⁴C-Urd foi expressa por unidade de massa celular presente nos lisados (absorbância a 260 nm), em relação à células controle, não tratadas, como descrito no item II.2.b.2. 100% de captação = 17744 cpm/A_{260 nm}.

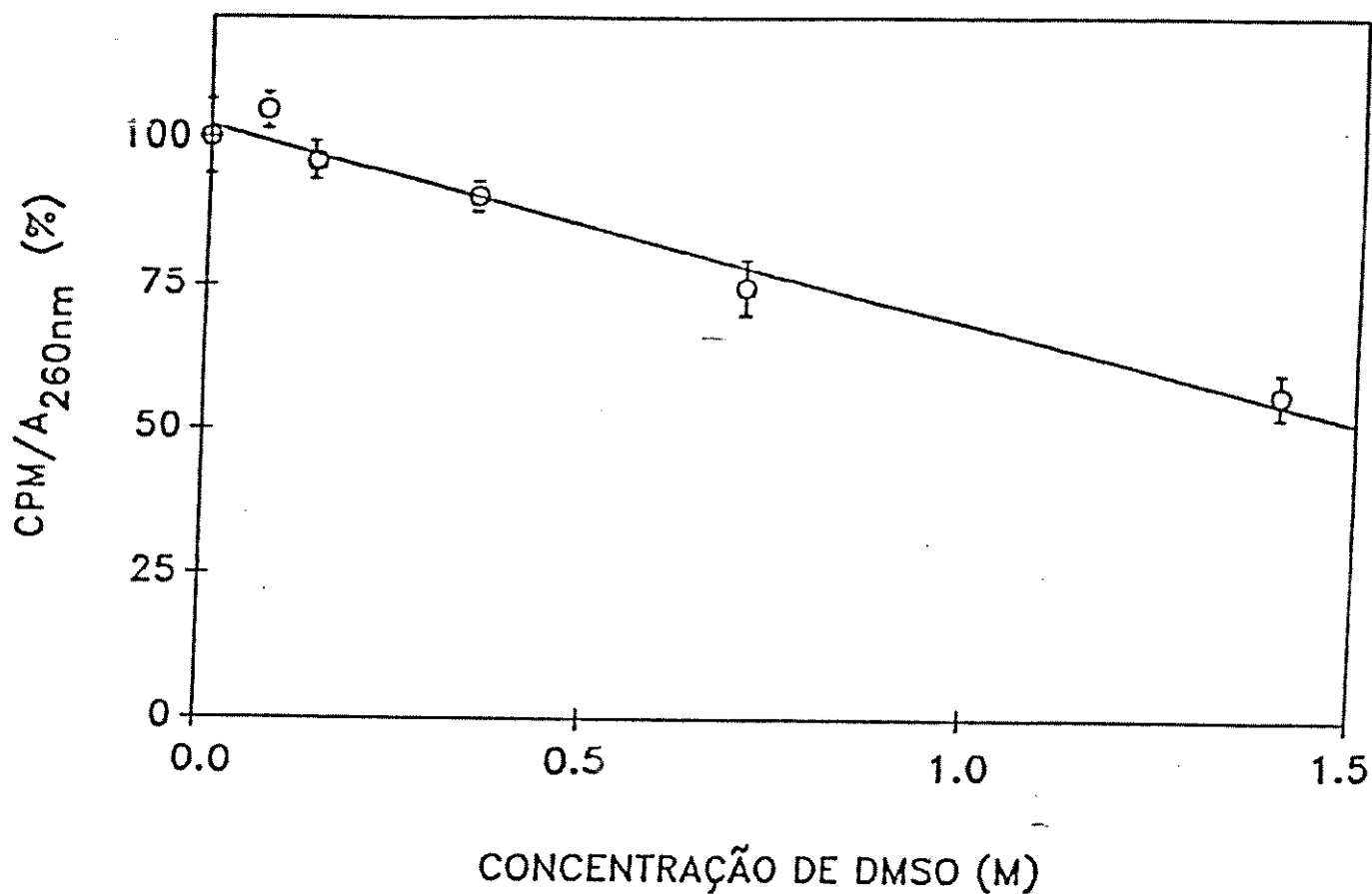


Figura 17.- Inibição da captação de Uridina por fibroblastos V-79 tratados com diferentes concentrações de DMSO (dimetilsulfóxido). As células, em fase exponencial de crescimento foram expostas a concentrações do agente entre 0,1 M - 1.5 M (em duplicata ou triplicata). Após a remoção do meio de tratamento, as culturas foram incubadas com meio completo (DMEM + 10% SFB) contendo ^{14}C -Urd (0,2 $\mu\text{Ci/ml}$) por 30 minutos, a 37 °C. A seguir, o meio foi removido, as culturas lavadas com tampão fisiológico e as células lisadas em meio alcalino. A taxa de captação de ^{14}C -Urd foi expressa por unidade de massa celular presente nos lisados (absorbância a 260 nm), em relação à culturas controle, como descrito no item II.2.b.2.g. 100% de captação=12375 cpm/unid.A_{260 nm}.

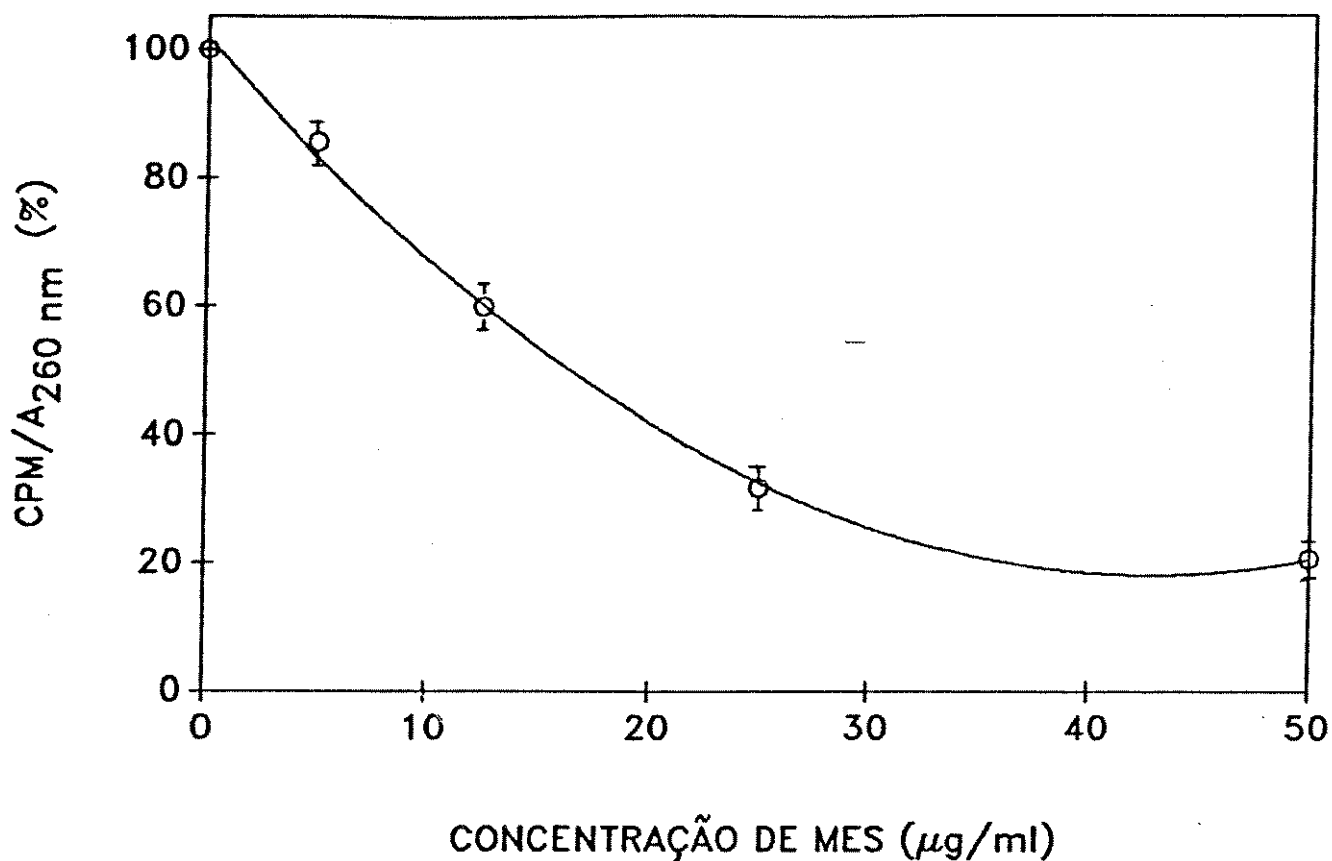


Figura 18.- Inibição da captação de Uridina por fibroblastos V-79 tratados com diferentes concentrações de MES purificado. As células, em fase exponencial de crescimento foram expostas (em duplicatas ou triplicatas) a concentrações do agente entre 5 e 50 $\mu\text{g/ml}$. Após a remoção do meio de tratamento, as culturas foram incubadas com meio completo (DMEM + 10% SFB) contendo ^{14}C -Urd (0,2 $\mu\text{Ci/ml}$) por 30 minutos, a 37 °C. A seguir, o meio foi removido, as culturas lavadas com tampão fisiológico e as células lisadas em meio alcalino. A taxa de captação de ^{14}C -Urd foi expressa por unidade de massa celular presente nos lisados (absorbância a 260 nm), como descrito no item II.2.b.2.g.; culturas controle, não expostas aos agentes, foram consideradas 100% de captação de Urd. 100% de captação = 17434 cpm/unid. $A_{260 \text{ nm}}$.

