



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

ANA LUÍZA GOMES QUINDERÉ

PROPRIEDADES NA NOCICEPÇÃO E NA INFLAMAÇÃO DE UMA FRAÇÃO  
POLISSACARÍDICA SULFATADA DA ALGA MARINHA *Acanthophora muscoides*

FORTALEZA

2011

ANA LUÍZA GOMES QUINDERÉ

PROPRIEDADES NA NOCICEPÇÃO E NA INFLAMAÇÃO DE UMA FRAÇÃO  
POLISSACARÍDICA SULFATADA DA ALGA MARINHA *Acanthophora muscoides*

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de  
Pós-Graduação em Bioquímica, como requisito  
parcial para a obtenção do grau de Mestre em  
Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Norma Maria Barros  
Benevides

FORTALEZA

2011

ANA LUÍZA GOMES QUINDERÉ

PROPRIEDADES NA NOCICEPÇÃO E NA INFLAMAÇÃO DE UMA FRAÇÃO  
POLISSACARÍDICA SULFATADA DA ALGA MARINHA *Acanthophora muscoides*

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica

Aprovada em: 21/02/2011.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra (Co-orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Profa. Dra. Edda Lisboa Leite  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

*À minha família*

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Norma M. B. Benevides, por ter sempre contribuído para a minha formação científica, ensinando-me desde a montar uma coluna de cromatografia, a escrever resumos e artigos e a dedicar-me aos meus trabalhos, seguindo seu exemplo.

À Profa. Mirna M. Bezerra, por gentilmente ter-me recebido em seu laboratório e por ajudar-me com seus esclarecimentos.

À Profa. Hellíada, por ter-me recebido tão gentilmente e por sua constante alegria.

Ao Prof. Alfredo, por tão prontamente ter aceitado auxiliar-me nos experimentos.

À Profa. Edda L. Leite, por gentilmente integrar a banca examinadora deste trabalho.

A todos do Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CARBOLEC) com quem tenho o prazer de conviver: Bruno P. Fontes, Edfranck S. O. Vanderlei, Chistiane O. Coura, Gabriela P. Almeida, Gabriele F. Maciel, Gardênia Prado, Ianna W. F. de Araújo, Ismael N. L. Queiroz, José Ariévilo G. Rodrigues, Jane F. T. Silva, Luana M. C.M. Silva, Natássia A. Ribeiro, Ticiania B. Lima, Ticiania M. Abreu, Joana Trycia M. Alexandre, Antonio Wilame S. Alves e Ygor R. G. Eloy.

Ao Bruno, ao Edfranck, a Ianna, ao Ismael, ao Ariévilo e a Trycia, agradeço o apoio constante durante a realizações dos meus experimentos.

A todos do Laboratório de Farmacologia (LAF-SOL) do Campus de Sobral, por gentilmente me acolherem.

Ao Prof. Dalgimar B. de Menezes, a Profa. Janaína S. A. M. Evangelista, a Profa. Helena S. A. Monteiro e a mestranda Roberta J. B. Jorge, pelo valioso auxílio nas análises hitopatológicas.

À Profa. Ana de Fátima Fontenele Urano de Carvalho por gentilmente ter permitido o uso do analisador hematológico automático e aos alunos de seu laboratório por me auxiliarem na utilização do aparelho.

Aos meus amigos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, que sempre me ajudaram.

Em especial agradeço:

Aos meus pais, Francisco Q. Ribeiro e Maria Zeneide G. Quinderé, por todo o amor e pela família maravilhosa que temos.

Ao meu irmão Gustavo, por sua paciência, pelo seu carinho constante e por me ajudar em tudo sempre.

Aos meus irmãos Marcelo e Mário Henrique, por serem presentes mesmo morando longe e por todo carinho.

Às minhas cunhadas Natália e Paula, por tornarem nossa família mais feliz com suas presenças.

À minha tia Wilneide, por seu amor e apoio contantes.

Ao meu tio Thomas, por sua presença em minha vida e pelas minhas lindas priminhas Anna Cecília e Maria Fernanda.

Ao meu namorado Bruno, por seu amor, seu apoio e sua confiança. O seu otimismo sempre me contagia. Obrigada por tudo!

O presente trabalho foi desenvolvido com o apoio das seguintes instituições:

UFC – Universidade Federal do Ceará, através do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo financiamento de projetos desenvolvidos no Laboratório de Carboidratos e Lectinas.

FUNCAP - Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa, financiamento de projetos desenvolvidos no Laboratório de Carboidratos e Lectinas.

## RESUMO

No presente trabalho, uma fração polissacarídica sulfatada obtida da alga marinha *Acanthophora muscoides* (AmII) foi avaliada através de modelos de nocicepção e inflamação. A toxicidade sistêmica dos polissacarídeos sulfatados totais também foi analisada. A atividade antinociceptiva foi avaliada através dos ensaios de contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina e da placa quente. Camundongos *Swiss* machos foram tratados com AmII (1, 3 ou 9 mg/kg; i.v.) 30 min antes de receber injeção de ácido acético 0,8% ou formalina 1% ou antes da exposição a um estímulo térmico. AmII reduziu significativamente o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético e o tempo lambadura da pata na segunda fase do teste da formalina. No teste da placa quente, AmII não prolongou o tempo de reação dos animais. A atividade antiinflamatória foi avaliada através do ensaio de migração de células através da cavidade peritoneal induzida por carragenana (700 µg/ cavidade) e dos ensaios de edema de pata induzidos por carragenana (500 µg/pata) ou por dextrano (400 µg/pata). Ratos *Wistar* foram tratados com AmII (1, 3 ou 9 mg/kg; s.c.) 60 min antes do estímulo inflamatório. AmII reduziu significativamente a migração de neutrófilos através da cavidade peritoneal. No ensaio do edema de pata induzido por carragenana, AmII não reduziu a formação do edema e a migração neutrofílica, analisada através da determinação dos níveis teciduais de mieloperoxidase. Entretanto, AmII inibiu o edema de pata induzido por dextrano no primeiro intervalo analisado. Adicionalmente, quando AmII (500 µg) foi injetada (s.c.) na pata, para verificar um possível efeito edematogênico, não foi observado edema. No ensaio de toxicidade subcrônica, camundongos foram tratados diariamente durante 14 dias com os polissacarídeos sulfatados totais de *A. muscoides* (20 mg/kg; i.p.). Sinais consistentes de dano sistêmico não foram observados, conforme revelado pela avaliação do peso corporal e dos órgãos fígado, rim, coração, baço, timo, e linfonodo e das análises bioquímicas, hematológicas e histopatológicas. Como conclusão, a fração AmII possui propriedades antinociceptiva e antiinflamatória e representa um potencial agente terapêutico, justificando estudos futuros.

**Palavras-chave:** algas marinhas, polissacarídeos sulfatados, nocicepção, inflamação.

## ABSTRACT

Herein, a sulfated polysaccharidic fraction obtained from the marine alga *Acanthophora muscoides* (AmII) was evaluated using models of nociception and inflammation. The systemic toxicity of the total sulfated polysaccharides was also assessed. The antinociceptive properties were assayed using the writhing test induced by acetic acid, the formalin and the hot plate test. *Swiss* mice were treated with AmII (1, 3 or 9 mg/kg; i.v.) 30 min prior to either receiving an injection of 0.8% acetic acid or 1% formalin or prior to a thermal stimulus. AmII reduced the number of acetic acid-induced writhes and licking time in the second phase of the formalin test, but it did not alter the response latency in the hot plate test. The anti-inflammatory properties were assayed using the carrageenan-induced neutrophil migration into the peritoneal cavity and carrageenan- or dextran-induced paw edema models. *Wistar* rats were treated with AmII (1, 3 or 9 mg/kg; s.c.) 60 min prior to inflammatory stimuli. AmII reduced significantly the neutrophil migration into the peritoneal cavity. In the carrageenan-induced paw edema, AmII did not reduce the edema formation or the neutrophil migration, as assessed by the determination of myeloperoxidase levels in the paw tissue. However, AmII reduced dextran-induced paw edema during the first interval analysed. Furthermore, when AmII (500 µg) was injected (s.c.) into the paw, to verify a possible edematogenic effect, no edema was observed. Additionally, when mice were treated with the total sulfated polysaccharides from *A. muscoides* (20 mg/kg; i.p.) for 14 days, no consistent signs of systemic damage were observed, as revealed by body weight, liver, kidney, heart, spleen, thymus and lymph node wet weight and by biochemical, hematological and histopathological analyses. In conclusion, AmII has antinociceptive and anti-inflammatory properties and represents a potential therapeutic agent warranting future studies.

**Keywords:** marine algae, sulfated polysaccharides, nociception, inflammation.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	O caminho da dor da periferia até o cérebro.....	26
FIGURA 2	Espécime da alga marinha <i>Acanthophora muscoides</i> (Linnaeus) Bory de Saint-Vincent.....	38
FIGURA 3	Esquema de extração dos polissacarídeos sulfatados totais.....	40
FIGURA 4	Cromatografia de troca iônica dos polissacarídeos totais da alga <i>Acanthophora muscoides</i> em coluna de DEAE-celulose.....	47
FIGURA 5	Efeito da fração AmII no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.....	49
FIGURA 6	Efeito da fração AmII no teste da formalina em camundongos.....	50
FIGURA 7	Efeito antinociceptivo da fração AmII no teste da placa quente em camundongos.....	51
FIGURA 8	Efeito da fração AmII no modelo de migração celular induzida por carragenana.....	52
FIGURA 9	Efeito da fração AmII no modelo de edema de pata induzido por carragenana em ratos.....	54
FIGURA 10	Atividade da mieloperoxidase (MPO) no sobrenadante do homogenato do tecido da pata.....	55
FIGURA 11	Efeito da fração AmII no modelo de edema de pata induzido por dextrano em ratos.....	56
FIGURA 12	Efeito da injeção subcutânea de AmII em ratos.....	57
TABELA 1	Análises bioquímicas e do peso corporal e dos órgãos de camundongos submetidos a tratamento subcrônico com Am-PST.....	59
TABELA 2	Parâmetros hematológicos de camundongos submetidos a tratamento subcrônico com Am-PST.....	60
FIGURA 13	Análise histopatológica dos órgãos baço, timo e linfonodo de camundongos submetidos a tratamento subcrônico com Am-PST.....	61
FIGURA 14	Análise histopatológica dos órgãos coração, fígado e rim de camundongos submetidos a tratamento subcrônico com Am-PST.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Am-PST	Polissacarídeos sulfatados totais obtidos da alga <i>Acanthophora muscoides</i>
AmII	Fração polissacarídica sulfatada eluída com 0,75 M de NaCl da alga <i>Acanthophora muscoides</i>
C	Carbono
COX	Ciclooxigenase
Cg	Carragenana
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
DEAE- elulose	Dietilaminoetil-celulose
Dexa	Dexametasona
fL	femtonlitro
HCM	Hemoglobina corpuscular média
IASP	Associação Internacional de Estudos sobre Dor
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
µg	micrograma
µL	microlitro
MPO	Mieloperoxidase
MPV	volume médio plaquetário
mg	miligrama
mL	mililitro
mmol	milimol
M	Molar
nm	Nanômetro
PDW	Amplitude da distribuição das plaquetas
pg	picograma
P-LCR	Percentual das plaquetas gigantes
RDW-CV	Coefficiente de anisocitose dos eritrócitos
RDW-SD	Amplitude da distribuição dos eritrócitos
RNA	Ácido ribonucléico

ROS	Espécies reativas de oxigênio
TNF	Fator de necrose tumoral
U	Unidade
U/mg	Unidade por miligrama
VCM	Volume corpuscular médio
v/v	volume/ volume

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Algas Marinhas.....</b>	<b>14</b>
1.1.1 Considerações Gerais.....	14
1.1.2 Importância econômica.....	15
<b>1.2 Características estruturais e atividades biológicas dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas.....</b>	<b>16</b>
1.2.1 Galactanas sulfatadas.....	17
1.2.1.1 Características estruturais de galactanas sulfatadas.....	17
1.2.1.2 Atividades biológicas de galactanas sulfatadas.....	18
1.2.2 Fucoidanas sulfatadas.....	19
1.2.2.1 Características estruturais de fucoidanas sulfatadas.....	19
1.2.2.2 Atividades biológicas de fucoidanas sulfatadas.....	20
1.2.3 Ulvanas e arabino-galactanas.....	22
1.2.3.1 Características estruturais de ulvanas e arabino-galactanas.....	22
1.2.3.2 Atividades biológicas de ulvanas e arabino-galactanas.....	22
<b>1.2 Dor e Nocicepção.....</b>	<b>23</b>
1.2.1 Fisiopatologia da dor.....	24
<b>1.3 Inflamação.....</b>	<b>27</b>
1.3.1 Eventos vasculares.....	28
1.3.2 Principais células envolvidas na inflamação.....	29
1.3.3 Recrutamento de leucócitos para os locais de inflamação.....	31
1.3.4 Mediadores inflamatórios.....	32
<b>1.4 Fármacos analgésicos e antiinflamatórios.....</b>	<b>34</b>
<b>2- OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>2.1. Geral.....</b>	<b>37</b>
<b>2.2. Específicos.....</b>	<b>37</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1 Materiais.....</b>	<b>38</b>
3.1.1 Algas marinhas.....	38
3.1.2 Animais.....	39
<b>3.2 Métodos.....</b>	<b>39</b>

3.2.1 Extração dos polissacarídeos sulfatados totais.....	39
3.2.2 Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados totais.....	41
3.2.3 Atividade antinociceptiva.....	41
3.2.3.1. Testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	41
3.2.3.2. Teste da formalina.....	42
3.2.3.3. Teste da placa quente.....	42
3.2.4. Atividade antiinflamatória.....	42
3.2.4.1. Ensaio de migração celular através da cavidade peritoneal induzida por carragenana.....	43
3.2.4.2. Edema de pata induzido por carragenana.....	43
3.2.4.3. Determinação da atividade de mieloperoxidase.....	44
3.2.3.4. Edema de pata induzido por dextrano.....	44
3.2.5 Ensaio edematogênico.....	45
3.2.6. Toxicidade subcrônica.....	45
<b>3.3 Análise Estatística.....</b>	<b>46</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
<b>5.1 Extração e purificação dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha <i>Acanthophora muscoides</i>.....</b>	<b>47</b>
<b>5.2. Atividade antinociceptiva.....</b>	<b>47</b>
<b>5.3 Atividade antiinflamatória.....</b>	<b>48</b>
<b>5.4 Avaliação do efeito edematogênico.....</b>	<b>53</b>
<b>5.5 Toxicidade subcrônica.....</b>	<b>58</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Algas marinhas

### 1.1.1 Considerações Gerais

As algas representam um grupo diversificado de organismos fotossintetizantes, encontrados em ambientes aquáticos e terrestres úmidos, que não apresentam pronunciada diferenciação tissular, e que podem assumir formas de vida planctônica (microalgas) e bentônica (macroalgas). O termo alga indica um grupo polifilético, pois inclui organismos que não compartilham uma origem comum, mas que seguem múltiplas e independentes linhas evolucionárias (BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

A classificação desses organismos está sob constante revisão à medida que mais evidências genéticas e de ultra-estruturas são acumuladas (BARSANTI; GUALTIERI, 2006). Avanços como a utilização das técnicas de microscopias eletrônicas de transmissão e de varredura e a análise de seqüências de nucleotídeos permitem a integração de dados moleculares e morfológicos e objetivam reforçar a segurança na identificação e classificação das espécies (SILVA, 2008).

As diversas origens evolutivas e a heterogeneidade das algas refletem-se na diversidade de tamanho, variando de fitoplâncton com apenas 0,2-2,0 mm de diâmetro para algas gigantes com até 60 m de comprimento; de habitats colonizados; de estrutura celular; de níveis de organização e morfologia; de pigmentos para a fotossíntese e de polissacarídeos estruturais e de reserva (BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

Dentre as principais divisões de macroalgas marinhas, podem ser citadas: Rhodophyta (algas vermelhas), Phaeophyta (algas pardas) e Chlorophyta (algas verdes) (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

As algas vermelhas são particularmente abundantes em águas tropicais quentes, embora muitas sejam encontradas em regiões frias. A presença do pigmento ficoeritrina em suas células é responsável pela coloração avermelhada destes organismos. As algas vermelhas possuem clorofilas a e d e carotenóides, e armazenam amido das florídeas como reserva (DAVIS; VOLESKY; MUCCI, 2003; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

As algas pardas compreendem as algas mais conspícuas das águas temperadas, boreais e polares, sendo também encontradas em regiões tropicais. As algas pardas podem chegar a 60 metros de comprimento e pesar mais de 300 quilogramas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007). Nestes organismos são encontrados os pigmentos fucoxantina, carotenóides, clorofilas a e c, e armazenam o polissacarídeo laminarana como substâncias de reserva (DAVIS; VOLESKY; MUCCI, 2003; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

As algas verdes acumulam amido no interior de suas células, e contêm os pigmentos clorofilas a e b, carotenos e xantofilas; a presença de clorofilas a e b sustenta a idéia de que as algas verdes tenham sido as ancestrais das plantas, por serem estas possuidoras destes tipos de clorofila (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

### 1.1.2 Importância econômica

As algas marinhas tradicionalmente fazem parte da dieta oriental, especialmente no Japão, China e Coréia. Nas últimas décadas, tem aumentado o consumo direto de algas marinhas como alimento nos países ocidentais. As algas são conhecidas por sua riqueza de polissacarídeos, proteínas, sais minerais e vitaminas e seu baixo teor lipídico, embora haja diferenças entre as espécies. A maior parte dos polissacarídeos de algas não é digerida pelos seres humanos, sendo desta forma considerada fibra alimentar (GÓMEZ-ORDÓÑEZ; JIMÉNEZ-ESCRIG; RUPÉREZ, 2010).

Os ficocolóides (ágar, alginato e carragenana) são extraídos de algas marinhas para o uso em indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de alimentos. As propriedades físico-químicas distintas dos alginatos confere-lhes aplicações nas indústrias alimentícias como agente gelificante e espessante (CARDOZO *et al.*, 2007), farmacêutica, como em microesferas para a liberação de drogas (CHAN; LEE; HENG, 2002) e nas indústrias de papel e têxtil como espessante de corantes (TURK; SCHNEIDER, 2000).

Na indústria alimentícia, as carragenanas têm sido utilizadas, por exemplo, para melhorar a textura do queijo cottage, para controlar a viscosidade e textura de doces e sobremesas, e como aglutinantes e estabilizadores na indústria de processamento de carne para a fabricação de salsichas e hambúrgueres de baixos teores de gordura. A indústria de alimentos responde por 70-80% do total da produção mundial de carragenanas, estimada em cerca de 45.000 toneladas métricas por ano, dos quais cerca de 45% é destinado para os

produtos lácteos e 30% para carne e seus derivados. O mercado total de carragenanas foi estimado nos Estados Unidos em 300 milhões de dólares por ano (CAMPO *et al.*, 2009; MCHUGH, 2003).

Carragenanas também são utilizadas nas indústrias farmacêutica e de cosméticos. As carragenanas têm sido utilizadas em preparações de creme dental, loções e xampus (CAMPO *et al.*, 2009). Provaram-se úteis também como excipientes de comprimidos, devido à boa compatibilidade, robustez e alta viscoelasticidade persistente do comprimido durante a compressão, indicando que carragenanas são excipientes apropriados para formulações de liberação sustentada (BHARDWAJ *et al.*, 2000).

O ágar é industrialmente importante devido a sua viscosidade que lhe confere propriedades espessantes, estabilizadoras e gelificantes (USOV, 1992). Géis de ágar com forças superiores a  $700 \text{ g cm}^{-2}$  em uma solução 1,5% são referidos como ágar de qualidade elevada e são bastante utilizados mundialmente. Géis de ágar com força inferior a estes valores geralmente são rejeitados para aplicações industriais e destinados para usos domésticos tradicionais da Ásia. No entanto, tem-se demonstrado que géis de menor força ( $30\text{-}200 \text{ g cm}^{-2}$ ) podem ser utilizados em novas aplicações industriais, incluindo alimentos líquidos, produtos de confeitaria de textura macia, substitutos de gordura e como crioprotetores que minimizam os danos no processo de congelamento e descongelamento (PEREIRA-PACHECO *et al.*, 2007).

O mercado em expansão dos ficocolóides enfrenta o desafio de obter grandes quantidades de algas sem prejuízos ao ambiente marinho. Nas últimas décadas, o cultivo de algas foi bastante enfatizado para a produção de seus valiosos produtos em larga escala (CARDOZO *et al.*, 2007).

## **1.2 Características estruturais e atividades biológicas dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas**

Os polissacarídeos sulfatados estão presentes nas algas vermelhas na forma de galactanas (PERCIVAL; McDOWELL, 1967), nas algas pardas na forma de fucoidanas (BERTEAU; MULLOY, 2003) e nas algas verdes, na forma de arabino-galactanas e ulvanas (PERCIVAL; McDOWELL, 1967).



