



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**EFEITO DA LECTINA DA ALGA MARINHA VERMELHA**  
*Pterocladia capillace* **EM FERIDAS LIMPAS INDUZIDAS EM**  
**RATOS**

LUANA MARIA CASTELO MELO SILVA

FORTALEZA

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**EFEITO DA LECTINA DA ALGA MARINHA VERMELHA**  
*Pterocladia capillace* **EM FERIDAS LIMPAS INDUZIDAS EM**  
**RATOS**

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, como Requisito Parcial para a Obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides

Coorientadora: Profa. Dra. Vilma Lima

**FORTALEZA**

**2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- S581e Silva, Luana Maria Castelo Melo.  
Efeito da Lectina da alga marinha vermelha *Pterocladiaella capillacea* em feridas limpas induzidas em ratos/ Luana Maria Castelo Melo Silva – 2012.  
135 f. : il., enc. ; 30 cm.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2012.  
Área de Concentração: Bioquímica..  
Orientação: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides  
Co-orientação: Profa. Dra. Vilma Lima.
1. Lectina 2. Polissacarídeos 3. Cicatrização de feridas I. Título.

---

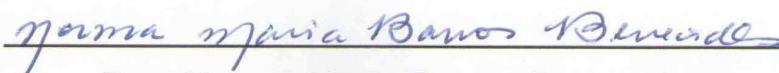
CDD 574-192

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários á obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se á disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade. A citação de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.



Luana Maria Castelo Melo Silva

TESE APROVADA EM 26 /03/12



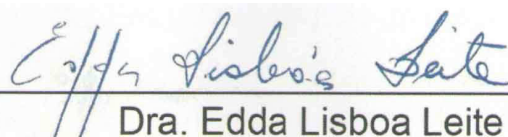
Dra. Norma Maria Barros Benevides

Depto. Bioquímica e Biologia Molecular-UFC (Orientadora)



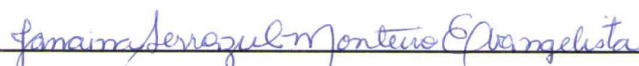
Dra. Vilma Lima

Depto. Fisiologia e Farmacologia-UFC (Co-orientadora e Conselheira)



Dra. Edda Lisboa Leite

Depto. Bioquímica -UFRN (Conselheira)



Dra. Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista

Faculdade de Veterinária-UECE (Conselheira)



Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira

Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas-UFC (Conselheira)



Dedico esta dissertação a Deus ao meu pai José Wellington Silva  
(*in memoriam*) e a minha mãe Mônica Maria pela dedicação e amor.

## AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Norma Maria Barros Benevides que nesses últimos a dedicou atenção, excelente orientação, sendo um exemplo de humildade, solidariedade e companheirismo. Serei eternamente grata por sua amizade e confiança.

À professora Vilma Lima pela excelente co-orientação, amizade e disciplina. Serei eternamente grata por sua dedicação e paciência.

As estudantes de mestrado Iracema Matos Melo e Ana Patrícia Souza Lima pelo apoio em alguns experimentos

As professoras Helena Serra Azul e Janaína Serra Azul pela disponibilidade de seus laboratórios e bolsistas pela boa recepção e dedicação nos estudos histológicos.

Ao Dr. Dalgimar Beserra de Menezes pelas análises histopatológicas

A estudante de doutorado Roberta Jeane Bezerra Jorge pelo apoio nas imagens das lâminas

À professora Nádia Accioly pela recepção e orientação em seu laboratório no Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará

A estudante de mestrado Dânia Bandeira Lima pelo apoio nos experimentos no Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará que foram fundamentais em minha formação.

Aos meus amigos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará

Em especial aos amigos Ticiane Abreu, Natássia Ribeiro, Ticiane Lima, Márjory Holanda, Gabriela Almeida, Ana Luiza Gomes, Bruno Pedrosa, Ygor Raphael, Ismael Nilo Lino, Ianna Wivianne, Edfranck Vanderlei, José Ariévilo Gurgel, Janne e Willame.

Aos meus familiares (mãe, irmã, sobrinho, tios, primos)

A todos meus amigos pelo companheirismo e presteza.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	X
<b>ABSTRACT</b>	XI
<b>CAPITULO 1</b>	
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	XXIII
<b>LISTA DE TABELAS</b>	XVII
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</b>	XXIII
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	20
1.1 Algas marinhas	20
1.2 Lectinas de algas marinhas	21
1.3 Polissacarídeos de algas marinhas	22
1.4 Atividades biológicas de lectinas e polissacarídeos	24
<b>2. OBJETIVOS</b>	27
2.1 Geral	27
2.2 Específicos	27
<b>3. MATERIAIS</b>	28
3.1 Algas marinhas	28
3.2 Células sanguíneas	28
3.3 Animais	28
3.4 Bactérias	28
3.5 Fármacos, reagentes e meios de cultura	29
<b>4. METODOLOGIA</b>	31
4.1 Obtenção da lectina da alga marinha vermelha <i>P. capillacea</i>	31
4.2 Atividade hemaglutinante e inibição da atividade hemaglutinante	31
4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida da P <sub>c</sub> L	32

4.4	Obtenção dos polissacarídeos sulfatados totais da alga marinha vermelha <i>Solieria filiformis</i>	33
4.5	Avaliação de parâmetros de toxicidade aguda por dose repetida de PcL e SfP	36
4.5.1	Dosagem das transaminases glutâmico oxalacética (TGO/AST) e glutâmico pirúvica (TGP/ALP)	36
4.5.2	Dosagem de fosfatase alcalina	37
4.5.3	Dosagem de ureia	38
4.6	Análise histológica do ensaio de toxicidade	38
4.7	Ensaio de inflamação	39
4.7.1	Ensaio do edema de pata induzido por $\lambda$ -carragenana (Cg)	39
4.7.2	Dosagem de mieloperoxidase (MPO)	40
4.8	Atividade antimicrobiana de PcL e SfP	41
4.8.1	Determinação da CIM (concentração inibitória mínima) de PcL	42
4.9	Utilização dos SfP como fonte de carbono	43
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
5.1	Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante de PcL	44
5.2	Eletroforese de PcL em gel de poliacrilamida	44
5.3	Avaliação sistêmica da toxicidade aguda de PcL e SfP	47
5.4	Análise histológica	52
5.5	Ensaio do edema de pata induzido por $\lambda$ -carragenana (Cg)	63
5.6	Atividade da mieloperoxidase (MPO)	64
5.7	Ensaio da atividade antimicrobiana da PcL e dos SfP	69
6.	CONCLUSÃO	74
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
	ANEXO 1	

<b>CAPÍTULO 2</b>		
	<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>LXXXIII</b>
	<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>LXXXVI</b>
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</b>	<b>LXXXVII</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>89</b>
<b>1.1</b>	<b>A importância terapêutica de compostos bioativos</b>	<b>89</b>
<b>1.2</b>	<b>Mecanismos envolvidos na cicatrização</b>	<b>91</b>
<b>1.3</b>	<b>Inflamação</b>	<b>93</b>
<b>1.4</b>	<b>Pesquisa de novos produtos para a inflamação e regeneração de tecidos</b>	<b>94</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>97</b>
<b>2.1</b>	<b>Geral</b>	<b>97</b>
<b>2.2</b>	<b>Específicos</b>	<b>97</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS</b>	<b>98</b>
<b>3.1</b>	<b>Algas marinhas</b>	<b>98</b>
<b>3.2</b>	<b>Animais</b>	<b>98</b>
<b>3.3</b>	<b>Fármacos, reagentes e meios de cultura</b>	<b>98</b>
<b>4.</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>100</b>
<b>4.1</b>	<b>Preparação de géis</b>	<b>100</b>
<b>4.2</b>	<b>Propriedades reológicas dos géis</b>	<b>102</b>
<b>4.3</b>	<b>Contagem de micro-organismos viáveis</b>	<b>102</b>
<b>4.4</b>	<b>Aplicação de géis em feridas limpas induzidas em ratos através de trauma mecânico</b>	<b>103</b>
<b>4.5</b>	<b>Análise macroscópica das feridas</b>	<b>106</b>
<b>4.6</b>	<b>Dosagem de MPO de tecidos obtidos do modelo das feridas</b>	<b>106</b>
<b>4.7</b>	<b>Análise histológica das feridas</b>	<b>106</b>

<b>4.8</b>	<b>Análise estatística</b>	<b>107</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>108</b>
<b>5.1</b>	<b>Propriedades reológicas dos géis</b>	<b>108</b>
<b>5.2</b>	<b>Qualidade microbiológica dos géis</b>	<b>111</b>
<b>5.3</b>	<b>Aplicação e análises macroscópicas das feridas</b>	<b>113</b>
<b>5.4</b>	<b>Dosagem de MPO</b>	<b>120</b>
<b>5.5</b>	<b>Análise histológica</b>	<b>122</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>129</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>130</b>
	<b>ANEXO 2</b>	

## RESUMO

Com base na necessidade de obter novas formulações mais eficientes e diante das propriedades apresentadas pelas moléculas oriundas de algas marinhas, acredita-se que estas possam ser eficazes no processo de cicatrização. A lectina da alga marinha vermelha *Pterocladia capillacea* (PcL) e os polissacarídeos da alga vermelha *Solieria filiformis* (SfP) inicialmente foram analisados em ensaio de toxicidade. PcL foi aplicada no ensaio do edema de pata seguido da dosagem de mieloperoxidase (MPO). Avaliou-se o efeito da lectina da alga *Pterocladia capillacea* (PcL) e os polissacarídeos das algas *Solieria filiformis* (SfP) na cicatrização de feridas induzidas em ratos. Ambas as moléculas foram submetidas a ensaios microbiológicos e analisadas quanto ao efeito no processo de cicatrização em feridas limpas induzidas no dorso de ratos. SfP foi utilizado como um possível veículo para a administração de PcL e comparado ao Carbopol 940 (C). Os géis (0,9%) foram submetidos a análise reológica e então aplicados nas lesões durante um período de tratamento de 10 (dez) dias, utilizando kollagenase<sup>®</sup> como controle. O processo de cicatrização foi avaliado quanto ao tamanho das feridas, dosagem de MPO e análise histológica. PcL e SfP não demonstraram toxicidade quanto aos parâmetros de peso corpóreo, órgãos e dosagens bioquímicas. Entretanto a análise histológica mostrou pequenas alterações no fígado e rim. PcL (1, 3 e 9 mg/kg, i.v.) reduziu o edema induzido por carragenana e quando administrada com seu inibidor mucina não foi possível verificar a redução do edema o qual foi confirmado pela dosagem de MPO. As duas moléculas foram aplicadas em ensaios microbiológicos e não inibiram o crescimento de nenhum micro-organismo testado, os quais também não foram capazes de utilizar SfP como fonte de carbono. A análise reológica mostrou que os SfP utilizados na formulação dos géis (PcL+SfP e SfP) apresentaram a característica de um pseudoplástico. A análise macroscópica das feridas mostrou uma redução da área da lesão nos animais tratados com PcL+SfP e PcL+C (53,5 e 60%, respectivamente) no sexto dia de administração. Na análise histológica, não foi observado infiltrado inflamatório acentuado nos tecidos obtidos até o 4º dia da administração dos géis (PcL+SfP e PcL+C) e Kollagenase<sup>®</sup> (controle positivo). No 6º dia, os animais não tratados e os tratados apenas com SfP mostraram infiltrado inflamatório. A dosagem de MPO demonstrou redução no processo inflamatório nas amostras contendo PcL, cujo resultado corrobora com a análise histológica. Em conclusão, PcL auxiliou no reparo de feridas, sugerindo seu uso futuro como uma possível ferramenta para o tratamento de lesões. O papel biológico e farmacológico das lectinas e polissacarídeos de algas marinhas faz parte de uma área de estudos ainda pouco explorada, onde muito conhecimento deverá ser investido visto que estas biomoléculas podem ser promissoras para a indústria farmacêutica.

Palavras-chave: Lectinas, Polissacarídeos, Cicatrização

## ABSTRACT

Based on the need for new formulations that are more efficient and on the properties provided by molecules derived from seaweed, it is believed that these can be effective in healing process. The lectin from the red seaweed *Pterocladia capillacea* (PcL) and the polysaccharides of red algae *Solieria filiformis* (SfP) were initially analyzed in toxicity testing. PcL was applied to the paw edema test followed by measurement of myeloperoxidase (MPO). We evaluated the effect of the seaweed *Pterocladia capillacea* lectin (PcL) and algal polysaccharides *Solieria filiformis* (SfP) in healing wounds in rats induced. Both molecules were submitted to microbiological tests and assayed for the effect on wound healing in wounds clean induced on the back of rats. SfP was used as a possible vehicle for the administration of PcL and compared to Carbopol 940 (C). The gels (0.9%) were analyzed rheological and then applied to the lesions during a treatment period of 10 days, using kollagenase® as control. The healing process was evaluated on the size of the wounds, levels of MPO and histological analysis. The molecule SfP and PcL is not toxic for the parameters of body weight, organ and biochemical measurements. However, the histological analysis showed minor changes in liver and kidney. PcL (1, 3 and 9 mg / kg, i.v) reduced the edema induced by carrageenan and its inhibitor when administered with mucin was not possible to check the reduction of edema which was confirmed by measurement of MPO. The two molecules were used in microbiological assays and not inhibit growth of any microorganism tested and unable to use SfP as carbon source. The rheological analysis showed that the SfP used in the formulation of the gels (PcL+SfP and SfP) had the characteristic of a pseudoplastic. Macroscopic analysis of wounds showed a reduction in lesion area in the animals treated with PCL, PCL+SfP, PCL+C (53.5 and 60% respectively) on the sixth day of administration. In histological analysis, there was no severe inflammatory infiltrate in the tissues obtained until 4th day of administration of the gels (PcL and PcL+SfP, PcL+C) and Kollagenase® (positive control). On day 6, the untreated animals and those treated only with SfP showed inflammatory infiltrate. The measurement of MPO showed a reduction in the inflammatory process in the samples containing PcL, whose results corroborate the histological analysis. In conclusion, PcL aid in wound repair, suggesting its use as a possible future tool for the treatment of lesions. The biological and pharmacological role of lectins and polysaccharides of seaweed is part of a study area little explored, where a lot of knowledge should be invested since these biomolecules can be promising for the pharmaceutical industry.

Keywords: Lectins, Polysaccharides, Healing



# **CAPÍTULO 1**

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquema de obtenção da lectina de *Pterocladia capillacea* (PcL). 34  
PI=Pico 1; PII=Pico 2.
- Figura 2-. Esquema de obtenção dos polissacarídeos de *Solieria filiformis* (SfP) 35
- Figura 3 – Obtenção da PcL por cromatografia de troca iônica DEAE-celulose 46  
(3A) e avaliação da pureza da PcL em condições nativa (PAGE) (3B) e em  
condição desnaturante (PAGE-SDS) na ausência e presença do agente redutor  
 $\beta$ -mercaptoetanol (3C). Marcadores de massas moleculares padrões (MM) de:  
Albumina sérica bovina 66,0 kDa; Ovoalbumina 45,0 kDa; Gliceraldeído-3-  
Fosfato Desidrogenase 36,0; Tripsinogênio 29,0 ; inibidor de tripsina 20,1 kDa  
(Sigma-Aldrich®, USA). M=mucina, S/ $\beta$ = sem  $\beta$ -mercaptoetanol e C/ $\beta$ =com  $\beta$ -  
mercaptoetanol.
- Figura 4- Fotomicrografia de uma secção de 4  $\mu$ m de espessura obtidos do 54  
coração (4A e 4B), fígado (4C e 4D) e rim (4E e 4F) de camundongos após a  
administração de salina durante um período de 14 dias através do ensaio de  
toxicidade por dose repetida onde não foi verificada nenhuma alteração. A seta  
branca indica a veia centrolobular. Coloração HE, aumento de 400 X.
- Figura 5- Fotomicrografia de uma secção longitudinal (5A) e transversal 5B) de 55  
4  $\mu$ m de espessura obtidos do coração de camundongos após a administração  
de PcL (9 mg/kg) durante um período de 14 dias através do ensaio de  
toxicidade por dose repetida onde não foi verificada nenhuma alteração nas  
fibras musculares estriadas cardíacas. Coloração HE, aumento de 400 X.
- Figura 6- Fotomicrografia de uma secção transversal de 4  $\mu$ m de espessura 56  
obtidos do fígado de camundongos após a administração de PcL (9 mg/kg)  
durante um período de 14 dias através do ensaio de toxicidade por dose  
repetida verificando degeneração turva de borda e discreta degeneração macro  
e micro vacuolar (6A). Nota-se que os hepatócitos estão mais claros e maiores

(seta laranja) que os demais da periferia (6B). Coloração HE, aumento de 400X.

Figura 7- Fotomicrografia de uma secção transversal de 4 µm de espessura obtidos do rim de camundongos após a administração de PcL (9 mg/kg) durante um período de 14 dias através do ensaio de toxicidade por dose repetida. As imagens mostram degeneração macro e micro vacuolar com a formação de vacúolos citoplasmáticos-microvacuolar. Observa-se vários vacúolos pequenos e um pouco maior como indicado nas setas brancas (7A). Verifica-se degeneração tubular subcapsular (seta laranja). As setas brancas mostram capsula renal (normal) de tecido conjuntivo frouxo (7B). Coloração HE, aumento de 400 X. 57

Figura 8- Fotomicrografia de uma secção transversal de 4µm de espessura obtidos do rim de camundongos após a administração de PcL (9 mg/kg) durante um período de 14 dias através do ensaio de toxicidade por dose repetida. Observa-se Formação de cilindros tubulares hialinos (Córtex e medula) mais presente em região medular estando menos presente em região cortical. Observa-se processo degenerativo tubular mostrando a formação de cilindros hialinos em túbulos renais (setas vermelhas) (8A). Verificam-se focos de hemorragia difusos pelo Córtex (setas verdes) e Medula. A seta branca mostra um túbulo renal normal e a amarela indica a capsula renal (8B). Coloração HE, aumento de 400 X. 58

Figura 9 - Fotomicrografia de uma secção longitudinal (9A) e transversal (9B) de 4 µm de espessura obtidos do coração de camundongos após a administração de SfP (9 mg/kg). Observam-se fibras musculares estriadas cardíacas (9A e 9B), onde não foram observadas alterações. Coloração HE, aumento de 400 X. 59

Figura 10- Fotomicrografia de uma secção transversal de 4µm de espessura obtidos do fígado de camundongos após a administração de SfP (9 mg/kg) Observa-se leve infiltrado mononuclear multifocal (setas branca) e discreta 60

dilatação dos sinusóides pericentrolobulares (observado somente na administração oral)\*\*\* (setas laranjas). Verifica-se leve hiperplasia das células de células de Kupffer (observado somente na administração oral)\*\*\* (setas roxa)(10A.). Verifica-se hepatócitos subcapsulares com degeneração turva (setas laranja). A cápsula está indicada pela seta roxa (10B). Coloração HE, aumento de 400 X.

Figura 11- Fotomicrografia de uma secção transversal de 4 µm de espessura obtidos do fígado de camundongos após a administração de SfP (9 mg/kg) 61  
Observa-se hepatócitos Pericentrolobulares com degeneração turva (setas roxa) Degeneração turva em região pericentrolobular (em volta da veia centrolobular). Notar que estes hepatócitos estão mais claros e maiores (setas roxa) que os demais da periferia (11A) Verifica-se leve degeneração tubular subcapsular e leve processo degenerativo tubular em região subcapsular (seta verdes) As setas vermelhas mostram a capsula renal (normal) de tecido conjuntivo frouxo. (11B) Coloração HE, aumento de 400 X.

Figura 12- Fotomicrografia de uma secção transversal de 4µm de espessura obtidos do rim de camundongos após a administração de SfP (9 mg/kg). 62  
Observa-se leve processo degenerativo tubular em região subcapsular (seta verdes) Coloração HE, aumento de 400 X.

Figura 13 - Efeitos da PcL em edema de pata induzido por carragenana. Antes 65  
de receber uma injeção de carragenana (300 mg/cav; intra plantar), os ratos receberam solução salina ou PcL (1, 3 ou 9 mg/kg, i.v). Dexametasona (1 mg/kg) foi injetada via s.c. Outro grupo recebeu apenas salina (i.v) sem Cg. Cg ( $\lambda$ -carragenana); Dexa (Dexametasona); PcL (Lectina da alga marinha *Pterocladia capillacea*); M (Mucina). Os dados são expressos em média  $\pm$  S.E.M. de seis ratos para cada grupo. \* p <0,05 indica diferença significativa do grupo Cg (ANOVA, teste de Bonferroni).

Figura 14 - Efeitos da PcL com mucina no edema de pata induzido por 66  
carragenana. Antes de receber uma injeção de carragenana (300 mg/cav; intra plantar), os ratos receberam PcL (9 mg/kg, i.v) com 1,25 mg/kg e 3 mucina mg/kg. Dexametasona (1 mg/kg) foi injetado via s.c. Outro grupo recebeu apenas salina (i.v) sem Cg. Cg ( $\lambda$ -carragenana); Dexa (Dexametasona); PcL

(Lectina da alga marinha *Pterocladia capillacea*); M (Mucina). Os dados são expressos em média  $\pm$  S.E.M. de seis ratos para cada grupo. \*  $p < 0,05$  indica diferença significativa do grupo Cg (ANOVA, teste de Bonferroni).