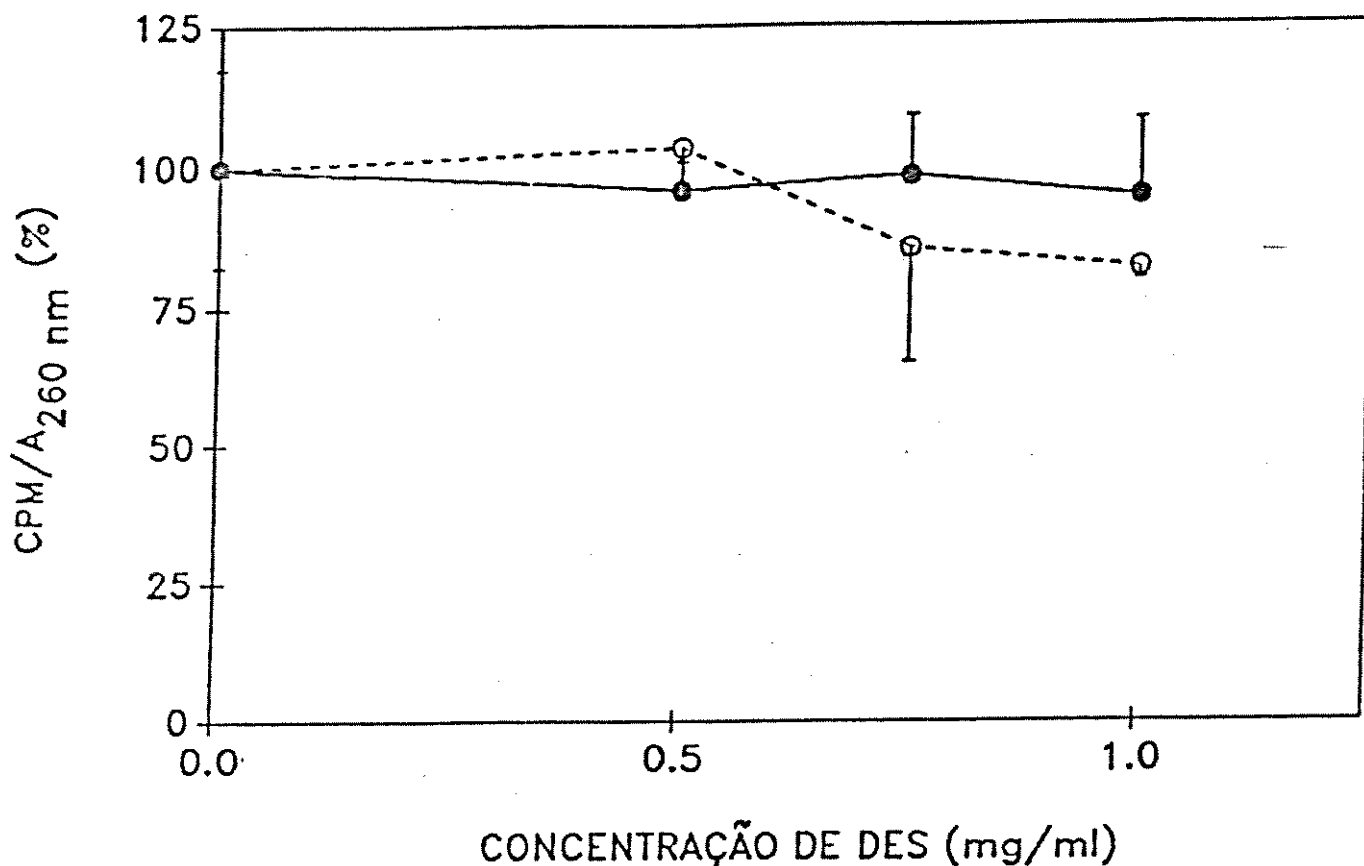


Figura 19.- Taxa de captação de Uridina por fibroblastos V-79 tratados com diferentes concentrações de DES purificado. As células, em fase exponencial de crescimento foram expostas (em duplicatas ou triplicatas) a concentrações do agente entre 500 a 1000 µg/ml (—) e igual volume de SIS (-----). Após a remoção do meio de tratamento, as culturas foram incubadas com meio completo (DMEM + 10% SFB) contendo ¹⁴C-Urd (0,2 µCi/ml) por 30 minutos, a 37 °C. A seguir, o meio foi removido, as culturas lavadas com tampão fisiológico e as células lisadas em meio alcalino. A taxa de captação de ¹⁴C-Urd foi expressa por unidade de massa celular presente nos lisados (absorbância a 260 nm), como descrito no item II.2.b.2.g.; culturas controles, não expostas aos agentes, foram consideradas 100% de captação de Urd. 100% de captação = 15334 cpm/unid. A_{260 nm}.

No intuito de realizar estudos comparativos dos efeitos do MES com os de outros agentes surfactantes, testaram-se os seguintes compostos: dodecil sulfato de sódio (SDS), Brij 35, Triton X-100, Tween 80 e Span 60. Os resultados estão apresentados nas figuras 20, 21 e 22 e na tabela 8. A UI_{50} foi determinada para cada um dos agentes testados, utilizando o método anteriormente reportado.

O surfactante aniônico Dodecil Sulfato de sódio (SDS) apresentou uma diminuição na taxa de captação de Uridina, diretamente proporcional à dose. A UI_{50} para este composto é de aproximadamente 40 $\mu\text{g/ml}$ (figura 20). O agente surfactante não iônico Brij 35 exibiu, igualmente, uma redução na taxa de captação de Urd proporcional à dose (figura 21), embora o declínio na captação do nucleosídeo seja consideravelmente mais lento que no caso do MES e do SDS. A inibição de 50% na captação de Urd (UI_{50}) foi estimada, por extrapolação, como 84 $\mu\text{g/ml}$. Outro agente tensoativo do tipo não iônico, o Triton X-100, apresentou efeitos na taxa de captação de Urd (figura 22), com uma UI_{50} calculada em 40 $\mu\text{g/ml}$. Entretanto, a curva apresentou um padrão completamente diferente dos anteriores, mostrando um aspecto sigmoidal, similar ao obtido na curva de hemólise (figura 15).

Outros compostos surfactantes do tipo não iônico, tais como o Span 60 e Tween 80 apresentaram uma baixa atividade inibitória na captação de Uridina, comparativamente ao MES, Brij 35 e Triton X-100. Os efeitos inibitórios de Span 60 na captação de Urd são

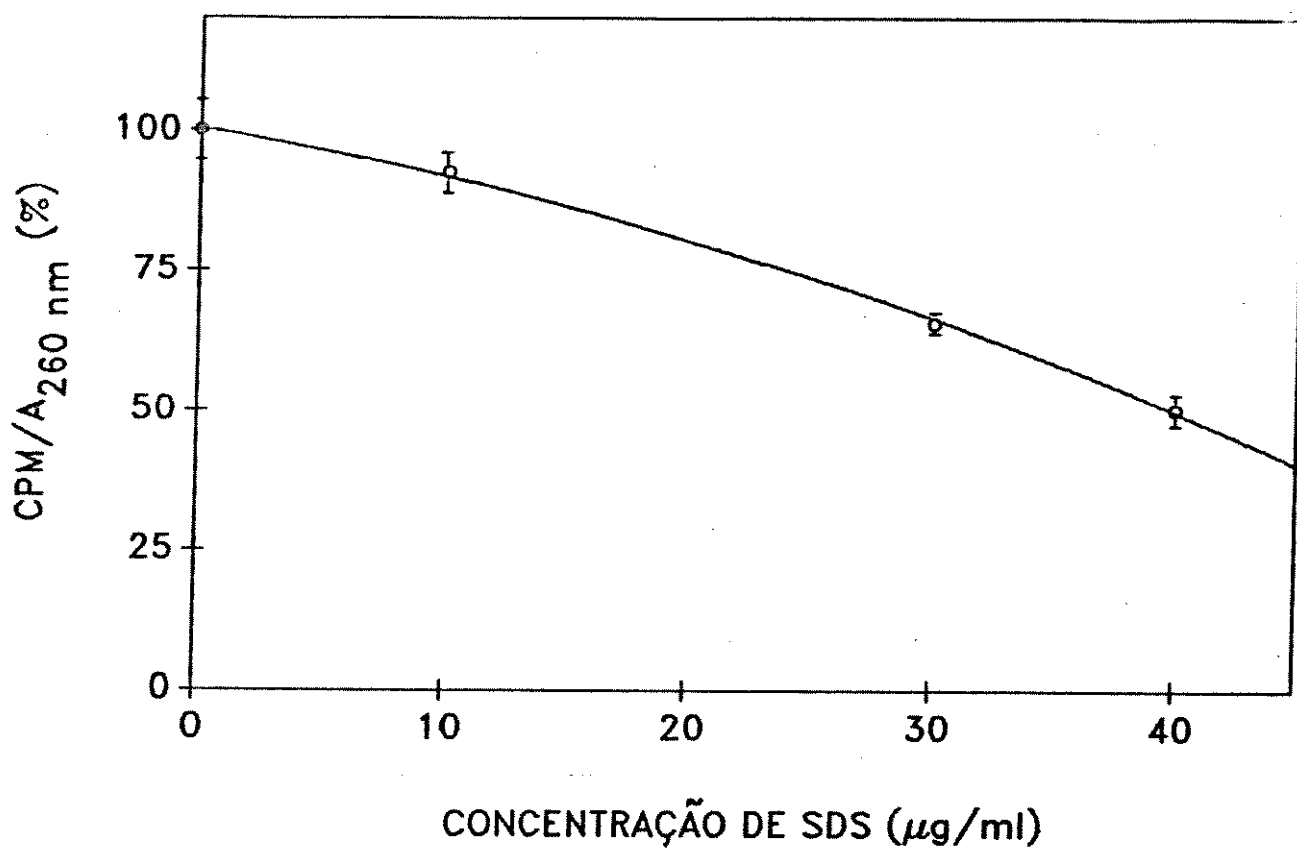


Figura 20.- Inibição da captação de Urd por fibroblastos V-79 em cultura. As células foram tratadas com dodecil sulfato de sódio (10 - 50 µg/ml), nas mesmas condições experimentais descritas na figura 16. 100% de captação= 20942 cpm/unid.A_{260 nm}.