## 1.2.1 Galactanas sulfatadas

### 1.2.1.1 Características estruturais de galactanas sulfatadas

As galactanas sulfatadas encontradas nas algas marinhas vermelhas são formadas por galactoses (ou derivados desse monossacarídeo) dispostas em uma cadeia linear composta por unidades dissacarídicas repetitivas de  $\beta$ -D-galactose ligada através dos carbonos C-1 e C-3 (unidade A) e  $\alpha$ -galactose através dos carbonos C-1 e C-4 (unidades B), sendo que algumas unidades de  $\alpha$ -galactose podem ser encontradas na forma de 3,6-anidrogalactose. As galactanas formam um arranjo alternado de unidades A e B, ou seja, (AB)<sub>n</sub> (PAINTER, 1983).

As carragenanas e as agaranas são as galactanas sulfatadas mais conhecidas e estudadas e diferem na configuração enantiométrica da  $\alpha$ -galactose da unidade B, sendo da série L para agaranas e D para carragenanas. A unidade A sempre pertence à série D (USOV, 1984). Estudos estruturais mais detalhados demonstram um terceiro grupo de galactanas, os híbridos D/L, em que as unidades B apresentam configuração D e L na mesma molécula (ESTEVEZ; CIANCIA; CEREZO, 2004).

As carragenanas são classificadas em 4 famílias, de acordo com a posição dos grupos sulfato nas unidades A e B e ciclização (presença de 3,6-anidrogalactose) da unidade B. A família Kappa ( $\kappa$ ), apresenta grupos sulfato no C-4 da unidade A e, de acordo com a posição dos grupos sulfatos na unidade B e da ciclização, divide-se carragenanas com estruturas ideais denominadas:  $\kappa$ -,  $\iota$ -,  $\mu$ - e  $\nu$ -carragenanas. A família Lambda ( $\lambda$ ) possui grupos sulfato no C-2 de ambas as unidades, e divide-se em  $\lambda$ -,  $\xi$ - e  $\pi$ -carragenanas (estruturas naturais) e  $\theta$ -carragenana (oriunda do tratamento alcalino da  $\lambda$ -carragenana). A família Beta ( $\beta$ ) compreende polissacarídeos em que a unidade A não é sulfatada. Incluindo  $\beta$ - e  $\alpha$ -carragenanas e seus precursores biológicos  $\gamma$ - e  $\delta$ -carragenanas. A família Omega ( $\omega$ ) compreende galactanas que apresentam grupos sulfato no C-6 da unidade A. Nesta família está a carragenana natural  $\omega$ - e seu precursor biológico  $\psi$ -carragenana (STORTZ; CEREZO, 2000).

A classificação das agaranas não é tão específica quanto a das carragenanas (STORTZ; CEREZO, 2000). As agaranas podem ter quantidades variáveis de diferentes grupos O-ligados, principalmente éter metílico, éster sulfato, acetal de ácido pirúvico ou resíduos  $\beta$ -D-xilopiranosil. A proporção e distribuição dos substituintes mencionados na

cadeia do esqueleto do galactano modificam as propriedades físico-químicas dos polissacarídeos (LAHAYE; ROCHAS, 1991; RODRÍGUEZ *et al.*, 2009). O maior grau de substituição por grupos sulfato, por exemplo, produz géis de menor força (VILLANUEVA *et al.*, 2010).

Atualmente, espécies de ordem Gelidiales (que inclui os gêneros *Gelidium*, *Pterocladia* e *Gelidiella*) e Gracilariales (*Gracilaria*, *Gracilariopsis* e *Hydropuntia*) são as mais exploradas comercialmente como matérias-primas para a produção de ágar (VILLANUEVA *et al.*, 2010). Embora o ágar de melhor qualidade seja extraído do gênero *Gelidium*, seu alto custo e o esgotamento gradual dos bancos naturais impulsionam a busca de novas fontes naturais para este polissacarídeo (RODRÍGUEZ *et al.*, 2009).

#### 1.2.1.2 Atividades biológicas de galactanas sulfatadas

Muitas atividades biológicas de galactanas sulfatadas têm sido descritas. Uma das propriedades mais estudadas é a capacidade de prolongar o tempo normal de coagulação sanguínea (MELO *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2010a). As atividade anticoagulante de galactanas sulfatadas dependem não somente da densidade de cargas, como também das posições dos radicais sulfato na molécula (FONSECA *et al.* 2008; PEREIRA *et al.*, 2005).

O duplo efeito de polissacarídeos sulfatados sobre a trombose venosa foi relatado para as galactanas sulfatadas de algas *Gelidium crinale* e *Botryocladia occidentalis*. A galactana de *G. crinale* apresentou discreto efeito pró-trombótico em doses baixas, mas em altas doses foi um potente inibidor da trombose venosa. Já a galactana de *B. occidentalis* mostrou-se antitrombótica em baixas doses, porém apresentou efeito pró-trombótico em altas doses (FONSECA *et al.* 2008).

A atividade antiviral é bastante relatada (HARDEN *et al.*, 2009; TALARICO *et al.*, 2005; YASUHARA-BELL; LU, 2010). Estudos buscam correlacionar estrutura e atividade antiviral (DUARTE *et al.*, 2004). A carragenana da alga *Meristiella gelidium* apresentou atividade anti-herpética (contra HSV-2), com elevado índice de seletividade (TISCHER *et al.*, 2006). As frações polissacarídicas isoladas da alga *Grateloupia indica* apresentaram potente atividade anti-herpética, inibindo a adsorção viral (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2007).

A galactana híbrida D/L da alga *Cryptonemia crenulata* inibiu as etapas de ligação e penetração do vírus da dengue tipo 2 (TALARICO *et al.* 2007). Talarico e Damonte (2007) demonstraram que  $\lambda$  e  $\iota$ -carragenanas são potentes inibidores da multiplicação do vírus da dengue tipo 2 e 3 em células de rim de macacos (Vero) e em células hepáticas humanas (HepG2).

Frações oligossacarídicas sulfatadas de baixo peso molecular da alga *Furcellaria lumbricalis* inibiram a  $\beta$ -secretase, que inicia a formação de peptídeo Ab  $\beta$ -amilóide, cujo excesso é fundamental para a fisiopatologia da doença de Alzheimer (YANG *et al.*, 2011).

As galactanas sulfatadas da alga *Champia feldmannii* apresentaram propriedades imunoestimulantes e antitumorais. Os polissacarídeos não apresentaram citotoxicidade *in vitro* significativa, porém apresentaram efeito antitumoral *in vivo*. Além de aumentarem significativamente o peso do baço, também foram capazes de reverter a diminuição no número de linfócitos causada pelo tumor Sarcoma 180 e de aumentar o número de anticorpos totais e específicos para ovoalbumina no soro de animais imunizados (LINS *et al.*, 2009).

Há poucos estudos sobre atividade antinociceptiva e antiinflamatória de polissacarídeos sulfatados de macroalgas marinhas. Viana *et al.* (2002) demonstraram a atividade antinociceptiva de polissacarídeos da alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum* no ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os polissacarídeos da alga marinha vermelha *Bryothamnion seaforthii* reduziram o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético, o tempo de lambadura da pata no teste da formalina, na primeira e segunda fase, e prolongaram o tempo de reação ao estímulo térmico no teste da placa quente (VIEIRA *et al.*, 2004).

Assreuy *et al.* (2008) reportaram o efeito antinociceptivo de uma fração polissacarídica sulfatada da alga *C. feldmannii* no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. A fração mostrou-se edematogênica quando aplicada por via s.c. na pata de ratos e induziu a migração de leucócitos quando administrada na cavidade peritoneal. Uma fração polissacarídica sulfatada da alga *Solieria filiformis* também apresentou efeito edematogênico significativo quando aplicado por via s.c. na pata de ratos (ASSREUY *et al.*, 2010).

## 1.2.2 Fucoïdanas sulfatadas

### 1.2.2.1 Características estruturais de fucoïdanas sulfatadas

Os polissacarídeos sulfatados de algas pardas são geralmente encontrados na forma de fucoïdanas, representando uma classe de polissacarídeos sulfatados ricos em L-fucose facilmente extraídos com água quente ou solução ácida (BERTEAU; MULLOY, 2003). Frequentemente estão presentes na composição dos fucoïdanas outros monossacarídeos como galactose, manose, xilose, ácido urônico e também grupos acetis (USOV; BILAN, 2009).

A primeira referência a fucoïdanas na literatura data de 1913, já os primeiros dados sobre suas estruturas químicas somente foram relatados em 1949. Ainda hoje, apesar do emprego de técnicas como a espectroscopia de ressonância magnética nuclear, a determinação da estrutura química de fucoïdanas é uma tarefa difícil devido ao alto grau de sulfatação, de ramificação dessas macromoléculas e principalmente devido à distribuição irregular de unidades estruturais individuais ao longo da cadeia (USOV; BILAN, 2009).

Segundo recomendações da IUPAC, são fucanas sulfatadas polissacarídeos baseados principalmente em L-fucose com menos de 10% de outros monossacarídeos. Este termo se aplica às fucanas sulfatadas obtidas de invertebrados marinhos, enquanto o termo fucoïdana refere-se a polissacarídeos mais complexos obtidos de algas (BERTEAU; MULLOY, 2003).

#### 1.2.2.2 Atividades biológicas de fucoïdanas sulfatadas

As fucoïdanas apresentam diversas atividades biológicas, dentre as quais as mais estudadas são as atividades anticoagulantes e antitrombóticas. A massa molecular e o conteúdo de sulfato, principalmente a estrutura exata e não somente a densidade de cargas, têm importante relação com as atividades (BERTEAU; MULLOY, 2003; BOISSON-VIDAL *et al.*, 2000).

A galactofucana sulfatada da alga parda *Spatoglossum schröderi* não apresentou atividade anticoagulante *in vitro*, porém apresentou atividade antitrombótica *in vivo*. A galactofucana estimulou a síntese de heparan sulfato pelas células endoteliais, sem estimular a proliferação destas células e sem indícios de citotoxicidade (ROCHA *et al.*, 2005). A heterofucana A da alga *S. schröderi* também se mostrou antitrombótica *in vivo*, sem apresentar efeito anticoagulante *in vitro* (BARROSO *et al.*, 2008; LEITE *et al.*, 1998). Recentemente, esta mesma fucana demonstrou não ser genotóxica ou mutagênica (ALMEIDA-LIMA *et al.*, 2010).

Azevedo *et al.* (2009) estudaram a influência dos grupamentos sulfatos e da massa molecular da fucoídana da alga parda *Fucus vesiculosus* na atividade anticoagulante, na agregação plaquetária e no efeito hemorrágico, utilizando polímeros nativos e dessulfatados e frações de diferentes massas moleculares. Foi demonstrado que a massa molecular e o grau de sulfatação são parâmetros importantes na atividade anticoagulante e na agregação plaquetária, porém não foram observadas diferenças quanto ao efeito hemorrágico.

As fucoídanas são promissores agentes antiinflamatórios. O tratamento com a fucoídana da alga *F. vesiculosus* inibiu a liberação de IL-1 e diminuiu a produção de TNF- $\alpha$  no fluido cérebro espinhal de coelhos infectados com *Streptococcus pneumoniae* (OSTERGARRD *et al.*, 2000). Frações de baixo peso molecular da fucoídana da alga *Ascophyllum nodosum* inibiram as primeiras etapas da via clássica de ativação do sistema complemento (TISSOT *et al.*, 2003).

A fucoídana da alga *Lobophora variegata* inibiu a migração de leucócitos induzida por tioglicolato e o edema de orelha causado pelo óleo de cróton em animais sensibilizados (MEDEIROS *et al.*, 2008). Em estudos posteriores, a fucoídana da alga *L. variegata* também inibiu o edema de pata em ratos induzido por diferentes estímulos: dextrano, carragenana, zimosan e fosfolipase A<sub>2</sub>. No ensaio de peritonite, a fucoídana inibiu a migração de neutrófilos induzida por zimosan e reduziu a concentração de nitrito do exsudato peritoneal (SIQUEIRA *et al.*, 2011)

A ação dos fucoídanas na oncogênese ocorre principalmente através de efeitos imunoestimulatórios que possibilitam a mobilização das defesas do hospedeiro (AHN *et al.*, 2008). As fucoídanas também estimulam a apoptose de células tumorais e a prevenção de metástases por alterar o comportamento adesivo de células. Outro mecanismo de atividade antitumoral é a supressão da formação de vasos sanguíneos, o que reduz a disponibilidade de nutrientes para os tecidos tumorais (USOV; BILAN, 2009).

Estudos relatam o potencial antiviral de fucoídanas. Uma fucoídana da alga *Cladosiphon okamuranus*, composta por ácido glucurônico e resíduos de fucose sulfatados, inibiu a infecção causada pelo vírus da dengue tipo 2. Demonstrou-se que a fucoídana interage diretamente com a glicoproteína do envelope (EGP) e que tanto o ácido glucurônico quanto os resíduos sulfatados de fucose são necessários para a inibição da infecção (HIDARI *et al.*, 2008).

As heterofucanas das algas *Dictyota mertensii*, *L. variegata*, a xylofucoglucuronana da alga *S. schröderi* e a fucana da alga *F. vesiculosus* apresentaram um

pronunciado efeito inibitório *in vitro* sobre a transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana (QUEIROZ *et al.*, 2008).

### 1.2.3 Ulvanas e arabino-galactanas

#### 1.2.3.1 Características estruturais de ulvanas e arabino-galactanas

Os polissacarídeos sulfatados de algas verdes são heteropolissacarídeos aniônicos bastante complexos. Os polissacarídeos das algas pertencentes à ordem Ulvales, denominados ulvanas, são compostos por diferentes seqüências químicas baseadas principalmente em dissacarídeos de raminose, ácido glucurônico e xilose (PERCIVAL; MCDOWELL, 1967; LAHAYE; ROBIC, 2007).

As ulvanas representam cerca de 8-29% do peso seco das algas verdes. Entre as propriedades funcionais, as ulvanas formam soluções aquosas viscosas capazes de formar géis termorreversíveis na presença de cátions polivalentes e borato (LAHAYE; ROBIC, 2007).

Os gêneros *Clodophora*, *Chaetomorpha*, *Caulerpa* e *Codium* apresentam polissacarídeos sulfatados constituídos por D-galactose, L-arabinose e D-xilose em diferentes proporções, denominados arabino-galactanas (PERCIVAL; McDOWELL, 1967).

#### 1.2.3.2 Atividades biológicas de ulvanas e arabino-galactanas

As ulvanas apresentam diversas propriedades biológicas valiosas para a agricultura, alimentos e aplicações farmacêuticas (ROBIC, SASSI, LAHAYE, 2008). Os heteropolissacarídeos sulfatados da alga *Monostroma nitidum* apresentaram citotoxicidade direta em células humanas cancerosas (linhagem AGS). Além disso, estimularam macrófagos (Raw264) induzindo considerável produção de óxido nítrico e prostaglandina E<sub>2</sub>, sugerindo que esses polissacarídeos possuem ação imunomodulatória (KARNJANAPRATUM, YOU, 2011).

Os polissacarídeos sulfatados da alga *Capsosiphon fulvescens* estimularam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$  e IL-6, de forma dose-dependente, além de

induzirem um aumento da expressão de iNOS e COX-2 em macrófagos RAW264.7, demonstrando assim ação imunoestimulante (NA *et al.*, 2010).

Os polissacarídeos da alga *Ulva rígida* induziram um aumento da expressão de quimiocinas e na produção de nitrito. Além disso, estimularam a secreção de prostaglandinas E<sub>2</sub> por macrófagos e induziram um aumento na expressão das enzimas ciclooxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico sintase 2 (LEIRO *et al.*, 2007).

Os polissacarídeos da alga *Ulva pertusa* apresentaram propriedades antihiperlipidêmicas, reduzindo os teores de colesterol plasmático total, lipoproteína de baixa densidade, triglicerídeos, além disso aumentaram acentuadamente os índices plasmáticos de lipoproteínas de alta densidade, em comparação ao grupo controle hiperlipidêmico (PENGZHAN *et al.*, 2003).

Os polissacarídeos sulfatados da alga *Caulerpa racemosa* inibiram seletivamente cepas de referência e cepas resistentes a aciclovir do vírus herpes simplex tipos 1 e 2 em células Vero e sem apresentarem efeitos citotóxicos (GHOSH *et al.*, 2004). Rodrigues *et al.* (2010b) mostraram que os polissacarídeos sulfatados das algas *C. racemosa* e *C. cupressoides* apresentaram baixo potencial anticoagulante.

Os polissacarídeos extraídos da alga *Bryopsis plumosa* apresentaram atividade antioxidante *in vitro* (SONG *et al.*, 2010). O polissacarídeo da alga *Codium fragile* exerce atividade antiviral contra o vírus herpes simplex tipo 2 *in vitro* e *in vivo* (OHTA *et al.*, 2009). O mesmo polissacarídeo estimulou a produção de óxido nítrico através da indução da expressão da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e dos RNA mensageiros de várias citocinas, como IL-1b, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  (LEE *et al.*, 2010).

## 1.2 Dor e Nociceção

A dor é definida, segundo a Associação Internacional de Estudos sobre Dor (IASP, 2011), como uma experiência emocional ou sensorial desagradável, associada ao dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termo de tal lesão. A dor é um fenômeno biológico complexo que envolve intricados componentes neurofisiológicos, comportamentais, psicossociais e afetivos (MCDOUGALL, 2011).

O termo nocicepção, oriundo do Latim *nocere*, prejudicar, é utilizado com melhor precisão em testes com animais, visto que é difícil elaborar testes que meçam o componente afetivo (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

A dor aguda serve como um sistema de alerta para afastar o indivíduo de um estímulo doloroso em particular. A dor crônica normalmente dura mais que a resposta de cura ou continua mesmo na ausência de qualquer dano tecidual observável e parece não servir a um propósito claro (MCCURDY; SCULLY, 2005; MCDOUGALL, 2011).

A dor aguda geralmente segue aos danos dos tecidos causados por infecções ou inflamações, como no caso da dor associada com a dismenorréia, a dor de cabeça comum ou enxaqueca, a dor de garganta ou de trauma leve, que são os tipos mais comuns da dor aguda, atendidos em clínica geral, e respondem pela maioria dos analgésicos prescritos (MOORE, 2009).

O tratamento inadequado da dor aguda pode levar à dor persistente e crônica, indicando a importância de seu gerenciamento rápido e eficaz (MOORE, 2009). O tratamento da dor crônica é um grave problema devido aos efeitos adversos dos medicamentos disponíveis, que variam de acordo com a classe de agente usado, tais como dependência, tolerância, efeitos gastrintestinais e abuso (MCCURDY; SCULLY, 2005).

### 1.2.1 Fisiopatologia da dor

A maioria dos tipos de dor começa na periferia com um estímulo nocivo não especializado, ativando as terminações nervosas livres associadas com neurônios aferentes primários de pequeno diâmetro. Este estímulo físico é posteriormente transduzido em um sinal eletroquímico, que é transmitido da periferia para o sistema nervoso central (MCDOUGALL, 2011).

O sistema corporal de percepção de dor envolve quatro estruturas anatômicas:

1. Nociceptores, que são estruturas especializadas do sistema nervoso periférico que detectam os estímulos nociceptivos.

2. Tratos nociceptivos ascendentes, como os tratos espinotalâmico e espinohipotalâmico, que transmitem os estímulos do corno dorsal da medula espinhal até os centros superiores localizados no sistema nervoso central.



3. Centros superiores no sistema nervoso central, que são estruturas envolvidas na discriminação da dor, incluindo o seu componente afetivo da memória e do controle motor relativo ao mecanismo de defesa representado pelo ato de fuga do estímulo doloroso.

4. Sistemas descendentes que permitem aos centros superiores do sistema nervoso central modificar a informação nociceptiva em diversos níveis (CAVALCANTE, 2005).

Os nociceptores têm a habilidade de detectar uma grande variedade de estímulos, incluindo os de natureza física e química, e de convertê-los em sinais eletroquímicos (JULIUS, BASBAUM, 2001). Outra característica dos nociceptores é apresentar um limiar alto de estímulo, sendo necessário um estímulo intenso para originar um potencial de ação (CAVALCANTE, 2005). Ao entrar no corno dorsal da medula espinhal, estes impulsos são transmitidos através de neurônios de segunda ordem ao longo de vias ascendentes para o cérebro (FIGURA 1). Ao veicular esses impulsos para áreas específicas do cérebro, como o córtex somatosensorial e a amígdala, os sinais eletroquímicos são moldados em uma experiência psicofísica que incorpora reflexos motores de proteção e respostas emocionais. Detalhes importantes de todo este processo ainda não são totalmente compreendidos (MCDOUGALL, 2011).

Os neurônios sensoriais são geralmente classificados em fibras A $\beta$ , A $\delta$  ou C com base em grau de mielinização e velocidade de seus potenciais de ação ao longo das fibras aferentes (LUMPKIN, CATERINA, 2007). As fibras A $\beta$ , mielinizadas e de grande diâmetro, detectam, em geral, estímulos inócuos (propriocepção e toque suave) aplicados a pele, músculos e articulações. Estas fibras não contribuem para o aumento da dor, podendo sua estimulação diminuir a percepção dor (JULIUS, BASBAUM, 2001).