Figura 15 - Área sob a curva do teste de edema de pata. O percentual representa o tamanho da área que fica abaixo da curva. Cg representa a maior área correspondente a 100%. Cg ( $\lambda$ -carragenana); Dexa (Dexametasona); PcL (Lectina da alga marinha *Pterocladia capillacea*); M (Mucina). Os dados são expressos em média  $\pm$  S.E.M. de seis ratos para cada grupo. \*  $P < 0,05$  indica diferença significativa do grupo Cg (ANOVA, teste de Bonferroni). 67

Figura 16 – Atividade da MPO (mieloperoxidase) em tecido obtido a partir de pata de ratos do teste do edema de pata. Atividade de mieloperoxidase (MPO) no sobrenadante de homogenatos de secções da pata onde foi injetada carragenana, PcL (1, 3 e 9 mg/kg), 9 mg/kg PcL com 1,25 e 3 mg/mL de mucina, dexametasona ou salina estéril, expressa como unidades de atividade de MPO por mg de tecido. Cg ( $\lambda$ -carragenana); Dexa (Dexametasona); PcL (Lectina da alga marinha *Pterocladia capillacea*); M (Mucina). Os dados são expressos em média  $\pm$  S.E.M. de seis ratos para cada grupo. \*  $P < 0,05$  indica diferença significativa do grupo Cg (ANOVA, teste de Bonferroni). 68

Figura 17 - Ensaio em meio líquido utilizando diferentes diluições de PcL (25 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ ). Como controle positivo para as espécies de bactérias foi utilizado o antibiótico amicacina e para a espécie *Candida albicans* o cetoconazol. (\* # representam  $p < 0,05$ ). 72

Figura 18 – Fotografia ilustrativa do meio sólido utilizando os polissacarídeos como uma possível fonte de carbono para o crescimento de micro-organismos. 73

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Inibição da atividade hemaglutinante da lectina da alga marinha *Pterocladia capillacea* (PcL) por mucina e SfP 45
- Tabela 2- Avaliação da toxicidade aguda da lectina PcL de *Pterocladia capillacea* administrada por via intra peritoneal. 48
- Tabela 3- Avaliação da toxicidade aguda da lectina PcL de *Pterocladia capillacea* administrada por via oral. 49
- Tabela 4- Avaliação da toxicidade aguda do polissacarídeo sulfatado SfP de *Solieria filiformis* administrado por via intra peritoneal 50
- Tabela 5- Avaliação da toxicidade aguda do polissacarídeo sulfatado SfP de *Solieria filiformis* administrado por via oral. 51
- Tabela 6- Atividade antimicrobiana da PcL e dos SfP sobre cepas microbianas padrão (cepas ATCC), determinada pela técnica de difusão em agar 71

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALT- Alanina aminotransferase  
ANOVA- Análise de variância  
AST- Aspartato aminotransferase  
ATCC – American Type Culture Collection  
ATP- Adenosina trifosfato  
BSA- Albumina Sérica Bovina  
C-Carbopol 940  
°C- Grau centígrado  
CEPA – Comitê de ética para pesquisa animal  
CIM – Concentração inibitória mínima  
Cg- Carragenana  
CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute  
COX-1- Cicloxigenase 1  
COX-2- Cicloxigenase 2  
DEAE- Dietilaminoetil  
DEXA- Dexametasona  
EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético  
E.P.M- Erro padrão da média  
HE- Hematoxilina-Eosina  
Ì- iota carragenana  
i.v- intravenosa  
i.p- intraperitoneal  
kDa- Kilodaltons  
K- Kappa carragenana  
min- minuto

mg- miligramas

mL- mililitros

MPO - Mieloperoxidase

nm- nanômetros

NO – oxido nítrico

PcL- Lectina da Alga Marinha Vermelha *Pterocladia capillacea*

PO- Pós Operatório

s- segundos

s.c- subcutânea

SfP – Polissacarídeos sulfatados totais da alga marinha *Solieria filiformis*

SDS- Dodecil sulfato de sódio

TEMED- N,N,N',N',tetrametiletilenodiamino

TGO-Transaminase Glutâmica Oxalacética

TGP- Transaminase Glutâmica Pirúvica

TRIS- Hidroximetil aminometano

U.H- Unidade de hemaglutinação

UFC – Unidades formadoras de colônias

v.o – via oral

μL- Microlitros

λ- lamda carragenana

%- Percentagem



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Algas marinhas

As macroalgas marinhas constituem um grupo heterogêneo de vegetais encontrados abundantemente em todos os ecossistemas (Sousa et al., 2008). Elas têm recebido merecido destaque, pois são fonte de moléculas bioativas que são classificadas em três principais classes; algas verdes (Chlorophyta), pardas (Phaeophyta) e vermelhas (Rhodophyta) (Garson, 1989).

Além de sua importância ecológica, as algas são consideradas excelentes fontes de proteínas e carboidratos, possuindo baixos teores de lipídios (Mabeau et al., 1992) e são fontes de polissacarídeos utilizados pela indústria (Cunha et al., 2009).

Na medicina popular, as algas têm sido utilizadas para variados fins terapêuticos, como no eczema, cálculos biliares, problemas renais, psoríase, asma, arteriosclerose, doenças cardíacas, úlceras e câncer (Raghavendran et al., 2006). Além disso, o emprego de algas marinhas para fins farmacêuticos, revelou importantes produtos químicos para a descoberta de novos agentes (Cardozo et al., 2007).

Segundo Guven *et al.* (2010) a estrutura química de moléculas de algas tem interessado muitos investigadores, a fim de desenvolver novos fármacos, pois estas apresentam compostos com grupos funcionais característicos. Com esta perspectiva, as algas marinhas têm se tornado o foco de interesse na pesquisa de compostos que apresentem propriedades farmacológicas.

Um foco especial tem sido atribuído ao cultivo de algumas espécies de algas marinhas para fins comerciais e lucrativos. Sabe-se que as algas vermelhas e pardas fornecem os polissacarídeos mais utilizados pela indústria. Assim, transformar biodiversidade em desenvolvimento, através do seu uso sustentado e de seus recursos derivados, é o grande desafio.

## 1.2 Lectinas de algas marinhas

Entre as diferentes classes de compostos com notável atividade bioquímica destacam-se as lectinas que são proteínas de ligação a carboidratos, encontradas em uma ampla gama de organismos. Esta ligação a carboidrato torna-se interessante para uma diversidade de aplicações em estudos imunológicos (Cardozo et al., 2004).

As lectinas segundo Peumans & Van Damme (1995), são proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico capaz de ligar-se reversivelmente a mono- ou oligossacarídeos específicos e foram primeiramente descritas por Stillmark (1888), o qual estudou e isolou uma lectina tóxica obtida de sementes de mamona (*Ricinus communis*), subsequentemente denominada de ricina (Peumans & Van Damme, 1998).

No Brasil, os estudos com lectinas de algas marinhas tiveram início com Ainouz & Sampaio (1991) que detectaram a presença dessas hemaglutininas nas algas marinhas da costa cearense. Das espécies de algas estudadas cerca de 65% foram capazes de aglutinar pelo menos um tipo dos eritrócitos tripsinizados testados. Dentre os eritrócitos utilizados (carneiro, coelho, galinha, cabra, boi e do sistema ABO), os de coelho e galinha foram os mais susceptíveis à aglutinação, enquanto que os de cabra não apresentaram resultados positivos.

Dando continuidade aos estudos de lectinas de algas marinhas, Freitas *et al.* (1997), estudaram a ocorrência de hemaglutininas em extratos de 30 espécies do litoral cearense utilizando eritrócitos nativos de coelho, galinha, carneiro e humanos do sistema ABO e tratados enzimaticamente. Posteriormente, Benevides *et al.* (1999), estudando a variação sazonal através da atividade hemaglutinante em duas espécies de algas marinhas (*Gracilaria domingensis* e *Gelidium pusillum*), verificaram uma variação na presença da atividade hemaglutinante de acordo com o período do ano, sugerindo assim cautela durante os trabalhos de levantamento da atividade hemaglutinante em algas marinhas.

Diante do número de lectinas isoladas, faz-se necessário avaliar essas biomoléculas, as quais podem ser utilizadas para as mais variadas aplicações biológicas.

### 1.3 Polissacarídeos de algas marinhas

Inúmeras são as classes de compostos químicos que podem ser extraídos das nossas espécies vegetais. Uma delas é representada pelos polissacarídeos (Cunha et al., 2009).

Dentre os polissacarídeos de algas vermelhas de interesse econômico destacam-se as galactanas (agaranas e carragenanas) e alginatos. As agaranas estão presentes na matriz intercelular em numerosas espécies de algas vermelhas, tendo função estrutural no tecido algal. Espécies produtoras de ágar, chamadas agarófitas, são encontradas nas famílias Gracilariaceae, Gelidiaceae, Phylloporaceae e Cearamiaceae (Stanley, 1995).

Segundo Stephanie *et al.* (2010), polissacarídeos sulfatados tais como as carragenanas podem ser isolados da parede celular de algumas algas vermelhas, cujo valor econômico é alto devido às suas propriedades gelificantes, que as tornam úteis na indústria de alimentos, cosméticos e farmacêutica.

As carragenanas são polímeros lineares constituídas com cerca de 25.000 derivados de galactose de estruturas regulares, porém imprecisas dependendo da fonte e das condições de extração (Falshaw et al., 2001; Dunstan et al., 2001).

Dentre as carragenanas existentes, as mais empregadas comercialmente são:  $\kappa$  (Kappa),  $\iota$  (Iota) e  $\lambda$  (Lambda), onde elas apresentam teores de sulfatação variando entre 22 e 38% (w/w) e massa molecular entre 400 e 600 kDa (Van De Velde et al., 2002). Um exemplo dessas galactanas que pode ser aplicada na indústria alimentícia é a carragenana obtida da alga marinha vermelha *Solieria filiformes* (Murano et al., 1997).

Segundo Holanda (2007), esta carragenana mostrou em sistemas lácteos interação com proteínas do leite aumentando drasticamente a

viscosidade das soluções lácteas em comparação quando presente em solução aquosa. Além disso, Rodrigues *et al.* (2010) afirmaram que a alga marinha vermelha *Solieria filiformis* possui uma iota-carragenana como principal polissacarídeo da parede celular, a qual demonstra baixa atividade anticoagulante. Entretanto, Araújo *et al.* (2011) demonstraram que os polissacarídeos sulfatados totais de *Solieria filiformis* são uma mistura de kappa e iota-carragenana.

Valenta *et al.* (2004) afirmaram que as carragenanas têm sido frequentemente utilizadas como aditivo na alimentação e, têm apresentado outras propriedades como adesiva na pele a qual pode ser um benefício para a aplicação tópica. Segundo Cunha *et al.* (2009), elas podem ter uma variedade de aplicações, destacando-se na liberação de fármacos e imobilização de células. Além disso, elas são consideradas potenciais agentes imunoestimuladores ao serem administradas por via local ou sistêmica e podem aumentar a imunidade natural de pacientes portadores de câncer ou infecção.

As carragenanas podem apresentar variações em suas estruturas que são originadas principalmente pelo número e disposição de grupos sulfato, pela ocorrência de carboidratos residuais como xilose, glucose, ácido urônico e de seus substituintes como ésteres metil e grupos piruvatos (Van De Velde *et al.*, 2002). A  $\lambda$ -carragenana, por exemplo, não forma gel, pois suas moléculas contêm na sua estrutura mais grupo éster sulfato quando comparada às outras carragenanas (Wang *et al.*, 2005).

Em soluções aquosas, iota-carragenanas produzem géis termorreversíveis, onde a cadeia simples forma dupla helice e, conseqüentemente verifica-se a formação de géis. Esse mecanismo de gelificação é favorecido pela presença de cátions multivalentes (Yuguchi, 2002). Outros polissacarídeos de interesse para a indústria são os alginatos que estão presentes nas algas pardas como polissacarídeos perfazendo 40% do peso seco presente na matriz intercelular como um gel contendo íons: sódio, cálcio, magnésio, estrôncio e bário. Ocorrem como componentes estruturais de algas pardas, e como polissacarídeos capsulares de bactérias

terrestres como *Azotobacter vinelandii*, *A. crococcum* e em diversas espécies de *Pseudomonas* (Moe, 1995).

#### **1.4 Atividades biológicas de lectinas e polissacarídeos**

Apesar do conhecimento de que lectinas de algas possuem atividade antiviral, antifúngica, antibacteriana, hemolítica e tóxica, pouco se sabe sobre o seu envolvimento nas funções fisiológicas (Viana et al., 2002).

De fato, estas proteínas ligantes a carboidratos medeiam o reconhecimento celular e servem como ferramentas no estudo de glicoconjugados. Essa característica de ligação a carboidratos específicos permite que tais biomoléculas possam ser utilizadas para tipar grupos sanguíneos e como marcadores celulares com o propósito de diagnosticar agentes infecciosos (vírus, bactérias, fungos e parasitas) (Rudiger & Gabius, 2001). As lectinas podem ainda, ser utilizadas como agentes terapêuticos alvos para diferenciar partes do intestino ou até diferenciar células devido à propriedade de aumentar a aderência do epitélio intestinal e intensificar a penetração de fármacos (Chowdary & Rao, 2004). Além disso, elas podem ser empregadas como bioadesivos que se ligam à superfície da mucosa, dentre outras utilidades farmacêuticas (Jepson et al., 2004).

Lectinas são ainda reconhecidas por contribuírem de forma dinâmica no reconhecimento de células tumorais, localização e adesão celular, estimulação mitogênica, citotoxicidade e apoptose (Wang et al., 2000).

Segundo Cardozo *et al.* (2007), existem poucos estudos sobre o isolamento, caracterização e propriedades biológicas de lectinas de algas, tornando-se um campo aberto para novas pesquisas.

A lectina presente na alga marinha vermelha *Solieria filiformes*, isolada por Benevides *et al.* (1996), mostrou efeito sobre o crescimento de eubactérias patogênicas (Holanda et al., 2005), bem como sobre o desenvolvimento de carrapatos bovinos (*Boophilus microplus*) (Nascimento, 2003). Outra lectina que também apresentou atividade carrapaticida foi obtida da alga marinha vermelha *Gracilaria córnea*. Esta proteína foi capaz de reduzir a massa

corpórea dos carrapatos após o período de oviposição, o peso dos ovos e o tempo de sobrevivência das larvas (Lima et al., 2005).

Lectinas isoladas das algas marinhas vermelhas *Amansia multifida*, *B. seaforthii*, *B. triquetrum* e *Gracilaria caudata*, específicas para oligossacarídeos complexos presentes em glicoproteínas, foram estudadas quanto aos seus efeitos sobre a indução de migração de neutrófilos quando administradas na cavidade peritoneal e em bolha de ar induzida no dorso de ratos ou camundongos. Os resultados obtidos demonstraram que as referidas lectinas foram capazes de induzir, *in vivo* e *in vitro* e, de maneira dose dependente a migração de neutrófilos (Neves et al., 2001).

Algumas espécies de algas marinhas produzem substâncias antibióticas capazes de inibir o crescimento de bactérias, vírus e fungos. Como exemplo, destaca-se o extrato protéico total da espécie de alga marinha vermelha *Pterocladia capillacea* que foi capaz de inibir o crescimento de *Vibrio vulnificus* revelando formação de zonas de inibição na superfície do ágar (Liao et al., 2003). Uma lectina obtida dessa mesma espécie de alga apresentou propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória com ação periférica nas doses de 0,9; 8,1 ou 72,9 mg/kg;i.v. (Silva et al., 2010). Com base nessas mesmas propriedades a lectina isolada da alga verde *Caulerpa cupressoides* também foi capaz de reduzir a dor e inflamação em ensaios clássicos (Vanderlei et al 2010).

A lectina da alga *Amansia multifida* também foi avaliada quanto sua ação antinociceptiva em camundongos por Neves *et al.* (2007) através dos ensaios de contorções abdominais induzidas por ácido acético e teste da placa quente. Neste estudo, constatou-se que a lectina foi capaz de reduzir o número das contorções abdominais e reduzir o tempo de lambertura da pata (teste da placa quente), cujo efeito foi revertido por naloxona indicando o envolvimento do sistema opióide. Estes resultados levaram os autores a sugerir que a lectina da alga *A. multifida* apresenta efeito antinociceptivo de ação central e periférica. De maneira semelhante, Bitencourt *et al.* (2008) demonstraram que a lectina da alga *Hypnea cervicornis* nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg também foi capaz de

inibir as contorções abdominais em camundongos (62%, 42% e 72%, respectivamente).

Além das lectinas, os polissacarídeos de algas marinhas também têm apresentado potenciais efeitos biológicos na medicina, demonstrando atividades antitumorais, antivirais, anticoagulante, dentre outras. Como exemplo, destaca-se a atividade anticoagulante observada para a galactana da alga marinha vermelha *Gelidium crinale* (Pereira et al., 2005). Além desta atividade, foi demonstrado que polissacarídeos sulfatados totais das espécies de algas *Bryothamnion seaforthii* e *B. triquetrum* apresentaram atividade antinociceptiva (Viana et al., 2002). Em estudos realizados por Araújo et al. (2011) utilizando uma fração polissacarídica sulfatada da alga *S. filiformis*, obtida por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose, apresentaram efeito antinociceptivo de ação periférica em ensaios clássicos de contorções abdominais, formalina e placa quente.

Em estudos relatados por Vandelei et al. (2011) foi demonstrado um efeito antiinflamatório de polissacarídeos sulfatados obtidos da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae* cuja dose de 10 mg/kg foi capaz de reduzir o número de leucócitos na cavidade peritoneal. Um efeito anti-inflamatório, ocasionado por uma redução no número de leucócitos (10 mg/kg e 25 mg/kg) também foi demonstrado para fucanas sulfatadas obtidas da alga *Padina gymnospora* (Marques et al., 2012).

Uma outra atividade que tem sido estudada com polissacarídeos obtidos de algas é a atividade antitumoral. Como por exemplo, Fernández et al. (1989) demonstraram que o ágar da alga *Gracilaria dominguensis* foi capaz de inibir o desenvolvimento de carcinoma em ratos. De maneira semelhante, Zhou et al. (2005), demonstraram que uma carragenana obtida da alga *Chondrus ocellatus* também apresentou atividade antitumoral.

Portanto, o papel biológico das lectinas e polissacarídeos de algas marinhas faz parte de uma área de estudos ainda pouco explorada, onde muito conhecimento deverá ser investido visto que estas biomoléculas podem ser consideradas fontes promissoras para a indústria farmacêutica.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar o grau de toxicidade da lectina da alga marinha vermelha *Pterocladia capillacea* (PcL) e dos polissacarídeos sulfatados totais (SfP) da alga marinha vermelha *Solieria filiformes*, a atividade anti-inflamatória da PcL e atividade antimicrobiana da PcL e dos SfP.

### 2.2 Específicos

- Extrair as proteínas totais e obter a PcL por cromatografia de troca iônica em gel de DEAE-celulose;
- Avaliar o grau de pureza da PcL por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativa, desnaturante e redutora;
- Extrair os SfP ;
- Realizar ensaios de inibição da atividade hemaglutinante da PcL pela glicoproteína mucina e SfP;
- Avaliar a toxicidade da PcL e SfP por doses repetidas através dos parâmetros bioquímicos e histológicos;
- Avaliar o efeito anti-inflamatório da PcL utilizando os ensaios de edema de pata e da mieloperoxidase (MPO);
- Avaliar a atividade antimicrobiana da PcL e dos SfP sobre o desenvolvimento de micro-organismos em meios sólido e líquido.



### **3. MATERIAIS**

#### **3.1 Algas marinhas**

A alga marinha vermelha *P. capilacea* foi coletada em rochas do meso-litoral, durante maré baixa (-0,2 a 2,0 m) na praia do Pacheco, município de Caucaia-CE e a alga marinha vermelha *S. filiformes* foi obtida de maricultura experimental situada a 200 m da costa na praia de Flexeiras, no município de Trairi-CE.

#### **3.2 Células sanguíneas**

Sangue de coelho albino foram obtidas de animais adultos e saudáveis, mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

#### **3.3 Animais**

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, pesando entre 20 e 25 g, e ratos *Wistar* machos, pesando entre 180 e 200 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e mantidos em salas com temperatura ambiente controlada e livre acesso à ração e à água no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Os ensaios com os animais seguiram os padrões exigidos de ética e biossegurança sendo aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) desta instituição N° 100/09 (Anexo 1).

#### **3.4 Bactérias**

Foram utilizadas as seguintes cepas padrão: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa*

ATCC 9027, *Salmonella cholerae-suis* ATCC 10708 e *Candida albicans* ATCC 10231.