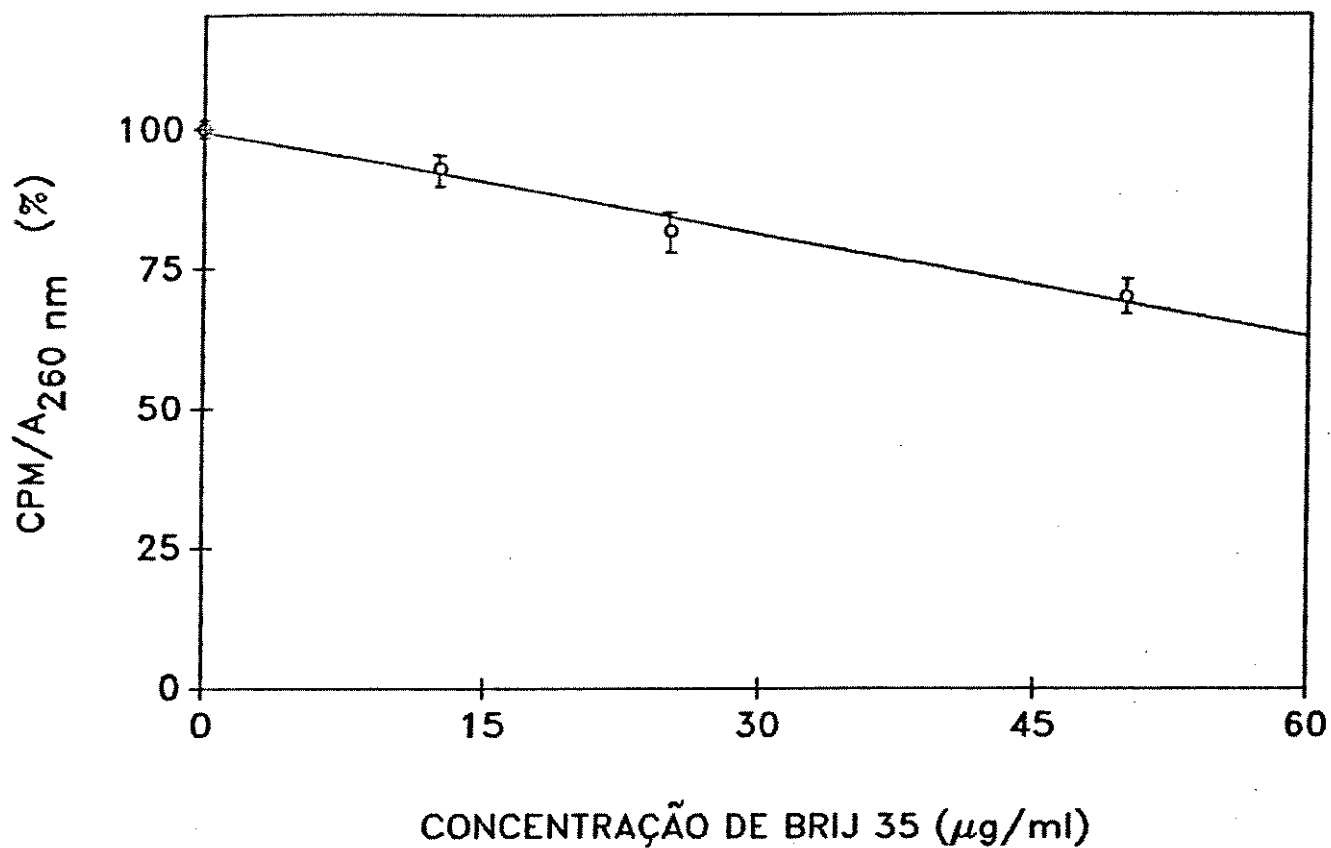


Figura 21.- Inibição da taxa de captação de Urd por fibroblastos V-79 expostos a diferentes concentrações de Brij 35 (10-50 $\mu\text{g/ml}$). As condições experimentais estão descritas na legenda da figura 16. A Taxa de captação 100% = 17744 cpm/unidade $A_{260 \text{ nm}}$.

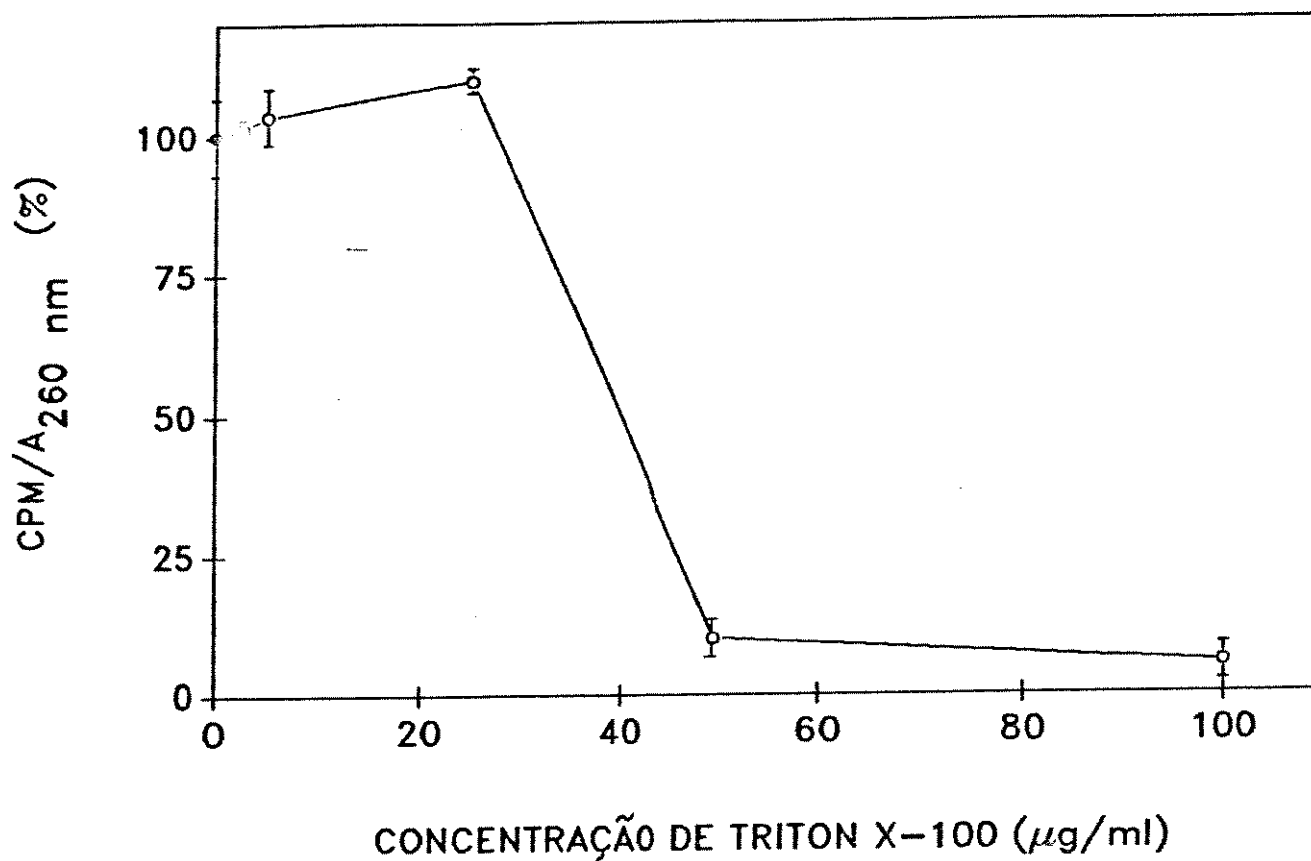


Figura 22.- Inibição da taxa de captação de Urd fibroblastos V-79 expostos a diferentes concentrações de Triton X-100. As condições experimentais estão descritas na legenda da figura 16. A taxa de captação 100% = 7189 cpm/unidade de A_{260 nm}.

Tabela 8.- Taxa de Captação de Uridina (Urd) por fibroblastos V-79 expostos aos surfactantes não iônicos Tween 80 e Span 60.

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO (µg/ml)	CPM / A ₂₆₀ EM (%)
TWEEN 80	0	100.0
	500	97,6
	1000	86,0
	2500	84,3
	10000	66,7
SPAN 60	0	100,0
	75	108,3
	167	103,2
	365	104,7
	750	94,7

O procedimento experimental está descrito na legenda da figura 16.

desprezíveis na faixa de concentração avaliada (até 750 µg/ml). Os efeitos inibitórios do Tween 80 situam-se numa faixa de concentração consideravelmente mais elevada: 1 - 10 mg/ml.

No teste de captação de Uridina, o composto que apresentou uma maior atividade inibitória foi o MES purificado. O derivado diesterificado, não apresentou, em doses superiores, nenhuma atividade na inibição da captação de Urd. Outros detergentes não iônicos apresentaram efeitos inibitórios na taxa de captação de Urd. A análise dos UI_{50} entre os diferentes surfactantes não iônicos mostra uma ordenação que, em nível crescente de potencial agressivo, na seguinte escala:

Tween 80 - Span 60 < Brij 35 < Triton X-100 < MES purificado.

IV - DISCUSSÃO

A purificação dos ésteres de sacarose por meio de cromatografia em coluna forneceu dois compostos, denominados de A e B. As frações foram analisadas e identificadas em cromatografia em camada delgada (CCD), por espectrometria infravermelha (IV) e por dosagem de sacarose presente nas frações. A análise dos compostos A e B em CCD mostrou diferentes mobilidades: a fração A, com maior mobilidade, indicou uma menor polaridade do que composto B (figura 4). Tal resultado sugeriu que os estearatos de sacarose purificados apresentavam diferentes graus de esterificação. Além do mais, a comparação com os dados descritos na literatura indicou que a fração A era cromatograficamente similar ao descrito para o diestearato de sacarose (DES) e, o da fração B, semelhante ao do monoestearato de sacarose (MES) (Nakamura e col., 1986; Donnelly & Bu'Lock, 1988). Embora o método cromatográfico utilizado não possibilite o fracionamento dos sucroderivados em função do comprimento da cadeia carbônica do ácido graxo esterificante (C_{16} e C_{18}), as frações obtidas foram consideradas como sendo principalmente estearatos de sacarose. A análise dos espectros infravermelhos (IV) (figura 5 e 6) das frações mostraram características similares aos descritos para ésteres de carboidratos (Akoh e Swanson, 1990, 1989a e b). A comparação dos espectros IV mostrou que a única diferença notável entre as duas

frações estava na intensidade da banda de 3350 cm^{-1} (figuras 5, 6). Este resultado foi interpretado como sendo indicador de diferentes conteúdos de OH não reagidos da sacarose. Tal resultado, assim como a análise em CCD, demonstra que os compostos A e B apresentam diferentes graus de esterificação, sendo o A mais esterificado que o composto B. A fim de melhor caracterizar as frações purificadas e de determinar os seus teores de pureza, procedeu-se à quantificação do conteúdo de sacarose presentes nestas frações. Os resultados das dosagens de sacarose forneceram valores compatíveis com a assunção de que as frações A e B eram, respectivamente, diestearato de sacarose (DES) e monoestearato de sacarose (MES). Esta análise também serviu para definir o grau de pureza das frações isoladas (95% para DES e 93% para MES) e para a quantificação dos seus principais contaminantes (tabela 3). Desta forma, pelo conjunto de resultados obtidos, as frações A e B foram interpretadas como sendo, respectivamente DES e MES, apresentando um grau de pureza mínimo de 93%.