As fibras aferentes primárias nociceptivas são representadas pelas fibras A $\delta$  e C, que, quando estimuladas, transmitem o estímulo para o corno dorsal da medula espinhal. As fibras A $\delta$ , pouco mielinizadas, conduzem o estímulo a uma velocidade de 2 a 30 m/s e respondem a estímulos nocivos mecânicos e térmicos. As fibras C, amielínicas, conduzem o estímulo em velocidades menores que 2 m/s e respondem a estímulos nocivos térmicos, mecânicos e químicos, sendo chamados de polimodais (CAVALCANTE, 2005).

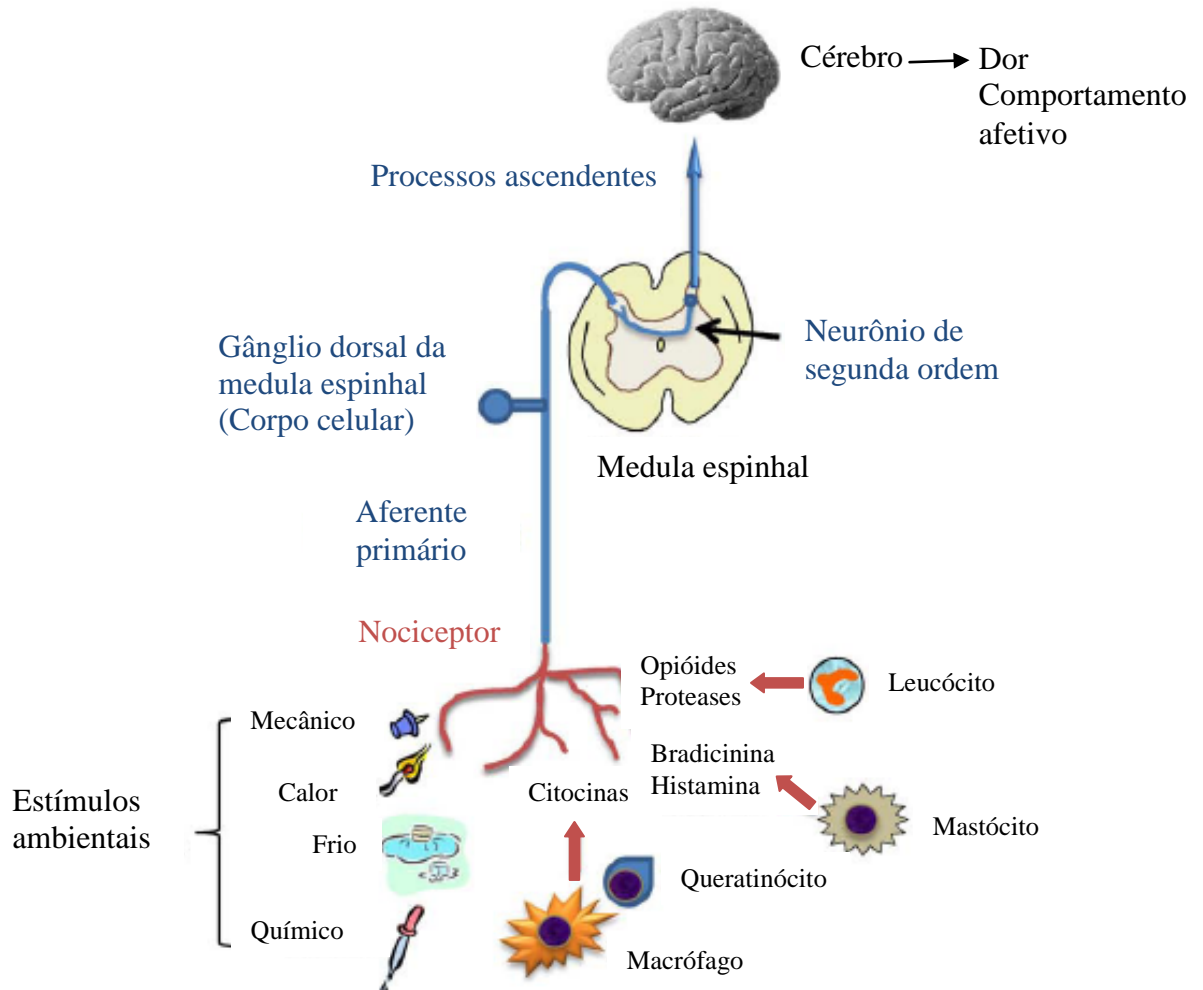


Figura 1- O caminho da dor da periferia até o cérebro. Estímulos nocivos podem ativar os nociceptores causando a sensação de dor. Várias células residentes nas proximidades das terminações nervosas podem liberar mediadores que podem tanto aumentar quanto reduzir o limiar de ativação dos nervos. Adaptado de McDougall (2011).

Há outra classe de neurônios aferentes primários amielinizados que normalmente não são sensíveis a estímulos mecânicos e térmicos intensos; no entanto, em situações de trauma e/ou inflamação, tornam-se responsivos, despolarizando-se vigorosamente, mesmo durante movimentos normais. Esses nociceptores foram identificados em diversas espécies animais e são denominados receptores silenciosos ou silentes (CAVALCANTE, 2005).

O conhecimento dos mecanismos do cérebro ainda é relativamente limitado. O corno dorsal da medula espinhal é dotado de diversos neurotransmissores e receptores, incluindo: substância P, somatostatina, neuropeptídeo Y, aminoácidos excitatórios e inibitórios, óxido nítrico, opióides endógenos, adenosina e monoaminas, entre outros. Desta forma, a transmissão da dor para o cérebro está sob controle fisiológico diversificado, o que contribui para um difícil desafio na descoberta dos modos de inibir sensações dolorosas sem causar efeitos colaterais (MCCURDY; SCULLY, 2005).

Mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas, sensibilizam os receptores de limiar alto, o que resulta no fenômeno de sensibilização periférica. Após a sensibilização, um estímulo mecânico de baixa intensidade, que normalmente não causaria dor, agora é percebido como doloroso. As prostaglandinas causam hiperalgesia por sensibilizarem os nociceptores periféricos aos efeitos de outros mediadores químicos da dor e inflamação, tais como a somatostatina, bradicinina e histamina (CAVALCANTE, 2005).

### **1.3 Inflamação**

O processo inflamatório é constituído por uma série complexa de eventos celulares e bioquímicos, submetidos a um forte controle, que evoluíram para eliminar ou conter agentes infecciosos e reparar danos teciduais. Uma resposta ineficiente ou descontrolada contribui para disfunção celular, dano tecidual e reparo inadequado, encontrados em muitas doenças inflamatórias (HALLETT *et al.*, 2008).

O início da resposta inflamatória deve ser bem regulado, para evitar danos colaterais consideráveis. Sinais moleculares de alarme gerados em resposta ao dano tecidual e/ou invasão microbiana são reconhecidos por células apresentadoras de antígenos, tais como macrófagos residentes ou células dendríticas. Devido à sua localização estratégica, próximo

ao local da lesão, as células residentes do tecido são os indutores primários da reação inflamatória (SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

Em contraste com células em apoptose, a morte celular por necrose, resultante da infecção ou lesão, leva à ruptura das membranas celulares. Conseqüentemente, a liberação dos componentes citoplasmáticos e nucleares faz com que padrões moleculares associados ao dano sejam reconhecidos por receptores de reconhecimento expressos por leucócitos ou por células apresentadoras de antígenos, promovendo a produção de citocinas pró-inflamatórias (SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

Uma resposta inflamatória aguda bem sucedida resulta na eliminação dos agentes infecciosos, sendo seguida por uma fase de resolução e reparação, mediada principalmente por macrófagos teciduais residentes e recrutados (HALLETT *et al.*, 2008; SERHAN, 2007). A mudança de mediadores lipídicos de prostaglandinas pró-inflamatórias para lipoxinas, que são antiinflamatórias, é crucial para a transição da inflamação para a fase de resolução. Lipoxinas inibem o recrutamento de neutrófilos e promovem o recrutamento de monócitos, que removem as células mortas e iniciam a remodelagem do tecido. Resolvinas e protectinas, que constituem uma outra classe de mediadores lipídicos, bem como fatores de crescimento produzidos por macrófagos, também têm um papel fundamental na resolução da inflamação (SERHAN, 2007).

Quando a resposta inflamatória aguda não elimina o patógeno, o processo inflamatório persiste e adquire novas características, ou seja, o infiltrado neutrofílico é substituído por macrófagos, e, no caso de infecções também há a presença de linfócitos T. Se o efeito combinado destas células ainda for insuficiente, desenvolve-se um processo inflamatório crônico, envolvendo a formação de granulomas. A inflamação crônica pode resultar também de lesões teciduais ocasionadas por outros agentes além de patógenos persistentes, tais como respostas auto-ímmunes ou corpos estranhos. Os mecanismos da inflamação induzida por infecção são melhor entendidos do que os de outros processos inflamatórios (MEDZHITOV, 2008).

### 1.3.1 Eventos vasculares

As células endoteliais regulam uma variedade de funções como tônus vascular, coagulação sanguínea, inflamação e angiogênese. A permeabilidade paracelular é regulada

por um complexo equilíbrio de forças contráteis intracelulares, de forças celulares adesivas entre células e de forças entre as células e matriz extracelular (WANG; DUDEK, 2009).

O reconhecimento inicial da infecção leva à produção de uma variedade de mediadores inflamatórios. O efeito principal e mais imediato destes mediadores é eliciar um exsudado inflamatório local: proteínas plasmáticas e leucócitos (principalmente neutrófilos), normalmente restritos aos vasos sanguíneos, acessam, através de vênulas pós-capilares, os tecidos extravasculares nos locais da infecção ou lesão (MEDZHITOV, 2008). Mediadores inflamatórios como a trombina, bradicinina, histamina, TNF- $\alpha$  e fator de crescimento vascular endotelial aumentam a permeabilidade vascular, abrindo espaços paracelulares e rompendo as junções endoteliais e os complexos de adesão (WANG; DUDEK, 2009).

O dano ao endotélio vascular permite que as proteínas do plasma e das plaquetas acessem os espaços extravasculares. O regulador chave da inflamação derivado do plasma, o fator de Hageman, conhecido como fator XII, é ativado pelo contato com o colágeno e outros componentes da matriz extracelular. O fator Hageman ativado atua como um sensor de dano vascular, iniciando quatro cascatas proteolíticas que geram mediadores inflamatórios: cascata da calicreína-cinina, cascata de coagulação, cascata fibrinolítica e cascata do complemento. As plaquetas também são ativadas quando em contato com o colágeno e também produzem vários mediadores inflamatórios, incluindo tromboxanos e serotonina (MEDZHITOV, 2008).

### 1.3.2 Principais células envolvidas na inflamação

A ação conjunta dos fagócitos profissionais (neutrófilos, monócitos e macrófagos) é crucial para a efetiva eliminação de agentes infecciosos e detritos celulares. Os neutrófilos são células de curta duração, recrutadas no início da resposta inflamatória, que utilizam uma grande variedade de mecanismos inflamatórios, alguns dos quais são potencialmente prejudiciais ao hospedeiro, e assim a ativação de neutrófilos tem de ser rigorosamente controlada para evitar dano excessivo aos tecidos (SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010).

Quando chegam ao local do tecido atingido, os neutrófilos tornam-se ativados, seja por contato direto com patógenos ou por meio das ações de citocinas secretadas por células residentes. Os neutrófilos ativados tentam destruir agentes invasores liberando o conteúdo tóxico de seus grânulos, que incluem espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio, proteinase 3, catepsina G e elastase. Estes potentes efetores não discriminam entre os alvos

microbianos e o hospedeiro, sendo os danos aos tecidos do hospedeiro inevitáveis (MEDZHITOV, 2008).

A fagocitose está associada à liberação do conteúdo dos grânulos (azurófilos e específicos) citoplasmáticos no vacúolo. Os azurófilos contêm proteínas e peptídeos específicos para destruição microbiana, enquanto, os específicos são responsáveis pela reposição dos componentes da membrana, além de limitar reações de radicais livres (SEGAL, 2005).

Os grânulos azurófilos contêm a enzima mieloperoxidase (MPO), uma proteína di-heme composta por dois heterodímeros idênticos. Os grupos heme, ligados covalentemente, possuem estrutura única e exibem propriedades espectrais incomuns responsáveis pela sua coloração verde (FIEDLER, DAVEY, FENNA, 2000). A MPO gera espécies oxidativas em neutrófilos, usando peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e haletos (X<sup>-</sup>) para produzir ácidos hipoclorosos (HOX) (JANTSCHKO *et al.*, 2005).

O papel das ROS e da halogenação mediada pela MPO como principal sistema dos neutrófilos de eliminação de micróbio tem sido reavaliado. Questiona-se se os patógenos são predominantemente eliminados por meio de mecanismos dependentes de oxigênio através de halogenação catalisada pela MPO ou através de mecanismos independente de oxigênio, envolvendo proteínas bactericidas, como a lisozima e a lactoferrina e proteases, tais como elastase. Tem-se sugerido que a MPO poderia atuar protegendo as enzimas digestivas da desnaturação oxidativa (JANTSCHKO *et al.*, 2005; SEGAL, 2005).

Os monócitos desenvolvem-se a partir de células-tronco pluripotentes da medula óssea sob a influência de fatores de crescimento específicos. Os monócitos maduros são liberados da medula óssea e penetram na corrente sanguínea como células quiescentes. Quando recrutados para locais de inflamação, diferenciam-se em macrófagos residentes. Eles também são os precursores das células dendríticas (KATSIARI *et al.*, 2010; SERBINA *et al.*, 2008).

Uma vez localizados nos tecidos, os macrófagos adquirem funções especializadas dependendo das necessidades locais. Assim, no fígado, macrófagos residentes, também conhecidos como células de Kupffer, desenvolvem uma alta capacidade fagocítica destinada à eliminação de endotoxina e de outros materiais estranhos à circulação portal. Nos pulmões, os macrófagos alveolares adquirem a capacidade de liberar grandes quantidades de oxidantes citotóxicos altamente reativos para a destruição de patógenos inalados e xenobióticos. Os macrófagos são efetores celulares essenciais da resposta imune inata, livrando o organismo de vírus, bactérias, células apoptóticas e algumas células tumorais (LASKIN *et al.*, 2011).

Os granulócitos (nome coletivo dado a neutrófilos, eosinófilos e basófilos) têm um papel proeminente na defesa imunológica. Os eosinófilos constituem 5% dos granulócitos circulantes, conferindo resistência à invasão parasitária, além de seu envolvimento na resposta alérgica (HALLETT *et al.*, 2008).

Os basófilos representam menos de 1% dos leucócitos. Além dos grânulos basófilos, compartilham algumas características com os mastócitos residentes, incluindo a expressão de algumas moléculas de superfície e a liberação de mediadores químicos relacionados com as alergias como a histamina (KARASUYAMA *et al.*, 2011).

Os mastócitos localizam-se principalmente na interface do hospedeiro com o ambiente, como a pele e mucosas, desempenhando um importante papel no reconhecimento de patógenos ou de outros sinais de infecção. Os mastócitos são conhecidos por sua associação com condições patológicas, como alergia, asma e anafilaxia (ABRAHAM, ST. JOHN, 2010).

### 1.3.3 Recrutamento de leucócitos para os locais de inflamação

O recrutamento de neutrófilos, linfócitos e o tráfico de recirculação de monócitos exigem adesão e a transmigração através das paredes dos vasos sanguíneos. Com a descoberta das integrinas, selectinas e seus respectivos ligantes, e quimiocinas e seus receptores, a cascata de adesão leucocitária emergiu como um conceito para explicar o recrutamento de subtipos de leucócitos para locais específicos (LEY *et al.*, 2007). Os leucócitos são recrutados para o local da inflamação por uma série de etapas adesivas que permite sua fixação à parede do vaso endotelial, sua locomoção ao longo desta parede, e sua travessia e migração através do tecido intersticial (MULLER, 2011).

O rolamento é mediado pela L-selectina, P-selectina e E-selectina. A L-selectina é expressa pela maioria dos leucócitos, enquanto E-selectina e P-selectina são expressas pelas células endoteliais inflamadas, sendo a P-selectina também expressa por plaquetas. As interações das selectinas com seus ligantes permitem a aderência dos leucócitos ao endotélio vascular. As integrinas também participam do rolamento e adesão de leucócitos (LEY *et al.*, 2007).

A transmigração, também denominada de migração transendotelial ou diapedese, através das paredes das vênulas pós-capilares é o último passo no processo da migração de

leucócitos para os tecidos inflamados. Antes de atravessar as paredes das vênulas, os neutrófilos e monócitos locomovem-se dentro dos vasos sanguíneos de uma forma dependente de receptores em busca de um local para transmigração (LEY *et al.*, 2007). A transmigração é sem dúvida um ponto sem retorno na resposta inflamatória. Todas as etapas anteriores, rolamento de leucócitos, ativação, adesão e locomoção, são reversíveis e a maior parte dos leucócitos que aderem a vênulas pós-capilares retorna à circulação (MULLER, 2011).

Até recentemente, acreditava-se que a migração celular de leucócitos transendotelial ocorria somente via paracelular, através das junções endoteliais, mas a migração dos leucócitos via transcelular, através da célula endotelial, pode ocorrer no sistema nervoso central, em vários cenários inflamatórios e em modelos *in vitro* (LEY *et al.*, 2007; MULLER, 2011). Algumas moléculas importantes para a migração paracelular também atuam na migração transcelular (MULLER, 2011).

#### 1.3.4 Mediadores inflamatórios

Os indutores da inflamação desencadeiam a produção de inúmeros mediadores inflamatórios, derivados de proteínas do plasma ou secretados por células, que alteram a funcionalidade de muitos tecidos e órgãos. Os mediadores celulares podem ser produzidos por leucócitos especializados, especialmente macrófagos e mastócitos, ou por células presentes no tecido local. Alguns mediadores, como a histamina e serotonina, são pré-formados e armazenados nos grânulos dos mastócitos, basófilos e plaquetas, enquanto outros circulam como precursores inativos no plasma ou são produzidos diretamente em resposta à estimulação adequada (MEDZHITOV, 2008).

As aminas vasoativas, histamina e serotonina, são liberadas na degranulação de mastócitos e plaquetas e apresentam efeitos complexos sobre a vasculatura, provocando aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação ou vasoconstrição, dependendo do contexto. As consequências imediatas de sua liberação podem resultar em colapso vascular e respiratório durante o choque anafilático (MEDZHITOV, 2008).

Os peptídeos vasoativos podem ser armazenados em suas formas ativas em vesículas secretoras, como a substância P, ou gerados por processamento proteolítico de precursores inativos no fluido extracelular, como as cininas, os fibrinopeptídeos A e B e os



produtos de degradação da fibrina. Outros peptídeos vasoativos são gerados através de proteólise pela trombina, pelo fator Hageman ou pela plasmina, ocasionando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, diretamente ou por indução da liberação de histamina dos mastócitos (MEDZHITOV, 2008).

A ativação da cascata do complemento envolve a ativação seqüencial e clivagem proteolítica de uma série de proteínas séricas, através das vias da lectina, clássica e alternativa. Os fragmentos do complemento C5a, e em menor extensão C3a e C4a, promovem o recrutamento de granulócitos e monócitos e induzem a degranulação dos mastócitos, afetando assim a vascularização (HAJISHENGALLIS, 2010).

Além de suas funções estruturais e de reserva, alguns lipídios são reconhecidos como moléculas de sinalização que regulam uma grande variedade de respostas celulares, incluindo as reações inflamatórias. Os lipídios bioativos são gerados por hidrólise de lipídios de membrana, principalmente por fosfolipases. Dentre esses, o ácido araquidônico é metabolizado formando eicosanóides por ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), que geram prostaglandinas e tromboxanos, ou por lipoxigenases, que produzem leucotrienos e lipoxinas (HUWILER; PFEILSCHIFTER, 2009).

As citocinas são proteínas ou glicoproteínas de baixo peso molecular (variando de 8 a 30 kDa) envolvidas na regulação das respostas imunes inatas e adaptativas e na modulação da resposta inflamatória (CHABALGOITY *et al.*, 2007). As citocinas inflamatórias, por exemplo, TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, são produzidas por vários tipos celulares, principalmente por macrófagos e mastócitos, e possuem diversos papéis na resposta inflamatória, incluindo a ativação do endotélio e de leucócitos e a indução da resposta de fase aguda (HOPKINS, 2003).

As quimiocinas são produzidas por muitos tipos celulares em resposta aos indutores da inflamação e controlam o extravasamento de leucócitos e quimiotaxia para os tecidos afetados. Uma família de receptores acoplados à proteína G, receptores de quimiocinas, detecta gradientes de quimiocinas e guia movimentos celulares *in vivo*. A maioria das quimiocinas possui quatro resíduos de cisteína característicos e, dependendo do motivo apresentado pelos dois primeiros resíduos cisteínicos, são classificadas em CXC ou alfa, CC ou beta, C ou gama, CX3C ou delta (JIN; XU; HERELD, 2008; ROSSI; ZLOTNIK, 2000).

As enzimas proteolíticas, como a elastina, catepsinas e metaloproteinases de matriz, exercem diversos papéis na inflamação, em parte através da degradação da matriz extracelular e de proteínas da membrana basal. Estas proteases apresentam um papel

importante em muitos processos, incluindo a defesa do hospedeiro, remodelação do tecido e migração de leucócitos (MEDZHITOV, 2008).