### 3.5 Fármacos, reagentes e meios de cultura

Reagentes e meios de cultura utilizados para o desenvolvimento deste trabalho foram:

- Acrilamida (Sigma-Aldrich®, USA);
- Ágar (Merck®);
- Ágar Muller Hinton (Merck®);
- Ágar Sabouraud-dextrose (Merck®);
- Agarose (Bioagency);
- Albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich®, USA);
- Ácido acético (Vetec);
- Álcool comercial (Santa Cruz);
- Amicacina (Sigma-Aldrich®, USA);
- Azul de Bromofenol (Vetec);
- BHI – Caldo de infusão de cérebro e coração (Merck®);
- Brometo de N-cetil-N,N,N,-trimetilamônio 0,1% (CETAVLON).
- $\beta$ -mercaptoetanol (Vetec);
- Carragenana iota(Sigma-Aldrich®, USA);
- Carragenana lambda(Sigma-Aldrich®, USA);
- Carragenana kappa (Sigma-Aldrich®, USA);
- Cetoconazol

- Cloral Hidratado (Vetec);
- Cloreto de Sódio (Vetec);
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Spectrum);
- DEAE-Celulose (Sigma-Aldrich®, USA);
- Dexametasona (Laboratório TEUTO);
- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (Sigma-Aldrich®, USA);
- Formaldeído (PA, Merck®);
- Fosfato de amônio diidrogênio (Merck®);
- Fosfato dipotássico (Merck®);
- Hematoxilina e Eosina (Reagen);
- HTAB (Vetec);
- Kit da Labtest® (TGO, TGP, Ureia e Fosfatase Alcalina);
- Marcadores para eletroforese: Albumina sérica bovina 66,0 kDa; Ovoalbumina 45,0 kDa; Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase 36,0; Tripsinogênio 24,0 kDa; inibidor de tripsina 20,1 kDa (Sigma-Aldrich®, USA);
- Mucina (Sigma-Aldrich®, USA);
- O-dianisidina dicloridrato e peróxido de hidrogênio (Merck®);
- Ovoalbumina (Sigma-Aldrich®, USA);
- TEMED (Sigma-Aldrich®, USA);
- Tripsina (Sigma-Aldrich®, USA);
- TRIS (Hidroximetil) Aminometano (Merck®);
- 1,3-diaminopropano (Vetec);

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Obtenção da lectina da alga marinha vermelha *P. capillacea*

A lectina da alga marinha vermelha *P. capillacea* (PcL) foi obtida segundo a metodologia descrita por Oliveira *et al.* (2002) com algumas modificações. Após prévia lavagem com água corrente e destilada, a alga foi triturada em almofariz, em presença de nitrogênio líquido e submetida a extração protéica com tampão Tris-HCl, 25 mM, pH 7,5 na proporção de 1:3 (p/v). O homogenato foi deixado em contato por 12 horas e em seguida filtrado em tecido de nylon. O filtrado obtido foi submetido a centrifugação, 6000 x g, 30 minutos, 10 °C sendo o resíduo descartado e o sobrenadante (extrato total) submetido a cromatografias sequenciais de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 e o extrato, previamente dialisado contra o mesmo tampão de equilíbrio, aplicado na coluna. Após a completa eluição da fração não retida na coluna, foi aplicado o tampão de equilíbrio contendo NaCl 0,3 M para a eluição da fração protéica contendo atividade hemaglutinante adsorvida na matriz. Durante os procedimentos cromatográficos foi mantido um fluxo constante de 30 mL/hora, coletando frações de 3 mL/tubo e a absorbância determinada a 280 nm. A proteína obtida foi dialisada com água destilada, liofilizada e armazenada a -20 °C para procedimentos posteriores.

### 4.2 Atividade hemaglutinante e inibição da atividade hemaglutinante

O ensaio da atividade hemaglutinante da PcL foi realizado através de diluições seriadas em tubos de ensaio. Em cada tubo foram adicionados 100 µL de NaCl 0,15 M. No primeiro tubo foram adicionados 100 µL da amostra (PcL) e uma série de diluições duplas foram feitas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, etc.), homogeneizando-se completamente antes de cada transferência. A cada diluição foram adicionados 100 µL de uma suspensão de eritrócitos de coelho tratados com tripsina (2%) e a reação foi incubada à temperatura ambiente por 60 minutos, conforme descrito por Ainouz *et al.* (1992). Posteriormente, os

tubos foram centrifugados a 2.000 x g por 30 segundos e os resultados foram lidos macroscopicamente, sendo o título expresso em unidades de hemaglutinação (UH/mL), que é o inverso da maior diluição da amostra que apresentou nítida aglutinação.

Para o ensaio de inibição da atividade hemaglutinante, uma alíquota da PcL, encerrando 32 UH/mL (100 µL), foi transferida para tubos contendo igual volume de soluções diluídas em série (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, etc.) a partir de soluções estoque da glicoproteína mucina e dos SfP na concentração de 5 mg/mL. Os tubos permaneceram 60 minutos à temperatura ambiente e após este período foram adicionados 100 µL de suspensão de eritrócitos de coelho a 2% tripsinizados. Os tubos foram deixados em repouso por mais 60 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugados a 2.000 x g por 30 segundos. O título da inibição da atividade hemaglutinante foi determinado considerando a diluição mais alta do inibidor capaz de inibir a atividade aglutinante (Ainouz et al., 1992).

#### **4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida da PcL**

O grau de pureza da PcL foi acompanhado por procedimento de eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% na forma *nativa* (PAGE) e desnaturante (PAGE-SDS) na ausência e presença do agente redutor β-mercaptoetanol, segundo o método de Laemilli descrito por Hames & Rickwood, (1983).

Para montagem das placas, foi utilizado um gel de concentração (3,95% de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 e, um gel de separação (acrilamida 12% dissolvida em tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,8). A fração protéica ativa foi dissolvida no tampão da amostra e incubada a 100 °C por 10 minutos. Alíquotas contendo 1 mg/mL de proteínas foram aplicadas nos poços do gel de concentração. A corrida eletroforética foi realizada a uma corrente constante de 40 mA. As bandas protéicas obtidas foram reveladas mediante coramento com uma solução de Coomassie R-250 a 2% dissolvido em ácido acético, metanol e água na proporção de (10:45:45, v/v/v) contendo ácido pícrico 0,2 M (Stephano

et al., 1986). No procedimento de PAGE-SDS, foram utilizados como padrões protéicos de massas moleculares conhecidas: Albumina sérica bovina 66,0 kDa; Ovoalbumina 45,0 kDa; Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase 36,0; Tripsinogênio 29,0 ; inibidor de tripsina 20,1 kDa (Sigma-Aldrich®, USA).

#### **4.4 Obtenção dos polissacarídeos sulfatados totais da alga marinha vermelha *S. filiformes***

A alga *S. filiformes* após coleta, lavagem e secagem em estufa a 60 °C, foi cortada em pequenos pedaços e inicialmente submetida a extração aquosa dos polissacarídeos sulfatados totais (SfP). Para remoção do amido das florídeas e alguns pigmentos, foram utilizados 5 g da alga seca e adicionado água destilada na proporção de 0,8% (p/v), deixado em contato por 12 h à temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, a mistura foi filtrada em nylon e o resíduo obtido, submetido ao procedimento de extração aquosa à quente dos SfP, durante 4 h a 70 °C. Posteriormente, a mistura foi filtrada em nylon e ao homogenato obtido adicionado álcool na proporção de 1:3, seguido de centrifugação (6.000 x g, 15 min, 10 °C). O precipitado obtido foi ressuspenso em água, dialisado contra água destilada, liofilizado (denominado de SfP) e armazenado em frascos hermeticamente fechados à temperatura ambiente para procedimentos posteriores.

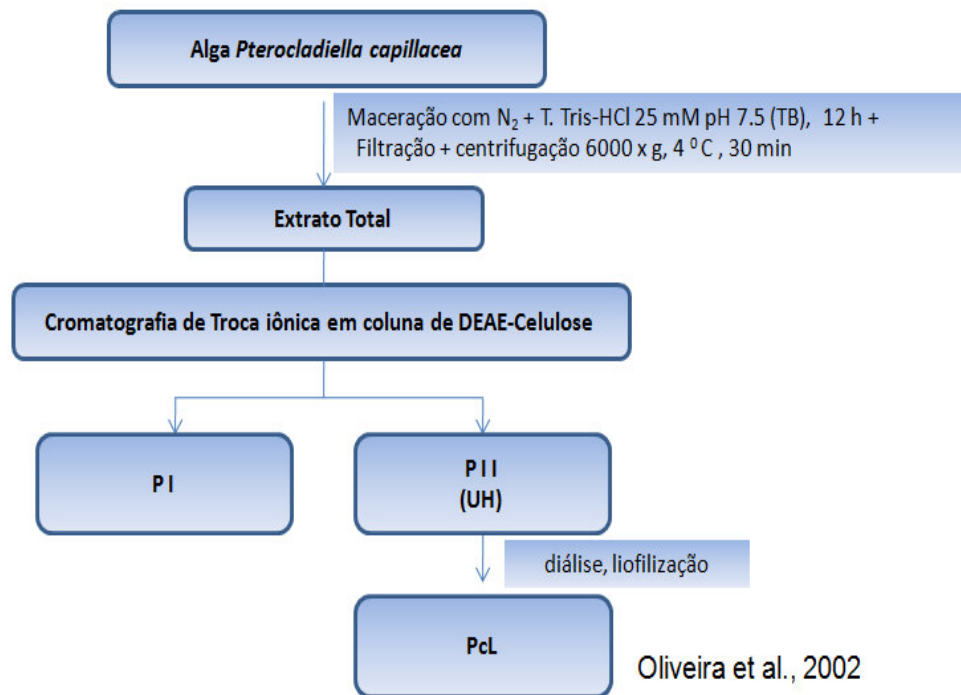


Figura 1 – Esquema de obtenção da lectina de *Pterocladia capillacea* (PcL).  
 PI=Pico 1; PII=Pico 2.

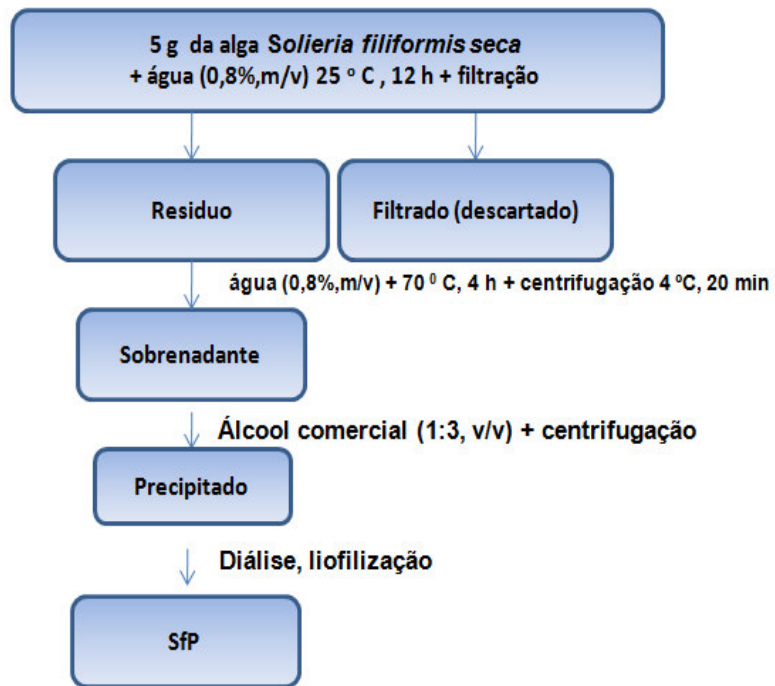


Figura 2-. Esquema de obtenção dos polissacarídeos de *Solieria filiformis* (SfP)



#### **4.5 Avaliação da toxicidade aguda por dose repetida de PcL e SfP**

Na avaliação estimativa e preliminar da toxicidade da PcL e dos SfP, estes foram administrados por um período de quatorze dias consecutivos com sacrifício dos animais no décimo quinto dia. Dessa forma, grupos (n=6) de camundongos machos e fêmeas (20-25 g) foram tratados com PcL e SfP pelas vias i.p e v.o na dose de 9 mg/kg, sendo os efeitos observados durante um período de 24 horas. No décimo quinto dia, os animais foram anestesiados e amostras de sangue coletadas do plexo retro orbitário e centrifugadas para a obtenção do plasma para posteriores dosagens bioquímicas das transaminases glutâmico-oxaloacético e pirúvica (TGO e TGP), fosfatase alcalina e uréia. Em seguida, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, seguido da retirada dos órgãos coração, fígado e rim direito para posterior pesagem, mantendo correlações com as respectivas massas corpóreas. Todos os parâmetros toxicológicos observados foram comparados a de animais que receberam apenas a solução controle negativo salina (NaCl 0,15 M), nas mesmas condições que os animais tratados.

##### **4.5.1 Dosagem das transaminases glutâmico oxalacética (TGO/AST) e glutâmico pirúvica (TGP/ALP)**

A enzima transaminase glutâmico oxalacética (TGO/AST) é uma enzima liberada no sangue quando ocorre uma lesão hepática, cardíaca, muscular ou cerebral. Do mesmo modo, a enzima transaminase glutâmico pirúvica (TGP/ALT) também é liberada no sangue quando ocorre lesão hepática. Portanto, estas mensurações são úteis na detecção de lesão celular hepática.

Neste procedimento foi utilizado as recomendações do Kit da Labtest®. que consistiu em adicionar 50 µL do substrato TGO (solução de 0,2 M de L-aspartato, 0,002 M α-cetoglutarato, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4), colocado em banho-maria a 37 °C por 2 min, seguido da adição de 10 µL do plasma e

incubado a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 50 µL do reagente de cor (solução 0,001 M de 2,4 Dinitrofenilhidrazina), homogeneizado e deixado em repouso à temperatura ambiente durante 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 500 µL de hidróxido de sódio 0,4 M e a solução deixada em repouso durante 5 minutos a temperatura ambiente. As leituras de absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro) a 505 nm.

Para a dosagem de transaminase glutâmico pirúvica (TGP/ALT), o procedimento consistiu em adicionar 50 µL de substrato TGP (solução de 0,2 M de L-alanina, 0,002 M α-cetoglutarato, tampão de fosfatos 0,1 M pH 7,4), adicionado em banho-maria a 37 °C, seguido da adição de 10 µL do plasma, homogeneizado e incubado a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 50 µL do reagente de cor (solução 0,001 M de 2,4 Dinitrofenilhidrazina), homogeneizado e deixado em repouso à temperatura ambiente durante 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 500 µL de hidróxido de sódio 0,4 M e a solução deixada em repouso durante 5 min a temperatura ambiente. As leituras de absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro) a 505 nm.

#### **4.5.2 Dosagem de fosfatase alcalina**

A fosfatase alcalina é produzida por muitos tecidos, principalmente pelos ossos, fígado, intestinos e placenta e é excretada pela bile. A dosagem sérica desta enzima é particularmente útil na investigação das doenças hepatobiliares e ósseas.

Esta metodologia trata-se de um método colorimétrico baseado no princípio de que a fosfatase alcalina presente no soro hidrolisa a timolftaleína monofosfato, liberando timolftaleína, que tem cor azul em meio alcalino. A intensidade da cor formada é proporcional à quantidade da fosfatase alcalina na amostra.

Desta forma, 25 µL de plasma de cada animal foram utilizados para a dosagem, sendo esta realizada seguindo as recomendações descritas no Kit da Labtest® (Cat. 40, ANVISA 10009010081)., As leituras de absorvância foram obtidas no comprimento de onda de 590 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro).

#### **4.5.3 Dosagem de ureia**

Fisiologicamente a uréia se eleva devido à dieta hiperprotéica ou com a idade, particularmente após os 40 anos. Elevações também ocorrem por catabolismo elevado (febre, septicemia) e hemorragias internas, principalmente do trato gastrointestinal.

Esta metodologia é baseada em um sistema enzimático-colorimétrico, cuja intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de uréia na amostra. O princípio se baseia na hidrólise da uréia pela uréase à íons amônio e CO<sub>2</sub> onde os íons amônio reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio para formar azul de indofenol. A intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de uréia formada.

Desta forma, 50 µL de plasma de cada animal foram utilizados para a dosagem, sendo esta realizada seguindo as recomendações descritas no Kit da Labtest® (Cat. 40, ANVISA 10009010081). As leituras de absorvância foram obtidas no comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro).

#### **4.6 Análise histológica do ensaio de toxicidade**

Diante da importância de ser realizada uma análise microscópica do efeito das moléculas PcL e SfP foi realizado o estudo histológico segundo a

metodologia de Prophet et al. (1992), utilizando um processador automático de tecidos Lupe® modelo PT09 (histotécnico).

Após retirada de sangue para a obtenção do plasma para as dosagens bioquímicas séricas foram retirados os órgãos: coração, fígado e rim, fixados em formol tamponado a 10% durante um período que variou em torno de 24 a 48 horas. Em seguida, foram realizados dois cortes transversais ao longo da espessura do fragmento tecidual, que após removidos, foram colocados em cassetes histológicos seguido da desidratação em quatro concentrações crescentes de etanol comercial (70 a 100%). Posteriormente, foi realizada a inclusão do material em parafina na forma líquida, mantido em banho histológico (Modelo BH05). Em seguida, os tecidos contidos nos blocos de parafina foram cortados (4 µm de espessura) utilizando-se um micrótomo de impacto (Poycut S, Leica, Alemanha) equipado com navalha de tungstênio de 16 cm, tipo D (Leica, Alemanha). Finalmente, os cortes histológicos foram transferidos para lâminas fixas e submetidos a coloração pela técnica de hematoxilina e eosina (HE), seguido da adição de verniz vitral e posterior avaliação em microscópio óptico.

## **4.7 Ensaios de inflamação**

### **4.7.1 Ensaio do edema de pata induzido por $\lambda$ -carragenana (Cg)**

Diante da capacidade indutora de inflamação da carragenana (Cg), esta foi utilizada como agente indutor para verificar o efeito anti-inflamatório de PcL. Portanto, grupos de seis animais (ratos *Wistar* machos) foram usados no ensaio do edema de pata induzido por  $\lambda$ -carragenana (300 mg/pata) em um volume final de 0,1 mL na pata traseira direita segundo o método de Winter *et al.* (1962). Os animais receberam 30 min antes do estímulo carragenana, PcL (1, 3 e 9 mg/kg, i.v), dexametasona (1 mg/kg, s.c) ou salina (0,15 M NaCl;i.v) preparadas em um volume final de 10 mL/kg. O volume da pata foi quantificado pelo volume deslocado pela pata, usando um pletismômetro (Ugo Basile, Itália),

imediatamente antes do estímulo Cg 0, 1, 2, 3 e 4 h após sua injeção. Para confirmar o efeito anti-inflamatório da Pcl, esta também foi aplicada em conjunto com seu inibidor a glicoproteína mucina (1,25 e 3 mg/kg) (Oliveira et al., 2002). O edema foi calculado como a diferença entre o volume de fluido deslocado em um determinado momento antes e após o estímulo (tempo zero). Os volumes foram expressos em mm<sup>3</sup> e comparados com aqueles obtidos a partir das patas dos animais injetados com o estímulo inflamatório ou com apenas 0,1 mL de solução salina. No final do teste, os animais foram sacrificados com hidrato de cloral, e a porção inferior do tecido da pata extraída e congelada (-20 °C) para posterior dosagem da atividade da MPO (mieloperoxidase).

#### **4.7.2 Dosagem da mieloperoxidase (MPO)**

A MPO é uma enzima derivada de leucócitos que catalisa a formação de numerosas espécies reativas oxidantes. Além de integrantes da resposta imune inata, evidências têm comprovado a contribuição desses oxidantes para o dano tecidual durante a inflamação. A sua dosagem é utilizada como um marcador da infiltração de neutrófilos (Roman et al., 2008).

A determinação da atividade MPO, utilizando alíquotas obtidas a partir do exsudato dos fragmentos do tecido da pata, foi realizada utilizando o método de Bradley *et al.* (1982). Cerca de 50-70 mg de tecido da pata foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio contendo HTAB 0,5% (1 mL de tampão por 50 mg de tecido). O homogeneizado foi então centrifugado a 40,000 x g por 7 min a 4 °C e a atividade MPO foi determinada medindo a variação de absorbância a 450 nm usando o-dianisidina dicloridrato e peróxido de hidrogênio. Uma unidade de atividade da MPO foi definida como a atividade necessária para converter 1 mol de peróxido de hidrogênio em água em 1 min a 22 °C. Os resultados são apresentados como unidades de MPO/mg de tecido. Esta metodologia também foi utilizada para a medição da atividade MPO em tecidos obtidos das feridas induzidas em ratos (capítulo 2).

#### 4.8 Atividade antimicrobiana de PcL e SfP

A determinação da atividade antimicrobiana da PcL e dos SfP foi realizada segundo o método de difusão em ágar (Norma M2-A8, Vol. 23 Nº 1 do Clinical and a Laboratory Standards Institute (CLSI, 2003). As amostras foram aplicadas em diferentes concentrações em poços formados no meio sólido.

Foram testadas as seguintes cepas microbianas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* ATCC 10708 e *Candida albicans* ATCC 10231.