Por tratar-se de compostos com certo caráter lipofílico, os estudos de solubilidade dos estearatos de sacarose indicaram que o MES purificado era parcialmente solúvel em sistemas aquosos e que o DES, mais lipofílico, era praticamente insolúvel em água. Para contornar esta dificuldade e para viabilizar o estudo comparativo destas moléculas em sistemas celulares, um sistema de solvente (SIS) foi desenvolvido. O SIS, além de não ser citotóxico nas doses empregadas nos diferentes ensaios, mostrou ser adequado para a

solubilização de derivados poliesterificados.

Quando células viáveis são expostas à agentes tóxicos, podem ocorrer várias interações em diferentes níveis. Por exemplo, podem ocorrer eventos ao nível da morfologia celular, da proliferação celular, ou então, no genoma celular. Estes efeitos podem ser estudados utilizando vários marcadores de citotoxicidade. O primeiro ensaio efetuado na investigação sobre o potencial citotóxico dos compostos MES e DES foi a detecção de eventuais alterações morfológicas em células fibroblásticas. Alguns protocolos similares são descritos na literatura (Borenfreund & Borrero, 1984; Shopsis e col., 1985; Tachon e col., 1989) e, as informações obtidas neste teste tem mostrando correlacionar-se bem com os dados *in vivo* (Shopsis e col., 1984).

Os resultados mostram claramente que o composto MES exibe um forte efeito na morfologia celular dos fibroblastos estudados (linhagens estabelecidas VA-13, de origem humana, V-79, de roedor, e culturas primárias de fibroblastos da derme humana) (microfotografias 2,3,6,7,9 e 10). Os efeitos do MES na morfologia de fibroblastos podem ser visualizados imediatamente após o contato das células com o MES (microfotografia 2). Ao fim de 30 minutos, em todas as variedades de fibroblastos analisadas, as alterações morfológicas foram extremamente pronunciadas (microfotografias 3, 7 e 10). O padrão das alterações morfológicas produzidas por MES sugeriu-nos que as células poderiam ter perdido a viabilidade. Este

resultado foi interpretado como uma primeira evidência da ação citotóxica do MES. Nenhum efeito significativo na arquitetura celular foi constatado quando as culturas fibroblásticas foram expostas ao DES. Tal resultado é um primeiro indicativo que os sucroderivados com diferentes graus de esterificação apresentam propriedades bastante distintas no que diz respeito ao potencial citotóxico.

Uma possível explicação para os efeitos do MES na morfologia de fibroblastos poderia ser decorrente da propriedade surfactante deste composto. Os agentes surfactantes tem como característica a capacidade de induzir a emulsificação de fosfolipídeos, causar a solubilização de lipídeos e a desnaturação de proteínas, fatos estes que podem levar à completa desorganização da membrana celular (Tachon e col., 1989; Darnell e col, 1986 e Zubay, 1988). O fato do derivado diesterificado, que também apresenta características de anfifilicidade, não ter causado alterações morfológicas detectáveis, pode ser explicado como resultante da modificação nas propriedades físico-químicas (concentração micelar crítica, balanço lipofílico-hidrofílico, etc), determinada pela introdução de uma segunda molécula de ácido esteárico na sacarose. Esta alteração promoveria uma interação diferenciada deste composto com a membrana celular dos fibroblastos.

Os pronunciados efeitos de MES na morfologia celular de fibroblastos em cultura sugeriram que as células, após 30 minutos

de tratamento, apresentavam modificações tais que a sua viabilidade poderia estar comprometida. A perda da viabilidade celular é definida como "o término irreversível da atividade celular e de suas funções, acoplado a uma desorganização completa da sua estrutura" (Dixon, 1967). As fases iniciais da injúria celular são representadas pela fragmentação da membrana celular e por alterações em organelas. Assim, a perda da viabilidade celular representa um evento prévio e irreversível à completa destruição celular, ou seja a lise celular.

O tratamento de linfócitos humanos com 0,42 mM de MES (250 µg/ml) provocou uma intensa diminuição da viabilidade celular: apenas 21,6% das células contadas apresentaram-se viáveis (tabela 4). A perda da viabilidade celular não ocorreu quando os linfócitos foram expostos à outros agentes surfactantes não iônicos (Span 60, Tween 60 e 80). Além disso, os resultados obtidos pelo tratamento com MES evidenciaram a ocorrência de um outro fato: a forte redução no número de células linfocíticas ao final da exposição. Calculando-se o número de células viáveis no final do tratamento em função do número total de linfócitos expostos, a percentagem de células viáveis reduz-se à 7,5%. O desaparecimento de células ao final do tratamento, calculado em 65%, somente pode ser explicado devido a ocorrência de rompimento de linfócitos durante a exposição. Este fenômeno não foi observado nos outros tratamentos.

Visando uma melhor caracterização dos efeitos registrados,

procuramos averiguar o efeito de diferentes doses de MES na viabilidade celular e no número de linfócitos ao final do tratamento. Os resultados mostram uma diminuição do número de células remanescentes ao final do tratamento em função do aumento da dose de MES (figura 8). A determinação da quantidade de células viáveis em relação ao número total de células no final do tratamento, mostrou um declínio acentuado da viabilidade celular nas doses menos elevadas de MES (abaixo de 0,13 mM, ou 75 µg/ml); doses superiores à essa não determinaram uma redução proporcionalmente maior do número de células viáveis. A explicação para isso é decorrente do fato da perda da viabilidade constituir-se um evento anterior à completa ruptura celular.

Tanto a perda da viabilidade como a indução de lise dos linfócitos humanos, representam danos celulares irreversíveis e, podem ser explicados baseados na atividade surfactante do MES. A interação do MES com as membranas dos linfócitos pode ter levado à desorganização desta estrutura, com o conseqüente aumento de permeabilidade ao Azul de Tripán e, num estágio mais avançado, causado a ruptura celular.

Investigamos a seguir a possível indução de perda de adesão celular em fibroblastos por MES e DES. A avaliação deste parâmetro é descrito na literatura como sendo uma alternativa relevante na avaliação do potencial citotóxico de xenobióticos (Reinhardt e col., 1985).

A perda de adesão celular de fibroblastos V-79 pode ser evidenciada pela redução na massa celular no final do tratamento por 50 µg/ml de MES (correspondendo à 0,085 mM) (tabela 5). A perda celular constatada pode ser consequência de dois eventos distintos: destacamento de células do substrato e por outro lado, a indução de lise celular. A análise dos lisados nas células remanescente (CR) após o tratamento mostrou que a ocorrência da redução na massa celular foi de aproximadamente 40%. O aumento das absorbâncias $A_{260\text{nm}}$ e $A_{280\text{nm}}$ no sobrenadante (SB-MT) indica a presença de material nucléico e protéico liberado, comprovando a ocorrência de rompimento celular. O fato de termos constatado a presença de material nucléico e protéico insolúvel (PPT-MT) evidenciou também a presença de núcleos ou então de células íntegras presentes nos meios de tratamento. Os efeitos de igual dose de MES em outra linhagem de fibroblastos (VA-13), produziu um padrão de perda de adesão similar aos descrito para a linhagem V-79 (Hoffmann, 1985). Comparativamente ao MES, o DES não apresentou efeitos significativos na promoção de lise ou na indução do destacamento celular. Como anteriormente discutido, a esterificação adicional da sacarose, provocando alterações nas propriedades físico-químicas no sucroderivado, resultou numa atenuação das características citotóxicas e reforçam a idéia de que os estearatos de sacarose possuem diferentes potenciais citotóxicos.

A determinação da curva dose-resposta (figura 9) mostra que a perda de adesão das células é diretamente proporcional à

concentração de MES. O efeito causado pela concentração de 50 µg/ml de MES neste experimento (83%) foi superior ao anterior. Isto pode ser explicado pelas diferenças dos protocolos utilizados: neste último, as várias lavagens a que as células foram submetidas podem ter constituído um estresse, resultando numa maior perda de adesão e rompimento de células. Pode-se determinar, por esta curva, um índice de perda de adesão celular 50% (PA_{50}), correspondendo à 29 µg/ml de MES (0,05 mM). A exposição dos fibroblastos ao DES, em doses 20 vezes maiores, não resultou numa perda de adesão celular significativa, demonstrando, mais uma vez, o diferente potencial citotóxico dos estearatos de sacarose.

A comprovação dos efeitos líticos do MES em fibroblastos sugere fortemente uma ação sobre a membrana, gerando distúrbios que levam ao rompimento celular. Comparando-se os resultados apresentados nos diferentes tratamentos na dose de 50 µg/ml, o MES apresentou efeitos na perda de adesão celular significativamente maiores aos apresentados pelos agentes surfactantes dodecil sulfato de sódio (SDS) e Triton X-100, detergentes conhecidos como potentes agentes citotóxicos (Tachon e col., 1989; Reindhart e col., 1985; Shopsis e col., 1985) (tabela 6). Os outros agentes surfactantes não iônicos ensaiados (Brij 35, Span 60 e Tween 80) não promoveram perdas na adesão celular nesta faixa de concentração.

Continuando os estudos do potencial agressivo dos estearatos de sacarose, investigamos um outro marcador da citotoxicidade, a

inibição da proliferação celular. Este parâmetro é tido como mais sensível que os anteriores (Reinhardt e col., 1985). A proliferação celular pode ser avaliada contando-se o número de células (Reinhardt e col., 1985) ou então por meio da determinação do conteúdo protéico (Shopsis e Eng, 1985; Tachon e col., 1989). Os nossos estudos sobre a ação citostática do MES foram efetuados estimando-se a massa celular por meio da determinação espectrofotométrica do conteúdo de ácidos nucleicos, que exibiu uma correlação positiva entre o número de células e o conteúdo de ácidos nucleicos (figura 10).