#### **1.4 Fármacos analgésicos e antiinflamatórios**

Substâncias derivadas de produtos naturais têm sido utilizadas desde o início dos tempos para vários fins, incluindo o tratamento da dor. Até o século XIX, os componentes individuais de diferentes remédios de produtos naturais ainda não haviam sido identificados e purificados. Ainda hoje, produtos naturais são investigados em busca de novas estruturas químicas que possam interagir com alvos terapêuticos (MCCURDY; SCULLY, 2005).

Várias abordagens terapêuticas visam o tratamento da dor aguda. Analgésicos, como antiinflamatórios não esteroidais (AINE) e opióides, atuam por diferentes mecanismos no sistema nervoso central e periférico (MOORE, 2009).

A aspirina (ou ácido acetilsalicílico) é derivada do ácido salicílico, extraído da casca da árvore de salgueiro. Aspirina foi o primeiro antiinflamatório não esteroidal (AINE) estudado e inibe a via do ácido araquidônico que, eventualmente, leva à síntese de eicosanóides, potentes mediadores da dor. O uso da aspirina, que inibe especificamente as enzimas ciclooxigenase (COX), levou à descoberta de outros AINEs sintéticos (MCCURDY; SCULLY, 2005).

Os AINEs são inibidores das enzimas COX-1 e -2, que catalisam a formação de prostaglandinas que mediam o processo inflamatório. A formação de prostaglandinas na inflamação é principalmente mediada pela COX-2, que é induzida, enquanto acredita-se que a COX-1 não seja induzível, e está associada à resistência gástrica à agressão, à síntese de tromboxano pelas plaquetas, e também à transmissão dos estímulos dolorosos, entre muitas outras ações. Os AINEs são comumente usados para o controle da dor aguda e crônica, e são eficazes em pacientes com dor moderada a grave. São analgésicos eficazes sem diferença clinicamente importante em termos de eficácia entre fármacos específicos, sendo rapidamente absorvidos e metabolizados pelo fígado (GOTZSCHE, 2003; MOORE, 2009).

Inicialmente acreditou-se que compostos seletivos visando a enzima COX-2 possuíam perfis mais seguro do que outros AINEs que inibem a enzima COX-1. No entanto, foram vistos com desconfiança após a retirada do mercado do medicamento rofecoxib devido ao risco aumentado de doenças cardiovasculares (MCCURDY; SCULLY, 2005).

Opióide é um nome comum para todos os compostos que têm o mesmo mecanismo de ação dos componentes do ópio, obtido da semente de papoula, *Papaver somniferum* (MCCURDY; SCULLY, 2005). A primeira descrição do cultivo de papoulas data de cerca de 3400 a.C. pelos sumérios na Mesopotâmia, que se referiam à planta como “planta da alegria”. O ópio contém vários alcalóides, dos quais apenas alguns (morfina, noscapina, codeína e papaverina) têm aplicação clínica (ANDERSEN; CHRISTRUP; SJØGREN, 2003; MCDOUGALL, 2011).

Todos os opióides interagem com o sistema endógeno de receptores opióides que atualmente inclui quatro subtipos de receptores, designados como mu, delta, kappa, e ORL-1 (receptor semelhante a receptor de opióide). Esses receptores são amplamente distribuídos no sistema de mamíferos e têm sido encontrados em todos os vertebrados. Estão presentes em densidade relativamente alta no cérebro e medula espinhal, sendo também encontrados no sistema gastrointestinal e no sistema imunológico. Cada subtipo parece desempenhar um papel ligeiramente diferente (MCCURDY; SCULLY, 2005).

O opióide mais conhecido é a morfina, que foi isolada pela primeira vez pelo farmacologista Friedrich Sertüner em 1806. Nomeada em homenagem a Morfeu, o deus grego dos sonhos, a morfina é um dos analgésicos mais utilizados e ainda é um tratamento de primeira linha para pacientes que sofrem de dor crônica (ANDERSEN; CHRISTRUP; SJØGREN, 2003; MCDOUGALL, 2011). Seus efeitos colaterais incluem depressão respiratória, miose, euforia, sedação, redução da motilidade gastrointestinal, náuseas e vômitos (ANDERSEN; CHRISTRUP; SJØGREN, 2003).

Os glicocorticóides, freqüentemente utilizados para o controle de doenças inflamatórias e autoimunes, são uma classe de hormônios esteróides dotados de potentes atividades antiinflamatórias e imunossupressoras exercidas através da ligação aos receptores de glicocorticóides, que controlam a expressão gênica e as cascatas de sinalização. Os glicocorticóides modulam a sobrevivência, a diferenciação, a migração e as funções efetoras de leucócitos e vários outros tipos de células, causando impacto nas imunidades inata e adaptativa (TISCHNER; REICHARDT, 2007).

Desde a disponibilidade da cortisona no final dos anos 1950, vários glicocorticóides sintéticos têm sido desenvolvidos, tais como a dexametasona, a prednisona e a betametasona. Os glicocorticóides superam muitos outros fármacos antiinflamatórios, em termos de variedade de aplicações e em número de doenças tratadas, que incluem artrite reumatóide, asma, polimialgia reumática, câncer e transplante de órgãos e tecido (LÖWENBERG *et al.*, 2008; DE BOSSCHER; BECK; HAEGEMAN, 2010).

O uso de glicocorticóides é limitado devido à ocorrência de efeitos colaterais que incluem distúrbios do humor, dor gastrointestinal e dor de cabeça. Sua administração crônica pode levar à osteoporose, diabetes, adiposidade central, dislipidemia, perda de massa muscular esquelética, osteoporose, retardo de crescimento em crianças e aumento na susceptibilidade a doenças infecciosas (DE BOSSCHER; BECK; HAEGEMAN, 2010; TISCHNER; REICHARDT, 2007).

Os grupos de fármacos atualmente disponíveis para o tratamento da dor e da inflamação relacionam-se geralmente à ocorrência de efeitos colaterais, o que impulsiona a busca por novos agentes analgésicos e antiinflamatórios, visando o desenvolvimento de opções terapêuticas eficazes e seguras.

## 2- OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Avaliar as atividades antinociceptiva e antiinflamatória de uma fração polissacarídica sulfatada da em modelos clássicos de nocicepção e inflamação e a toxicidade subcrônica dos polissacarídeos sulfatados totais da alga marinha vermelha *Acanthophora muscoides*.

### 2.2. Específicos

Obter os polissacarídeos sulfatados totais da alga marinha vermelha *Acanthophora muscoides* e fracioná-los através de cromatografia de troca iônica;

Investigar o potencial antinociceptivo da fração polissacarídica sulfatada através dos testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético, da placa quente e da formalina;

Avaliar a atividade antiinflamatória da fração polissacarídica sulfatada através do ensaio de migração celular induzida por carraenana e dos ensaios de edema de pata em ratos induzidos por carragenana e dextrano;

Analisar a toxicidade subcrônica dos polissacarídeos sulfatados totais.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Alga marinha

A alga marinha *Acanthophora muscoides* (Linnaeus) Bory de Saint-Vincent foi coletada em maré baixa (-0,2 a 0,3 m) na praia do Pacheco município de Caucaia-Ce. Após a coleta, foi acondicionada em sacos plásticos e transportada ao laboratório em recipiente isotérmico, onde as epífitas foram removidas e a alga foi lavada com água corrente e destilada e estocada a -20 °C, para posterior utilização (Figura 2). Uma exsicata da espécie foi depositada sob o número 46093 no Herbário Prisco Bezerra (EAC) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.



Figura 2 - Espécime da alga marinha *Acanthophora muscoides* (Linnaeus) Bory de Saint-Vincent.

### 3.1.2 Animais

Os ratos *Wistar* (machos) e os camundongos *Swiss* (machos e fêmeas) foram obtidos junto ao Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da referida instituição.

A autorização para o uso dos animais nos experimentos foi obtida junto a Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (CEPA – UFC) como parte do projeto “Compostos bioativos de algas marinhas: bases moleculares, implicações terapêuticas e industriais” aprovado sob o processo de número 125/07.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Extração dos polissacarídeos sulfatados totais

As algas frescas foram maceradas em nitrogênio líquido e colocadas em contato com tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0, contendo cisteína 5 mM e EDTA 5 mM e 510 mg de papaína bruta, na proporção de 5 g de alga para 250 mL de tampão. A mistura foi incubada a 60 °C em banho maria por 6 horas e em seguida foi filtrada em membrana de nylon. O resíduo obtido foi lavado com água destilada, novamente filtrado e o filtrado obtido foi reunido ao material anteriormente obtido. Os filtrados reunidos foram então centrifugados (6.000  $\times$  g ; 20 min.; 5 °C). Os polissacarídeos sulfatados presentes no sobrenadante foram precipitados através da adição de 16 mL de uma solução a 10% de cloreto de cetilpiridínio (CCP), mantendo-se a mistura por 18 horas à temperatura ambiente. A solução foi então centrifugada (6.000  $\times$  g; 20 min.; 5 °C) e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 610 mL de uma solução a 0,05% de CCP, centrifugado, e depois dissolvido em 172 mL de uma solução de NaCl 2 M e etanol absoluto (100:15, v/v). Os polissacarídeos sulfatados foram novamente precipitados com 305 mL de etanol absoluto por 24 horas a 4 °C. Em seguida, o material foi novamente centrifugado e submetido a duas lavagens com 305 mL de etanol a 80% e uma vez com o mesmo volume de etanol absoluto (Figura 3). O material obtido foi dialisado, liofilizado e denominado de polissacarídeos sulfatados totais (Am-PST) (FARIAS *et al.*, 2000).

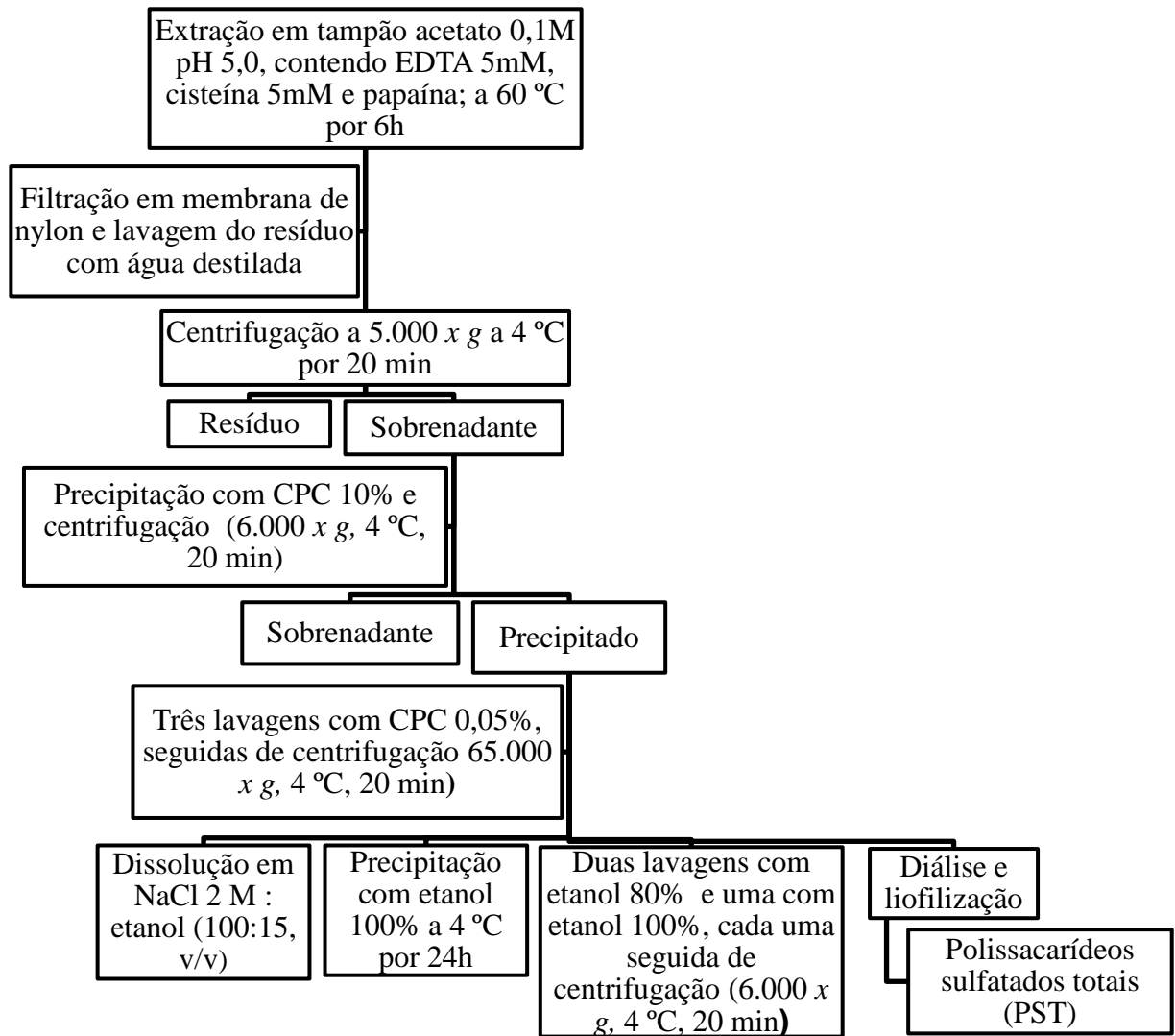


Figura 3- Esquema de extração dos polissacarídeos sulfatados totais.



### 3.2.2 Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados totais

Os Am-PST foram dissolvidos em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e a solução obtida (2 mg/mL) foi aplicada em cromatografia de troca iônica em uma coluna de DEAE-celulose previamente equilibrada com o mesmo tampão. Após lavagem da coluna com o tampão de equilíbrio para a eluição dos polissacarídeos não adsorvidos, os polissacarídeos sulfatados adsorvidos no gel foram eluídos com o tampão de equilíbrio contendo NaCl em diferentes concentrações. A eluição das frações polissacarídicas sulfatadas foi monitorada através da propriedade metacromática usando o azul de 1,9-dimetilmetileno (ADM) e as leituras realizadas em espectrofotômetro (Armersham Biosciences Ultrospec 1100 pro) a 525 nm (FARNDALE; BUTTLE; BARRETT, 1986). Os picos majoritários, com padrões de sulfatação distintos, foram reunidos, dialisados, liofilizados e armazenados para uso posterior.

### 3.2.3 Atividade antinociceptiva

Os ensaios de nocicepção foram realizados utilizando camundongos *Swiss* machos (20-25 g; n=6). Os animais receberam os seguintes tratamentos 30 min antes do estímulo nociceptivo: AmII (1, 3 ou 9 mg/kg; i.v.), salina estéril (NaCl 0,15 M; i.v.) como controle negativo, indometacina (5 mg/kg; s.c), um antiinflamatório não-esteroidal, e morfina (5 mg/kg; s.c.), um agonista opióide, como controles positivos.

#### 3.2.3.1. Testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético

O teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético é um modelo clássico de nocicepção periférica, em que após a injeção intraperitoneal do agente nociceptivo, observam-se respostas que consistem em uma seqüência de contorções no abdômen acompanhadas por extensão dos membros inferiores. As contorções abdominais foram induzidas por ácido acético 0,8% (i.p.), segundo o método descrito por Koster,

Anderson, De Beer (1959). Após administração do ácido acético, o número de contorções foi registrado durante 30 minutos.

#### 3.2.3.2. Teste da formalina

O teste da formalina caracteriza-se por apresentar resposta bifásica distinta, sendo a primeira fase considerada neurogênica e a segunda, inflamatória em resposta a um estímulo químico (HUNSKAAR; HOLE, 1987). Após a injeção intraplantar de formalina (1% v/v; 20 µl/ pata) na pata traseira direita do animal, foi registrado o tempo gasto pelo animal lambendo a pata durante dois períodos: de 0-5 min (fase neurogênica) e de 20-25 min (fase inflamatória).

#### 3.2.3.3. Teste da placa quente

A atividade analgésica central foi avaliada pelo teste da placa quente, segundo o método de Eddy e Leimbach (1953), que consiste em registrar o tempo (s) que os animais, quando em contato com uma placa de metal aquecida ( $51\pm 1$  °C), levam para manifestar uma resposta, que corresponde ao ato de retirar ou lamber a pata traseira e/ou saltar. Este teste é específico para verificar a nocicepção central. Os animais primeiramente foram familiarizados com a placa quente, para observação do tempo de reação controle. Os animais que apresentaram um tempo de reação superior a 10 s foram descartados do teste. As respostas ao estímulo térmico foram registradas nos intervalos de 30, 60 e 90 min após os tratamentos, sendo o tempo de reação observado por no máximo 40 s em cada intervalo.

#### 3.2.4. Atividade antiinflamatória

Os ensaios de inflamação foram realizados utilizando ratos *Wistar* machos (180-250 g; n=6). Os animais receberam os seguintes tratamentos 60 min antes do estímulo

inflamatório: AmII (1, 3 ou 9 mg/kg; s.c.), salina estéril (NaCl 0,15 M; s.c.) como controle negativo e dexametasona (1mg/kg; s.c), um glicocorticóide, como controle positivo.

#### 3.2.4.1. Ensaio de migração celular através da cavidade peritoneal induzida por carragenana

Os animais receberam por via i.p. o estímulo inflamatório carragenana (700 µg/cavidade) dissolvida em salina estéril. A migração de neutrófilos foi avaliada após 4 horas. Para tanto, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e, em seguida, as células presentes na cavidade peritoneal foram coletadas através da lavagem com 10 mL de salina contendo 5 U/mL de heparina. Os abdômens dos animais foram levemente massageados e, através de uma pequena incisão, foram coletados cerca de 7 mL de fluido peritoneal, com pipeta Pasteur. As contagens total e diferencial dos leucócitos foram realizadas conforme metodologia descrita anteriormente por Souza e Ferreira (1985). Os fluidos coletados de cada animal (20 µL) foram diluídos em 380 µL do reagente de Turk e posteriormente usados para a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. Para contagem diferencial das células, o fluido peritoneal (50 µL) foi centrifugado em citocentrífuga a 400 g, durante 10 min. Após este processo, os esfregaços foram corados pelo método de hematoxilina-eosina. As células foram contadas através de microscopia óptica, sendo os resultados expressos como média ± E.P.M. do número de células x 10<sup>3</sup>/mL de fluido peritoneal.

#### 3.2.4.2. Edema de pata induzido por carragenana

O edema de pata induzido por carragenana foi realizado segundo o método de Winter *et al.* (1962). A carragenana (500 µg/pata) foi administrada por via subcutânea. Um grupo adicional recebeu apenas solução salina estéril (NaCl 0,15M; s.c.). Os volumes da pata direita traseira de cada animal foram medidos através de pletismômetro (Panlab, Espanha) antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero) e nos intervalos de 1, 2, 3 e 4 horas após a administração do agente inflamatório. O edema foi calculado como a diferença entre o volume de líquido deslocado pela pata no tempo zero e em um determinado tempo após o estímulo. Ao término do ensaio, os animais foram eutanasiados com cloral hidratado (20%) e a

porção inferior da pata foi extraída e congelada a (-20 °C) para a posterior dosagem de mieloperoxidase.

#### 3.2.4.3. Determinação da atividade de mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada principalmente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e, portanto, tem sido amplamente utilizada como um marcador bioquímico da infiltração de neutrófilos em vários tecidos. A determinação da atividade de MPO no tecido foi realizada segundo Bradley et al. (1982). Para tanto, 50 mg de tecido da pata foi homogeneizado em 1 mL tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, contendo 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio, utilizando um homogeneizador Polytron (dois ciclos de 10 s). Após centrifugação a 4000 g por 12 min a 4 ° C, amostras dos sobrenadantes (7 µL) foram adicionadas ao tampão fosfato (200 µL) contendo diidrocloreto de o-dianisidina 1mM e peróxido de hidrogênio 0,0005% em microplaca. A absorbância foi medida a 450 nm, tomando duas leituras em intervalos de 60 s. Durante o ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio é degradado ocorre a produção do ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianosidina em um composto de coloração marrom. Foi considerado que 1 unidade de MPO converte 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 1 min a 22 °C causando uma mudança na absorção de  $1,13 \times 10^{-2}$  nm/min. Os resultados foram expressos como unidades de MPO/mg de tecido.

#### 3.2.4.4. Edema de pata induzido por dextrano

O modelo do edema de pata induzido por dextrano foi realizado segundo Maity *et al.* (1998). O dextrano (400 µg/pata) foi administrado por via subcutânea. Os volumes da pata direita traseira de cada animal foram medidos através de pletismômetro antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero) e nos intervalos de 0,5; 1; 2; 3 e 4 horas após a administração do agente inflamatório. O edema foi calculado como a diferença entre o volume de líquido deslocado pela pata no tempo zero e em um determinado tempo após o estímulo.

### 3.2.5 Ensaio edematogênico

AmII (500 µg/pata) ou salina estéril (NaCl 0,15 M) foram injetados na pata posterior direita de ratos (0,1 mL/100 g de massa corporal). Os volumes da pata direita traseira de cada animal foram medidos através de pletismômetro antes da injeção AmII ou salina estéril (tempo zero) e em intervalos de tempo selecionados (0,5; 1; 2; 3 e 4 h). Os resultados foram expressos como a variação do volume da pata (mL), calculado como a diferença do volume basal (tempo zero).