Culturas microbianas puras mantidas em ágar estoque sob refrigeração, foram repicadas para caldo de infusão de cérebro e coração (BHI, Merck) e incubadas a 35 °C até atingirem fase exponencial de crescimento (10h). Após esse período, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada em solução salina 0,85% estéril, de modo a se obter uma turbidez comparável à do tubo 0,5 da escala de McFarland o que resulta em uma suspensão microbiana contendo aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

Com o auxílio de *swabs* estéreis, essas suspensões foram semeadas na superfície do ágar Mueller-Hinton (Merck) (para cepas bacterianas) ou ágar Sabouraud-dextrose (Merck) (para cepa de levedura). De acordo com a metodologia e para evitar resultados incorretos, a camada de ágar na placa de Petri tinha de 3 a 4 mm de espessura e foi semeada em três direções, para que fosse obtido um crescimento confluyente e homogêneo. Após 5 minutos, foram feitos poços de 5 mm de diâmetro interno no ágar, utilizando-se para isso um perfurador estéril. Nesses poços foram aplicados volumes de 25 µL de PcL (2 mg/mL) filtrada em membranas de 0,22 µm e SfP (2 mg/mL) diluídos em água estéril. Para título de controle foram utilizados os antimicrobianos amicacina e cetoconazol. Após 16-18h de incubação a 35 °C, os halos de inibição de crescimento foram medidos em milímetros com auxílio de um paquímetro. Esses ensaios foram feitos em duplicata onde os valores

dos halos de inibição expressam as médias das medidas dos dois resultados.

#### **4.8.1 Determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) de PcL**

A determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) foi realizada através da técnica de microdiluição em placas de acordo com a Norma M7-A6, Vol. 23 N° 2, CLSI, 2003. Foram utilizadas microplacas esterilizadas com 96 poços, de fundo redondo.

As culturas, mantidas em agar estoque sob refrigeração, foram repicadas para caldo e incubadas a 35 °C até atingirem fase exponencial de crescimento (10h). Após esse período, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada caldo, de modo a se obter uma turbidez equivalente à do tubo 0,5 da escala de McFarland, o que resulta em uma suspensão microbiana contendo aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

Essa suspensão foi diluída 100 vezes, em caldo BHI, o que corresponde aproximadamente a uma suspensão contendo  $10^6$  UFC/mL, da qual foram retirados 80µL e adicionados em cada poço da placa. Cada poço da placa continha 100 µL de caldo BHI, 20 µL PcL (filtrada em membranas de 0,22 µm) em concentrações que variaram de 1000 µg/mL a 25 µg/mL e 80 µL de suspensão de microorganismo. Como controle da inibição do crescimento microbiano foi utilizado o meio de cultura, o agente antimicrobiano e o inóculo do microorganismo. Já como controle da ausência de inibição do crescimento microbiano foi usado meio de cultura, água estéril e o inóculo do microorganismo.

As placas de culturas, fechadas por tampas apropriadas, foram incubadas durante 24 horas em estufa bacteriológica a 35°C. Após esse período foi realizada a inspeção visual do crescimento microbiano e a leitura das absorbâncias em leitora de Elisa Bio-Tek a 620nm.

A CIM é considerada a menor concentração capaz de inibir o crescimento

microbiano, constatado pela ausência de turvação visível, por inspeção visual do crescimento microbiano. As placas de cultura foram submetidas à leitura de absorbância a 620nm para confirmação dos valores de CIM, assim como para excluir a interferência da turvação determinada pelas amostras.

#### **4.9 Utilização dos SfP como fonte de carbono**

Para investigar se os microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* ATCC 10708 e *Candida albicans* ATCC 10231 possuem a capacidade de utilizar os SfP como fonte de carbono, preparou-se um meio de cultura contendo apenas uma fonte de nitrogênio, minerais e os polissacarídeos sulfatados totais SfP. O meio em questão foi composto por sulfato de Magnésio (0,2g/L), fosfato de amônio diidrogênio (1g/L), fosfato Dipotássico (1g/L), SfP (2g/L), cloreto de Sódio (5g/L), azul de bromotimol (0,08g/L) e ágar (15g/L). Após a esterilização, corrigiu-se o pH para  $6.8 \pm 0.1$ , distribuiu-se em tubos que foram inclinados e esperou-se sua solidificação. Os microrganismos foram semeados na superfície do ágar com ajuda de uma agulha de inoculação, incubou-se em estufa bacteriológica 37°C durante 24 horas e verificou-se a mudança de coloração do meio.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante de PcL

Como os polissacarídeos sulfatados totais da alga *Solieria filiformis* (SfP) foram aplicados como veículo para a administração da PcL em ensaio de cicatrização (a ser descrito no capítulo 2) achou-se necessário a realização do ensaio de inibição da atividade hemaglutinante da PcL pelos SfP e seu hapteno a glicoproteína mucina.

Os resultados obtidos mostraram que a PcL teve seu sítio de interação inibido somente pelo seu hapteno mucina, conforme já demonstrado por Oliveira *et al.* (2002) demonstrando portanto, que os SfP poderão ser utilizados como veículo nos ensaios de cicatrização (Tabela 1).

### 5.2 Eletroforese de PcL em gel de poliacrilamida

Na avaliação do grau de pureza da PcL obtida por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose (Figura 3A) foi observada uma única banda por eletroforese gel de poliacrilamida em condições nativa (PAGE) assim como uma única banda de massa molecular aparente de 36,1 KDa por PAGE-SDS na ausência e presença do agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol (Figura 3B e 3C) confirmando o resultado descrito por Silva (2008).

Tabela 1- Inibição da atividade hemaglutinante da lectina da alga marinha *Pterocladia capillacea* (PcL) por mucina e SfP

<b>AÇÚCARES</b>	<b>CONCENTRAÇÃO MÍNIMA*</b>
	<b>mg/ml</b>
<b>MUCINA</b>	<b>0,625</b>
<b>SfP</b>	<b>-</b>

Título da atividade: 2<sup>5</sup> (32 UH)

UH:Unidades de Hemaglutinação

(-) Não houve inibição da UH na concentração utilizada (5 mg/mL)

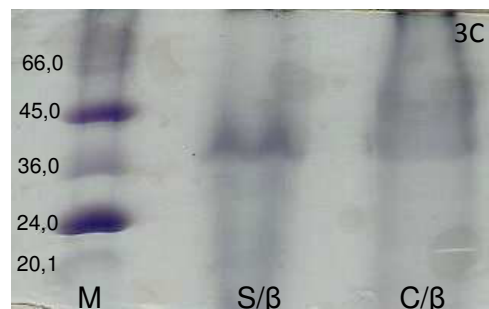
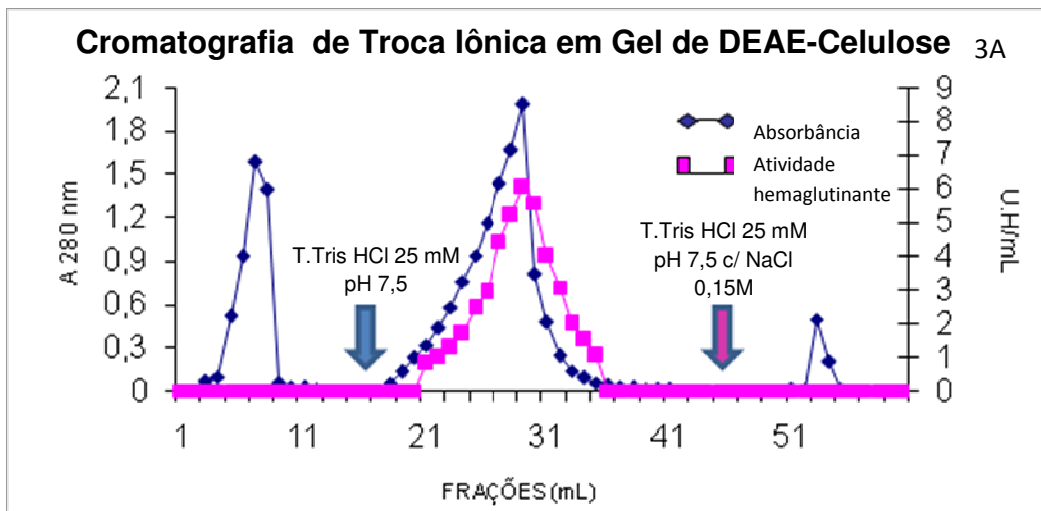


Figura 3 – Obtenção da PcL por cromatografia de troca iônica DEAE-celulose (3A) e avaliação da pureza da PcL em condições nativa (PAGE) (3B) e em condição desnaturante (PAGE-SDS) na ausência e presença do agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol (3C). Marcadores de massas moleculares padrões (MM) de: Albumina sérica bovina 66,0 kDa; Ovoalbumina 45,0 kDa; Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase 36,0; Tripsinogênio 29,0 ; inibidor de tripsina 20,1 kDa (Sigma-Aldrich®, USA). M=mucina, S/ $\beta$ = sem  $\beta$ -mercaptoetanol e C/ $\beta$ =com  $\beta$ -mercaptoetanol.

### 5.3 Avaliação sistêmica da toxicidade aguda da PcL e dos SfP

O ensaio de toxicidade aguda da PcL e dos SfP, administradas na mesma concentração (9 mg/kg) por vias i.p e v.o, respectivamente durante um período de 14 dias em camundongos (machos e fêmeas) não apresentou alterações na massa corporal dos animais e nenhuma alteração na massa dos órgãos avaliados (coração, fígado e rim). Também não houve mudanças significativas nos níveis das enzimas (AST, ALT, fosfatase alcalina e uréia) em comparação com o grupo controle (Tabelas 2, 3, 4 e 5).

Estes dados estão em conformidade com os obtidos por Silva *et al.* (2010) que administrou por via intravenosa a lectina da alga *Pterocladia capillacea*. Resultado semelhante também foi observado pela administração intravenosa de um lectina obtida da alga *Caulerpa cupressoides* por Vanderlei *et al.* (2010).

A ausência de toxicidade da SfP corrobora com os resultados obtidos para os polissacarídeos sulfatados totais, obtidos por extração enzimática, para a mesma espécie de alga por Araújo *et al.*(2011). Rodrigues *et al.* (2011) demonstraram que os polissacarídeos sulfatados da rodofícea *Hypnea musciformis* também não ocasionaram alteração hepática ou renal quando administrados somente por via i.p durante um período de 14 dias.

Os resultados de toxicidade obtidos neste trabalho foram de grande valia visto que, as duas moléculas (PcL e SfP) foram utilizadas em ensaio posterior de cicatrização através da aplicação tópica. Segundo Pandit (2008) embora muitos fármacos sejam aplicados na pele para o tratamento de afecções locais, a absorção sistêmica é possível.

Tabela 2- Avaliação da toxicidade aguda da lectina PcL de *Pterocladia capillacea* administrada por via intra peritoneal.

Parâmetros	Tratamento (9 mg/kg, i.p)			
	Fêmea		Macho	
	Salina	PcL	Salina	PcL
Massa corpórea (g) (tempo zero)	23,5 ± 0,7638	28,8 ± 0,2	29,5 ± 0,6	34,8 ± 0,9
Massa corpórea (g)	28,2 ± 0,9	30,2 ± 0,6	34,8 ± 0,9	30,3 ± 0,6
Fígado (g)/massa (g)	1,4 ± 0,4	1,5 ± 0,4	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1
Rim (g)/massa (g)	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
Coração (g)/massa (g)	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
TGO (mg/dL)	51,5±5,4	49,8±6,3	48,3±4,3	52,1±2,3
TGP (U/L)	41,5±4,3	31,2±4,2	36,0±3,4	37,2±4,0
Ureia (U/L)	48,4±2,5	52,5±5,0	46,3±1,1	41,4±3,0
Fosfatase Alcalina (U/L)	40,1±4,3	46,7±1,01	42,2±3,0	52,0±3,0

Após 14 dias de tratamento, os animais foram pesados e amostras de sangue coletadas para análise de parâmetros que correspondem ao peso corpóreo, dos órgãos e dosagens bioquímicas (AST, ALT, ureia e fosfatase alcalina). Os valores são apresentados como média ± S.E.M. Teste t de Student para valores não pareados.

Tabela 3- Avaliação da toxicidade aguda da lectina PcL de *Pterocladia capillacea* administrada por via oral.

Parâmetros	Tratamento (9 mg/kg, v.o)			
	Fêmea		Macho	
	Salina	PcL	Salina	PcL
Massa corpórea (g) (tempo zero)	27,0 ± 0,5	28,3 ± 0,5	30,8 ± 0,4	24,3 ± 0,2
Massa corpórea (g)	27,2 ± 0,4	27,2 ± 0,4	35,0 ± 0,1	31,5 ± 0,2
Fígado (g)/ massa (g)	1,2 ± 0,4	1,3 ± 0,3	1,4 ± 0,3	1,6 ± 0,5
Rim (g)/ massa (g)	0,18 ± 0,1	0,20 ± 0,5	0,3 ± 0,4	0,22 ± 0,2
Coração (g)/massa (g)	0,4 ± 0,5	0,17 ± 0,2	0,20 ± 0,2	0,1 ± 0,2
TGO (mg/dL)	45,7±0,6	48±0,3	59,5±0,3	47,5±0,4
TGP (U/L)	37,2±0,1	35,5±0,1	26,5±0,4	37,3±0,6
Uréia (U/L)	49,3±0,2	41,2±0,4	44,5±0,4	41,1±0,2
Fosfatase Alcalina (U/L)	48,5±0,5	59,3±0,3	62,2±0,2	65,4±0,1

Após 14 dias de tratamento, os animais foram pesados e amostras de sangue coletadas para análise de parâmetros que correspondem ao peso corpóreo, dos órgãos e dosagens bioquímicas (AST, ALT, ureia e fosfatase alcalina). Os valores são apresentados como média ± S.E.M. Teste t de Student para valores não pareados.

Tabela 4- Avaliação da toxicidade aguda do polissacarídeo sulfatado SfP de *Solieria filiformis* administrado por via intra peritoneal.

Parâmetros	Tratamento (9 mg/kg, i.p)			
	Fêmea		Macho	
	Salina	SfP	Salina	SfP
Massa corpórea (g) (tempo zero)	23,5 ± 0,3	30,3 ± 0,1	29,5 ± 0,6	25,0 ± 0,4
Massa corpórea (g)	28,2 ± 0,2	33,3 ± 0,2	34,3 ± 0,5	28,3 ± 0,3
Fígado (g)/massa (g)	1,4 ± 0,5	1,9 ± 0,2	1,8 ± 0,2	1,8 ± 0,2
Rim (g)/massa (g)	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
Coração (g)/massa (g)	0,15 ± 0,2	0,15 ± 0,1	0,18 ± 0,1	0,15 ± 0,5
TGO (mg/dL)	51,5±0,5	49,1±0,4	48,3±0,3	54,4±0,2
TGP (U/L)	41,5±0,3	31,2±0,4	35,4±0,3	57,2±0,3
Ureia (U/L)	48,4±0,2	45,7±0,3	46,3±0,1	50,3±0,3
Fosfatase Alcalina (U/L)	40,1±0,4	34,4±0,3	42,2±0,2	49,9±0,3

Após 14 dias de tratamento, os animais foram pesados e amostras de sangue coletadas para análise de parâmetros que correspondem ao peso corpóreo, dos órgãos e dosagens bioquímicas (AST, ALT, ureia e fosfatase alcalina). Os valores são apresentados como média ± S.E.M. Teste t de Student para valores não pareados.

Tabela 5- Avaliação da toxicidade aguda do polissacarídeo sulfatado SfP de *Solieria filiformis* administrado por via oral.

Parâmetros	Tratamento (9 mg/kg, v.o)			
	Fêmea		Macho	
	Saline	SfP	Saline	SfP
Massa corpórea (g) (tempo zero)	27,3 ± 0,3	30,5 ± 0,4	30,2 ± 0,5	25,2 ± 0,4
Massa corpórea (g)	27,2 ± 0,3	30,5 ± 0,6	35,3 ± 0,1	28,0 ± 0,2
Fígado (g)/massa	1,2 ± 0,4	1,3 ± 0,4	1,4 ± 0,5	1,26 ± 0,1
Rim (g)/massa	0,18 ± 0,1	0,23 ± 0,5	0,29 ± 0,1	0,26 ± 0,3
Coração (g)/massa	0,14 ± 0,5	0,18 ± 0,3	0,20 ± 0,2	0,18 ± 0,2
TGO (mg/dL)	46,0±0,1	42,0±0,3	59,7±0,3	43,1±0,2
TGP (U/L)	37,2±0,1	45,2±0,4	26,5±0,4	48,5±0,5
Uréia(U/L)	49,3±0,3	51,0±0,4	44,5±0,2	55,5±0,3
Fosfatase Alcalina (U/L)	48,5±0,4	57,3±0,3	62,2±0,2	40,3±0,4

Após 14 dias de tratamento, os animais foram pesados e amostras de sangue coletadas para análise de parâmetros que correspondem ao peso corpóreo, dos órgãos e dosagens bioquímicas (AST, ALT, ureia e fosfatase alcalina). Os valores são apresentados como média ± S.E.M. Teste t de Student para valores não pareados.



#### 5.4 Análise histológica

O ensaio de toxicidade foi também acompanhado pela análise histológica do coração, fígado e rim direito de camundongos machos e fêmeas. A Figura 4 demonstra ausência de alterações no coração, fígado e rim em animais que foram tratados com salina (NaCl 0,15M). Em todos os grupos não foram encontradas diferenças entre machos, fêmeas e as vias de administração. As análises do tecido do coração de animais tratados com PcL não demonstraram nenhuma alteração nas fibras musculares cardíacas (Figura 5A e 5B). As análises dos tecidos do fígado tratados com PcL, em ambas as vias, apresentaram degenerações macro e microvacuolar multifocal, turva pericentrolobular e de borda (Figura 6A e 6B). Além disso, os rins também apresentaram degeneração tubular subcapsular, formação de cilindros tubulares hialinos (Córtex e medula) e focos de hemorragia difusos pelo Córtex e Medula (Figura 7A e B). Também foi observado um processo degenerativo tubular mostrando a formação de cilindros hialinos em túbulos renais e focos hemorrágicos difusos pelo Córtex e Medula (Figura 8A). Além da degeneração de túbulos subcapsulares também foram observados túbulos renais normal (Figura 8B).

Na análise dos tecidos dos órgãos de animais tratados com os SfP por vias i.p e v.o, foi verificado que não ocorreram alterações aparentes no coração (Figura 9A e 9B). A análise do fígado não mostrou nenhuma alteração, entretanto a administração por via oral apresentou um leve infiltrado mononuclear multifocal e uma discreta dilatação dos sinusóides pericentrolobulares, uma leve hiperplasia das células de Kupffer, hepatócitos subcapsulares com degeneração turva, um leve infiltrado mononuclear multifocal, hepatócitos pericentrolobulares com degeneração turva, discreta dilatação dos sinusóides pericentrolobulares e leve hiperplasia das células de Kupffer (Figura 10A e 10B). Observa-se ainda na secção transversal do fígado hepatócitos pericentrolobulares com degeneração turva onde os hepatócitos encontram-se mais claros e maiores que os demais da periferia. (11A e 11B). Com relação a análise renal foi observado na secção transversal um leve

processo degenerativo tubular na região subcapsular (figura 12). Apesar de alguns autores relatarem a inexistência da toxicidade de polissacarídeos de algas, neste trabalho foi verificado que a avaliação histológica apresentou uma discreta toxicidade.

A literatura científica pouco relata artigos que abordam a utilização de compostos oriundos somente de algas marinhas no tratamento da pele intacta ou danificada. Entretanto, verifica-se uma grande quantidade de produtos comercializados que apresentam em suas formulações extrato de algas marinhas, os quais não são claros quanto a sua composição e o grau de toxicidade das moléculas presentes.