As investigações efetuadas sobre a ação do MES no crescimento celular mostraram que o tratamento prévio por 30 minutos com este agente resultou numa forte inibição do crescimento de fibroblastos VA-13, no período de crescimento de 66 horas subsequente ao tratamento (figura 11). Pela curva determinamos a dose que causa 50% de inibição da proliferação celular (IP_{50}), com o valor de 2 $\mu\text{g/ml}$ (0,0034 mM). Na dose de 2,7 $\mu\text{g/ml}$ de MES (0,0046 mM) obteve-se um índice de crescimento relativo igual a 1,0, indicando que o número final de células é igual ao número de células no momento do tratamento. Este resultado mostra a completa inibição da proliferação celular. Doses superiores à esta resultaram num índice de crescimento menor que 1,0, indicando ter ocorrido também perda de células após o tratamento. Resultados similares foram encontrados com a linhagem V-79. A comparação deste resultado com o parâmetro da perda de adesão celular, mostra que a inibição do

crescimento celular é consideravelmente mais sensível como marcador da citotoxicidade. Os resultados encontrados na literatura mostram que, dependendo do agente avaliado, diferenças em até três ordens de grandeza podem ser encontrados nos dois protocolos (Reinhardt e col., 1985).

A avaliação dos efeitos de DES, numa dose relativamente elevada (50 µg/ml), na proliferação celular mostrou uma ausência total de ação inibitória deste éster sobre o crescimento celular (figura 12). Tal achado demonstra novamente o comportamento diferenciado de ésteres de sacarose em função do grau de esterificação.

A marcada ação inibitória de um agente no crescimento celular pode ser resultante de uma ação numa via metabólica essencial ou então resultante de uma ação sobre o genoma celular. Devido ao fato de agentes surfactantes exercerem uma marcada ação sobre as membranas celulares, parece-nos mais plausível interpretar os efeitos inibitórios de MES no crescimento celular como sendo consequência de modificações não letais ao nível da permeabilidade da membrana, levando à alterações do metabolismo celular. Num segundo estágio, em concentrações mais elevadas de MES, poderiam ocorrer alterações mais drásticas da membrana que levariam à perda de viabilidade e à lise celular.

Uma abordagem mais sensível para a determinação da ação letal

de um agente é a verificação da capacidade do crescimento clonal das células (Reinhardt e col., 1985; Shopsis e col., 1985). A curva de sobrevivência de células V-79 (figura 13) mostrou que o tratamento com 0,013 mM de MES (7,5 µg/ml) causou uma inibição de 50% na formação de colônias (IC_{50}). Comparando-se as doses IP_{50} (0,0034 mM) e a dose IC_{50} (0,013mM), pode-se constatar que a inibição do crescimento celular ocorre numa faixa de dose de MES inferior àquela (cerca de 4 vezes) que causa a morte das células, comprovando que as alterações não letais da membrana celular antecedem à morte. A mesma comparação pode ser estabelecida entre os índices IC_{50} (0,013 mM) e PA_{50} (0,05 mM). A razão entre a perda de adesão e a letalidade é de aproximadamente 4 vezes, mostrando, conseqüentemente, que a morte celular antecede a perda de adesão. De uma maneira global, os resultados mostram a seguinte sequência de eventos citotóxicos: a inibição do crescimento celular é anterior à morte e esta, anterior à perda de adesão.

Vários agentes químicos tem a sua ação citotóxica alterada pela presença de alguns componentes do meio de cultura. Alguns destes agentes podem atuar, por exemplo, como agentes quelantes. A interação entre o agente e os componentes do meio de cultura pode acarretar numa redução ou mesmo na eliminação da toxicidade (Stark e col., 1986). Um bom exemplo destas possíveis interações é a comparação da ação citotóxica de compostos na ausência e presença de soro fetal bovino (Mummery e col., 1983; Coulomb e col., 1984; Stark e col., 1986). No que se refere especificamente aos agentes

surfactantes, estudos mostram que as suas atividades biológicas podem ser marcadamente reduzidas na presença de proteínas (Kabara, 1979). Resultados similares foram recentemente relatados sobre o efeito do soro fetal bovino na citotoxicidade de outros detergentes, como o dodecil sulfato de sódio e o Triton X-100. (Tachon e col., 1989; Shopsis e Eng, 1988). Dependendo do surfactante avaliado, as modulações no potencial citotóxico pelo soro fetal bovino, podem apresentar intensidades diversas (Shopsis e Eng, 1988). Em vista disto, procuramos investigar o efeito da presença do soro fetal bovino durante o tratamento com MES, no crescimento clonal de fibroblastos V-79. Os resultados mostraram que a adição de 10% de soro fetal bovino no meio de incubação do MES, resultou na supressão total do efeito letal do MES (figura 13). A explicação encontrada para esse resultado é a possível interação do MES com proteínas encontradas no soro fetal bovino, possivelmente formando um complexo detergente-proteína, o que acarretaria, conseqüentemente, a remoção de moléculas ativas de MES da solução.

O conjunto de resultados obtidos sobre a capacidade citotóxica do MES forneceu resultados que podem ser interpretados como tendo a mesma base mecanística descrita para os agentes surfactantes. O mecanismo de ação citotóxica dos surfactantes aponta a membrana plasmática das células como o alvo principal. A fim de estabelecer a ação do MES ao nível da membrana, alguns experimentos foram efetuados tendo como parâmetros a integridade estrutural e

funcional da membrana celular. Para tal, empregamos o experimento clássico de hemólise, e avaliamos a integridade funcional da membrana celular de fibroblastos, determinando-se a taxa de captação de Uridina.

A hemólise causada por agentes surfactantes é um fenômeno bem conhecido. Muitos detergentes, incluindo os não iônicos, dissolvem a membrana celular via a formação de micelas mistas de detergente-lípideos e detergentes-lípideos-proteínas na bicamada lipídica (Isomaa e col., 1988; Zubay, 1988). Embora os eventos moleculares envolvidos neste processo não tenham sido ainda completamente elucidados, é geralmente aceito tratar-se um processo composto por 5 etapas:

- 1) adsorção do surfactante à superfície celular;
- 2) intercalação do surfactante na membrana celular;
- 3) desorganização da membrana celular;
- 4) aumento da permeabilidade da membrana celular e,
- 5) ruptura da célula.

As etapas 1 e 5 são consideradas etapas rápidas e os passos 2, 3 e 4 são considerados como etapas limitantes da velocidade do processo hemolítico.

Preparações de hemácias, previamente avaliadas quanto a sua normalidade, foram expostas ao MES, Triton X-100 e ao DES (figura

14 e 15). A determinação da hemólise em função de diferentes doses de MES forneceu uma curva sigmoidal: doses entre 12,5 e 25 µg/ml de MES causam um aumento menos acelerado da hemólise. Doses superiores a 25 µg/ml determinam um aumento rápido do rompimento de hemácias. A dose hemolítica 50% (DH₅₀) foi equivalente 0,05 mM (30 µg/ml). A comparação da IP₅₀ e DH₅₀ do MES mostra que sua ação hemolítica ocorre numa faixa de concentração 15 vezes superior àquela que causa inibição de 50% da proliferação. Por outro lado, a comparação dos índices DH₅₀ e PA₅₀ mostra que a ação hemolítica e a perda de adesão celular ocorrem na mesma faixa de dose (0,05 mM). Já o agente Triton X-100 apresentou, neste mesmo experimento, um efeito hemolítico numa faixa mais elevada e estreita de dose (50 a 75 µg/ml). A sua DH₅₀ foi determinada como 0,095 mM (66 µg/ml), mostrando que o potencial hemolítico do MES é aproximadamente o dobro do correspondente ao Triton X-100. Isto permite concluir que o MES apresenta uma maior capacidade em interagir e desorganizar membranas celulares que o Triton X-100. O composto DES, em concentrações de até 500 µg/ml (0,56 mM) não produziu hemólise das hemácias. O derivado DES parece produzir efeitos diferentes do que o MES ao nível da membrana celular, o que poderia, por sua vez, explicar o seu baixo potencial citotóxico.

Para comprovar o efeito supressivo do soro fetal bovino na ação citotóxica do MES, comparamos o efeito da presença de 10% do soro na ação hemolítica do MES. Os resultados evidenciaram que a introdução desta mistura complexa de proteínas aboliu, de maneira

efetiva a ação do MES de maneira similar ao acontecido com o seu efeito letal (tabela 7).

Para elucidar os efeitos dos estearatos de sacarose em membranas celulares de fibroblastos, avaliamos a ação destes compostos por um parâmetro que indica a funcionalidade desta estrutura. A penetração de nutrientes nas células envolve processos específicos de transporte, ativos ou passivos, através da membrana plasmática. Agentes que determinam alterações estruturais na membrana irão causar distúrbios na captação de nutrientes importantes pelas células, como a glicose, aminoácidos e nucleosídeos. A Uridina (Urd) é um nucleosídeo precursor dos ácidos ribonucleicos, cuja a cinética de captação está relacionada com a integridade da membrana celular, com a atividade metabólica e com o crescimento celular (Koren, 1980).

O mecanismo da captação de Urd por células de mamíferos se dá por um processo bifásico: 1) etapa de transporte através da membrana plasmática, por um mecanismo de difusão facilitado; 2) etapa de reação de fosforilação intracelular por quinases específicas, formando os nucleotídeos de uracila (Stambrook e col., 1973). A segunda etapa do processo é a fase limitante da velocidade de captação do nucleosídeo. A literatura mostra que a cinética de captação de Urd pode ser afetada de duas maneiras: a) estimulação por fatores de crescimento (Rozengurt e col., 1978) e b) inibição por agentes citotóxicos (Shopsis e Sathe, 1984; Borenfreund e col.,

1983). Em células não tratadas, esta cinética varia em função do estágio de crescimento e do estado de transformação celular (Koren, 1980).

A fim de determinar a ação do MES sobre a taxa de captação de Urd, padronizamos primeiramente a técnica com o álcool alílico, descrito como tendo uma forte ação inibidora na taxa de captação de Urd e, com o dimetilsulfóxido (DMSO), que exibe uma fraca ação na captação de Urd (Borenfreund e col., 1983; Shopsis e Sathe, 1984 e Shopsis e col., 1985). Observamos que o álcool alílico produziu uma inibição acentuada na captação de Urd na faixa de 0,01 - 0,15 M e um aumento na inibição da captação de Urd menos acentuado em doses mais elevadas (0,15 - 0,5 M) (figura 16). O comportamento bifásico pode ser explicado pelo fato da captação de Urd poder ser induzida por vários mecanismos, que incluem alterações no influxo, na velocidade de fosforilação e na velocidade de efluxo. A obtenção do comportamento bifásico na captação de Urd por álcool alílico indica a ocorrência de mais de um dos possíveis mecanismos. Os dados encontrados mostraram que o álcool alílico determina uma inibição de 50% na captação de Urd (UI_{50}) em 72 mM. O ensaio com DMSO (figura 17) mostrou que a inibição na captação de Urd é diretamente proporcional à dose aplicada; a UI_{50} foi estimada, por extrapolação da curva, em 1,55 M. A comparação dos resultados indicou que a dose inibitória 50% para o álcool alílico é 21,5 vezes menor do que a UI_{50} do DMSO, de maneira compatível ao esperado para um agente toxico moderado e um levemente tóxico, respectivamente. As doses

UI₅₀ descritas na literatura para o álcool alílico e para o DMSO são, respectivamente, 12 mM e 451 mM. O fato de termos encontrado doses UI₅₀ mais elevadas pode ser explicado pela curta duração do tratamento efetuado: 30 minutos ao invés de 4 horas (Borenfreund e col., 1983; Shopsis e Sathe, 1984 e Shopsis e col., 1985).