### 3.2.6. Toxicidade subcrônica

Camundongos machos e fêmeas receberam tratamento subcrônico com injeção diária de Am-PST (20 mg/kg; i.p.) ou salina estéril (NaCl 0,15 M; i.p.) por quatorze dias. Foram avaliados o peso corporal e dos órgãos e parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos. Após o tratamento, os camundongos foram anestesiados com cloral hidratado e o sangue periférico foi coletado.

Para as análises bioquímicas do plasma, o sangue foi centrifugado a 500 g por 15 min. As amostras de plasma foram armazenadas a -80 °C até o uso. Os níveis plasmáticos de alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (ASP), fosfatase alcalina (ALP), uréia e creatinina foram determinados, utilizando testes enzimáticos e colorimétricos (LABTEST).

Amostras de sangue heparinizadas foram aplicadas em um analisador automático (pocH 100iV DIFF Sysmex Europe GmbH, Hamburg, Germany) para a determinação dos seguintes parâmetros: contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), amplitude da distribuição dos eritrócitos (RDW-SD), coeficiente de anisocitose das hemácias (RDW-CV), amplitude da distribuição das plaquetas (PDW), volume médio plaquetário (MPV), contagem de leucócitos e plaquetas, percentual de plaquetas gigantes (P-LCR), linfócitos, monócitos e neutrófilos.

Após a eutanásia, os órgãos (fígado, rim direito, coração, baço, timo e linfonodo) foram removidos, pesados e fixados com formalina 10%. O material foi então desidratado com concentrações crescentes de etanol (70 a 100%) e processado para inclusão em parafina. Os

blocos resultantes foram cortados em secções de 5 µm de espessura, corados com hematoxilina e eosina e observados em microscopia ótica.

### **3.3 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (Erro Padrão da Média). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos foi realizada Análise de Variância (ANOVA) e teste de Bonferroni e para valores não pareados foi utilizado o Teste de t-Student. Foi considerado significativo  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Extração e purificação dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Acanthophora muscoides*

Os polissacarídeos sulfatados totais da alga *A. muscoides* (Am-PST) foram obtidos e fracionados em cromatografia de troca iônica, conforme descrito anteriormente para polissacarídeos sulfatados totais da mesma espécie por Quinderé (2008). O fracionamento Am-PST foi realizado através de cromatografia de troca-iônica em coluna de DEAE-celulose, resultando em três frações sulfatadas majoritárias denominadas de AmI, AmII e AmIII, eluídas respectivamente com 0,5, 0,75 e 1 M de NaCl (Figura 4). A fração AmII foi posteriormente utilizada em modelos experimentais de nocicepção e inflamação aguda.

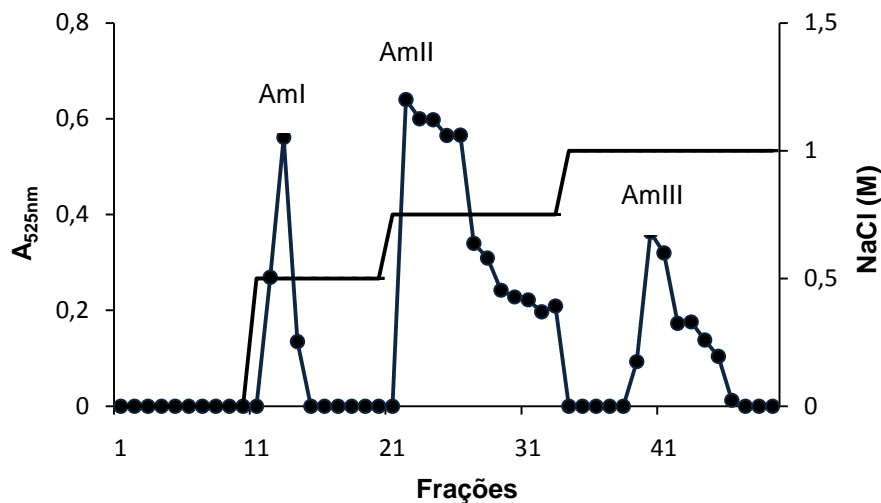


Figura 4 - Cromatografia de troca iônica dos polissacarídeos totais da alga *Acanthophora muscoides* em coluna de DEAE-celulose equilibrada com tampão Acetato 0,05 M pH 5,0. As frações foram eluídas por “step wise” com tampão de equilíbrio contendo NaCl (—) nas concentrações de 0,5 M ; 0,75 M e 1 M e monitoradas por metacromasia com ADM (●—●).

### 5.2. Atividade antinociceptiva

Os tratamentos com a fração AmII (1, 3 ou 9 mg/kg, i.v.), antes da aplicação do ácido acético 0,8%, reduziram significativamente os números de contorções abdominais em

60,0; 64,4 e 71,3%, respectivamente. Não houve diferença estatística entre as doses utilizadas. O tratamentos com indometacina (5 mg/kg, s.c) e morfina (5 mg/kg, s.c), utilizados como controles positivos, reduziram os números de contorções em 55,7 e 98,2%, respectivamente (Figura 5).

Na primeira fase do teste da formalina, a fração AmII não reduziu o tempo de lambertura em nenhuma das doses administradas. Na segunda fase, A fração AmII (1, 3 ou 9 mg/kg, i.v.) reduziu tempo de lambertura da pata em 87,36; 88,44 e 93,10%, respectivamente (Figura 6). Não houve diferença estatística entre as doses utilizadas. Morfina (5 mg/kg, s.c) e indometacina (5 mg/kg, s.c) inibiram a segunda fase em 91,62 e 63,28%, respectivamente.

No teste da placa quente, a fração AmII (1, 3 ou 9 mg/kg, i.v.) e indometacina (5 mg/kg, s.c) não prolongaram o tempo de reação ao estímulo térmico durante o período observado (Figura 7). A morfina (5 mg/kg, s.c) prolongou o tempo de reação em  $34,1 \pm 2,8$ ;  $29,8 \pm 1,4$  e  $23,1 \pm 2,7$ , nos tempos de 30; 60 e 90 min, respectivamente.

### **5.3 Atividade antiinflamatória**

Carragenana (700 µg/cavidade) causou intensa migração neutrofílica quando injetada na cavidade peritoneal dos ratos. A fração AmII (1, 3 ou 9 mg/kg; s.c.), injetada 1 h antes da carragenana, reduziu significativamente a migração neutrofílica em 54,31; 56,66 e 65,78%, respectivamente. A dexametasona (1 mg/kg; s.c.) reduziu a migração neutrofílica em 62,49%. A contagem de neutrófilos no grupo carragenana foi 79,78% maior que a do grupo salina (Figura 8).



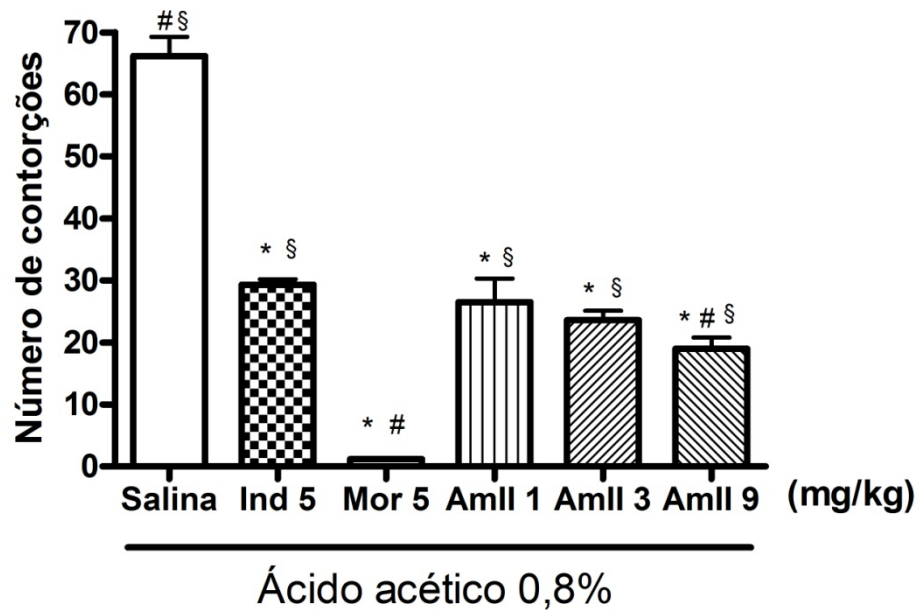


Figura 5 - Efeito da fração AmII no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Foram aplicadas morfina (5 mg/kg, s.c.), indometacina (5 mg/kg, s.c), Am II (1, 3 ou 9 mg/kg, i.v.) ou salina (i.v.), aplicadas 30 min antes do ácido acético. Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=6). \* $p$ <0,05 comparando com o controle salina (NaCl 0,15 M), # $p$ <0,05 comparando com indometacina e § $p$ <0,05 comparando com morfina (ANOVA; Teste de Bonferroni).

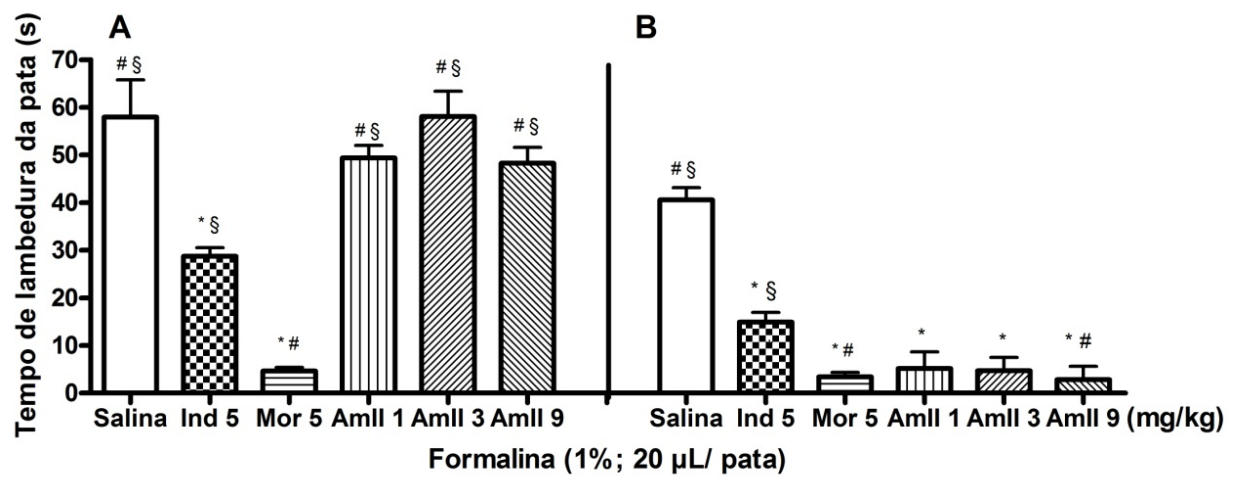


Figura 6 - Efeito da fração AmII no teste da formalina em camundongos. O tempo de lambertura da pata foi determinado durante os 5 primeiros minutos (1ª fase – Painel A) e durante 20-25 min (2ª fase – Painel B) por injeção de formalina 1% em camundongos. Morfina (5 mg/kg; s.c), indometacina (5 mg/kg; s.c), Am II (1, 3 ou 9 mg/kg, i.v.) ou salina (i.v.) foram aplicadas 30 min. antes da formalina. Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=6). \* $p < 0,05$  comparando com o controle salina (NaCl 0,15 M), #  $p < 0,05$  comparando com indometacina e §  $p < 0,05$  comparando com morfina. (ANOVA; Teste de Bonferroni).

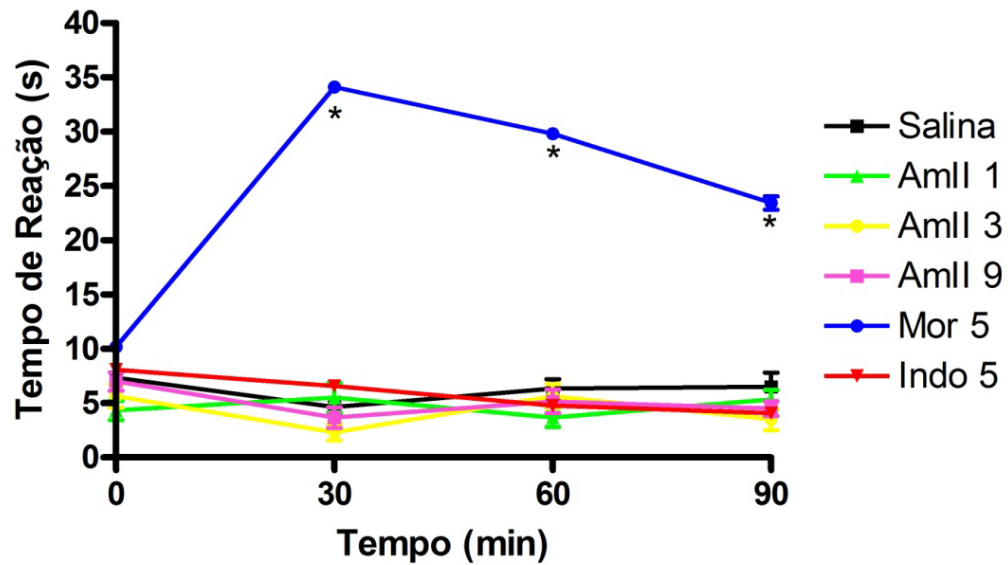


Figura 7 - Efeito antinociceptivo da fração AmII no teste da placa quente em camundongos. Foram aplicadas morfina (5 mg/kg, s.c.), indometacina (5 mg/kg, s.c), Am II (1, 3 ou 9 mg/kg, i.v.) ou salina (i.v.) Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6) do tempo de reação (s). \* $p < 0,05$  comparando com o controle salina (NaCl 0,15 M). (ANOVA; Teste de Bonferroni).

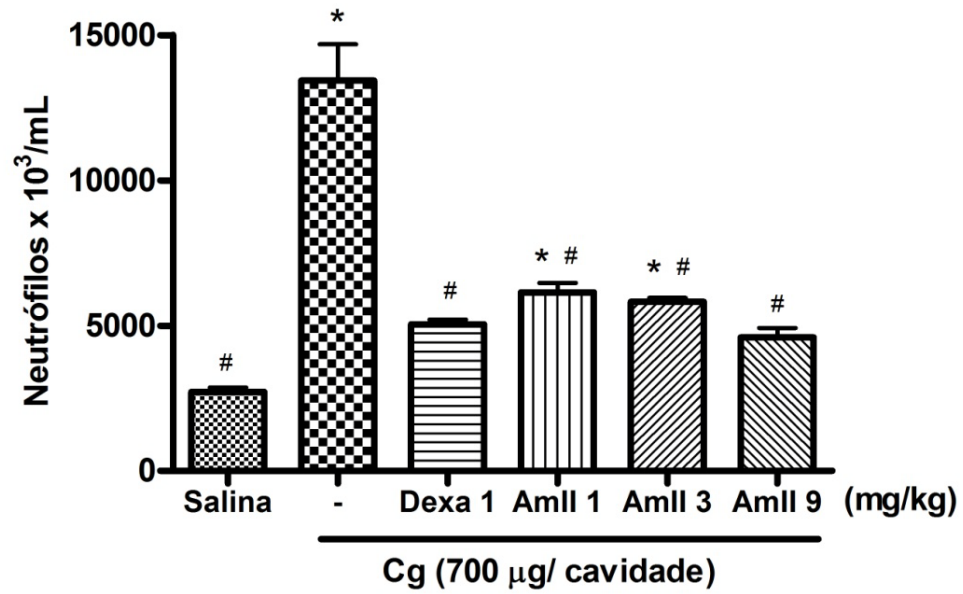


Figura 8 - Efeito da fração AmII no modelo de migração celular induzida por carragenana. AmII (1, 3 ou 9 mg/kg, s.c.), dexametasona (1 mg/kg, s.c.) ou salina (NaCl 0,15 M; s.c.) foram administradas 1 h antes da injeção de carragenana (Cg; 700 µg/cavidade) Os dados foram expressos como média ± E.P.M. (n=6). \* $p < 0,05$  comparando com o grupo que recebeu apenas salina (-) # $p < 0,05$  comparando com o grupo controle carragenana (ANOVA; Teste de Bonferroni).

Carragenana (500 µg/pata; s.c.) causou intenso edema de pata, atingindo nível máximo na terceira hora ( $0,58 \pm 0,04$  mL). A fração AmII (1, 3 ou 9 mg/kg; s.c.) não alterou a ocorrência do edema quando comparada ao grupo controle. A dexametasona (1 mg/kg; s.c.), controle positivo, reduziu significativamente o edema a partir do tempo 2 h após o estímulo inflamatório (Figura 9).

A dosagem de mieloperoxidase foi realizada nas amostras de tecidos das patas retiradas após o ensaio do edema de pata induzido por carragenana. A fração AmII não reduziu atividade de MPO (Figura 10).

No ensaio de edema de pata em ratos induzido por dextrano, a fração AmII (1, 3 ou 9 mg/kg; s.c.) reduziu o edema osmótico somente no intervalo de 0,5 h após a administração do agente inflamatório (Figura 11).

#### **5.4 Avaliação do efeito edematogênico**

A fração AmII (500 µg/pata) aplicada via s.c. não provocou edema de pata quando comparada aos animais controle, que receberam o mesmo volume de salina estéril (NaCl 0,15 M) (Figura 12).

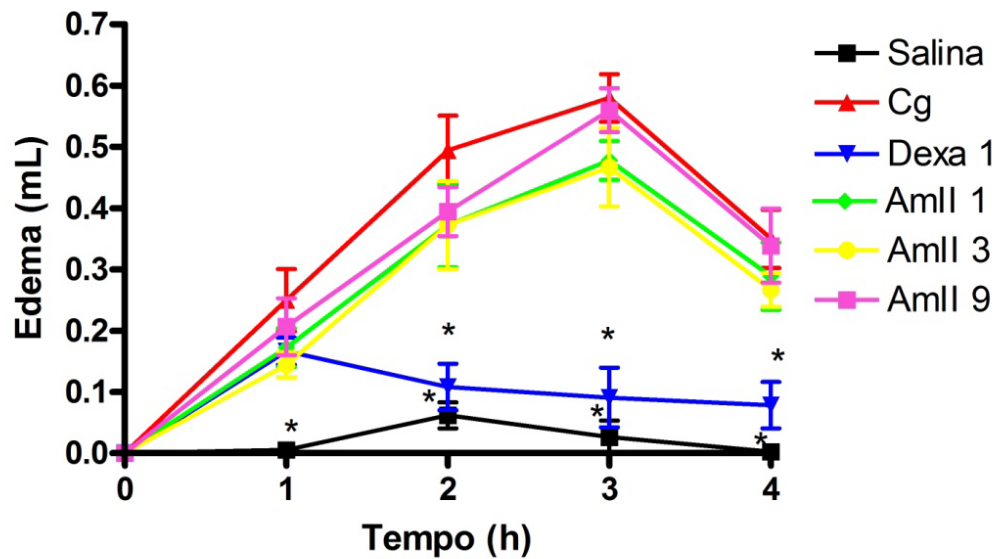


Figura 9 - Efeito da fração AmII no modelo de edema de pata induzido por carragenana em ratos. AmII (1, 3 ou 9 mg/kg, s.c.), dexametasona (1 mg/kg, s.c.) ou salina (NaCl 0,15 M; s.c.) foram administradas 1 h antes da injeção s.c. de carragenana (Cg) (40  $\mu$ L; 500  $\mu$ g/pata). Os volumes das patas foram medidos através de pletismômetro nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 h após injeção do estímulo inflamatório Cg. Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=6). \* $p$ <0,05 comparando com o controle carragenana (ANOVA; Teste de Bonferroni).

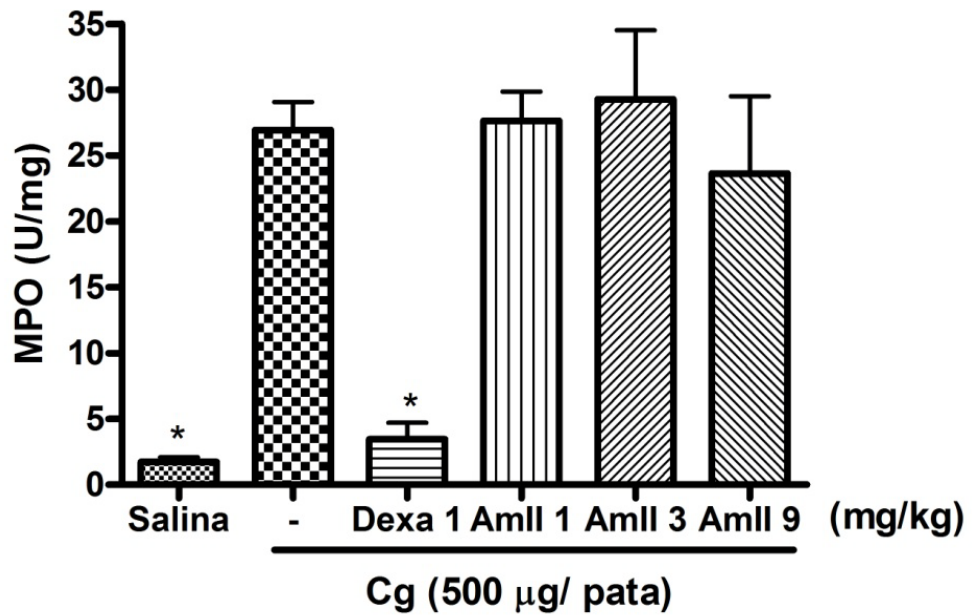


Figura 10 - Atividade da mieloperoxidase (MPO) no sobrenadante do homogenato do tecido da pata. AmII (1, 3 e 9 mg/kg, s.c.), dexametasona (Dexa, 1 mg/kg, s.c.) ou salina estéril (NaCl 0,15 M; s.c.) foram administradas 1 h antes da injeção s.c. de carragenana (Cg) (40 µL; 500 µg/pata). Os resultados foram expressos em unidades atividade da MPO/ mg de tecido. Os dados foram expressos como média ± E.P.M. (n=6). \* $p < 0,05$  comparando com o controle salina (ANOVA; Teste de Bonferroni).