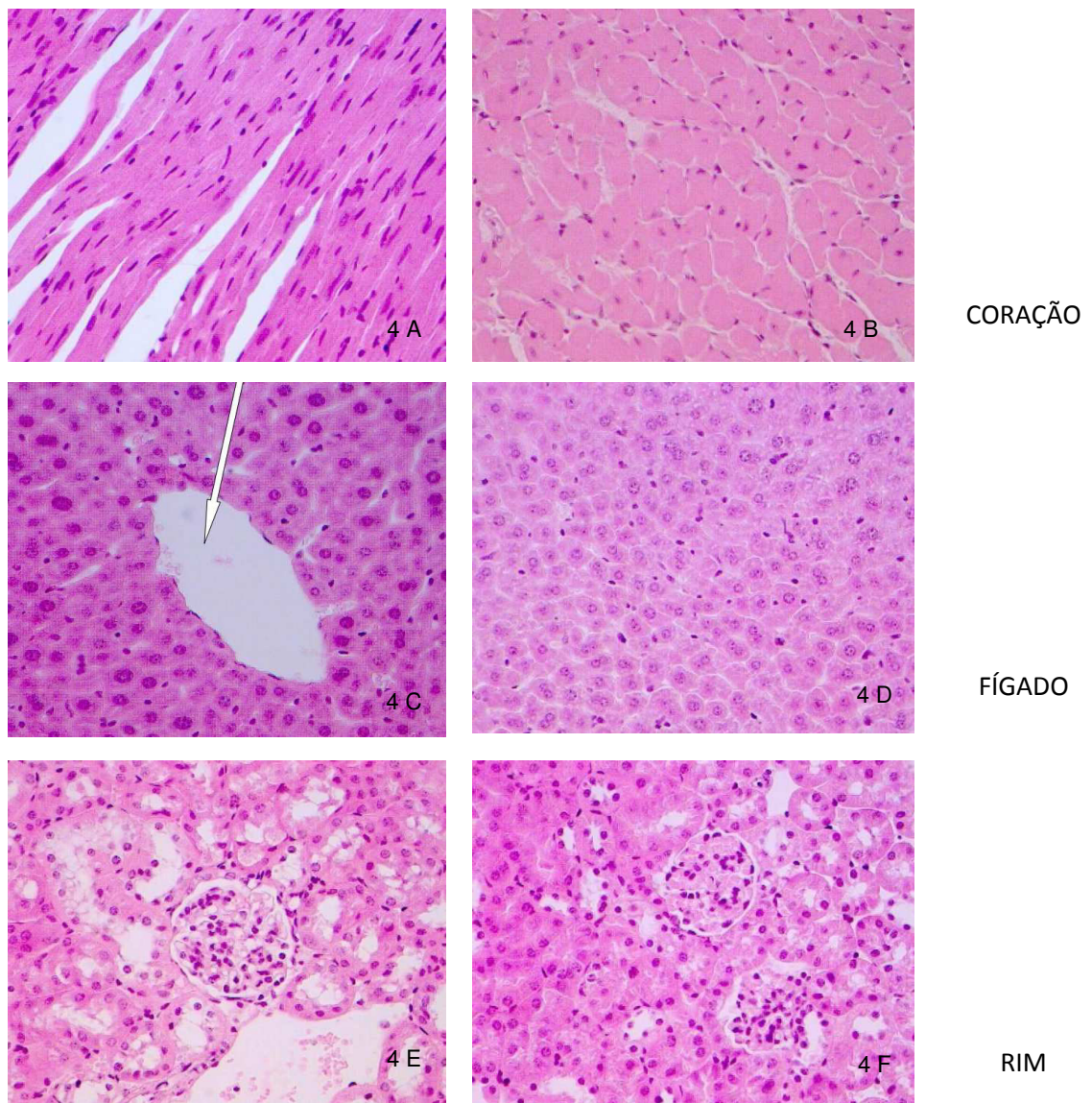


Figura 4- Fotomicrografia de uma secção de 4  $\mu\text{m}$  de espessura obtidos do coração (4A e 4B), fígado (4C e 4D) e rim (4E e 4F) de camundongos após a administração de salina durante um período de 14 dias através do ensaio de toxicidade por dose repetida onde não foi verificada nenhuma alteração. A seta branca indica a veia centrolobular. Coloração HE, aumento de 400 X.

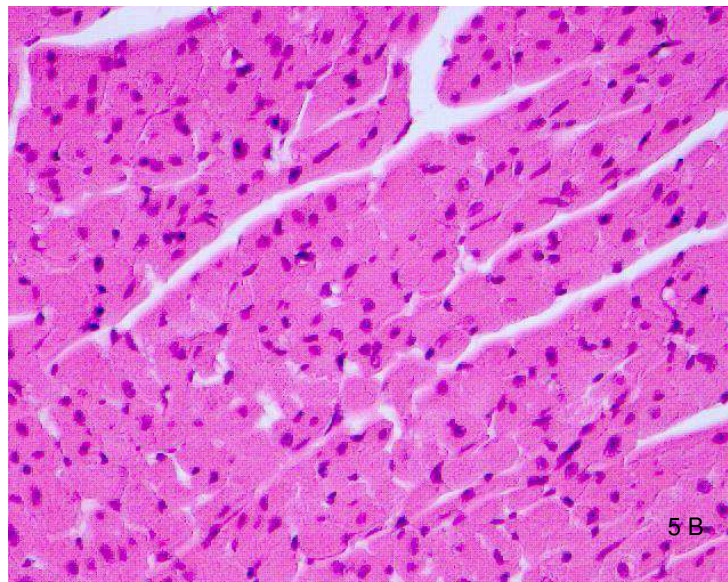
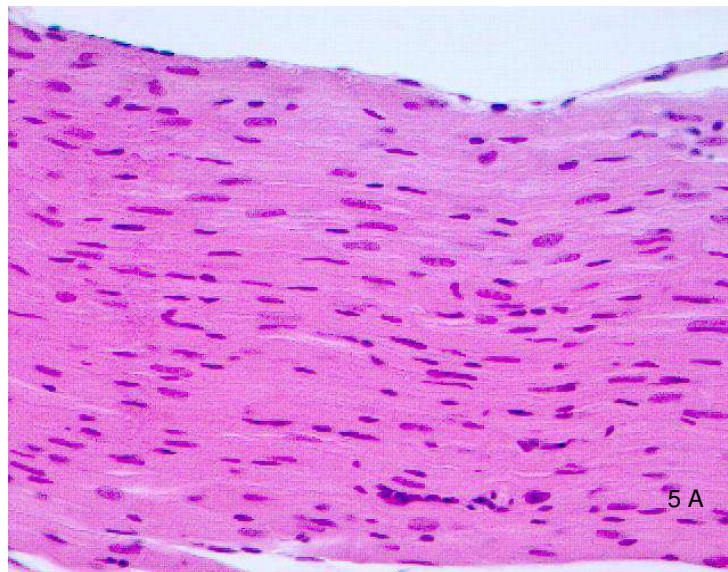


Figura 5- Fotomicrografia de uma secção longitudinal (5A) e transversal 5B) de 4  $\mu$ m de espessura obtidos do coração de camundongos após a administração de PcL (9 mg/kg) durante um período de 14 dias através do ensaio de toxicidade por dose repetida onde não foi verificada nenhuma alteração nas fibras musculares estriadas cardíacas. Coloração HE, aumento de 400 X.



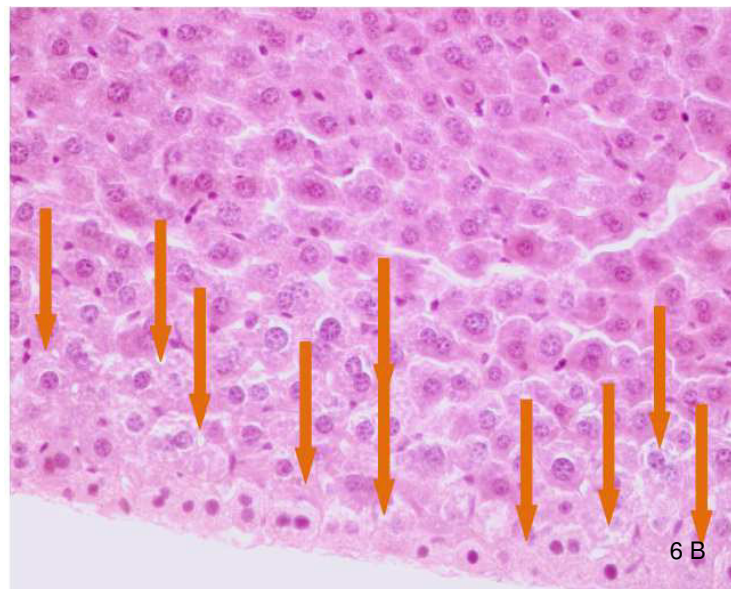
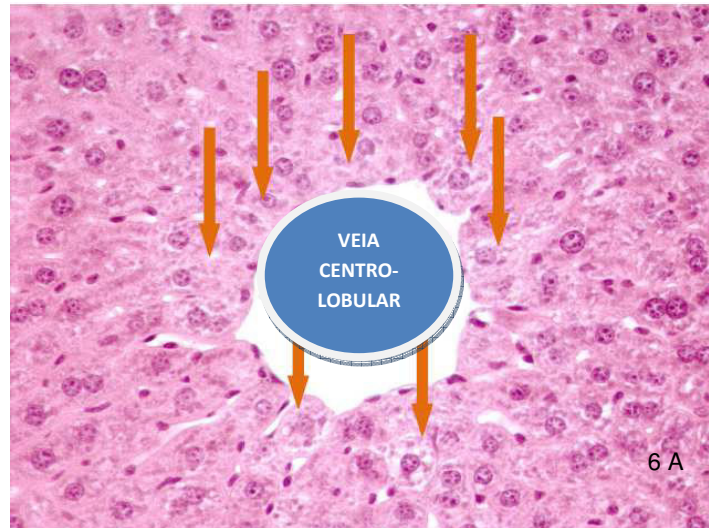


Figura 6- Fotomicrografia de uma secção transversal de 4  $\mu\text{m}$  de espessura obtidos do fígado de camundongos após a administração de PcL (9 mg/kg) durante um período de 14 dias através do ensaio de toxicidade por dose repetida verificando degeneração turva de borda e discreta degeneração macro e micro vacuolar (6A). Nota-se que os hepatócitos estão mais claros e maiores (seta laranja) que os demais da periferia (6B). Coloração HE, aumento de 400X.

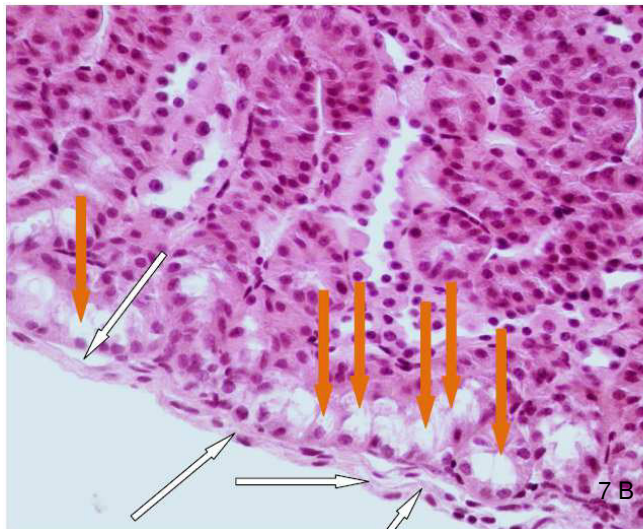
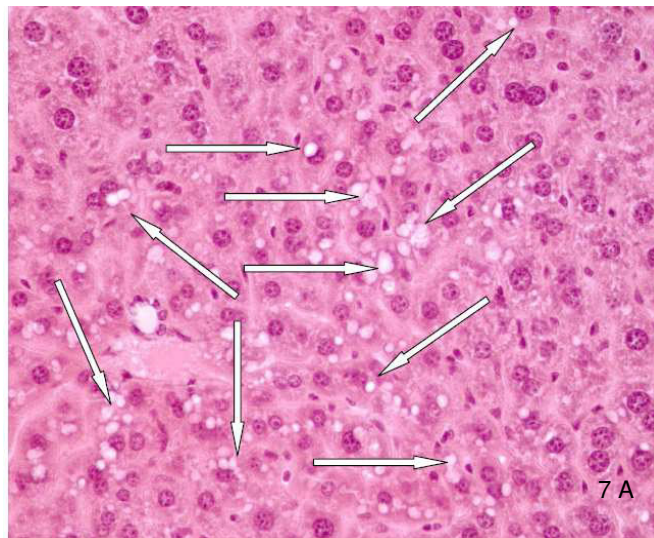


Figura 7- Fotomicrografia de uma secção transversal de 4  $\mu$ m de espessura obtidos do rim de camundongos após a administração de PcL (9 mg/kg) durante um período de 14 dias através do ensaio de toxicidade por dose repetida. As imagens mostram degeneração macro e micro vacuolar com a formação de vacúolos citoplasmáticos-microvacuolar. Observa-se vários vacúolos pequenos e um pouco maior como indicado nas setas brancas (7A). Verifica-se degeneração tubular subcapsular (seta laranja). As setas brancas mostram capsula renal (normal) de tecido conjuntivo frouxo (7B). Coloração HE, aumento de 400 X.

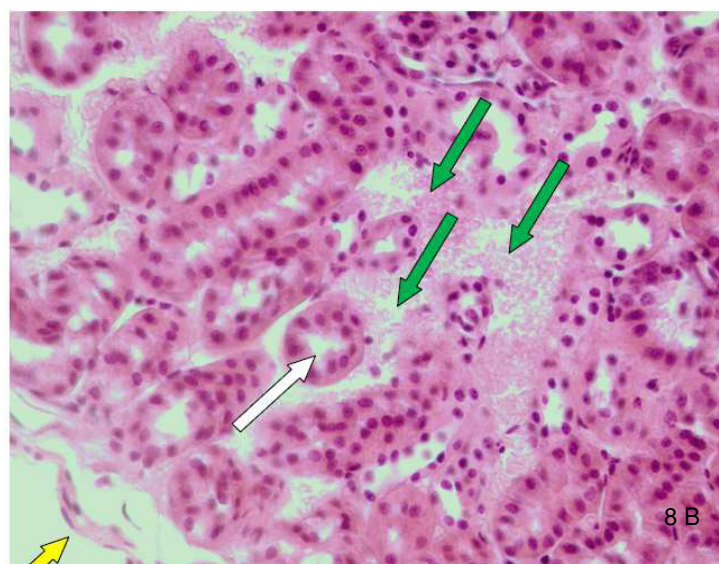
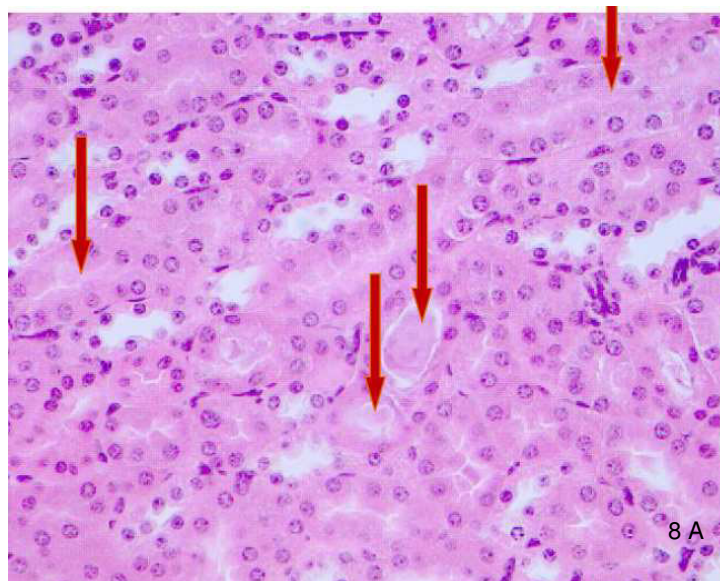


Figura 8- Fotomicrografia de uma secção transversal de 4 $\mu$ m de espessura obtidos do rim de camundongos após a administração de PcL (9 mg/kg) durante um período de 14 dias através do ensaio de toxicidade por dose repetida. Observa-se Formação de cilindros tubulares hialinos (Córtex e medula) mais presente em região medular estando menos presente em região cortical. Observa-se processo degenerativo tubular mostrando a formação de cilindros hialinos em túbulos renais (setas vermelhas) (8A). Verificam-se focos de hemorragia difusos pelo Córtex (setas verdes) e Medula. A seta branca mostra um túbulo renal normal e a amarela indica a capsula renal (8B). Coloração HE, aumento de 400 X.



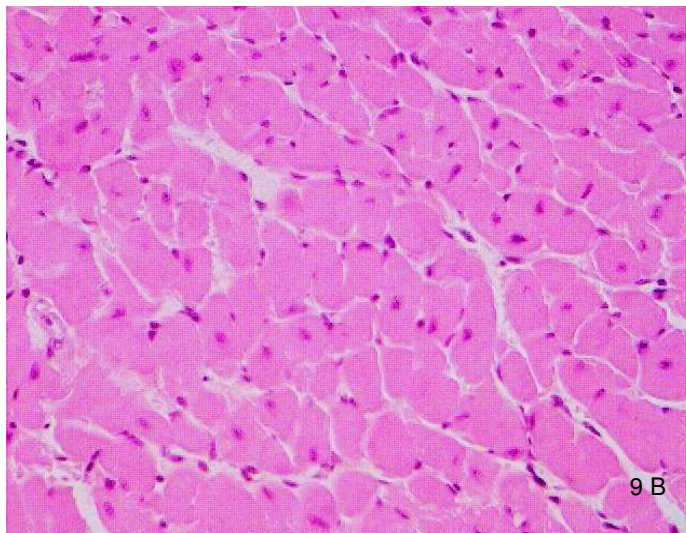
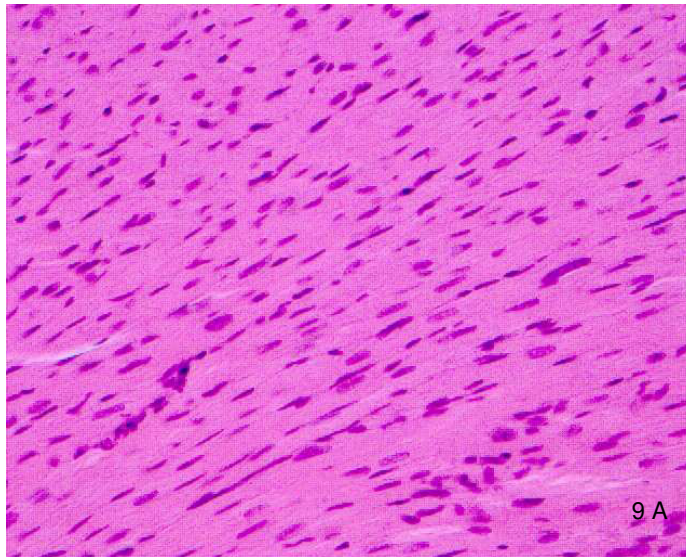
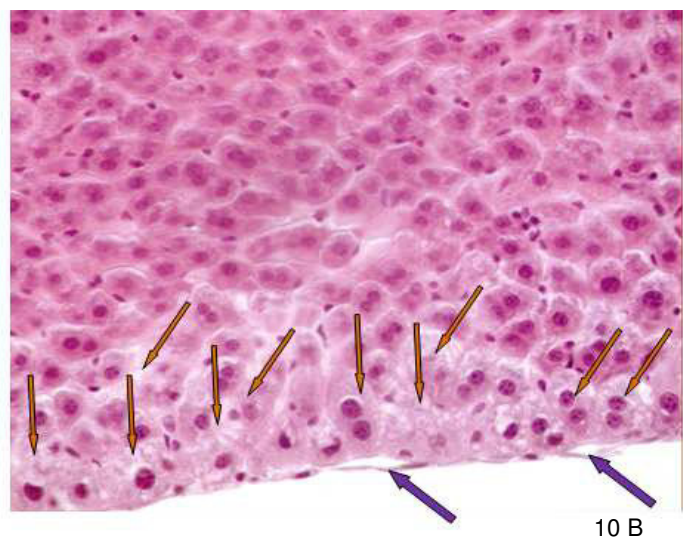
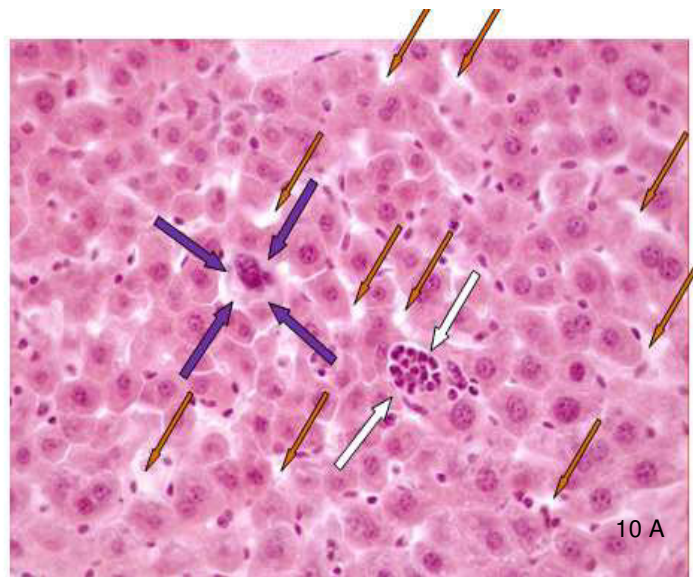


Figura 9 - Fotomicrografia de uma secção longitudinal (9A) e transversal (9B) de 4  $\mu\text{m}$  de espessura obtidos do coração de camundongos após a administração de SfP (9 mg/kg). Observam-se fibras musculares estriadas cardíacas (9A e 9B), onde não foram observadas alterações. Coloração HE, aumento de 400 X.





Hepatocitos normais

Figura 10- Fotomicrografia de uma secção transversal de 4 $\mu$ m de espessura obtidos do fígado de camundongos após a administração de SfP (9 mg/kg) Observa-se leve infiltrado mononuclear multifocal (setas branca) e discreta dilatação dos sinusóides pericentrolobulares (observado somente na administração oral)\*\*\* (setas laranjas). Verifica-se leve hiperplasia das células de células de Kupffer (observado somente na administração oral)\*\*\* (setas roxa)(10A.). Verifica-se hepatócitos subcapsulares com degeneração turva (setas laranja). A cápsula está indicada pela seta roxa (10B). Coloração HE, aumento de 400 X.