Uma vez padronizadas as nossas condições, avaliamos os efeitos dos estearatos de sacarose na captação de Urd. Os resultados foram expressos em termos da radioatividade incorporada em função da absorbância em 260 nm para a normalização dos resultados em função do número de células remanescentes. Os resultados obtidos (figura 18) mostram que o MES apresenta um comportamento bifásico, similar ao descrito para o álcool alílico, exibindo uma UI₅₀ calculada em 16,2 µg/ml, correspondendo a 0,027 mM. O resultado demonstra que o MES apresenta a capacidade de alterar as funções normais de membranas celulares, afetando o transporte de Urd e seu metabolismo intracelular. Isto nos leva a propor que os eventos ao nível do transporte e metabolismo de Urd ou de outros metabólitos, sejam responsáveis pela inibição do crescimento celular causada pelo MES. O DES, por sua vez, não altera significativamente a captação de Urd, mesmo em concentrações elevadas (1000 µg/ml, correspondendo a 1,12 mM) (figura 19).

Os estudos efetuados com outros agentes surfactantes, tais como o dodecil sulfato de sódio (SDS), Triton X-100, Brij 35, Tween 80 e Span 60, permitiu a comparação dos resultados obtidos com o

MES. O agente surfactante aniônico SDS produziu efeitos inibitórios na captação de Urd, de uma maneira proporcional à dose aplicada (figura 20). A UI_{50} foi calculada em 40 $\mu\text{g/ml}$ (correspondendo a 0,14 mM). O valor UI_{50} descrito para o SDS é de 0,29 mM ou 0,10 mM na presença ou ausência de soro fetal bovino (Shopsis e col., 1985; Shopsis e Eng, 1988), similares, portanto, aos nossos achados. Os autores afirmam que os dados citotóxicos obtidos na ausência de soro fetal bovino, como nos nossos estudos, correlacionam melhor com os dados *in vivo* (Shopsis e Eng, 1988; Triglia e col., 1990).

Os efeitos inibitórios na taxa de captação de Urd pelo surfactante não iônico Brij 35 mostrou também uma relação diretamente proporcional com a dose tratada (figura 21). A UI_{50} foi calculada em 84 $\mu\text{g/ml}$, mostrando, conseqüentemente, um menor efeito na captação de Urd que o MES e o SDS.

A determinação da inibição de captação de Urd pelo surfactante não iônico Triton X-100 (figura 22), apresentou um padrão distinto dos anteriores, mostrando um comportamento similar ao detectado no ensaio de hemólise (figura 15). Os resultados obtidos em baixas doses (5 a 25 $\mu\text{g/ml}$, correspondendo a 0,008 - 0,04 mM) parecem indicar um aumento na captação de Urd, sugerindo a ocorrência de uma alteração menos drástica da membrana, que favorece a entrada deste nucleosídeo. Contudo, o tratamento com concentrações entre 25 - 50 $\mu\text{g/ml}$ (0,04 - 0,08 mM) reduziu drasticamente a captação de Urd, indicando a ocorrência de uma acelerada e drástica

desorganização da membrana, inibindo o transporte do nucleosídeo. A UI_{50} foi calculada como 40 $\mu\text{g/ml}$ (0,064 mM).

Os outros agentes tensoativos do tipo não iônico avaliados, Tween 80 e Span 60, tidos como surfactantes com baixo poder agressivo, apresentaram efeitos na taxa de captação de Urd em doses consideravelmente mais elevadas: os efeitos do Tween 80 foram detectados em concentrações a partir de 1000 $\mu\text{g/ml}$ e do Span 60 em concentrações a partir de 750 $\mu\text{g/ml}$ (tabela 8).

A comparação dos valores de UI_{50} dos detergentes por nós estudados mostram que o MES é um agente citotóxico mais potente do que os outros surfactantes não iônico (Triton X-100, Brij 35, Span 60 e Tween 80). Embora a classe dos surfactantes aniônicos seja considerada como tendo um potencial citotóxico mais acentuado do que os surfactantes anfotéricos ou não iônicos, os resultados obtidos na UI_{50} indicam que o MES apresentou um maior potencial citotóxico que um representante típico dos aniônicos: o SDS. Comparativamente ao DMSO e o álcool alílico, podemos situar o MES numa escala de potência como um agente altamente citotóxico.

O conjunto de resultados obtidos mostra claramente a forte ação citotóxica do MES em células de mamíferos. Os efeitos citotóxicos aqui reportados ocorreram em doses baixas, inferiores à 0,05 mM, que é a concentração micelar crítica (cmc) descrita para

o MES (Abran e col., 1989). Da mesma maneira, os efeitos reportados para o SDS (cmc = 8,3 mM) foram reportados abaixo desta concentração, o mesmo ocorrendo com o Triton X-100 (0,24 mM). Os efeitos relatados aqui, portanto, foram obtidos com os surfactantes dissolvidos na solução na forma de monômeros e não na forma de agregados moleculares (micelas). Há evidências que as micelas não estão envolvidas na reação rápida de hemólise, como é o caso do MES (Isomaa e col., 1988). O mesmo tipo de raciocínio pode ser extrapolado para os efeitos observados nos diferentes parâmetros de citotoxicidade avaliados.

A atividade biológica dos estearatos de sacarose foi anteriormente estudada, por vários autores (Nishikawa e col., 1977a e b; Ikekawa e col., 1979 e Marshall e Bullerman, 1986). Os relatos exibem dados que mostram a atividade antitumoral e antifúngica destes sucroderivados. Os autores mostram que estas atividades estão diretamente correlacionadas com o conteúdo de monoestearato de sacarose presente nas preparações avaliadas. Os estudos demonstram que o MES mostrou ser eficaz *in vivo* contra o tumor ascítico de Ehrlich (Kato e col., 1971; Nishikawa, 1977a e b; Ikekawa e col., 1979), ativo *in vitro* contra uma linhagem de células leucêmica (Nishikawa e col., 1977b; Ikekawa e col., 1979) e inativo contra uma forma de tumor sólido (Nishikawa e col., 1977b). Embora os estudos não apresentem uma explicação conclusiva para os efeitos antitumorais de MES, os autores, contudo, não descartam a possibilidade da atividade deste derivado ser

resultante de uma interação direta deste agente nas membranas celulares, alterando esta estrutura e, finalmente, destruindo a célula tumoral (Kato e col., 1971; Nishikawa, 1977a e b; Ikekawa e col., 1979).

Os resultados obtidos na atividade antitumoral apresentada pelo derivado monoestearato de sacarose pode ser interpretado como sendo resultante da propriedade anfifílica deste composto. É importante observar que os efeitos antitumorais *in vivo* foram detectados apenas em algumas formas tumorais. Mais ainda, a atividade contra os tumores ascíticos de Ehrlich foi constatada apenas quando o MES era administrado intraperitonealmente, isto é, numa condição que permite o contato direto entre o MES com a célula tumoral. Demonstramos no nosso trabalho, que o MES exibe uma forte ação deletéria nos diversos tipos celulares estudados. Os resultados por nós obtidos demonstram também que o alvo celular da ação tóxica do MES é a membrana, com uma mecanística semelhante à descrita para outros agentes surfactantes (Tachon e col., 1989). Provavelmente o mecanismo pelo qual o MES apresenta a reportada atividade antitumoral, *in vivo* como *in vitro* é resultante de uma atividade tóxica não específica sobre as células, tumorais ou não. A dedução pode ser extrapolada para os efeitos antifúngicos e antimicrobianos.

Como mostram os nossos resultados, o MES exibe uma potente ação citotóxica. Por outro lado, este composto é referido na

literatura como sendo sendo atóxico em animais, tendo o seu uso sido liberado para a indústria de alimentos (Walker, 1984) e para a indústria cosmética (Desai, 1985; Desai e Lowicki, 1985 e Desai, 1990). Este aparente paradoxo, a forte toxicidade *in vitro* e a inoquidade *in vivo*, pode ser explicado à luz de nossos resultados, que mostraram a considerável atenuação dos efeitos citotóxicos do MES na presença de proteínas do sêro fetal bovino. Mais recentemente, foi também constatada a indução da proliferação de linfócitos por MES na presença de 4% de sêro fetal bovino (Thérien e col., 1989). Este resultado mostra que a interação do MES com as prtoteínas séricas não apenas abole os efeitos deletérios do sucroderivado, podendo até apresentar efeitos opostos aos observados na ausência de proteínas do sêro. Desta forma, a presença de diversos tipos de proteínas plasmáticas nos ensaios toxicológicos realizados *in vivo*, atenuaria significativamente ou mesmos poderia reverter os efeitos deletérios do MES.

Os nossos resultados permitem também avaliar a relativa citotoxicidade dos diferentes estearatos de sacarose. A introdução de mais um radical estearoil na molécula do MES, formando o derivado diesterificado, aboliu os efeitos deletérios observados em membranas celulares. Embora o DES apresente características de anfifilicidade, as alterações nas propriedades físico-químicas (c.m.c e HLB) deste derivado poderia explicar o seu comportamento tão diferenciado em células em cultura. Nossos estudos deixam claro que as atividades adversas encontradas nas amostras industriais de

estearatos de sacarose devem ser causadas unicamente pelo MES presente nas preparações.

De qualquer modo, apesar da potente ação citotóxica exibida pelo MES, sua atividade sobre a membrana celular torna-se interessante à luz dos achados de Abran e col. (1989) que apontam o MES como um detergente de escolha na purificação de proteínas intrínsecas da membrana, pela sua inatividade sobre estruturas protéicas. Esta propriedade abre perspectivas promissoras de emprego do MES na pesquisa bioquímica, em purificações de proteínas e enzimas no seu estado nativo.