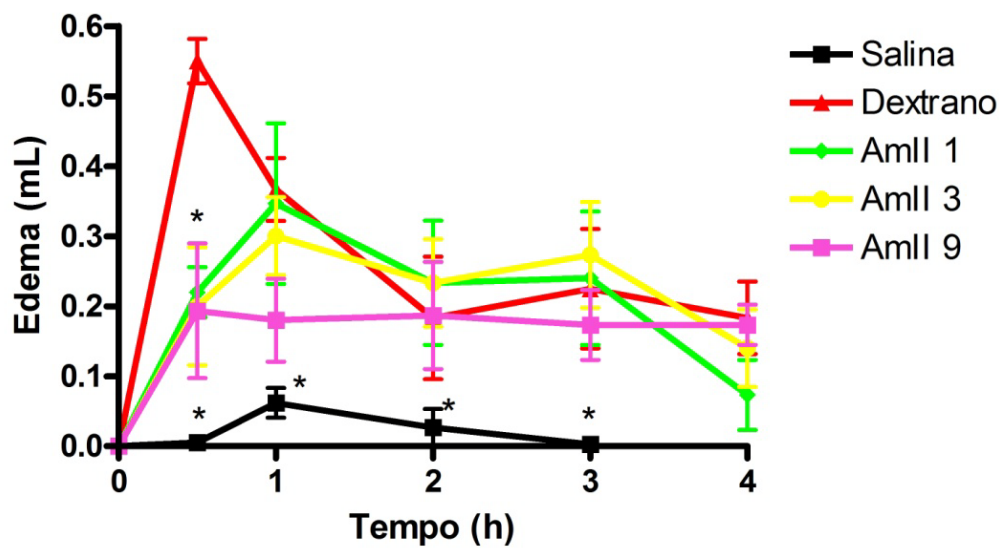


Figura 11 - Efeito da fração AmII no modelo de edema de pata induzido por dextrano em ratos. AmII (1, 3 e 9 mg/kg, s.c.) ou salina estéril (NaCl 0,15 M; s.c.) foram administradas 1 h antes da injeção subplantar de Dextrano (400 µg/pata). Os volumes das patas foram medidos através de pletismômetro nos tempos 0; 0,5; 1; 2; 3 e 4 h após injeção do estímulo inflamatório. Os dados foram expressos como média ± e.p.m. (n=6). \* $p < 0,05$  comparando com o controle salina (ANOVA; Teste de Bonferroni).



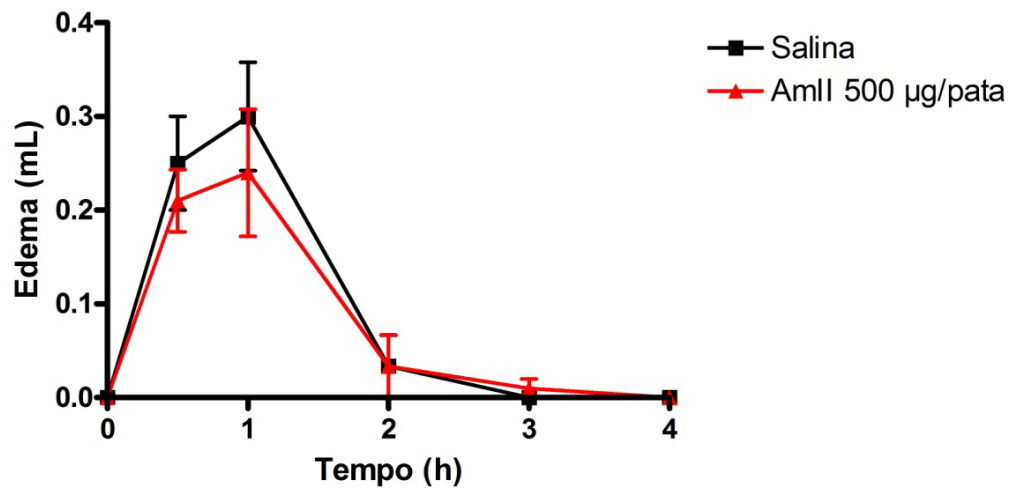


Figura 12- Efeito da injeção subcutânea de AmII em ratos. AmII (500 µg/pata) e salina (NaCl 0,15 M) foram administradas via s.c. Os volumes das patas foram medidos através de pletismômetro nos tempos 0; 0,5; 1; 2; 3 e 4 h após injeção. Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=6). (ANOVA; Teste de Bonferroni).

## 5.5 Toxicidade subcrônica

Injeções diárias de Am-PST (20 mg/kg; i.p.) durante 14 dias não alteraram a massa corporal dos camundongos, machos e fêmeas, assim como o peso relativo dos órgãos fígado, coração, rim, baço, timo e linfonodo (Tabela 1). Os níveis plasmáticos de aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT) e creatinina não diferiram dos respectivos controles. Os níveis de fosfatase alcalina e de uréia mostraram-se diminuídos somente nos camundongos fêmeas, sendo a redução de 55,16 e 47,15% respectivamente (Tabela 1). Essas reduções não têm expressão de toxicidade. Houve também uma leve redução no percentual de linfócitos somente no grupo dos machos (Tabela 2).

Análises histopatológicas do baço, timo e linfonodo removidos não apresentaram sinais de danos aos tecidos (Figura 13). O coração apresentou degeneração microvesicular nas fibras cardíacas, no fígado foi encontrada discreta degeneração vacuolar e no rim foi observado infiltrado inflamatório misto apenas na gordura perirenal (Figura 14). As alterações histológicas observadas foram consideradas reversíveis. Desta forma, não houve sinais consistentes de danos sistêmicos.

Tabela 1- Análises bioquímicas e do peso corporal e dos órgãos de camundongos submetidos a tratamento subcrônico com Am-PST. Os animais foram pesados e injetados com Am-PST diariamente durante quatorze dias. Posteriormente, os animais foram anestesiados e amostras de sangue coletadas para dosagens bioquímicas (AST, ALT, ALP, uréia, e creatinina). Os animais foram eutanasiados e os órgãos pesados. Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=6). Teste t-Student para valores não pareados. \* $p < 0,05$  comparando com o controle salina.

Parâmetros	Tratamentos (i.p.)	
	Salina	AmII (20 mg/kg)
<b>Machos</b>		
Peso corporal médio (g) inicial	25,68 $\pm$ 0,67	22,33 $\pm$ 0,33
Peso corporal médio(g) final	29,58 $\pm$ 0,72	25,38 $\pm$ 0,50
Fígado (g/ 100g peso corporal)	5,24 $\pm$ 0,18	6,14 $\pm$ 0,14
Rim (g/ 100g peso corporal)	0,77 $\pm$ 0,03	0,86 $\pm$ 0,02
Coração (g/ 100g peso corporal)	0,72 $\pm$ 0,03	0,67 $\pm$ 0,02
Baço (g/ 100g peso corporal)	0,42 $\pm$ 0,04	0,46 $\pm$ 0,03
Timo (g/ 100g peso corporal)	0,30 $\pm$ 0,03	0,30 $\pm$ 0,03
Linfonodo (g/ 100g peso corporal)	0,22 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,03
AST (UI/L)	76,57 $\pm$ 5,49	76,42 $\pm$ 4,16
ALT (UI/L)	31,00 $\pm$ 1,56	39,92 $\pm$ 4,27
ALP (UI/L)	104,80 $\pm$ 4,24	100,80 $\pm$ 11,54
Uréia (mg/dL)	32,93 $\pm$ 3,03	29,37 $\pm$ 2,78
Creatinina (UI/L)	2,18 $\pm$ 0,28	1,52 $\pm$ 0,13
<b>Fêmeas</b>		
Peso corporal médio (g) inicial	22,15 $\pm$ 0,67	23,67 $\pm$ 0,42
Peso corporal médio(g) final	25,17 $\pm$ 0,60	30,00 $\pm$ 0,60
Fígado (g/ 100g peso corporal)	5,46 $\pm$ 0,08	6,16 $\pm$ 0,17
Rim (g/ 100g peso corporal)	0,86 $\pm$ 0,14	1,04 $\pm$ 0,02
Coração (g/ 100g peso corporal)	0,81 $\pm$ 0,03	0,83 $\pm$ 0,05
Baço (g/ 100g peso corporal)	0,49 $\pm$ 0,03	0,62 $\pm$ 0,04
Timo (g/ 100g peso corporal)	0,41 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,07
Linfonodo (g/ 100g peso corporal)	0,22 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,07
AST (UI/L)	51,60 $\pm$ 10,08	65,39 $\pm$ 6,60
ALT (UI/L)	45,86 $\pm$ 6,47	36,64 $\pm$ 2,88
ALP (UI/L)	87,32 $\pm$ 9,62	37,63 $\pm$ 5,60*
Uréia (mg/dL)	30,33 $\pm$ 1,83	17,61 $\pm$ 1,05*
Creatinina (UI/L)	1,75 $\pm$ 0,21	1,80 $\pm$ 0,17

Tabela 2- Parâmetros hematológicos de camundongos submetidos a tratamento subcrônico com Am-PST. Os animais foram pesados e injetados com Am-PST diariamente durante quatorze dias. Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=6). Teste t-Student para valores não pareados. \* $p < 0,05$  comparando com o controle salina.

Parâmetros	Tratamentos (i.p.)	
	Salina	AmII (20 mg/kg)
<b>Machos</b>		
Eritrócitos ( $10^6/\mu\text{L}$ )	10,54 $\pm$ 2,33	8,89 $\pm$ 0,14
Hemoglobina (g/dL)	14,62 $\pm$ 0,44	14,05 $\pm$ 0,24
Hematócrito (%)	43,58 $\pm$ 2,72	44,07 $\pm$ 0,66
MCV (fL)	228,2 $\pm$ 176,6	49,60 $\pm$ 0,53
MCH (pg)	29,03 $\pm$ 12,97	15,80 $\pm$ 0,20
MCHC (g/dL)	25,92 $\pm$ 5,19	31,88 $\pm$ 0,21
Leucócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	10,77 $\pm$ 6,80	4,97 $\pm$ 0,82
Linfócitos (%)	89,43 $\pm$ 1,47	74,48 $\pm$ 4,35*
Monócitos (%)	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Neutrófilos (%)	10,57 $\pm$ 1,47	26,57 $\pm$ 4,29
Plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ )	720,9 $\pm$ 160,5	995,2 $\pm$ 203,1
RDW-SD (fL)	26,55 $\pm$ 0,60	26,75 $\pm$ 0,61
RDW-CV (%)	13,93 $\pm$ 0,15	15,17 $\pm$ 0,38
PDW (fL)	7,70 $\pm$ 0,0	9,02 $\pm$ 0,77
MPV (fL)	6,60 $\pm$ 0,0	7,40 $\pm$ 0,33
P-LCR (%)	6,70 $\pm$ 0,0	13,70 $\pm$ 2,46
<b>Fêmeas</b>		
Eritrócitos ( $10^6/\mu\text{L}$ )	8,22 $\pm$ 0,24	9,45 $\pm$ 0,18
Hemoglobina (g/dL)	13,18 $\pm$ 0,36	15,12 $\pm$ 0,16
Hematócrito (%)	40,78 $\pm$ 1,37	46,87 $\pm$ 0,83
MCV (fL)	49,60 $\pm$ 0,43	49,57 $\pm$ 0,78
MCH (pg)	16,05 $\pm$ 0,18	16,00 $\pm$ 0,19
MCHC (g/dL)	32,35 $\pm$ 0,29	32,27 $\pm$ 0,29
Leucócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	2,08 $\pm$ 0,36	4,86 $\pm$ 1,07
Linfócitos (%)	81,62 $\pm$ 1,98	80,34 $\pm$ 1,72
Monócitos (%)	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Neutrófilos (%)	18,27 $\pm$ 2,01	19,66 $\pm$ 1,72
Plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ )	699,5 $\pm$ 92,64	827,2 $\pm$ 134,8
RDW-SD (fL)	24,80 $\pm$ 0,42	26,95 $\pm$ 0,47
RDW-CV (%)	13,23 $\pm$ 0,46	15,80 $\pm$ 0,49
PDW (fL)	6,02 $\pm$ 1,023	8,75 $\pm$ 0,05
MPV (fL)	6,94 $\pm$ 0,57	7,35 $\pm$ 0,05
P-LCR (%)	8,65 $\pm$ 1,90	12,65 $\pm$ 0,65

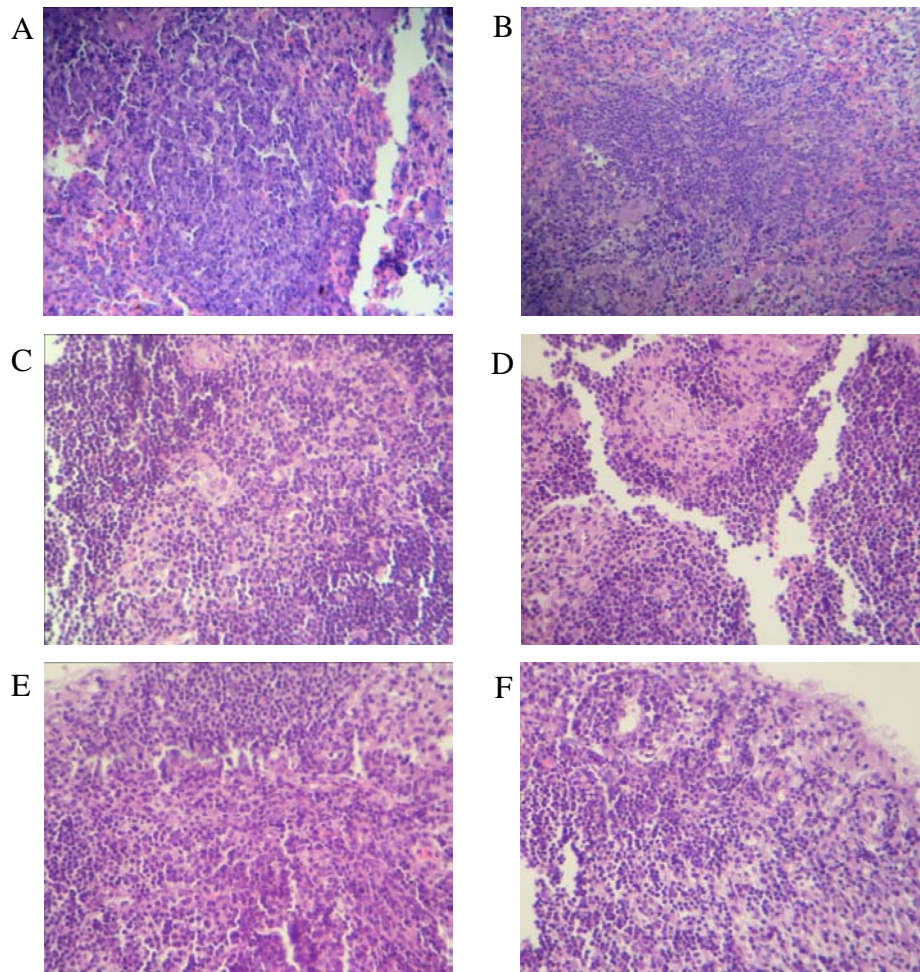


Figura 13 - Análise histopatológica dos órgãos baço, timo e linfonodo de camundongos submetidos a tratamento subcrônico com injeções diárias de Am-PST (20 mg/kg; i.p.) durante quatorze dias. Análises de secções transversais não revelaram diferença entre os baços isolados do grupo salina (A) e do grupo Am-PST (B), entre os timos isolados do grupo salina (C) e do grupo Am-PST (D) e entre os linfonods isolados do grupo salina (E) e do grupo Am-PST (F). Não foi verificada diferença entre machos e fêmeas em nenhum dos grupos analisados. Coloração hematoxilina-eosina.

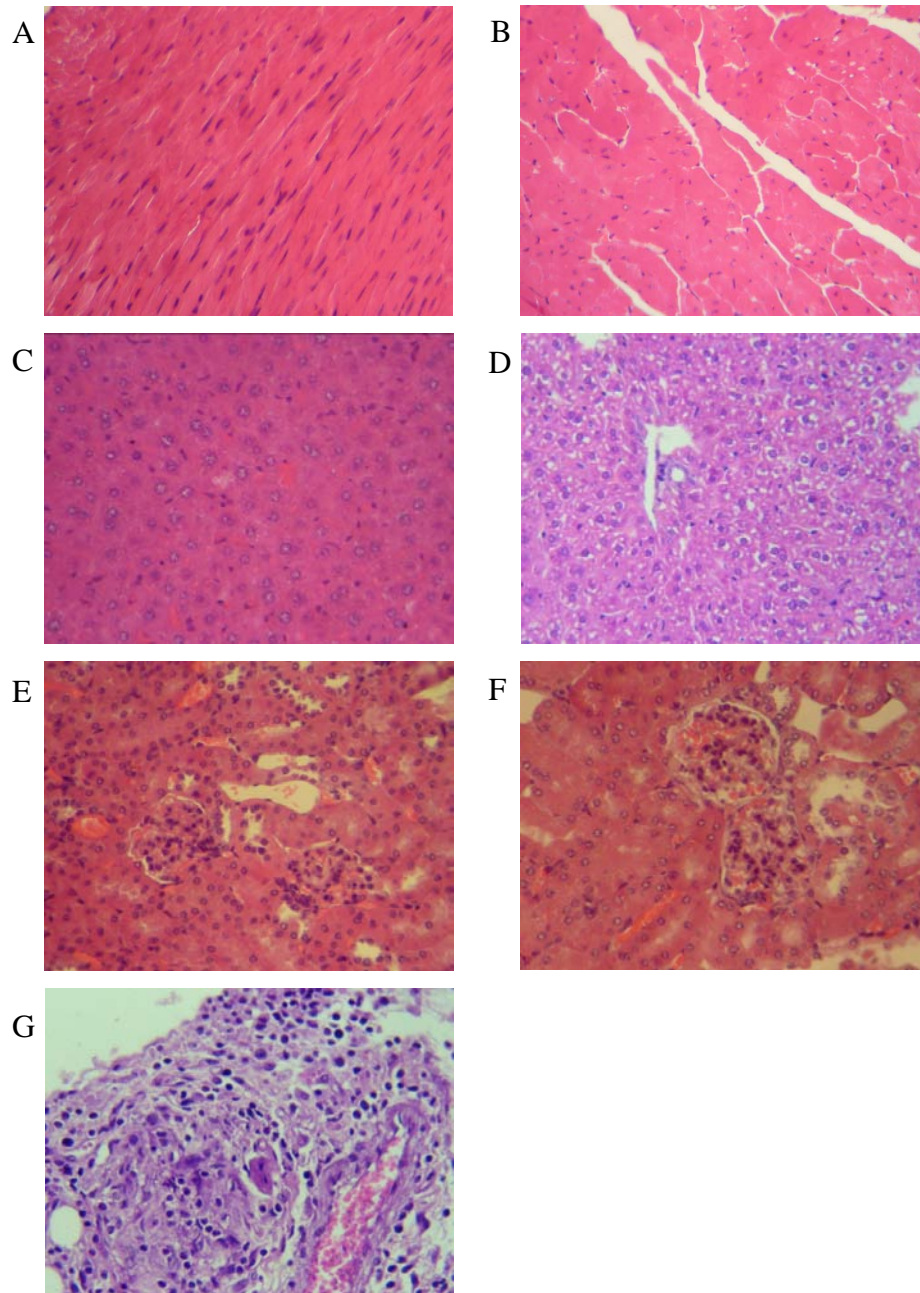


Figura 14 - Análise histopatológica dos órgãos coração, fígado e rim de camundongos submetidos a tratamento subcrônico com injeções diárias de Am-PST (20 mg/kg; i.p.) durante quatorze dias. Análises de secções transversais revelaram degeneração microvesicular nas fibras cardíacas do grupo Am-PST (B) em relação aos corações isolados do grupo salina (A) e discreta degeneração vacuolar nos fígados isolados do grupo Am-PST (D) em relação aos corações isolados do grupo salina (C). Análises de secções transversais dos rins isolados do grupo salina (E) e do grupo Am-PST (F) revelaram que suas estruturas encontraram-se preservadas. Foi encontrado infiltrado inflamatório misto apenas na gordura perirenal dos rins isolados do grupo Am-PST (G). Não foi verificada diferença entre machos e fêmeas em nenhum dos grupos analisados. Coloração hematoxilina-eosina.