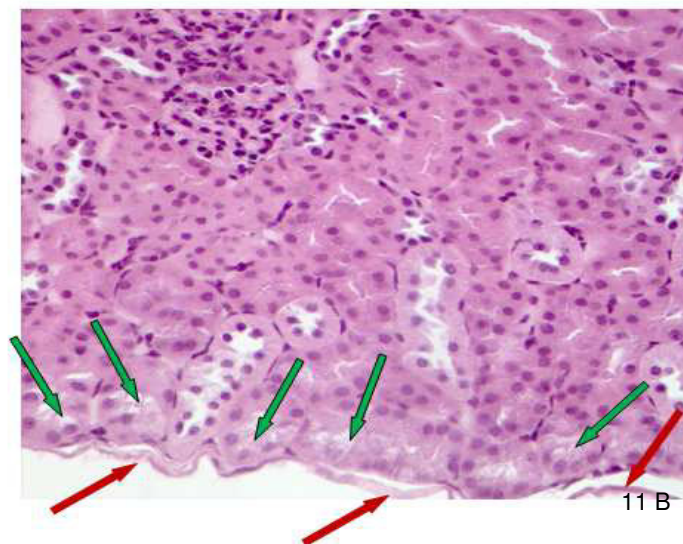
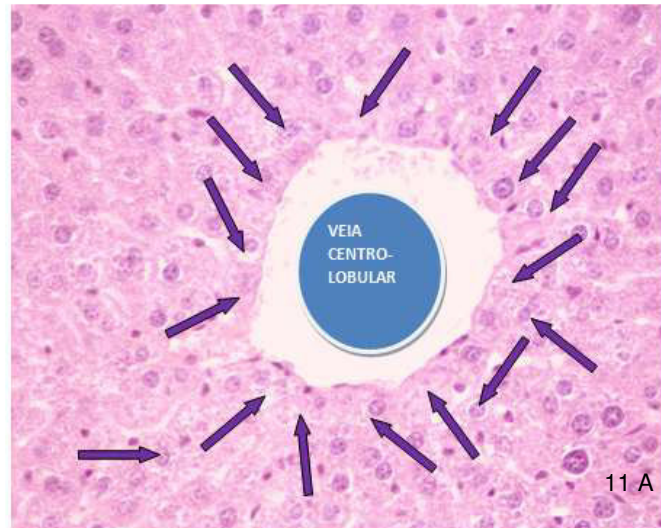


Figura 11- Fotomicrografia de uma secção transversal de 4  $\mu\text{m}$  de espessura obtidos do fígado de camundongos após a administração de SfP (9 mg/kg) Observa-se hepatócitos Pericentrolobulares com degeneração turva (setas roxa) Degeneração turva em região pericentrolobular (em volta da veia centrolobular). Notar que estes hepatócitos estão mais claros e maiores (setas roxa) que os demais da periferia (11A) Verifica-se leve degeneração tubular subcapsular e leve processo degenerativo tubular em região subcapsular (seta verdes) As setas vermelhas mostram a capsula renal (normal) de tecido conjuntivo frouxo. (11B) Coloração HE, aumento de 400 X.

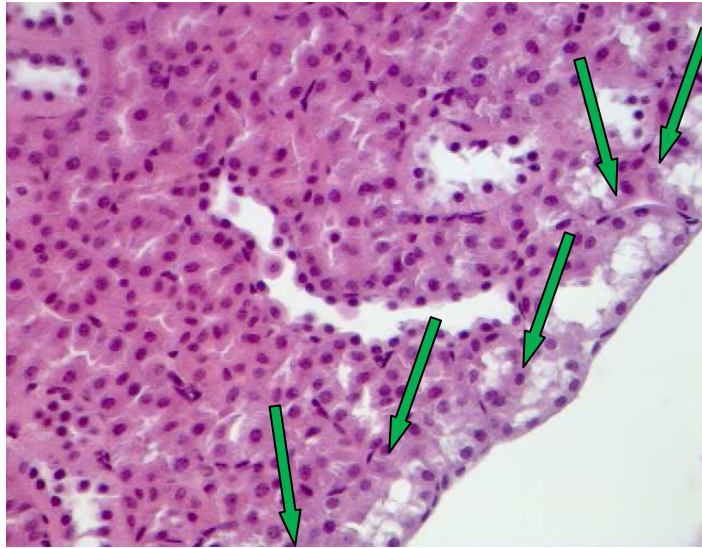


Figura 12- Fotomicrografia de uma secção transversal de 4 $\mu$ m de espessura obtidos do rim de camundongos após a administração de SfP (9 mg/kg). Observa-se leve processo degenerativo tubular em região subcapsular (seta verdes) Coloração HE, aumento de 400 X.

## 5.5 Edema de pata induzido por $\Lambda$ -carragenana (Cg)

O edema induzido por carragenana (Cg), considerado modelo bifásico de inflamação, envolve a participação de vários mediadores. Na fase inicial da resposta inflamatória (0-1 h), ocorre a liberação dos mediadores histamina, serotonina e bradicinina, enquanto na fase posterior (1-6 h) ocorre um aumento da produção de prostaglandinas, ativação da COX-2 e a liberação de NO (Lima-Batista et al., 2001).

Na avaliação do edema induzido pelo agente flogístico  $\Lambda$ -carragenana (Cg) foi observado que a PcL (1, 3 e 9 mg/kg) após a primeira hora de administração mostrou uma redução do edema até a quarta hora de observação para todas as concentrações utilizadas de forma dose dependente. Resultado semelhante foi obtido para o controle positivo dexametasona (Figuras 13 e 15).

Com a finalidade de verificar se o efeito inibitório está realmente relacionado a PcL foi realizado um outro ensaio de edema administrando a PcL (9 mg/kg) previamente incubada com seu hapteno mucina (1,25 e 3,0 mg/kg). O resultado obtido mostrou que o efeito redutor do edema pela PcL foi abolido ao longo do período de avaliação para as duas doses testadas de seu hapteno em 47,4 % e 61 %, respectivamente (Figuras 14 e 15).

Em estudos realizados por nosso grupo de estudo, foi relatado que a PcL apresentou efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório em modelos clássicos de dor e inflamação. Os autores atribuíram que o efeito antinociceptivo obtido está associado a inflamação, tendo em vista que através dos resultados obtidos nos ensaios de inflamação (migração celular e edema de pata) foi sugerido que o efeito anti-inflamatório da PcL está relacionado com a inibição do rolamento ou aderência de neutrófilos, ocasionada pela interação da PcL com as proteínas integrinas ou P-selectina de membranas (Silva et al.,2010).

Com base em outros estudos relacionados aos efeitos da PcL sobre a imunomodulação e a viabilidade celular *in vitro* em esplenócitos de camundongos foi demonstrado que a PcL foi capaz de induzir a produção das

interleucinas IL-6 e IL-10. Diante desses resultados, foi sugerido que o efeito anti-inflamatório da PcL pode estar relacionado com a liberação dessas interleucinas (Abreu et al., 2012, artigo aceito).

### **5.6 Atividade da mieloperoxidase (MPO)**

O efeito anti-inflamatório de moléculas também pode ser avaliado através da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), que encontra-se presente principalmente em grânulos azurófilos de neutrófilos e em concentrações mais baixas em monócitos e macrófagos. Portanto, a MPO pode ser utilizada como um marcador bioquímico da infiltração de neutrófilos em tecidos danificados, onde sua concentração é diretamente proporcional à concentração de neutrófilos em um tecido inflamado (Krawiz et al., 1984).

Diante do exposto, os tecidos removidos das patas dos ratos após o ensaio do edema de pata foram utilizados para quantificar a MPO. Os resultados obtidos demonstraram que houve uma redução da concentração da MPO de forma dose dependente da PcL administrada (1, 3 e 9 mg/kg). No entanto, essa redução foi abolida quando foram utilizados tecidos removidos das patas após tratamento com PcL (9 mg/kg) incubada com o seu hapteno mucina (1,25 e 3 mg/kg) (Figura 16).

Os resultados deste ensaio corroboram com os obtidos no ensaio do edema de pata, que mostrou um efeito anti-inflamatório para a PcL. Com base nos resultados de inflamação descritos anteriormente, a PcL na dose de 9 mg/kg passou a ser utilizada nos ensaios posteriores de sua aplicação em feridas induzidas em ratos e apresentados no capítulo a seguir (Capítulo 2).

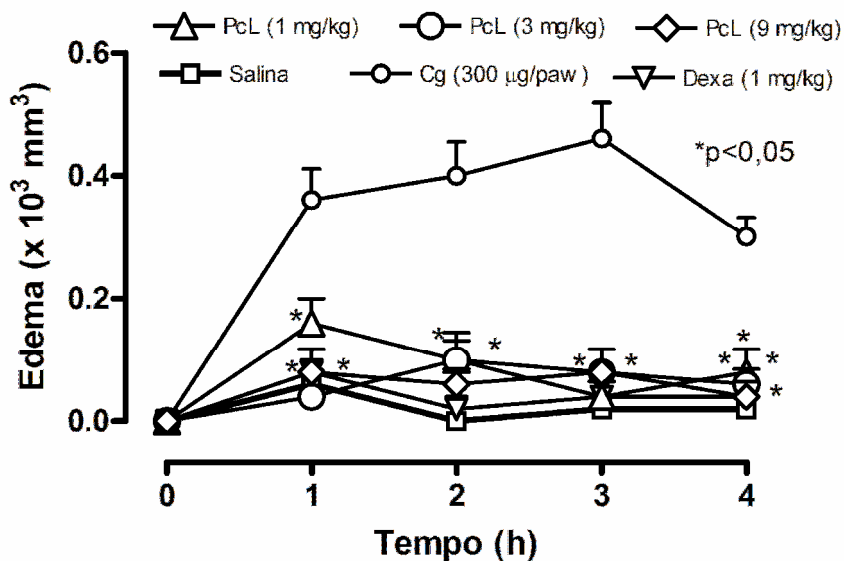


Figura 13 - Efeitos da PcL em edema de pata induzido por carragenana. Antes de receber uma injeção de carragenana (300 mg/cav; intra plantar), os ratos receberam solução salina ou PcL (1, 3 ou 9 mg/kg, i.v). Dexametasona (1 mg/kg) foi injetada via s.c. Outro grupo recebeu apenas salina (i.v) sem Cg. Cg ( $\lambda$ -carragenana); Dexa (Dexametasona); PcL (Lectina da alga marinha *Pterocladia capillacea*); M (Mucina). Os dados são expressos em média  $\pm$  S.E.M. de seis ratos para cada grupo. \*  $p < 0,05$  indica diferença significativa do grupo Cg (ANOVA, teste de Bonferroni).

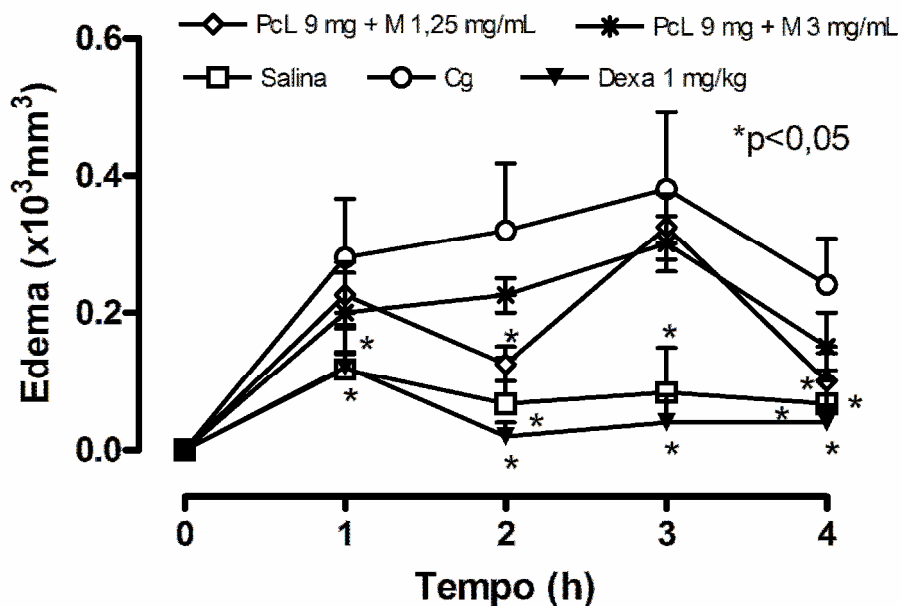


Figura 14 - Efeitos da PcL com mucina no edema de pata induzido por carragenana. Antes de receber uma injeção de carragenana (300 mg/cav; intra plantar), os ratos receberam PcL (9 mg/kg, i.v) com 1,25 mg/kg e 3 mucina mg/kg. Dexametasona (1 mg/kg) foi injetado via s.c. Outro grupo recebeu apenas salina (i.v) sem Cg. Cg ( $\lambda$ -carragenana); Dexa (Dexametasona); PcL (Lectina da alga marinha *Pterocladia capillacea*); M (Mucina). Os dados são expressos em média  $\pm$  S.E.M. de seis ratos para cada grupo. \* p < 0,05 indica diferença significativa do grupo Cg (ANOVA, teste de Bonferroni).



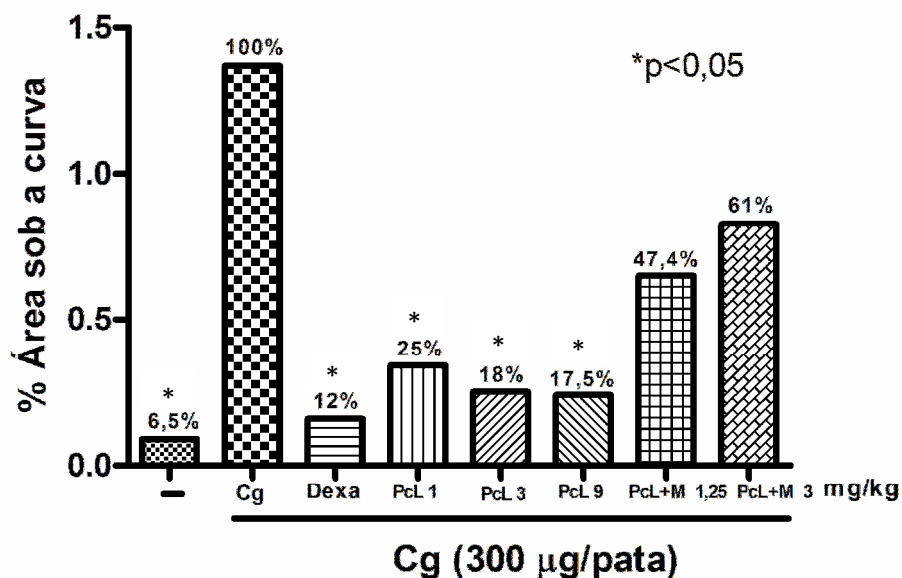


Figura 15 - Área sob a curva do teste de edema de pata. O percentual representa o tamanho da área que fica abaixo da curva. Cg representa a maior área correspondente a 100%. Cg ( $\lambda$ -carragenana); Dexa (Dexametasona); PcL (Lectina da alga marinha *Pterocladia capillacea*); M (Mucina). Os dados são expressos em média  $\pm$  S.E.M. de seis ratos para cada grupo. \* P < 0,05 indica diferença significativa do grupo Cg (ANOVA, teste de Bonferroni).



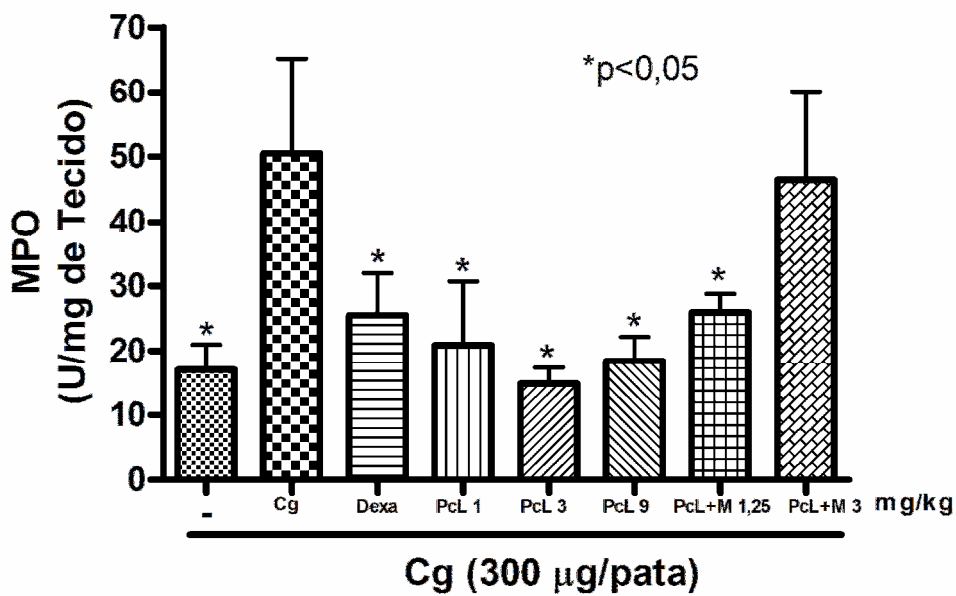


Figura 16 – Atividade da MPO (mieloperoxidase) em tecido obtido a partir de pata de ratos do teste do edema de pata. Atividade de mieloperoxidase (MPO) no sobrenadante de homogenatos de secções da pata onde foi injetada carragenana, PcL (1, 3 e 9 mg/kg), 9 mg/kg PcL com 1,25 e 3 mg/mL de mucina, dexametasona ou salina estéril, expressa como unidades de atividade de MPO por mg de tecido. Cg ( $\lambda$ -carragenana); Dexa (Dexametasona); PcL (Lectina da alga marinha *Pterocladia capillacea*); M (Mucina). Os dados são expressos em média  $\pm$  S.E.M. de seis ratos para cada grupo. \* P < 0,05 indica diferença significativa do grupo Cg (ANOVA, teste de Bonferroni).

## 5.7 Atividade antimicrobiana da PcL e dos SfP

Visando avaliar se a PcL e os SfP, a serem empregados nos ensaios posteriores de aplicação em feridas limpas induzidas em ratos (Capítulo 2), poderiam mostrar-se capazes de apresentar atividade antimicrobiana, foram realizados ensaios de atividade antimicrobiana utilizando as cepas patogênicas para humanos: *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis* subsp. *Choleraesuis* e *C. albicans*.

Desta forma, na determinação da atividade antimicrobiana da PcL (2 mg/m/L) e dos SfP (2 mg/m/L), por difusão em meios sólido (Tabela 6) e líquido, somente para PcL em concentrações que variaram de 25 µg/mL a 1000 µg/mL (Figura 17), levaram a resultados que permitiram constatar que PcL e SfP não foram capazes de inibir o crescimento das cepas testadas. Além disso, em meio sólido a base dos SfP foi verificado que os micro-organismos não utilizaram os SfP como fonte de carbono (Figura 18).

De acordo com estudos realizados por Lowry (1998) o *S.* é um importante patógeno devido à sua virulência, resistência aos antimicrobianos e associação a várias doenças, incluindo as enfermidades sistêmicas potencialmente fatais, infecções cutâneas e oportunistas e intoxicação alimentar. A espécie *P. aeruginosa* é descrita por Koneman *et al.* (2001) como um bacilo gram-negativo aeróbio, não fermentador, oriundo do solo, água, plantas e animais, incluindo o homem. Segundo Forbes *et al.* (1998) este bacilo é considerada uma das espécies bacterianas que vem sendo mais freqüentemente isolada a partir de amostras clínicas (coletadas de humanos) onde as infecções em geral foram observadas em sítios com tendência ao acúmulo de umidade, tais como; traqueostomia, cateteres permanentes, queimaduras, ouvido externo, feridas cutâneas exsudativas, do trato urinário e das vias respiratórias inferiores. Em outros estudos realizados por Laylee *et al.* (1957), foi constatado que o micro-organismo *S. choleraesuis* pode adentrar a corrente sanguínea causando uma infecção generalizada e conseqüentemente alta mortalidade.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com os obtidos por González del Val *et al.* (2011) que utilizando extratos etanólicos obtidos de 44 espécies de algas, incluindo a alga *P. capillacea*, em ensaios de atividade antimicrobianos, mostraram que nenhum dos extratos avaliados foram capazes de inibir o crescimento dos micro-organismos analisados.

Holanda *et al.* (2005) em estudos de atividade antimicrobiana de uma lectina purificada da alga *Solieria filiformis* utilizando 10 espécies de micro-organismos demonstraram que apenas três dos micro-organismos testados não apresentaram atividade antimicrobiana, sendo que duas das espécies que não apresentaram antimicrobiana também não apresentaram em nosso estudo (*S. aureus* e *E. coli*).

Tabela 6- Atividade antimicrobiana da PcL e dos SfP sobre cepas microbianas padrão (cepas ATCC), determinada pela técnica de difusão em agar

Cepa microbiana	PcL/SfP		Antimicrobiano	
	HI	mg/mL	HI	µg/µL
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	-	2	24/25	AMI 1,2
<i>E. coli</i> ATCC 10536	-	2	23/26	AMI 1,2
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	-	2	29/30	AMI 1,2
<i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708	-	2	29/30	AMI 1,2
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	-	2	25/25	CET 2

(-) sem atividade antimicrobiana.