Por outro lado, o derivado diesterificado apresenta algumas características que podem ter um significado importante para a indústria cosmético-farmacêutica. Um estudo recente demonstrou a propriedade do DES formar vesículas em sistemas aquosos, com vantagens sobre os fosfolipídeos normalmente empregados para este fim (Ishigami e Machida, 1989). Esta propriedade do DES permite prever seu potencial de aplicação na confecção de microemulsões e na manufatura de sistemas de aporte do tipo lipossomas.

V - SUMÁRIO

Os ésteres de sacarose apresentam um grande potencial de emprego, constituindo-se numa fonte de matéria-prima renovável de importância para a indústria de alimentos e de cosméticos. Apesar do enorme interesse industrial que os estearatos de sacarose tem despertado nos últimos anos, os seus efeitos em células de mamíferos não foram estudados de modo sistemático e conclusivo.

Visando estudar a ação de estearatos de sacarose em células de mamíferos, purificamos e identificamos quimicamente os derivados mono e diestearato de sacarose a partir de uma mistura industrial. Devido às suas estruturas químicas, estes dois derivados apresentam características de agentes anfifílicos, sendo classificados como surfactantes do tipo não iônico.

A determinação dos efeitos biológicos do monoestearato de sacarose (MES) e do diestearato de sacarose (DES) foi efetuada em cultura de tecidos *in vitro*, empregando células humanas (hemácias, linfócitos, fibroblastos primários da derme e fibroblastos de pulmão estabelecidos em cultura) e de roedor (fibroblastos V-79). Vários marcadores da atividade citotóxica foram empregados para a caracterização dos potenciais citotóxicos dos sucroderivados, tais como alterações na morfologia, perda de viabilidade, perda de adesão, inibição da proliferação e morte das células.

Contrariamente ao DES, o MES exibiu uma potente ação citotóxica, constatada em todos os tipos celulares estudados, mostrando, uma atuação não seletiva sobre as células. Os resultados obtidos mostram que o MES apresenta um potencial citotóxico mais elevado que os outros agentes surfactantes avaliados (dodecil sulfato de sódio e Triton X-100) que são classificados como agentes agressivo para as células. O mecanismo de ação do MES foi interpretado como sendo similar ao descrito para outros surfactantes, causando alterações estruturais e funcionais das membranas celulares. A ausência de citotoxicidade do DES, o qual também apresenta anfifilicidade, foi interpretada como sendo resultante da modificação das propriedades físico-químicas, decorrentes de uma segunda esterificação na molécula de sacarose.

Os efeitos do MES sobre as membranas celulares foram comprovados através da determinação de sua ação hemolítica em eritrócitos e de sua capacidade de inibir a captação de uridina em fibroblastos. Contrariamente ao MES, o DES não causou alterações ao nível das membranas celulares, em concordância com o esperado pela sua ausência de citotoxicidade.

Os efeitos deletérios do MES foram consideravelmente atenuados na presença de proteínas séricas, possivelmente devido a formação de um complexo detergente-proteína, inativo sobre a membrana celular. Este achado pode explicar a ausência de efeitos tóxicos do MES em animais, reportada na literatura.

VI - SUMMARY

The food and cosmetic industries have recently focused attention on the possible use of fatty acid sucrose ester as a renewable raw material. Despite the above interest on sucrose esters, their action on mammalian cells was not investigated systematically and conclusively.

In order to study the sucrose stearate effect on mammalian cells, the mono- and di- derivatives were separated from an industrial product, purified and chemically identified. The compounds showed properties of amphiphilic agents and were classified as non ionic surfactants.

The biological actions of sucrose monostearate ester (SME) and sucrose distearate ester (SDE) were performed on *in vitro* tissue cultures, using human cells (erythrocytes, lymphocytes, dermal fibroblast or a cell line obtained from lung fibroblast) and with rodent cells (fibroblast V-79). Several cytotoxicity end points (morphological alterations, cell viability, cell detachment, cell growth inhibition and cell death) were employed to characterize the cytotoxic potential of those purified sucrose ester derivatives.

SME showed a non-selective and a potent cytotoxic action on all cell types analyzed. None of those effects were obtained with SDE. The results indicated also that SME had the strongest activity

when compared to other surfactants known to be aggressive on cells (sodium dodecyl sulfate and Triton X-100). The mechanism for the SME action was assumed to be similar to those described for surfactants, causing structural and functional alterations on cell membrane. The absence of cytotoxicity observed with SDE (also an amphiphilic compound) was interpreted as a consequence of changes on the physico-chemical properties resulting from a second esterification in the sucrose molecule.

The effects of SME on cell membranes were observed through the determination of the hemolytic potential on erythrocytes and on the fibroblast membrane mediated uridine uptake. The SDE, in opposition to SME, did not induce modifications at the cell membrane level, according to the observed absence of cytotoxicity action.

The damaging SME action, both on cells and membranes, were significantly diminished in the presence of serum proteins, probably forming an inactive detergent-protein complex on cell membranes. This finding can explain why SME is normally reported as a nontoxic surfactant in animals.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADOLPHE, M. & BARLOVARTZ-MEINON, M., 1988. - Culture de cellules animales - methodologies et applications, Editions INSERM, Paris, p.141-167.
- AKOH, C. C. & SWANSON, B. G., 1989a. Synthesis and properties of alkyl glycosides and stachyose fatty acid polyesters. J. Am. Oil Chem. Soc., 66:1295-301.
- AKOH, C. C. & SWANSON, B. G., 1989b. Preparation of Trehalose and sorbitol fatty acid polyesters by interesterification. J. Am. Oil Chem. Soc., 66:1581-3.
- AKOH, C.C. & SWANSON, B.G., 1990. Optimized synthesis of sucrose polyesters: comparison of physical properties of sucrose polyesters, raffinose polyesters and salad oils. J. Food Sci., 55:236-43.
- ABRAN, D.; BOUCHER, F.; HAMANAKA, T.; HIRAKI, K.; KITO, Y.; KOYAMA, K.; LEBLANC, R.M.; MACHIDA, H.; MUNGER, G.; SEIDOU, M & TESSIER, M., 1989. On some physicochemical properties of sucrose esters and the stability they confer to membrane proteins - J. Colloid Interf. Sci., 128:230-6.

- BOBALEK, E. G., 1977. Propects and potential for commercial production and utilization of sucrose fatty acid esters. Ed. Hickson, J. L. In Sucrochemistry, Washington, p.162-75. (ACS Symposium Series, v. 41).
- BORENFREUND, E. & BORRERO, O., 1984. In vitro cytotoxicity: potential alternatives to the Draize ocular irritancy test. Cell. Biol. Toxicol., 1:55-65.
- BORENFREUND, E.; SHOPSIS, C.; BORRERO, O. & SATHE, S. 1983. -In vitro alternative irritancy assays: comparison of cytotoxic and membrane transport effects of alcohols. Ann. N. Y. Acad. Sci., 407:416-19.
- BOSSHARD, E., 1985. Review on skin and mucous irritation tests and their applications. Fd. Chem. Toxic. 23:149-53.
- BOYUN, A., 1968. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. Scan. J. Clin. Lab. Invest., 21:77-89.
- COULOMB, H.M.; GU, Z.W.; LOITREAU, M. & CHOUROULINKOV, I., 1984. Effect of serum concentration on cytotoxicity and sister chromatid exchange induction by a chemical carcinogen and by a diesel particulate extract in V-79 hamster cells. Cancer Lett., 22:77-82.

- CRODA - CRODESTA SUCROSE FATTY ACID ESTERS (1985) - Crodata
Bulletin, Croda, New York.
- DARNELL, J.; LODISH, H. & BALTIMORE, D., 1986. Molecular Cell
Biology. New Yorks, Scientific American Books, p. 569-612.
- DESAI, N. B., 1985. Saccharoseester Eine fur Kosmetika Interessante
Stoffklasser - Parfum. Kosmetik, 66:629-35.
- DESAI, N. B., 1990. Esters of sucrose and glucose as cosmetic
materials - as renewable natural resources, carbohydrates are
gaining importance as chemical raw materials. Cosmet. Tiolet.
105:99-107.
- DESAI, N.B. & LOWICKI, N., 1985. New sucrose esters and their
applications in cosmetics. Cosmet. Toilet., 100:55-59.
- DIXON, K.C., 1967. Events in dying cells. Proc. Royal. Soc. Med.
60:271-275.
- DK - ESTER, 1982. Sucrose fatty esters products. Dai Ichi Kogyo
Seigaku, Tokyo (Technical Bulletin).
- DONNELLY, M. J. & BU'LOCK, J. D., 1988. Sucrose esters as model
compounds for synthetic glycolipid surfactants. - J. Am. Oil
Chem. Soc., 65:284-87.

- DRAIZE, J. H.; WOODWARD, G. & CALVERY, H. O., 1944. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. - J. Pharmacol. Exp. Theor., 82:377-89.
- DREYWOOD, R., 1946. Qualitative test for carbohydrate material. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 18:499.
- EKWALL, B., 1980. Screening of toxic compounds in tissue culture. Toxicology 17:127-42.
- FALCONE, S.F.; GUIMARÃES, Z. & PEREIRA, P.C., 1987. Ésteres graxos de sacarose e suas aplicações no campo de detergentes. Inf. INT 19:27-34.
- FALLAT, R.W.; GLUECK, C.J.; LUTMER, R. & MATTSON, F.H., 1976. Short term study of sucrose polyester a nonabsorbable fat-like material as a dietary agent for lowering plasma cholesterol. Am. J. Clin. Nutr., 29:1204-15.
- FERRENBACH, C., 1985. A process for the production of acetylated sugar esters. Henkel Ref., 21:27-9.
- FEUGE, R.O.; ZERINGUE, H.J.; WEISS, T.J. & BROWN, M., 1970. Preparation of sucrose esters by interesterification. J. Am. Oil Chem. Soc., 47:56-60.