## 6. DISCUSSÃO

O tratamento da dor, tanto aguda como crônica, está longe de ser ideal, indicando a necessidade de descoberta de novas drogas. Modelos animais têm sido utilizados na previsão da eficácia analgésica buscando o desenvolvimento de medicamentos de uso clínico (MOGIL; DAVIS; DERBYSHIRE, 2010).

No presente estudo, a atividade antinociceptiva foi inicialmente avaliada pelo teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Este teste é um modelo típico de dor inflamatória, largamente utilizado na busca por novos agentes com propriedades analgésicas periféricas e antiinflamatórias (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001, VANDERLEI *et al.*, 2010). A atividade nociceptiva do ácido acético está associada com a liberação de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, aminas simpatomiméticas e várias citocinas, incluindo IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-8 de macrófagos residentes e mastócitos (RIBEIRO *et al.*, 2000).

Na avaliação da fração AmII no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, a diminuição no número de contorções observada pode estar relacionada a inibição da liberação de substâncias endógenas que excitam as terminações nervosas. Efeito semelhante já foi descrito na literatura para alguns polissacarídeos sulfatados de algas marinhas vermelhas.

Os polissacarídeos sulfatados totais obtidos por digestão enzimática das espécies algas *Bryothamnion triquetrum* e *B. seaforthii* também apresentaram uma redução no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético (VIANA *et al.* 2002; VIEIRA *et al.*, 2004). Uma fração polissacarídica sulfatada da alga *Champia feldmannii* obtida por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose também mostrou-se efetiva no modelo de contorções abdominais (ASSREUY *et al.*, 2008).

O modelo de nocicepção induzida por formalina, amplamente utilizado como modelo de dor persistente (SHIELDS *et al.*, 2010), também foi utilizado neste estudo para avaliar as propriedades antinociceptivas da fração AmII. A injeção de formalina produz uma resposta comportamental bifásica. A primeira fase é caracterizada por ativação direta dos nociceptores. A segunda fase é caracterizada por dor inflamatória desencadeada por uma combinação de estímulos de sensibilização central (SHIELDS *et al.*, 2010; TJØLSEN *et al.*, 1992). Mediadores inflamatórios como a substância P e a bradicinina participam da fase inicial, enquanto histamina, serotonina, prostaglandinas, óxido nítrico e bradicinina, liberados de células danificadas, estão envolvidos na última fase (LOPES *et al.*, 2010).



Vieira *et al.* (2004) relataram que os polissacarídeos da alga *B. seaforthii* reduziram o tempo de lambadura do teste da formalina em ambas as fases tanto quando administrados por via i.p. quanto por via p.o.

Tem sido bastante relatado que drogas que agem primariamente no sistema nervoso central inibem igualmente ambas as fases, enquanto drogas que agem periféricamente, como antiinflamatórios não esteroidais e corticosteróides, inibem predominantemente a segunda fase (BITENCOURT *et al.*, 2008). Neste ensaio, a fração AmII inibiu significativamente somente a segunda fase, sugerindo que seu efeito antinociceptivo está relacionado à dor inflamatória.

O teste da placa quente é um método amplamente utilizado em estudos nocicepção experimental em ratos e camundongos (GUNN *et al.*, 2011) sendo considerado um teste padronizado e de referência na avaliação de drogas analgésicas de efeito central em que agentes opióides exercem seus efeitos analgésicos via receptores supra espinal e espinal (NEMIROVSKY *et al.*, 2001;YALCIN *et al.*, 2009). No entanto, este método é insensível a analgésicos não-esteroidais como inibidores da ciclooxigenase (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

No presente trabalho, a fração AmII não alterou o tempo de latência nos intervalos de tempo avaliados, sugerindo que a ação antinociceptiva da fração AmII ocorre via mecanismos periférico. Analgésicos de ação central tendem a produzir inúmeros efeitos colaterais como disforia, déficits motores e dependência. Desta forma, as drogas de ação periférica têm a vantagem de contornar esses efeitos (MCDUGALL, 2011).

Diferentemente, os polissacarídeos sulfatados totais da alga *B. seaforthii* prolongaram o tempo de reação quando avaliados pelo teste da placa quente, sendo esses efeitos revertidos através de pré-tratamento dos animais com naloxona, um antagonista opióide (VIEIRA *et al.*, 2004). Entretanto, a morfina, um agonista opióide, permanece sendo o analgésico opióide mais utilizado (ANDERSEN; CHRISTRUP; SJØGREN, 2003).

Visto que os nossos resultados sugeriram que o efeito antinociceptivo da fração AmII está relacionado a dor inflamatória, as propriedades desta fração também foram avaliadas através dos seguintes modelos de inflamação aguda: peritonite induzida por carragenana e edemas de pata induzidos por carragenana e dextrano. A  $\lambda$ -carragenana comercial é bastante utilizada na indução da inflamação em roedores (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001), sendo comercialmete obtida a partir da alga vermelha *Chondrus crispus* Stackhouse (Gigartinaceae, Rhodophyta) (WANG *et al.*, 2008). O dextrano é um polímero de D-glicose



obtido da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* em especial da cepa NRRL B-512F (PURAMA *et al.*, 2009).

No modelo de peritonite, a carragenana induz a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos por um mecanismo indireto, via ativação de macrófagos (SOUZA *et al.*, 1988). No presente estudo, AmII reduziu significativamente a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, semelhantemente ao controle positivo dexametasona. Diferentemente, os polissacarídeos sulfatados da alga *C. feldmanii* apresentaram efeitos pró-inflamatórios, induzindo a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal (ASSREUY *et al.*, 2008).

O edema de pata induzido por carragenana também é considerado um modelo bastante utilizado na determinação da atividade antiinflamatória de novas drogas. Este edema é um fenômeno temporal e envolve a participação de vários mediadores. Dentre estes, histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas estão envolvidas no aumento de permeabilidade vascular, seguido da infiltração celular, principalmente de neutrófilos, que contribuem para a resposta inflamatória (DIROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971, POSADAS *et al.*, 2004). A infiltração neutrofílica pode ser avaliada pela determinação da atividade de MPO em tecidos, em que os níveis teciduais de MPO correlacionam-se com a severidade da doença (POSADAS *et al.*, 2004).

Nossos resultados mostraram que a fração AmII não reduziu o edema de pata induzido por carragenana, o que foi confirmado através da atividade da MPO que não demonstrou redução no infiltrado neutrofílico. Diferentemente, a dexametasona, controle positivo, reduziu tanto o edema de pata quanto os níveis de MPO no tecido. Os glicocorticóides sintéticos, como a dexametasona, estão entre as drogas mais prescritas no mundo para o tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas (LÖWENBERG *et al.*, 2008; TISCHNER; REICHARDT, 2007).

Estudos realizados com plantas superiores demonstraram que polissacarídeos (galactomanoglucana) obtidos do mesocarpo do fruto de *Arecastrum romanzoffianum* apresentou atividade antiinflamatória no modelo do edema de pata induzido por carragenana (SILVA, PARENTE, 2010).

Apesar de a fração AmII não ter apresentado efeito anti-edematogênico no modelo de edema de pata induzido por carragenana, utilizamos o modelo de edema osmótico induzido por dextrano, que apresenta características distintas. O modelo de edema de pata induzido por dextrano permite a avaliação da atividade de novos agentes em processos mediados predominantemente por histamina (LO, ALMEIDA, BEAVEN, 1982). O dextrano promove a

liberação de histamina, serotonina e bradicinina, causando edema osmótico caracterizado por aumento na permeabilidade vascular e baixos níveis de proteínas e neutrófilos. A histamina é um importante mediador químico nas respostas fisiológicas e patológicas. Suas funções biológicas são mediadas por quatro receptores (H<sub>1</sub>R, H<sub>2</sub>R, H<sub>3</sub>R e H<sub>4</sub>R), que variam de expressão, sinalização, função e capacidade de ligação a histamina e, portanto, apresentam diferentes aplicações terapêuticas (ZHANG; THURMOND; DUNFORD, 2007).

Neste trabalho, a fração AmII reduziu o edema de pata induzido por dextrano no primeiro intervalo analisado, sugerindo um efeito anti-histamínico, que pode estar relacionado à inibição da degranulação dos mastócitos (BARBOSA *et al.*, 2009; BABU *et al.*, 2009).

Siqueira *et al.*, (2011) relataram que os polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Lobophora variegata* inibiram o edema de pata em ratos induzido por dextrano e carragenana. No entanto, existem poucos relatos de atividade antiinflamatória de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas (WIJESEKARA, PANGESTUTI, KIM, 2011).

Considerando um estudo com polissacarídeos de plantas superiores, foi demonstrado que uma glucomanana obtida de pseudobulbo da orquídea *Cyrtopodium cardiochilum* reduziu o aumento na permeabilidade vascular induzido por ácido acético (BARRETO; PARENTE, 2006). Além deste estudo, Silva e Parente (2003) relataram que três glucanas isoladas do caule de *Costus spicatus*, conhecido popularmente como cana-do-brejo, também reduziram o aumento na permeabilidade vascular induzido por ácido acético.

Com o objetivo de verificar um possível efeito edematogênico da fração AmII, foi utilizada uma via local de administração. No entanto, injeção subplantar da fração AmII não provocou edema de pata. Diferentemente, do demonstrado para alguns polissacarídeos sulfatados de algas marinhas vermelhas que apresentam propriedades edematogênicas. Por exemplo, uma fração polissacarídica obtida da alga vermelha *C. feldmannii* mostrou-se pró-inflamatória, induzindo a formação do edema em todas as doses testadas (0,1; 0,3 ou 0,9 mg/kg), sendo o efeito mais pronunciado na maior dose (ASSREUY *et al.*, 2008). Além disso, uma fração polissacarídica obtida da alga vermelha *Solieria filiformis* também se mostrou pró-inflamatória quando administrada por via s.c. na pata (1 mg/kg), induzindo a formação do edema (ASSREUY *et al.*, 2010).

Os efeitos sistêmicos dos Am-PST aos serem avaliados em modelo de toxicidade subcrônica, através da análise da integridade de órgãos (coração, fígado, rins, baço, timo e linfonodo) de camundongos e dos parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos mostraram-se seguros. Em relatos recentes, tem sido reportado que polissacarídeos sulfatados

de outras algas também foram considerados seguros (ASSREUY *et al.*, 2008, SIQUEIRA *et al.*, 2011).

Dentre os marcadores da função hepática, as dosagens de transaminases são largamente utilizadas para avaliar a segurança de novas drogas tanto em ensaios pré-clínicos quanto clínicos (AMACHER, 1998). No presente estudo, injeções diárias de Am-PST em camundongos não alteraram os níveis alanina transaminase e aspartato transaminase. Na análise histopatológica do fígado, foi encontrada uma discreta degeneração vacuolar reversível, sugerindo que Am-PST não alteraram a função hepática.

Dosagens de uréia e creatinina são utilizadas para a verificação da função renal (EACHEMPATI, REED, 2003). Diminuições da uréia não têm expressão clínica. Neste trabalho, os níveis de creatinina não diferiram do controle, mas os níveis de uréia mostraram-se diminuídos somente no grupo das fêmeas. Na análise histopatológica do rim, foram encontrados infiltrados inflamatórios mistos apenas na gordura perirenal. Essas alterações também são consideradas reversíveis. Desta forma, Am-PST também não alteraram a função renal.

A fosfatase alcalina é uma enzima ubíqua, encontrada principalmente no plasma sanguíneo ou soro, ossos, rins, glândula mamária, baço, pulmão, leucócitos, córtex adrenal e túbulos seminíferos (SHANMUGHAM *et al.*, 2007). A dosagem plasmática desta enzima é particularmente útil na investigação das doenças hepatobiliares e ósseas. Níveis diminuídos da fosfatase alcalina são encontrados na desnutrição crônica, na hipofosfatosemia e, ocasionalmente, no hipotireoidismo e anemia perniciosa. No nosso estudo, Am-PST diminuíram os níveis de fosfatase alcalina somente nos camundongos fêmeas.

Dentre os parâmetros hematológicos analisados, somente foi observada uma leve redução no percentual de linfócitos no grupo dos machos. Além disso, as análises histopatológicas do baço, timo e linfonodo não apresentaram sinais de danos aos tecidos. Portanto, a análise integrada desses resultados mostra que não foram encontrados sinais consistentes de danos sistêmicos.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que a fração polissacarídica sulfatada AmII da alga marinha *Acanthophora muscoides* apresentou atividade antinociceptiva, antiinflamatória e anti-edematogênica. Além disso, no ensaio de toxicidade subcrônica os polissacarídeos sulfatados totais mostraram-se seguros. Salientamos ainda que exato mecanismo de ação desta fração polissacarídica ainda permanece a ser elucidado, no entanto esses polissacarídeos representam importantes agentes para estudos futuros.

## REFERÊNCIAS

ABRAHAM, S. N., ST. JOHN, A. L. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. **Nat.** v.10, p. 440-452, 2010.

AHN, G., HWANG, I., PARK, E., KIM, J., JEON, Y., LEE, J., PARK, J.W., JEE, Y. Immunomodulatory effects of an enzymatic extract from *Ecklonia cava* on murine splenocytes. **Mar Biotechnol.** v.10, n. 3, p. 278-289, 2008.

AMACHER, D. E. Serum transaminase elevations as indicators of hepatic injury following the administration of drugs. **Regul Toxicol Pharmacol** v.27, p.119-130 1998.

ANDERSEN, G., CHRISTRUP, L., SJØGREN, P. Relationships among aorphine metabolism, pain and side effects during long-term treatment: an update. **J Pain Symptom Manag.** v.25, p.74-91, 2003.

ALMEIDA-LIMA, J., COSTA, L. S., SILVA, N.B., MELO-SILVEIRA, R. F., SILVA, F. V., FELIPE, M. B. M. C., MEDEIROS, S. R. B., LEITE, E. L., ROCHA, H. A. O. Evaluating the possible genotoxic, mutagenic and tumor cell proliferation-inhibition effects of a non-anticoagulant, but antithrombotic algal heterofucan. **J. Appl. Toxicol.** v.30, p.708-715, 2010.

ASSREUY, A. M. S., GOMES, D. M, SILVA, M. S. J., TORRES, V. M., SIQUEIRA, R. C. L., PIRES, A. F. P., CRIDDLE, D. N., ALENCAR, N. M. N., CAVADA, B. S., SAMPAIO, A. H., FARIAS, W. R. L. Biological effects of a sulfated-polysaccharide isolated from the marine red algae *Champia feldmannii*. **Biol Pharm Bull.** v.31, n.4, p.691-695, 2008.

ASSREUY, A. M. S., PONTES, G. C. P., RODRIGUES, N. V. F. C. GOMES, D. M., XAVIER, P. A., ARAUJO, G. S., SAMPAIO, A. H., CAVADA, B. S., PEREIRA, M. G., FARIAS, W. R. L. Vascular effects of a sulfated polysaccharide from the red marine alga *Solieria filiformis*. **Nat Prod Commun,** v. 5, n.8, p. 1267-1272, 2010.

AZEVEDO, T.C.G.; BEZERRA, M.E.B.; SANTOS, M.G.L.; SOUZA, L.A. MARQUES, C.T.; BENEVIDES, N.M.B.; LEITE, E.L. Heparinoids algal and their anticoagulant, hemorrhagic activities and platelet aggregation. **Biomed Pharmacother.** v.63, p. 477-483, 2009.

BABU, N. P., PANDIKUMAR, P., IGNACIMUTHU, S. Anti-inflammatory activity of *Albizia lebbek* Benth., an ethnomedicinal plant, in acute and chronic animal models of inflammation. **J Ethnopharmacol** v.125, p.356-360, 2009

- BARBOSA, A. L. R., PINHEIRO, C. A., OLIVEIRA, G. J., MORAES, M. O., RIBEIRO, R. A., VALE, M. L., SOUZA, M. H. L. P. Tumor bearing decreases systemic acute inflammation in rats - role of mast cell degranulation. **Inflamm Res.** v.58, p. 235-240, 2009
- BARRETO, D. W., PARENTE, J. P. Chemical properties and biological activity of a polysaccharide from *Cyrtopodium cardiochilum*. **Carbohydr Polym.** v.64, p.287-291, 2006.
- BARROSO, E. M., COSTA, L. S., MEDEIROS, V. P., CORDEIRO, S. L., COSTA, M. S., FRANCO, C. R., NADER, H. B., LEITE, E. L., ROCHA, H. A. O. A non-anticoagulant heterofucan has antithrombotic activity in vivo. **Planta Med.** v.74, n.7, p. 712-718, 2008.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae – Anatomy, Biochemistry and Biotechnology.** 1ª Ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC, 2006.
- BERTEAU, O.; MULLOY, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans Sulfated fucans, fresh perspectives and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide **Glycobiol** v. 13 n.6 p. 29R-40R, 2003.
- BHARDWAJ, T. R., KANWAR, M., LAL, R., GUPTA, A. Natural gums and modified natural gums as sustained-release carriers. **Drug Dev Ind Pharm,** v.26, p.1025-1038, 2000.
- BITENCOURT, F. S., FIGUEIREDO, J. G., MOTA, M. R. L., BEZERRA, C. C. R., SILVESTRE, P., VALE, M. R., NASCIMENTO, K. S., SAMPAIO, A. H., NAGANO, C. S., SAKER-SAMPAIO, S., FARIAS, W. R. L., CAVADA, B. S., ASSREUY, A. M. S., ALENCAR N. M. N. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.**, v.377, p.139-148, 2008.
- BOISSON-VIDAL, C. ; CHAUBET, F.; L CHEVOLOT, L.; SINQUIN, C.; THEVENIAUX, J.; MILLET, J.; STERNBERG, C.; MULLOY, B. ; FISCHER, A.M. Relationship Between Antithrombotic Activities of Fucans and Their Structure. **Drug Dev Res.** v.51 p. 216–224, 2000.
- BRADLEY, P. P., PRIEBAT, D.A., CHRISTENSEN, R.D., ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophils content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol.**, v.78, p. 206-209, 1982.
- CAMPO, V. L.; KAWANO, D. F.; SILVA, D. B.; CARVALHO, I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – a review. **Carbohydr Polym,** v. 77, n. 2, p. 167-180, 2009.

CARDOZO, K.H.M.; GUARANTINI, T.; BARROS, M.P.; FALCÃO, V.R.; TONON, A.P.; LOPES, N.P.; CAMPOS, S.; TORRES, M.A.; SOUZA, A.O.; COLEPICCOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comp Biochem Physiol Part C: Toxicol Pharmacol.**,v.146, p. 60-78, 2007.

CAVALCANTE, V. O. Fisiopatologia da Dor. In: \_\_\_\_\_. **Dor e saúde mental**. 1 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. cap 2, p.23-32.

CHABALGOITY, J. A., BAZ, A., RIAL, A., GRILLE, S. The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines. **Cytokine Growth Factor Rev.** v.18, p.195-207, 2007.

CHAN, L.W.; LEE, H.Y.; HENG, P.W.S. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. **Int J Pharm** v.242, p. 259–262, 2002.

CHATTOPADHYAY, K., MATEU, C. G., MANDAL, P., PUJOL, C. A., ELSA B. DAMONTE, E. B. RAY, B. Galactan sulfate of *Grateloupia indica*: Isolation, structural features and antiviral activity. **Phytochem.** v.68, p.1428-1435, 2007.

DAVIS, T. A., VOLESKY, B., MUCCI, A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. **Water Res.** v.37, p. 4311-4330, 2003.

DE BOSSCHER, K., BECK, I. M., HAEGEMAN, G. Classic glucocorticoids versus non-steroidal glucocorticoid receptor modulators: Survival of the fittest regulator of the immune system? **Brain, Behav Immun.** v.24, p.1035-1042, 2010.

DIROSA, M., GIROUD J. P., WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J Path,** v. 104, p. 15-29, 1971.

DUARTE, M. E. R.; CAUDURO, J. P.; NOSEDA, D. G.; NOSEDA, M. D.; GONÇALVES, A. G.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; CEREZO, A. S. The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. **Carbohydr Res,** v. 339, p. 335-347, 2004.

EACHEMPATI, S. R., REED, R. L. Use of creatinine clearances to monitor the effect of low-dose dopamine in critically III surgical patients. **J Surg Res.** v.112, p. 43-48, 2003.

EDDY, N. B., LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. **J Pharmacol Exper Ther.,** v. 107, p. 385-93, 1953.

ESTEVEZ, J.M., CIANCIA, M., CERESO, A.S. The system of galactans of the red seaweed *Kappaphycus alvarezii* with emphasis on its minor constituents. **Carbohydr Res**, v. 339, p.2575-2592, 2004.

FIEDLER, T. J., DAVEY, C. A., FENNA, R. E. X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8°A resolution. **J.Biol. Chem.** v.275,p.11964-71, 2000.

FONSECA, R. J. C.; OLIVEIRA, S. M. C. G.; MELO, F. R.; PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B.; MOURÃO, P. A. S. Slight differences in sulfation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. **Thromb Haemost**, v. 99, p. 539-545, 2008.