AMI: amicacina;

CET: cetoconazol;

HI: halo de inibição (mm)

Volume aplicado em cada poço: 25 µL

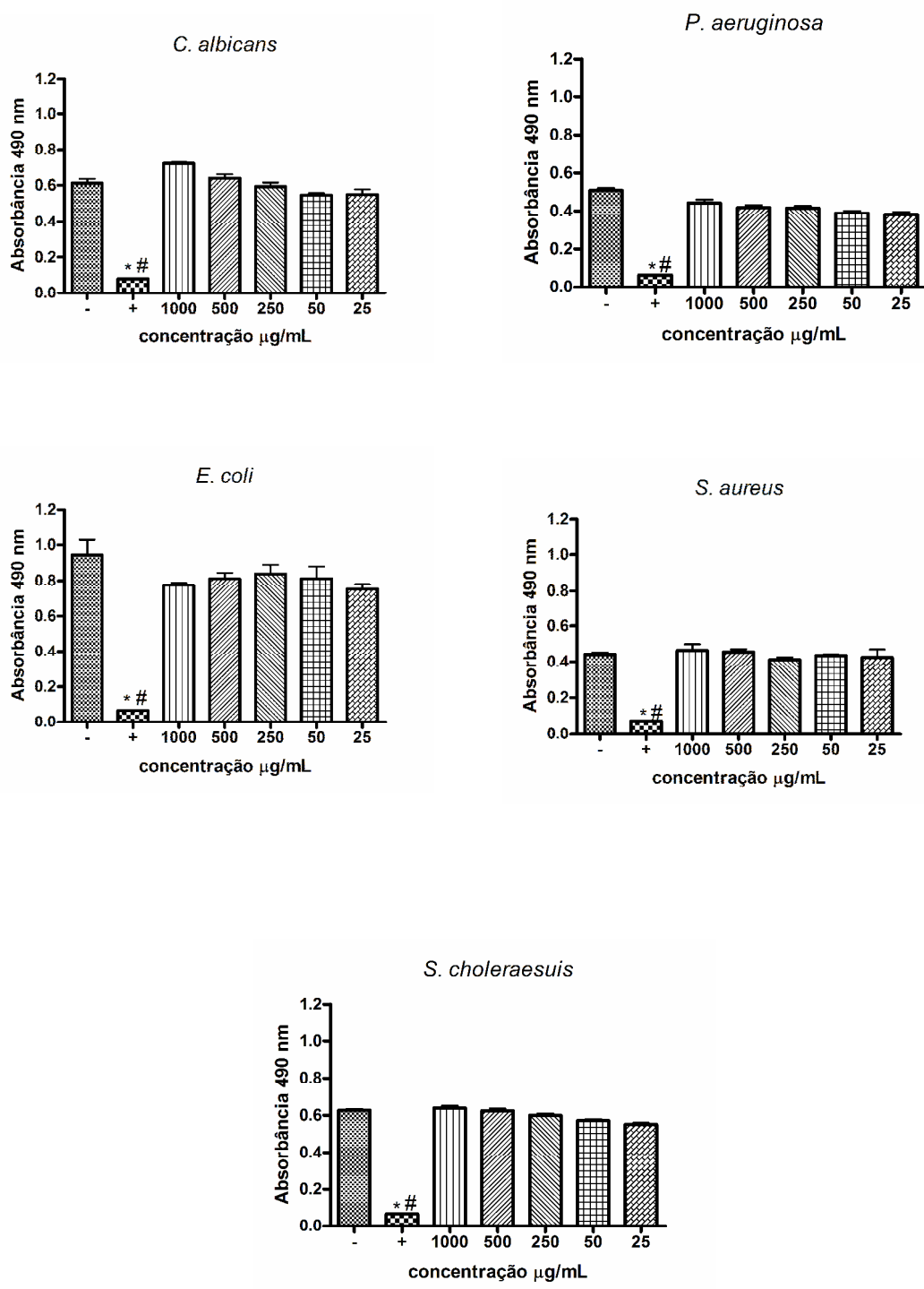


Figura 17 - Ensaio em meio líquido utilizando diferentes diluições de PcL (25 a 1000 µg/mL). Como controle positivo para as espécies de bactérias foi utilizado o antibiótico amicacina e para a espécie *Candida albicans* o cetoconazol. (\* # representam  $p < 0,05$ ).

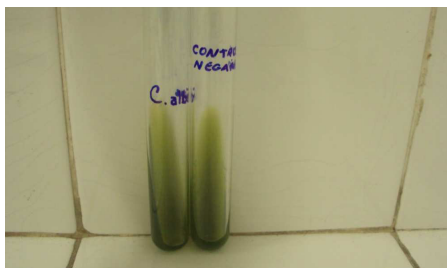
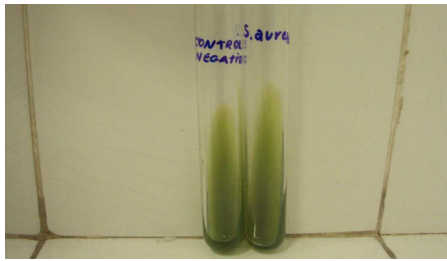


Figura 18 – Fotografia ilustrativa do meio sólido utilizando os polissacarídeos como uma possível fonte de carbono para o crescimento de micro-organismos.

## 6 CONCLUSÃO

- Verificou-se que a lectina da alga marinha vermelha *Pterocladia capilacea* (PcL) e os polissacarídeos sulfatados totais da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* (Sfp), administrados por duas vias de administração distintas (i.p e v.o), não demonstraram toxicidade através de dosagens séricas, exceto quando das análises histológicas de fígado e rim.
- A PcL demonstrou atividade anti-inflamatória reduzindo o edema de pata e atividade da enzima MPO. Estas atividades foram revertidas quando PcL foi administrada em conjunto com a glicoproteína mucina.
- A PcL e os SfP não foram capazes de inibir o crescimento das cepas testadas em meio sólido. PcL também não capaz de inibir o crescimento micobiano em meio líquido. Os SfP não são fonte de carbono para as espécies testadas.
- A PcL mostrou-se anti-inflamatória e foi aplicada como um agente anti-inflamatório por via tópica em feridas limpas induzidas no dorso de ratos e os SfP como um veículo alternativo para a administração da referida lectina (Capítulo 2).

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, T.M., Silva, L.M.C.M., Vanderlei, E.S.O., Melo, C.M.L., Pereira, V.R.A., Benevides, N.M.B. Cytokine production induced by marine algae lectins in BALB/c mice splenocytes. **Protein and Peptid Letters**, 2012.

Ainouz, I. L. & Sampaio, A. H. Screening of brazilian marine algae for hemagglutinins. **Botanica Marina**, v. 34, p. 211-214, 1991.

Ainouz, I. L., Sampaio, A. H., Benevides, N. M. B., Freitas A. P., Costa, F. H. F., Carvalho, M. R. & Pinheiro-Joventino, F. Agglutination of enzyme treated erythrocytes by brazilian marine algal extracts. **Botânica Marina**. v. 35, p. 475-479, 1992.

Araújo, I.W.F., Vanderlei, E. S. O., Rodrigues, J. A. G., Coura, C. O., Quinderé, A. L. G., Fontes, B. P., Queiroz, I. N. L., Jorge, R. J. B., Bezerra, M. M., Silva, A. A. R., Chaves, H. V., Monteiro, H. S. A., Paula, R. C. M., Benevides, N. M. B. Effects of a sulfated polysaccharides isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1207-1215, 2011.

Benevides, N. M. B., Leite A. M. & Freitas A. P. Atividade hemaglutinante na alga marinha vermelha *Solieria filiformis*. **R. Bras. Fisiol. Veg**, v. 8, n. 2, p. 117-122, 1996.

Benevides, N. M. B., Oliveira, S. R. M., Holanda, M. L., Melo, F. R., Freitas, A. L.P. and Sampaio, A. M. Seasonal variations in hemagglutinating activity and chemical composition of two red marine algae *Gracilaria dominigensis* and *Gelidium pusillum*. **R. Bras. Fisiol. Veg**, v. 11, n 2, p. 91-95, 1999.

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., Assureuy, 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-Schmiedebergs Arch Pharmacol*, v. 377, p.139-148, 2008.



Bradley PP, Christensen RD, Rothstein G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood** v. 60, 618-622, 1982.

Cardozo, K. H. M., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcão, V. R., Tonon, A.P., Lopes, N. P., Campos, S., Torres, M. A., Souza, A. O., Colepicolo., Pinto, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 146, p. 60-78, 2007.

Chowdary, K.P.R., Rao, Y.S. Mucoadhesive microspheres for controlled drug delivery. **Biol. Pharm. Bull**, v. 27, p. 1717-1724, 2004.

Clinical and a Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. 8<sup>th</sup> ed. Approved Standard: M2-A8. CLSI, 2003.

Cunha, P. L.R., Paula, R. C. M., Feitosa, J.P.A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Quim. Nova**, V. 32, N. 3, 649-660,2009.

Dietrich, C. P; Dietrich, S. M. C. Electrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, v. 70, p. 645-647, 1976.

Garson, J. Marine natural products. **Nat. Prod.**v.6, 143-170, 1989.

Güven, K. C., Percot, A., Sezik, E. Alkaloids in Marine Algae **Mar. Drugs**,v. 8, 269-284, 2010.

Falshaw,R., Bixler, H.J., Johndro, K. Structure and performance of commercial kappa-2 carrageenan extracts: I. Structure analysis, **Food Hydrocolloids**, v. 15 441– 452,2001.

Farmacopéia Brasileira IV ed. Atheneu editor, São Paulo, LTDA, 1998.

Fernandéz, L. E., Valiente, O. G., Mainardi, V., Bello, J. L., Vélez, H., Rosado, A. Isolation and characterization of an antitumor active Agar-type polysaccharide of *Gracilaria domingensis*. **Carbohydrate Research**, v. 190, p. 77-83, 1989.

Freitas, A. L. P., Teixeira, D. I. A., Costa, F. H. F., Farias, W. R. L., Lobato, A. S. C., Sampaio, A. H., Benevides, N. M. B. A new survey of brazilian marine algae for agglutinins. **Journal of applied phycology**, v. 9, p. 495-501, 1997.

Forbes, B.A; Sahm, D.F; Weissfeld, A.S. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. Tenth Edition, Missouri:MOSBY,1998.

Hames, B. D. AND D. Rickwood. **Gel electrophoresis of proteins. A Practical Approach.** IRL Press, Washington, pp. 287, 1983.

Holanda, M. L. Iota carragenana da alga marinha *Solieria filiformes* versus iota-carragenana comercial: Propriedades Estruturais e Reológicas. 180 f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-Ceará, 2007.

Holanda, M.L., Melo, V. M. M., Silva, L. M. C. M., Amorim, R. C. N., Pereira, M. G., Benevides, N. M. B. Differential Activity of a Lectin From *Solieria filiformes* Against Human Pathogenic Bacteria. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, p. 1769-1773, 2005.

Jepson, M.A., Clark, M.A., Hirst, B.H. M. cell targeting by lectins: a strategy for mucosal vaccination and drugs delivery. **Adv. Drug Deliv. Ver**, v. 56, p. 511-525, 2004.

Knill, C.J., Kennedy, J. F., Mistry, J., Miraftab, M., Smart, G., Grocock, M. R., Williams. Alginate fibres modified with unhydrolysed and hydrolysed chitosans for wound dressings. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, p. 65-76, 2004.

Krawisz J.E, Sharon P., Stenson W.F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in the rat and hamster model. **Gastroenterology** v.87, 1344-1350, 1984.

Koneman, E.W; Allen, S.D; Janda, W.M; Schreckenberger, P.C . Diagnóstico Microbiológico-Texto e Atlas Colorido. 5ª edição, Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

Laylee, A.M., M.B., Ch.B. Human infection with *Salmonella Choleraesuis*. **British Medical Journal**, v. 1, p. 1284, 1957.

Liao, W. R., Lin, J. Y., Shieh, W. Y., Jeag, W. L., Huang, R. Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. **J. Ind. Microbiol Biotechnol**, v.30, p. 433 - 439, 2003.

Lima-Batista KV, Ribeiro RA, Balestieri FMP, Thomas G, Piuvezam MR. Anti-inflammatory activity of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) Leaf Extract. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 20, 275-279, 2001.

Lowry, F. D. *Saphylococcus aureus* infections. **New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 520-532, 1998.

Marques, C.T., Azevedo, T.C.G., Nascimento, M.S., Medeiros, V.P., Alves, L.G., Benevides, N.M.B., Rocha, H.A.O., Leite, E.L. Sulfated fucans extracted

from algae *Padina gymnospora* have anti-inflammatory effect. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 115-122, 2012.

Moe, S. T.- Alginates. In: Stephen, A. M. Food Polysaccharides and their Applications. New York: Marcel Dekker. Inc., p. 245-286, 1995.

Murano, E., Toffanin R., Cecere., E., Rizzo., R. Knutsen, S. H. Investigation of the carrageenans extracted from *Solieria filiformis* and *Agardhiella subulata* from Mar Piccolo, Taranto. **Marine Chemistry** v.58, 319-325, 1997.

Nascimento, A. E. **Efeitos tóxicos de lectina e toxina da alga marinha *Solieria filiformis* sobre camundongos e *Boophilos microplus* (carrapatos)**. 130 f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-Ceará, 2003.

Neves, S, A., Dias-Baruffi., Freitas, A. L. P., Roque-Barreira, M. C. Neutrophil migration induced *in vivo* and *in vitro* marine algal lectins. **Inflamm. Res.** v 50, p.486-490, 2001.

Neves, S, A., Freitas, A. L. P., Souza, B. W. S., Rocha, M. L. A., Correia, M. V. O., Sampaio, D. A., Viana, G. S. B. Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux. **Brasilian Journal of Medical and Biological research**, v. 40, p. 127-134, 2007.

Oliveira, A.X. et al. Enumeração de coliformis totais e bactérias mesófilas em leite pasteurizado tipo "C" comercializado na cidade de Salvador-BA. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v.21, n. 150, p. 235, 2006.

Oliveira, S. R. M., Nascimento, A. E., Lima, M. E. P., Leite, Y. F. M. M., Benevides, N. M. B. Purification and characterisation of a lectin from the red marine alga *Pterocladia capillacea* Santel & Hommers. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, p. 397- 403, 2002.

Pandit, N.K. Introdução às ciências farmacêuticas. Porto Alegre: Artmed, 2008, 424p.

Pereira, M. G., Benevides, N. M. B., Melo, M. R.S., ValentE, A. Melo, F. R., Mourão, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of a red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulantaction? *Carbohydrate Research*, v. 340, 2015-2023, 2005.

Peumans, W. J. & Van Damme, W. J. N. Lectin as plant defense proteins. **Plant Physiology. Belgium**, v.109, p. 347- 352, 1995.

Peumans, W. J. & Van Damme, W. J. N. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **In Biothecnology and Genetic Enginerring Reviews**, v 15, p. 199 - 228, 1998.

Prophet, E. B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. Laboratory methods in histotechnology. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, dc. 1992. 279p.

Rodrigues, J.A.G., Araújo, I.W.F., Paula, G.A., Lima, T.B., Benevides, N.M.B. Isolamento, fracionamento e atividade anticoagulante de iota-carragenanas da *Solieria filiformis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n. 11, p. 2310-2316, 2010.

Rodrigues, J.A.G., Araújo, I. W. F., Paula, G.A., Vanderlei, E.S.O., Queiroz, I.N.L., Quinderê, A.L.G., Coura, C.O., Bessa, E.F., Lima, T.B., Benevides, N.M.B. Isolamento, fracionamento e avaliação toxicológica *in vivo* de polissacarídeos sulfatados de *Hypnea musciformis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.7, p.1211-1217, 2011.

Roman, R. M., Wendland, a. E., Polanczyk, C. A. Mieloperoxidase e doença arterial coronariana: da pesquisa à prática clínica. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. v.91, p. 11 e 12, 2008.

Rudiger, H., Gabius, H.J. Plants lectins: occurrence, biochemistry, functions and application. **Glycoconj. J.** v. 18, p. 589 - 613, 2001.

Silva, L.M.C.M., Lima, V., Holanda, M.L., Pinheiro, P. G., Rodrigues, J.A.G., Lima, M.E.P., Benevides, N.M.B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from marine red alga *Pterocladia capillacea*. **Biol. Pharm. Bull.** v. 5, p. 830-835, 2010.

Silva, F. R. F., Dore, C. M. P. G., Marques, C. T., Nascimento, M. S., Benevides, N. M. B., Rocha, H. A. O., Chavante, S. F., Leite, E. L. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: Action of major types of commercial carrageenans. **Carbohydrates polymers**, v. 79, p. 26-33, 2010.

Sousa, m.B., Pires, K.M.S., Alencar, D.B., Sampaio, A.H., Saker-Sampaio, S.  $\alpha$ -,  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -tocoferol em algas marinhas in natura. **Ciência. Tecnol. Aliment.**, v. 28, p. 953-958, 2008.

Stanley, N. Agars. In: STEHEN, A. M. Food Polysaccharides and their Applications. New York: Marcel Dekker. Inc., p. 187-204, 1995.

Stephanie, B., Eric., D., Sophie, F.M., Christian, B., Yu, G. Carrageenan from *Solieria chordalis* (Gigartinales): Structural analysis and immunological activities

of the low molecular weight fractions. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, 448–460, 2010.

Stephano, J.L., M. AND I. Rojas-Galicia. Advantages of picrate fixation for staining polypeptides in polyacrylamide gels. **Analytical Biochem**, v. 152, p. 308 - 313, 1986.

Tobacman, J.K. Review of Harmful Gastrointestinal Effects of Carrageenan in Animal Experiments. **Environmental Health Perspectives**, v.109, 983-994, 2001.

Thompson, J.E. A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos. Porto Alegre: Artemed, 2006.

Van DE Velde, F. Khutsen, S.H., Usov, A. I., Rollema, H. S., Cerezo, A. S. H. C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Food Science & Technology**, v. 13, p. 73-92, 2002.

Vanderlei, E. S. O., Araújo, I. W. F., Quinderé, A. L. G., Fontes, B. P., Eloy, Y. R.G., Rodrigues, J. A. G., Silva, A. A. R., Chaves, H. V., Jorge, R. J. B., Menezes, D. B., Evangelista, J. S. A. M., Bezerra, M. M., Benevides, N. M. B. The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Inflammation research**, 2011.

Vanderlei, E.S.O., Patoilo, 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*. **International Immunopharmacology**, v.10, 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 algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*. **Brazilian Journal of medical and Biological Research**, v. 35, p. 713-722, 2002.

Vilela, P.R., Rafael, J.A., Silveira, I.A., Furtado, K. M.F. Controle de qualidade de formulação cosmética e tintura – mãe de *Calendula officinalis* L. XIV INIC, X EPG, IV ININC Jr. 2010.

Wang, H., NG. T.B., OOI, V. E. C., Liu, W.K. Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 32, p. 365 - 372, 2000.

Wang, Q., Rademacher, B., Sedlmeyer, F., Kulozik, U. Gelation behaviour of aqueous solutions of different types of carrageenan investigated by low-intensity-ultrasound measurements and comparison to rheological measurements. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, 465 – 472, 2005.

Winter, C. A., Risely, E. A., Nuss, G. W. Carrageenan-induced edema in the hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 111, p. 544 - 547, 1962.

Yuguchi, Y., Thuy, t., Urakawa, H., Kajiwara, K. **Food Hydrocolloid**, v. 16 515, 2002.

Zhou, G., Sheng, W., Yao, W., Wang, C. Effect of low molecular  $\lambda$ -carragenana from *Chondrus ocellatus* on antitumor H-22 activity of 5-Fu. **Pharmacological Research**, p. 1-6, 2005.

## **CAPÍTULO 2**

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Esquema de preparação dos géis de PcL + SfP, PcL + C e SfP. 101
- Figura 2- Esquema do modelo de feridas experimentais 105
- Figura 3 - Análise reológica dos géis SfP, PcL+ SfP e PcL+C. A figura 3A representa o efeito da temperatura sobre a viscosidade dos géis a uma taxa de cisalhamento constante a 1 Hz, 3 Pa. A figura 3 B representa o efeito da taxa de cisalhamento sobre a viscosidade dos géis a 25° C, 1 Hz. 110
- Figura 4 - Percentual de redução das lesões (mm<sup>2</sup>). 4A/4B/4C/4D/4E representam a porcentagem de contração da ferida no controle, Kollagenase®, SfP, PcL+ SfP e PcL+C grupos, respectivamente. Os dados são expressos em média ± S.E.M. de seis ratos para cada grupo. \* p <0,05 indica diferença significativa de cada grupo em relação ao dia 0. (ANOVA, teste de Bonferroni). 117
- Figura 5 - Fotografia das feridas através de análise macroscópica (5 A/5B/5C/5D/5E). A figura mostra o processo de cicatrização dos grupos no 6º dia. (5A) não tratada; (5B) K; (5C) SfP; (5D) PcL + SfP e (5E) PcL+C. A ferida esquerda representa o controle, que não recebeu tratamento em conjunto com o grupo de animais em (4A) que não recebeu tratamento em nenhuma uma das feridas e as da direita receberam tratamento. SfP=polissacarídeos sulfatados totais de *Solieria filiformis*, PcL= Lectina da alga marinha *Pterocladia capillacea*, C=Carbopol 940. 118
- Figura 6 - Medição da atividade MPO (mieloperoxidase) em tecido obtido das lesões de animais sacrificados nos dias 0 (6A), 4 (6B) e 6 (6C). Os dados são 121



expressos em média  $\pm$  S.E.M. de seis ratos para cada grupo. \*  $p < 0,05$  indica diferença significativa do grupo que não recebeu nenhum tratamento. (ANOVA, teste de Bonferroni). (-) Indica animais que não receberam nenhum tipo de tratamento. SfP=polissacarídeos sulfatados totais de *Solieria filiformis*, Pcl= Lectina da alga marinha *Pterocladia capillacea*, C=Carbopol 940.