- FORD, D.K. & YERGANIAN, G., 1958. Observations on the chromosomes of chinese hamster cells in tissue culture. J. Nat. Cancer Inst., 21:393-425.
- GLUECK, C.J.; JANACEK, R.; HOGG, E.; ALLEN, C.; BAEHLER, L. & TEWKSBURY, M., 1983. Sucrose polyester: substitution for dietary fats in hypocaloric diets in treatment of familar hypercholesterolemia. Am. J. Clin. Nutr., 37:347-54.
- GOLDBERG, A.M. & FRAZIER, J.M., 1989. Alternatives to animals in toxicity testing. Sci. Amer., 261:24-30.
- GOLDEMBERG, R. L., 1978. Reduction of topical irritation. Int. J. Soc. Cosmet. Chem., 28:677-79.
- HAUMANN, B. F., 1986. Getting the fat out: researchers seek substitutes for full-fat fat. - J. Am. Oil Chem. Soc., 63:278-88.
- HOFFMANN, M. E., 1985. Relatório Técnico-Científico I, Termo aditivo 03, Convênio Johnson & Johnson - UNICAMP, Campinas.
- IKEKAWA, T.; UMEJI, M.; YANOMA, S.; YOSHIMOTO, K. & NISHIKAWA, Y., 1979. Chemical and biochemical studies on carbohydrate esters. VIII - Antitumor activity of sucrose fatty acid esters. Chem. Pharm. Bull., 27:2016-20.

- ISHIGAMI, Y. & MACHIDA, H., 1989. Vesicles from sucrose fatty acid esters. J. Am. Oil Chem. Soc., 66:599-603.
- ISOMAA, B.; ENGBLOM, A.C. & HAGERSTRAND, H., 1988. On the time-dependence of amphiphile-induced haemolysis. Toxicology 48:285-291.
- JANDACEK, R.J., 1982. The effect of non adsorbable lipids on the intestinal absorption of lipophyles. Drug. Metabol. Rev., 13:695-705.
- JASPERS, M.E.A.P.; van LEEUWEN, F.F.; NIEUWENHUIS, H.J.W. & VIANEN, G.M., 1987. High performance liquid chromatographic separation of sucrose fatty acid esters. J. Am. Oil Chem. Soc., 64:1020-25.
- KABARA, J.J., 1979. Toxicological, bacteriocidal and fungicidal properties of fatty acids and some derivatives. J. Am. Oil Chem. Soc., 56:760A-67A.
- KATO, A.; ANDO, K.; TAMURA, G. & ARIMA, K., 1971. Effects of some fatty acid esters on the viability and transplantability of Ehrlich ascites tumor cells. Cancer Res., 31:501-4.
- KHAN, R., 1977. Some fundamental aspects of the chemistry of sucrose - Hickson, J. L., ed. In Sucrochemistry, Washington, p. 40-61 (ACS Symposium Series, v. 41).

KLAUSNER, A., 1987. Tissue culture for improved toxicology.
Biotechnology 5:779-86.

KOREN, R., 1980. The relevance of the state of growth and
transformation of cells to their patterns of metabolite uptake.
Int. Rev. Cytol., 68:127-72.

LaBARGE, R. G., 1988. The Search of a Low Caloric Oil. Food
Technol., 42:84-90.

LEMIEUX, R.U. & McINNES, A.G., 1962. The composition of the sucrose
monomyristate prepared by transesterification. Can. J. Chem.,
40:2394-401.

MARSHALL, D.L. & BULLERMAN, L.B., 1986. Antimicrobial activity of
sucrose fatty acid ester emulsifiers. J. Food Sci., 51:468-70.

MATTSON, F. H. & VOLPENHEIN, R. A., 1972. Hydrolysis of fully
esterified alcohols containing one to eight hydroxyl groups by
the lipolytic enzymes in rat pancreatic juice. J. Lipid Res.,
13:325-8.

MUMMERY, C.L.; van der BRINK, S.; van der SAAG, P.T. & de LATT,
S.W., 1983. Screening for cytotoxicity in neuroblastoma cells I.-
Dependence of growth inhibition on the presence of serum.
Toxicol. Lett., 18:201-9.

- MORSE, E.E., 1947. Anthrone in estimating low concentrations of sucrose. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 19:1012-3.
- NAKAMURA, T.; ROSENTHAL, F.R.T.; FERREIRA, V.T.; GHIOTTI, A.M.T.; PERES, L.M. & SANTOS, H.A., 1986. Ésteres de sacarose - reação em pressão ambiente. *Inf. INT* 18:8-13.
- NISHIKAWA, Y.; YOSHIMOTO, K.; OKADA, M.; IKEKAWA, T.; AKIBO, N. & FUKUOKA, F., 1977a. Chemical and biochemical studies on carbohydrate esters. V - antitumor Ehrlich ascite tumor and chromatographic behaviours of fatty acyl monoesters of sucrose and trehalose. *Chem. Pharm. Bull.*, 25:1717-24.
- NISHIKAWA, Y.; YOSHIMOTO, K.; MANABE, T. & IKEKAWA, T., 1977b. Chemical and biochemical studies on carbohydrate esters. IV - Further examinations on antitumor activities of stearyl esters of sucrose. *Chem. Pharm. Bull.*, 25:2378-84.
- NOLEN, G.A.; WOOD, F.E.Jr. & DIERCKMAN, T.A., 1987. A two generation reproductive and developmental toxicity study of sucrose polyester. *Fd. Chem. Toxic.*, 25:1-8.
- OSIPOW, L.; SNELL, F. D.; YORK, W. C. & FINCHLER, A., 1956. Fatty acid esters of sucrose. *Ind. Eng. Chem.*, 48:1459-62.

- OSIPOW, L.I.; ROSENBLATT, W., 1967. Microemulsion process for the preparation of sucrose esters. J. Am. Oil Chem. Soc., 44:307-10.
- PARKER, K. J.; JAMES, K. & HURTORD, J., 1977. Sucrose ester surfactants - a solventless process and the products thereof. Hickson, J. L., ed. In Sucrochemistry, Washington, p. 97-114 (ACS Symposium Series v. 41).
- RELATÓRIO INTERNO J & J - Sucrose Esters (1984), Sumaré, SP. Johnson & Johnson Chemical Synthesis Plant R&D Lab.
- REINHARDT, C.A.; PELLI, D.A. & ZBINDEM. G., 1985. Interpretation of cell toxicity data for the estimation of potential irritation. Fd. Chem. Toxic., 23:247-52.
- ROZENGURT, E.; MIERZEJEWSKI, K. & WIGGLESWORTH, N., 1978. Uridine transport and phosphorylation in mouse cells in culture: effect of growth-promoting factors, cell cycle transit and oncogenic transformatrion. J. Cell Physiol., 97:241-52.
- ROWAN, A. N. & GOLDBERG, A. M., 1985. Perspectives on alternatives to current animal testing techniques in preclinical toxicology. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 25:225-47.

- SHEPPARD, W.J. & LIPINSKY, E.S., 1977. Can Sucrose compete with hydrocarbons as a chemical feedstock? Hickson, J. L. ed., In *Sucrochemistry*, Washington, p.336-50. (ACS Symposium Series, v. 41.
- SHOPSIS, C. & ENG, B., 1985. Rapid cytotoxicity testing using a semi-automated protein determination on cultured cells. *Toxicol. Lett.*, 26:1-8.
- SHOPSIS, C. & ENG, B., 1988. In vitro ocular irritancy prediction in serum-free media correlate better with in vivo data. Goldberg, A. M. ed., In *Alternative Methods in Toxicology*, New York, p. 253-64, Mary Ann Libert Inc. Publ., v. 6.
- SHOPSIS, C.; BORENFREUND, E.; WALBERG, J. & STARK, D., 1984. In vitro cytotoxicity assays as potential alternatives to the Draize ocular irritancy test. Goldberg, A. M. ed., In *Alternative Methods in Toxicology*, New York, p. 103-14, Mary Ann Libert Inc. Publ., v. 2.
- SHOPSIS, C.; BORENFREUND, E.; WALBERG, J. & STARK, D.M., 1985. A battery of potential alternatives to the Draize test: uridine uptake inhibition, morphological cytotoxicity, macrophage chemotaxis and exfoliative cytology. *Fd. Chem. Toxic.*, 23:259-66.
- SHOPSIS, C. & SATHE, S., 1984. Uridine uptake inhibition as a

cytotoxicity test: correlations with the Draize test. *Toxicology* 29:195-206.

SILVA, C.L., 1978. Tese (Mestrado). Monoacilgliceróis de *Nocardia rhodochrous*, *Nocardia asteroides*, *Gordona lentifragmenta* e *Gordona bronchialis*, São Paulo, Universidade de São Paulo.

STAMBROOK, P.J.; SISKEN, J.E. & EBERT, J., 1973. Uridine uptake and its intracellular phosphorylation during the cell cycle. *J. Cell. Physiol.*, 82:267-76.

STARK, D. M.; SHOPSIS, C.; BORENFREUND, E. & BABICH, H., 1986. Progress and problems in evaluating and validating alternatives assays in toxicology. *Fd. Chem. Toxic.*, 24:449-55.

TACHON, P.; COTOVIO, J.; DOSSOU, K.G. & PRUNIERAS, M., 1989. Assessment of surfactant cytotoxicity: comparison with the Draize test. *Int. J. Cosm. Sci.*, 11:233-43.

TARDIFF, R. G., 1978. In Vitro methods of toxicity evaluation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 18:357-69.

THÉRIEN, H.-M.; GRUDA, I.; BOUCHARD, L. & DAIGLE, I., 1989. Stimulation of lymphoproliferation by sucrose esters. *Immunopharm. Immunotoxicol.*, 11:603-9.

TRIGLIA, D.; WEGENER, P.T.; HARBELL, J.; WALLACE, K.; MATHESON, D. & SHOPSIS, C. 1990. Interlaboratory validation study of the keratinocyte neutral red bioassay from Clonetics Corporation. In Alternatives methods in Toxicology. (No prelo).

WALKER, C. E., 1984. Food applications of sucrose esters. Cereal Foods World, 29:286-9.

WEIL, C. S. & SCALA, R. A., 1971. Study of intra- and interlaboratory variability in results of rabbit eye and skin irritation tests. Toxic. Appl. Pharmac., 19:276-360.

WILKINSON, J.B. & MOORE, R.J., 1987. Harry's Cosmeticology - 7 ed. New York, Chemical Pub. p.632-40.

WOMACK, M. D.; KENDALL, D. A. & McDONALD, R. C., 1983. Detergent effects on enzyme activity and solubilization of lipid bilayer membranes. Biochim. Biophys. Acta 733:210-5.

ZUBAY, G. 1988. - Biochemistry - 2 ed., New York, MacMillan Pub. p.176-210.