GHOSH, P., ADHIKARI, U., GHOSAL, P. K. PUJOL, C. A., CARLUCCI, M. J., DAMONTE, E. B. RAY, B. In vitro anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**. v.65, p.3151-3157, 2004.

GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E., JIMÉNEZ-ESCRIG, A., RUPÉREZ, P. Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast. **Food Res Int**. v.43, p. 2289-2294, 2010.

GOTZSCHE, P. C. Non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Clin Evid**. v.9, p.1292-1300, 2003.

GUNN, A., BOBECK, E. N., WEBER, C., MORGAN, M. M. The influence of non-nociceptive factors on hot-plate latency in rats. **J Pain**, v. 12, n. 2, p. 222-227, 2011.

HAJISHENGALLIS, G. Complement and periodontitis. **Biochem Pharmacol**. v.80, p.1992–2001, 2010.

HALLETT, J. M., LEITCH, A. M., RILEY, N. A., DUFFIN, R., HASLETT, C., ROSSI, A. G. Novel pharmacological strategies for driving inflammatory cell apoptosis and enhancing the resolution of inflammation. **Trends Pharmacol Sci**. v.29, n.5, p. 25-257, 2008.

HARDEN, E. A., FALSHAW, R., CARNACHAN, S. M., KERN, E. R., MARK, N. PRICHARDA, M. N. Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus. **Antivir Res**. v.83, p. 282–289, 2009.



HIDARI, K. I. P. J., TAKAHASHI, N., ARIHARA, M., NAGAOKA, M., MORITA, K., SUZUKI, T. Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. **Biochem Biophys Res Commun.** v.376, p.91-95, 2008.

HOPKINS, S. J. The pathophysiological role of cytokines. **Leg Med.** v.5, p. S45–S57, 2003.

HUNSKAAR, S, HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain.** v.30, p.103-114, 1987.

HUWILER, A., PFEILSCHIFTER, J. Lipids as targets for novel anti-inflammatory therapies. **Pharmacol Ther.** v.124, p.96-112, 2009.

JANTSCHKO, W., FURTMÜLLER, P. G., ZEDERBAUER, M., NEUGSCHWANDTNER, K., LEHNER, I., JAKOPITSCH, C., ARNHOLD, J., OBINGER, C. Exploitation of the unusual thermodynamic properties of human myeloperoxidase in inhibitor design. **Biochem Pharmacol** v.69, p.1149–1157, 2005.

JIN, T., XU, X., HERELD, D. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. **Cytokine.** v. 44, p.1–8, 2008.

JULIUS, D., BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nat.** v. 413, p. 203-210, 2001.

KARASUYAMA, H., MUKAI, K., OBATA, K., TSUJIMURA, Y., WADA, T. Nonredundant roles of basophils in immunity. **Annu. Rev. Immunol.** v.29, p.45-69, 2011, doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101257

KARNJANAPRATUM, S., YOU, S., Molecular characteristics of sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their in vitro anticancer and immunomodulatory activities. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 48, p.311-318, 2011.

KATSIARI, C. G., LIOSSIS, S. C., SFIKAKIS, P. P. The pathophysiologic role of monocytes and macrophages in systemic lupus erythematosus: a reappraisal. **Semin Arthritis Rheum.** v. 39, p.491-503, 2010.

KOSTER, R, ANDERSON, M, DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed Proc.** v.18, p.412-4, 1959.

LAHAYE, M., ROBIC, A. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. **Biomacromol.** v.8, p.1765-1774, 2007.

LAHAYE, M., ROCHAS, C. Chemical structure and physico-chemical properties of agar. **Hydrobiol.** v.221, p.137-148, 1991.

LASKIN, D. L., SUNIL, V. R., GARDNER, C. R. LASKIN, J. D. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 51, p.267-288, 2011.

LE BARS, D., GOZARIU, M., CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev.** v.53, p. 597-652, 2001.

LEE, J. B., OHTA, Y., HAYASHI, K., HAYASHI, T. Immunostimulating effects of a sulfated galactan from *Codium fragile*. **Carbohydr Res.** v.345, p.1452-1454, 2010.

LEIRO, J. M., CASTRO, R. ARRANZ, J. A., LAMAS, J. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. **Int Immunopharmacol.** v.7, p.879-888, 2007.

LEITE, E. L., MEDEIROS, M. G. L, ROCHA, H. A. O, FARIAS, G. G. M., SILVA, L. F., CHAVANTE, S. F., ABREU, L. R. D., DIETRICH, C. P., NADER, H. B. Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schröderi*. **Plant Sci.** v. 132, p.215-228, 1998.

LEY, K., LAUDANNA, C., CYBULSKY, M. I., NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat. Rev. Immunol.** v.7, p.678-89, 2007.

LINS, K. O. A. L., BEZERRA, D.P., ALVES, A. P. N. N., ALENCAR, N. M. N., LIMA, M. W., TORRES, V. M. , FARIAS, W. R. L., PESSOA, C., MORAES, M. O., COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). **J Appl Toxicol**, v.29, p. 20-26, 2009.

LO, T. N., ALMEIDA, A. P., BEAVEN, M. A. Dextran and carrageenin evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **J Pharmacol Exp Ther.** v.221, p.261-267, 1982.

LOPES, L. S., MARQUES, R. B., PEREIRA, S. S., AYRES, M. C. C., CHAVES, M. H., CAVALHEIRO, A. J., VIEIRA JÚNIOR, G. M., ALMEIDA, F. R. C. Antinociceptive effect on mice of the hydroalcoholic fraction and (-) epicatechin obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich. **Braz J Med Biol Res.** v. 43, p.1184-1192, 2010.

LÖWENBERG, M., STAHN, C., HOMMES, D.W., BUTTGEREIT, F. Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands. **Steroids** v.73, p.1025-1029, 2008.

LUMPKIN, E. A., CATERINA, M. J. Mechanisms of sensory transduction in the skin. **Nat.** v.445, p.858-865, 2007.

MAITY, T. K.; MANDAL, S. C.; MUKHERJEE, P.K.; SAHA, K.; DAS, J.; PAL, M.; SAHA, B. P. Studies on anti-inflammatory effect of *Cassia tora* leaf extract (Fam. Leguminales). **Phytotherapy Research**. v.12, p. 221–223, 1998.

MCCURDY, C. R., SCULLY, S. S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). **Life Sci** v.78, p.476-484, 2005.

MCDUGALL, J. J. Peripheral analgesia: hitting pain where it hurts. **Biochim Biophys Acta**. v.1812, p. 459-467, 2011.

MCHUGH, D. J. A guide to the seaweed industry: **FAO fisheries technical paper**. Rome: FAO, n. 441, p.61-72, 2003.

MEDEIROS, V. P., QUEIROZ, K. C., CARDOSO, M. L., MONTEIRO, G. R., OLIVEIRA, F. W., CHAVANTE, S. F., GUIMARÃES, L. A., ROCHA, H. A., LEITE, E. L. Sulfated galactofucan from *Lobophora variegata*: anticoagulant and anti-inflammatory properties. **Biochem (Mosc)**. v.73, p.1018-1024, 2008.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nat.** v.454, p.428-435, 2008

MELO, F. R., PEREIRA, M. S., MONTEIRO, R. Q., FOGUEL, D., MOURÃO, P. A. S. Sulfated galactan is a catalyst of antithrombin-mediated inactivation of  $\alpha$ -thrombin. **Biochim Biophys Acta**. v.1780, p.1047-1053, 2008.

MOGIL, J. S., DAVIS, K. D., DERBYSHIRE, S. W. The necessity of animal models in pain research. **Pain**. v.151, p. 12-17, 2010.

MOORE, N. D. In search of an ideal analgesic for common acute pain. **Acute Pain** v.11, p.129-137, 2009.

MULLER, W. A., Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis**. v.6, p.323–44, 2011.

- NA, Y. S., KIM, W. J., KIM, S. M., PARK, J. K., LEE, S. M., KIM, S. O., SYNYTSYA, A. PARK, Y. I. Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens*. **Int Immunopharmacol.** v.10, p.364-370, 2010.
- NEMIROVSKY, A., CHEN, L., ZELMA, V., JURNA, I. The antinociceptive effect of the combination of spinal morphine with systemic morphine or buprenorphine. **Anesthesiol Analgesic.** v.93, p.197-203, 2001.
- OHTA, Y., LEE, J. B., HAYASHI, K., HAYASHI, T. Isolation of sulfated galactan from *Codium fragile* and its antiviral effect. **Biol. Pharm. Bull.** v.32 n.5, p.892-898, 2009.
- ØSTERGAARD, C., YIENG-KOW, R. V., BENFIELD, T., FRIMODT-MØLLER, N., ESPERSEN, F., LUNDGREN, J. D. Inhibition of leukocyte entry into the brain by the selectin blocker fucoidin decreases interleukin-1 (IL-1) levels but increases IL-8 levels in cerebrospinal fluid during experimental pneumococcal meningitis in rabbits. **Infect Immun.** v.68, p.3153-3157, 2000.
- PAINTER, T. J. Algal polysaccharides. IN: **The polysaccharides**, Academic Press Ed., N.Y., II: 195p, 1983.
- PENGZHAN, Y., QUANBIN, Z., NING, L., ZUHONG, X., YANMEI, W., ZHIE, L. Polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and preliminary studies on their antihyperlipidemia activity. **J Appl Phycol.** v.,15, p. 21-27, 2003.
- PERCIVAL, E.; McDOWELL, R. H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. **Academic Press, New York**, 1967.
- PEREIRA, M.G.; BENEVIDES, N.M.B.; MELO, M.R.S.; VALENTE, A.P.; MELO, F.R.; MOURÃO, P.A.S. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carbohydr Res**, v. 340, n. 12, p. 2015-2023, 2005.
- PEREIRA-PACHECO, F., ROBLEDO, D., RODRÍGUEZ-CARVAJAL, L., FREILE-PELEGRÍN, Y. Optimization of native agar extraction from *Hydropuntia cornea* from Yucatán, México. **Bioresour Technol** v.98, p.1278-1284, 2007.
- POSADAS, I., BUCCI, M., ROVIEZZO, F., ROSSI, A., PARENTE, L., SAUTEBIN, L., CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **Br J Pharmacol.** v.142, p.331-338, 2004.

PURAMA, R. K., GOSWAMI, P., KHAN, A. T., GOYAL, A. Structural analysis and properties of dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. **Carbohydr Polym.** v.76, p. 30-35, 2009.

QUEIROZ, K.C.S. , MEDEIROS, V.P., QUEIROZ, L.S., ABREU, L.R.D., ROCHA, H.A.O., FERREIRA, C.V., JUCÁ , M.B., AOYAMA, H., LEITE, E.L. Inhibition of reverse transcriptase activity of HIV by polysaccharides of brown algae. **Biomed Pharmacother.** v.62, p.303-307, 2008.

QUINDERÉ, A.L.G. **Atividades anticoagulante e antitrombótica dos polissacarídeos sulfatados das algas marinhas vermelhas *Acanthophora muscoides* (Rhodomelaceae) e *Pterocladia capillacea* (Gelidiaceae).** 2008. 37f. Monografia. (Graduação em Ciências Biológicas) Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F., EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal.** 7ª Ed., Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2007.

RIBEIRO, R. A., VALE, M. L., THOMAZZI, S. M., PASCHOALATO, A. B., POOLE, S., FERREIRA, S. H., CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur J Pharmacol.** v.387, p.111-118, 2000.

ROBIC, A., SASSI, J. F., LAHAYE, M. Impact of stabilization treatments of the green seaweed *Ulva rotundata* (Chlorophyta) on the extraction yield, the physico-chemical and rheological properties of ulvan. **Carbohydr Polym.** v.74, p.344-352, 2008.

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

RODRIGUES, J. A. G., VANDERLEI, E. S. O., QUINDERÉ, A. L. G., COURA, C. O., BENEVIDES, N. M. B. Avaliação do potencial anticoagulante de polissacarídeos sulfatados de macroalgas marinhas **Rev. Bras. Eng. Pesca.** v.5, n.1, p.56-69, 2010a.

RODRIGUES, J.A.G., VANDERLEI, E.S.O., QUINDERÉ, A.L.G., FONTES, B.P.F., BENEVIDES, N.M.B. Polissacarídeos sulfatados isolados das clorófitas *Caulerpa racemosa* e *Caulerpa cupressoides* – extração, fracionamento e atividade anticoagulante. **Acta Sci. Biol Sci** v.32, p.113-120, 2010b.

RODRÍGUEZ, M.C., MATULEWICZ, M.C., NOSEDA, M.D., DUCATTI, D.R.B., LEONARDI, P.I. Agar from *Gracilaria gracilis* (Gracilariales, Rhodophyta) of the Patagonic coast of Argentina – Content, structure and physical properties. **Bioresour Technol.** v.100, p.1435-1441, 2009.

ROSSI, D., ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annu. Rev. Immunol.** v.18, p.217-242, 2000.

SCHRODER, K., TSCHOPP, J. The Inflammasomes. **Cell** v.140, p.821–832, 2010.  
SEGAL, A. W., How neutrophils kill microbes. **Annu. Rev. Immunol.** v. 23, p.19-223, 2005.

SERBINA, N. V., JIA, T., HOHL, T. M., PAMER, E. G. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. **Annu. Rev. Immunol.** v.26, p.421-52, 2008.

SERHAN, C. N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. **Annu. Rev. Immunol.** v.25, p.101-137, 2007.

SHANMUGHAM, L. N., PETRARCA, C., CASTELLANI, M. L., SYMEONIDOU, I., FRYDAS, S., JACOPO VECCHIET, J., FALASCA, K., TETE, S., CONTI, P., SALINI, V. IL-1b Induces alkaline phosphatase in human phagocytes. **Arc Med Res.** v.38, p.39-44, 2007.

SHIELDS, S. D., CAVANAUGH, D. J., LEE, H., ANDERSON, D. J., BASBAUM, A. I. Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. **Pain.** v.151, p.422-429, 2010.

SILVA, B. P., PARENTE, J. P. Bioactive polysaccharides from *Costus spicatus*. **Carbohydr Polym.** v.51, p. 239-242, 2003.

SILVA, B. P., PARENTE, J. P. Chemical properties and antiinflammatory activity of a galactomannoglucan from *Arecastrum romanzoffianum*. **Phytochem Lett.** v.3, p.109-112, 2010.

SILVA, P. C. Historical review of attempts to decrease subjectivity in species identification, with particular regard to algae. **Protist,** v. 159, p.153-161, 2008.

SIQUEIRA, R. C. L.; SILVA, M. S. J.; ALENCAR, D. B.; PIRES, A. F.; ALENCAR, N. M. N. PEREIRA, M. G.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L.; ASSREUY, A. M. S. *In vivo* anti-inflammatory effect of a sulfated polysaccharide isolated from the marine brown algae *Lobophora variegata*. **Pharm Biol,** v. 49, p. 167-174, 2011.

SOEHNLEIN, O., LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol.** v.20, p.427-439 2010.

SONG, H., ZHANG, Q., ZHANG, Z., WANG, J. In vitro antioxidant activity of polysaccharides extracted from *Bryopsis plumose*. **Carbohydr Polym.** v.80,p. 1057-1061, 2010.

SOUZA, G. E., CUNHA, F. Q., MELLO, R., FERREIRA, S. H. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents Actions.** v.24, p.377-80, 1988.

SOUZA, G. E. P, FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils in to the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions.** v.17, p. 97-103, 1985.

STORTZ, C.A.; CERESO, A.S. Novel findings in carragenans, agaroids and “hybrid” red seaweed galactans. **Curr Top Phytochem,** v. 4, p. 121-134, 2000

TALARICO, L. B., DAMONTE, E. B. Interference in dengue virus adsorption and uncoating by carrageenans. **Virol.** v.363, p.473-485, 2007.

TALARICO, L. B., DUARTE, M. E., ZIBETTI, R. G., NOSEDA, M. D., DAMONTE, E. B. An algal derived DL-galactan hybrid is an efficient preventing agent for in vitro dengue virus infection. **Planta Med.** v.73, p.1464-1468, 2007.

TALARICO, L.B.; PUJOL, C.A.; ZIBETTI, R.G.M.; FARIA, P.C.S.; NOSEDA, M.E.R.; DAMONTE, E.B. The antiviral activity of sulfated polysaccharide against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. **Antivir Res,** v. 66, n. 1, p. 103-110, 2005.

The International Association for the Study of Pain. IASP pain terminology. Disponível em: <[http://www.iasp-pain.org/AM/Template.cfm?Section=Pain\\_Defi...isplay.cfm&ContentID=1728#Pain](http://www.iasp-pain.org/AM/Template.cfm?Section=Pain_Defi...isplay.cfm&ContentID=1728#Pain)> Acesso em 10 Jan 2011.

TISCHNER, D., REICHARDT, H. M. Glucocorticoids in the control of neuroinflammation. **Mol Cell Endocrinol.** v.275, p. 62-70, 2007.

TISCHER, P. C.F., TALARICO, L. B., NOSEDA, M. D., GUIMARÃES, S. M. P. B., DAMONTE, E. B., DUARTE, M. E. R. Chemical structure and antiviral activity of carrageenans from *Meristiella gelidium* against herpes simplex and dengue virus. **Carbohydr Polym** v.63, p.459-465, 2006.

TISSOT, B., MONTDARGENT, CHEVOLOT, B. L., VARENNE, A., DESCROIX, S., GAREIL, P., DANIEL, R. Interaction of fucoidan with the proteins of the complement classical pathway. **Biochim Biophys Acta**. v. 1651, p.5-16, 2003.

TJØLSEN, A., BERGE, D. G., HUNSKAAR, S., ROSLAND, J. H., HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**. v.51, p.5-17, 1992.

TURK, S.S.; SCHNEIDER, R. Printing properties of a high substituted guar gum and its mixture with alginate. **Dye Pigment** v. 47, p. 269-275, 2000.

USOV, A. I.; BILAN, M. I. Fucoidans-sulfated polysaccharides of brown algae. **Russ Chem Rev** v. 78 n.8 p. 785-799, 2009.

USOV, A.I. NMR Spectroscopy of red seaweed polysaccharides: agars, carragenans and xylans. **Bot Mar**. v.27, p. 189-202, 1984.

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

VANDERLEI, E. S. O., PATOILLO, K. K. N. R., LIMA, N. A., LIMA, A. P. S., RODRIGUES, J. A. G., SILVA, L. M. C. M., LIMA, M. E. P., LIMA, V., BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. **Int Immunopharmacol** v.10, p.1113-1118, 2010.

VIANA, G. S. B., FREITAS, A. L. P., LIMA, M. M. L., VIEIRA, L. A. P., ANDRADE, M. C. H., BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red alga *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz. and *B. triquetrum* (S.G. Gmel.) M. Howe. **Braz J Med Biol Res** v.35, n.6, p. 713-722, 2002.

VIDOTTI, E.C.; ROLLEMBERG, M.C. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Quím nov**, v.27, n.1, p.139-145, 2004.

VIEIRA, L. A. P., FREITAS, A. L. P., FEITOSA, J. P. A., SILVA, D. C., VIANA, G. S. B. The alga *Bryothamnion seaforthii* contains carbohydrates with antinociceptive activity. **Braz J Med Biol Res**. v.37, n.7, p.1071-1079, 2004.

VILLANUEVA, R. D., ROMERO, J. B., RAGASA, A. L. R., MONTAÑO, M. N. E. Agar from the red seaweed, *Laurencia flexilis* (Ceramiales, Rhodophyta) from northern Philippines. **Phycol Res**. v.58, p.151-156, 2010.



WANG, L., DUDEK, S. M. Regulation of vascular permeability by sphingosine 1-phosphate. **Microvasc Res.** v.77, p. 39-45, 2009.

WANG, X., ZHAO, F., HU, Z., CRITCHLEY, A. T., MORRELL, S.L., DUAN, D. Inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis of genetic variation of *Chondrus crispus* populations from North Atlantic. **Aquatic Botany.** v.88, p. 154-159, 2008.

WIJESEKARA, I., PANGESTUTI, R., KIM, S. K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydr Polym** v.84, p.14-21, 2011.

WINTER, C. A., RISLEY, E. A., NUSS, G. W. Carrageenin induced oedema in hind paw of rats as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc Soc Exp Biol Med** v.111, p.544-7, 1962.

YALCIN, I., CHARLET, A., FREUND-MERCIER, M. J., BARROT, M., POISBEAU, P. Differentiating thermal allodynia and hyperalgesia using dynamic hot and cold plate in rodents. **J Pain,** v 10, n. 7, p. 767-773, 2009.

YANG, B., YU, G., ZHAO, X., REN, W., JIAO, G., FANG, L., WANG, Y., DU, G., TILLER, C., GIROUARD, G., BARROW, C. J., EWART, H. S., ZHANG, J. Structural characterisation and bioactivities of hybrid carrageenan-like sulphated galactan from red alga *Furcellaria lumbricalis*. **Food Chem.** v.124, p.50-57, 2011.

YASUHARA-BELL, J., LU, Y. Marine compounds and their antiviral activities. **Antivir Res.** v.86, p.231-240, 2010.

ZHANG, M., THURMOND, R. L., DUNFORD, P. J. The histamine H4 receptor: A novel modulator of inflammatory and immune disorders. **Pharmacol Ther.** v.113, p.594-606, 2007.