Figura 7- Fotomicrografia de uma secção transversal de 4  $\mu$ m de espessura obtidos de pele de ratos que não receberam tratamento nos dias 0 (7A/B), 4 (7C/D) e 6 (7E/F) dia. Coloração HE, e a área marcada com círculo representa os aumentos de 100 e 400 X, respectivamente. 124

Figura 8- Fotomicrografia de uma secção transversal de 4  $\mu$ m de espessura obtidos de pele de ratos que receberam tratamento com kollagenase nos dias 0 (8A/B), 4 (8C/D) e 6 (8E/F) dia. Coloração HE, e a área marcada com círculo representa os aumentos de 100 e 400 X, respectivamente. 1=folículo piloso; 2=glândula sebácea; 3=epiderme; 4=derme; 5= melanócitos. 125

Figura 9- Fotomicrografia de uma secção transversal de 4  $\mu$ m de espessura obtidos de pele de ratos que receberam tratamento com SfP nos dias 0 (9A/B), 4 (9C/D) e 6 (9E/F) dia. Coloração HE, e a área marcada com círculo representa os aumentos de 100 e 400X, respectivamente. 1=epiderme; 2=separação; 3=derme. 126

Figura 10- Fotomicrografia de uma secção transversal de 4  $\mu$ m de espessura obtidos de pele de ratos que receberam tratamento com Pcl+SfP nos dias 0 (10A/B), 4 (10C/D) e 6 (10E/F) dia. Coloração HE, e a área marcada com círculo representa os aumentos de 100 e 400 X, respectivamente. 127

Figura 11- Fotomicrografia de uma secção transversal de 4  $\mu\text{m}$  de espessura obtidos de pele de ratos que receberam tratamento com PcL+SfP nos dias 0 (15A), 4 (15B) e 6<sup>o</sup> (15C) dia. Coloração HE, e a área marcada com círculo representa os aumentos de 100 e 400 X, respectivamente. 128

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -. Qualidade microbiológica dos geis SfP e PcL+SfP	112
Tabela 2 - Tamanho da ferida (mm <sup>2</sup> ) no modelo de excisão.	118

## LISTA DE ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

ALT- Alanina aminotransferase  
AMPc- Adenosina monofosfato  
ANOVA- Análise de variância  
AST- Aspartato aminotransferase  
ATP- Adenosina trifosfato  
BSA- Albumina Sérica Bovina  
o C- Grau centígrado  
Cg- Carragenana  
COX-1- Cicloxigenase 1  
COX-2- Cicloxigenase 2  
DEAE- Dietilaminoetil  
DEXA- Dexametasona  
EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético  
E.P.M- Erro padrão da média  
HE- Hematoxilina-Eosina  
i.v- intravenosa  
i.p- intraperitoneal  
i.pl-intraplantar  
kDa- Kilodaltons  
min- minuto  
mg- miligramas  
mL- mililitros  
nm- nanômetros  
PcL- Lectina da Alga Marinha Vermelha *Pterocladia capillacea*  
PI- Pico I  
PII- Pico II  
PGI<sub>2</sub>- Prostaglandinas da série I  
PGE<sub>2</sub>- Prostaglandinas da série E  
PO- Pós-operatório  
s- segundos

s.c- subcutânea

SDS- Dodecil sulfato de sódio

SNC- Sistema Nervoso Central

TEMED- N,N,N,N,tetrametiletilenodiamino

TGO-Transaminase Glutâmica Oxalacética

TGP- Transaminase Glutâmica Pirúvica

TRIS- Hidroximetil aminometano

U.H- Unidade de hemaglutinação

μL- Microlitros

%- Percentagem

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A importância terapêutica de compostos bioativos

Por muito tempo, a humanidade tem se beneficiado de substâncias extraídas a partir de plantas, animais ou provindas de microorganismos (Kayser et al., 2003). Especial atenção tem sido atribuída a substâncias eficazes no controle da resposta inflamatória. Com isso, a busca incansável de substâncias eficazes com mínimos efeitos colaterais tem despertado em muitos pesquisadores o interesse por vegetais como fonte desses compostos.

Os produtos de origem vegetal estão relacionados com a exploração tecnológica e econômica de vegetais empregados na prevenção, no tratamento e na cura de condições patológicas que acometem o homem e os animais (Nunes-Pinheiro et al., 2003).

A importância de substâncias ativas derivadas de vegetais no desenvolvimento de fármacos pode ser comprovada pela utilização de substâncias tais como: morfina, quinina, dicumarol, digitoxina, atropina dentre outros. Isto sem mencionar que a descoberta das atividades de algumas substâncias também tem favorecido novas possibilidades de intervenções terapêuticas. São exemplos, a cocaína, que originou os anestésicos locais e a atropina, que introduziu a terapêutica dos anticolinérgicos (Orzechowski et al., 2002).

Com o aumento da utilização de produtos naturais, cresce a busca por alternativas de substâncias que possibilitem a prevenção e tratamento de doenças sem agredir o organismo. As pesquisas por novas formas farmacêuticas fitoterápicas vêm crescendo, a fim de viabilizar fitofármacos eficazes, seguros e com boa biodisponibilidade, entre estas formas a de aplicação na pele (Lopes et al., 2006).

Segundo Courtois, 2009 polissacarídeos e oligossacarídeos obtidos a partir de plantas terrestres e algas, representam uma grande diversidade de biomoléculas com potenciais aplicações na terapêutica e na biotecnologia.

Desta forma, os componentes bioativos de plantas de especial interesse incluem grupos como polifenóis, estrógenos, lectinas, oligossacarídeos e ácidos graxos poliinsaturados. Além disso, elementos de natureza protéica, glicídica, lipídica e outros constituintes químicos, mostram-se possuidores de atividades biológicas *in vitro* e/ou *in vivo* (Orzechowski et al., 2002). Nesse sentido, tem-se dado grande ênfase a estudos de substâncias naturais que possam potencialmente apresentar atividade terapêutica e, claramente, venham representar uma alternativa eficaz, segura e menos onerosa à população. Como exemplo de atividade biológica destaca-se a propriedade cicatrizante apresentada pela jaqueira (*Artocarpus heterophyllus* Lam) que é atribuída a uma proteína encontrada na semente de sua fruta que em caso de queimaduras de pele, proporciona a regeneração do tecido danificado. Esta proteína é a lectina KM+ que além de induzir a proliferação celular, favorece a regeneração do tecido (Vitorino Filho et al., 2007).

Assim, os vegetais vêm se tornando fontes importantes de novos fármacos, onde os considerados vegetais inferiores, tais como as algas marinhas, têm despertado o interesse de muitos pesquisadores, pois são fontes de moléculas bioativas com potencial na área biológica.

Segundo Cardozo et al. (2007), a aplicação de compostos isolados de diversas classes de algas visa obter importantes novos agentes e como exemplo dessas moléculas, destacam-se as proteínas lectinas e os polissacarídeos. Estas moléculas têm apresentado atividade antiinflamatória sendo utilizadas em pesquisas biomédicas e proporcionado bons resultados (Smit, 2004).

Assim, diante da busca de novas alternativas naturais, as quais possam ser eficazes e apresentem poucos efeitos adversos, acredita-se que as algas

marinhas sejam importantes fontes alternativas de novos produtos e que possam vir a ser aplicados no processo de cicatrização.

## **1.2 Mecanismos envolvidos na cicatrização**

Diante das inúmeras afecções que podem atingir a pele proporcionando danos de variados graus, estão incluídas as feridas cujo processo de cicatrização envolve uma complexa sequência de eventos celulares e bioquímicos, com o objetivo de restaurar a integridade tecidual após o trauma. Este processo caracteriza-se pela homeostase, inflamação e formação de tecido de granulação. Durante a fase inflamatória, são observados infiltrados celulares (neutrófilos, linfócitos e macrófagos), cuja participação é fundamental para regular o processo de reparação, pois secretam citocinas e linfocinas efetoras de crescimento que atuam como sinalizadores moleculares (Schirato et al., 2006).

Assim, para otimizar a reabilitação de lesões e a utilização de biomateriais, compreendidos, como materiais interativos capazes de estabelecer uma afinidade apropriada com o tecido vizinho sem a indução de uma resposta adversa do hospedeiro (Ratner & Bryant, 2004), pesquisas vêm sendo desenvolvidas. Portanto, o tratamento de feridas ainda é motivo de diversos estudos pela falta de consenso a respeito da melhor forma de tratamento (Cavazana et al., 2007). Com base neste aspecto, a busca por tratamentos alternativos das feridas cutâneas tem sido intensificada nos últimos anos (Monteiro et al., 2007).

Dentre as características que um biomaterial antiinflamatório local deva apresentar destacam-se: boa relação custo/benefício, manutenção do leito da ferida com umidade ideal e áreas periféricas secas protegidas, além de facilidade de aplicação e adaptabilidade (Mandelbaum et al., 2003).

Portanto, os curativos comercializados pela indústria farmacêutica como hidrocolóides, carvão ativado e alginatos vêm sendo utilizados na cicatrização



de feridas (Coelho et al., 2002). Entretanto o acesso a esta tecnologia é restrito, tornando-se necessário investigar outras formas de terapia na busca de um embasamento científico para práticas alternativas voltadas para o uso popular e de custo acessível (Monteiro et al., 2007).

Em organismos superiores o reparo de tecidos pode ocorrer de duas formas: pela regeneração com a reposição da atividade funcional do tecido ou pela cicatrização com restabelecimento da homeostasia do tecido com perda da atividade funcional pela formação de cicatriz fibrótica (Balbino et al., 2005).

O processo de cicatrização de feridas consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares e interação para que ocorra a repavimentação e a reconstituição do tecido. Tal evento é um processo dinâmico que envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos que se comportam de forma harmoniosa a fim de garantir a restauração tissular (Mandelbaum et al., 2003).

Diferentes classificações didáticas são utilizadas para facilitar o entendimento de um processo dinâmico e com fases interdependentes como a cicatrização. Segundo Schultz et al. (2003), feridas ocasionadas por traumas envolvem um processo complexo dividido em quatro estágios, os quais são: coagulação, inflamação, proliferação celular e reepitelização.

Logo após a formação do coágulo é estabelecida uma barreira impermeabilizante que protege de contaminação o processo de lesão tecidual através de uma liberação local de histamina, serotonina e bradicinina que irão ocasionar vasodilatação e aumento de fluxo sanguíneo local e, conseqüentemente, sinais inflamatórios como calor e rubor. A permeabilidade capilar aumenta causando extravasamento de líquido para o espaço extracelular, e edema. A fase proliferativa tem início após o 3º dia da lesão e é considerada o marco inicial da formação da cicatriz. Ela é caracterizada pela formação de tecido de granulação que é constituído por um leito capilar composto por fibroblastos, macrófagos, um frouxo arranjo de colágeno, fibronectina e ácido hialurônico. Os fibroblastos apresentam a função primordial de sintetizar o colágeno ainda na fase celular da inflamação. O colágeno é uma

proteína de alto peso molecular responsável pela força da cicatriz, cuja síntese é dependente da oxigenação das células. Nas primeiras 24 a 36 horas após a lesão, fatores de crescimento epidérmico estimulam a proliferação de células do epitélio caracterizando assim a fase de reepitelização (Tazima et al., 2008).

Considerando-se que o processo de cicatrização é um fenômeno local do qual participam elementos comuns a vários setores do organismo, é fácil imaginar que fatores ambientais e fisiológicos exerçam grande impacto na evolução da cicatrização, podendo exercer influência na qualidade da cicatriz, no tempo de cicatrização e na presença ou não de complicações (Biondo-Simões et al., 2006).

Embora, a inflamação tenha sido reconhecida como um dos primeiros participantes na cicatrização de feridas, a compreensão da importância da inflamação e seu papel regulador na cicatrização tem sido um processo gradual onde conexão entre a inflamação e cicatrização de feridas pode ser rastreada até ao antigo Egito (Henry & Garner, 2003). Assim, o uso de substâncias químicas para melhorar a dor e a inflamação é uma das necessidades mais antigas da humanidade (Monteiro et al., 2008).

Como a ciência da cicatrização de feridas progride, os investigadores continuam a desenvolver novas idéias e possíveis terapias, cuja inflamação estimula e coordena as funções essenciais da cicatrização (Henry & Garner, 2003).

### **1.3 Inflamação**

A inflamação é um processo geralmente agudo, envolvendo eventos vasculares, neutrófilos e mastócitos. A considerada aguda pode evoluir para formas crônicas, cuja fase crônica é mais longa e caracterizada pela presença de células mononucleares, macrófagos, linfócitos e pela proliferação do tecido conectivo (Fellet et al., 2002). Os neutrófilos estão implicados na liberação de citocinas inflamatórias, mediadores lipídicos e enzimas capazes de promover dano tecidual (Holz et al., 2008).

O processo inflamatório pode ser caracterizado por: vasodilatação dos vasos sanguíneos locais, aumento da permeabilidade dos capilares locais, coagulação dos líquidos nos espaços intersticiais, migração de inúmeros granulócitos e monócitos para o tecido e edema das células. A reação inflamatória consiste em um evento complexo que envolve o reconhecimento do agente/estímulo lesivo, para sua posterior destruição e tentativa de reconstruir o tecido danificado. O reconhecimento desencadeia a ativação e a amplificação do sistema imune resultando na ativação de células e na liberação de diversos mediadores responsáveis pela resposta inflamatória (Nathan, 2002). Assim, dos inúmeros produtos teciduais que causam essas reações incluem histamina, bradicinina, serotonina, prostaglandinas, produtos de reação do sistema da coagulação sanguínea e múltiplas substâncias denominadas linfocinas, que são liberadas pelos linfócitos T sensibilizados (Wagner & Roth, 2000).

A maioria dos mediadores realizam atividades ligando-se a receptores específicos em células alvo, onde podem estimular a liberação de mediadores pelas próprias células-alvo, constituindo assim mecanismos por amplificação ou, neutralização dos mediadores iniciais. Eles podem atuar em um ou vários tipos celulares, possuir alvos difusos, ou ainda, apresentar efeitos diversos, de acordo com os tipos de células e tecidos. Os mediadores da dor inflamatória compreendem, portanto, os que causam sensibilização do nociceptor (hiperalgésicos) e os que ativam diretamente o nociceptor (Cotran et al., 2000).

Sabe-se que os medicamentos utilizados para amenizar o processo inflamatório são os antiinflamatórios cuja finalidade é a contenção e a reversão da inflamação, seja ela local ou sistêmica. Eles devem apresentar rapidez de ação, potência analgésica e segurança (Mendes et al., 2001).

#### **1.4 Pesquisas de novos produtos para a inflamação e regeneração de tecidos**

A pele é o maior órgão do corpo e uma de suas principais funções é protegê-lo de agentes nocivos, que podem propiciar o surgimento de

ferimentos, infecções e inflamações (Medeiros et al., 2009). Ela serve como uma via de administração de fármacos possibilitando a permeação e facilitando que os mesmos atinjam a circulação sistêmica (Lopes et al., 2006).

Desta forma, tentativas humana de intervir no processo de cicatrização de feridas acidentais provocadas intencionalmente, remontam à antiguidade, demonstrando que desde então já se reconhecia a importância de protegê-las de forma a evitar maiores danos (Mandelbaum et al., 2003). Assim, a ferida requer uma barreira protetora para permitir a cura onde as preparações comercialmente disponíveis incluem hidrocolóides, filmes, espumas, alginatos e hidrogéis (Menke et al., 2008).

O tratamento de feridas vem recebendo grande atenção com o uso de novos produtos e o abandono de terapias tradicionais, cujo tratamento de feridas ainda é motivo de diversos estudos pela falta de um consenso a respeito da melhor forma de tratamento (Cavazana et al., 2007).

Segundo Knill et al., (2004), produtos a base de alginato são usados em tratamento de feridas por oferecerem a vantagem de formar um gel que auxilia na absorção de exsudato da ferida e evitando o desconforto de pacientes durante a remoção do curativo. De fato, a gelificação impede que a superfície da ferida seque, o que é um benefício uma vez que a umidade da ferida auxilia na cura e leva a uma melhor reparação. Acredita-se que polissacarídeos podem ativamente participar no processo de cicatrização de feridas. Além disso, com tantas variações em composição, estrutura e função alguns polissacarídeos podem apresentar propriedades benéficas a este processo (Lloyd et al., 1998).

Segundo Corrêa et al., 2005 os géis hidrofílicos têm sido muito usados em produtos cosméticos e como base dermatológica, pois apresentam fácil espalhamento, não são gordurosos e podem veicular princípios ativos hidrossolúveis e lipossomas. Dentre as matérias primas usadas na preparação de géis, tem-se destacado os ácidos carboxivinílicos (Carbopois<sup>®</sup>) e os ácidos poliacrílicos (Pemulen<sup>®</sup>). O tipo de polímero empregado na formulação do gel pode influenciar o comportamento reológico deste e portanto, pode influenciar a estabilidade física do produto, assim como, no seu comportamento sobre a

pele (liberação do princípio ativo pelo veículo e formação de filme na pele) resultando em diferentes graus de aceitação do mesmo pelo consumidor. As características reológicas são propriedades importantes a serem consideradas na fabricação, estocagem e aplicação de produtos de uso tópico.

Entretanto, apesar dos grandes avanços verificados nas últimas décadas acerca dos diversos fatores e fenômenos envolvidos com o processo de reparação tissular, a crescente pesquisa e a descoberta de novos recursos e tecnologias, muito há que ser investigado, em especial nos países subdesenvolvidos. Assim, dentre os principais recursos disponíveis no Brasil utilizados na formulação de novos fármacos, destacam-se: ácidos graxos essenciais, alginato de cálcio, carvão ativado, colágeno de origem bovina, hidrocolóides, sulfadiazina de prata, dentre outros. Além desses, novas tecnologias têm auxiliado na descoberta de novos produtos tanto a base do látex da seringueira como da secreção de caramujo (Mandelbaum et al., 2003). Entretanto, a literatura pouco faz referência a produtos antiinflamatórios locais oriundos basicamente de algas marinhas.

Desta forma, diante do que já foi pesquisado, muito há que ser estudado para o aperfeiçoamento de novos recursos mediante o desenvolvimento de tecnologias mais simples, eficientes e de baixo custo (Mandelbaum et al., 2003). Assim, a indústria farmacêutica e instituições públicas e privadas de ensino em todo o mundo realizam pesquisas com o intuito de possibilitar condutas terapêuticas eficientes, com resultados clínicos rápidos e seguros (Silva et al., 2010).

Com base na necessidade de obter novas formulações mais eficientes e nas propriedades apresentadas pelas moléculas oriundas de algas marinhas, acredita-se que estas possam ser eficazes no processo de cicatrização.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Este capítulo teve por objetivo aplicar a PcL, utilizando como veículos alternativos SfP e Carbopol 940 (C), em feridas limpas induzidas em ratos no intuito de avaliar seu efeito no processo de cicatrização.

### 2.2 Específicos

- Preparar os géis contendo PcL, utilizando os veículos alternativos SfP e Carbopol 940 (C);
- Analisar a reologia dos géis;
- Avaliar a qualidade microbiológica dos géis;
- Aplicar os géis;
- Avaliar a atividade cicatrizante dos géis e analisar macroscopicamente as feridas;
- Avaliar a atividade da MPO nos tecidos obtidos das feridas;
- Realizar análises histológicas dos tecidos obtidos das feridas para avaliar as possíveis alterações.

### 3. MATERIAIS

#### 3.1 Algas marinhas

A alga marinha vermelha *Pterocladella capilacea* foi coletada em rochas do meso-litoral, durante maré baixa (-0,2 a 2,0 m) na praia do Pacheco, município de Caucaia-CE. A alga marinha vermelha *Solieria filiformes* foi obtida de maricultura situada a 200m da costa na praia de Flexeiras, no município de Trairi-CE.

#### 3.2 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, pesando entre 180 e 200 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e mantidos em salas com temperatura ambiente controlada e livre acesso à ração e à água no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Os ensaios com os animais seguiram os padrões exigidos de ética e biossegurança sendo aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) desta instituição N° 100/09 (Anexo 2).

#### 3.3 Fármacos, reagentes e meios de cultura

Os fármacos e reagentes utilizados para o desenvolvimento deste trabalho foram:

- Ágar Mueller-Hinton
- Ágar Sabouraud-dextrose
- Álcool comercial (Santa Cruz);
- Álcool iodado 0,15% (Ricin);

- Brometo de Hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (Sigma-Aldrich®, USA);
- $\beta$ -mercaptoetanol (Vetec);
- Carragenana iota(Sigma-Aldrich®, USA);
- Carragenana lambda(Sigma-Aldrich®, USA);
- Carbapol 940 (Pharmanostra);
- Cloral Hidratado (Vetec);
- Cloreto de Sódio (Vetec);
- Dexametasona (Laboratório TEUTO);
- Formaldeído (PA, Merck®);
- Hematoxilina e Eosina (Reagen);
- Kit da Labtest®;
- Kollagenase (Cristália);



## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Preparação dos géis

SfP e Carbopol 940 (C) foram utilizados como veículos para a formulação de géis em diferentes proporções (0,1, 0,3 e 0,9%) para a administração tópica de PcL e assim, verificar o efeito da PcL na cicatrização. Ambos os veículos tiveram melhor viscosidade na concentração de 0,9%, onde esta foi selecionada para a formulação do géis. O gel PcL+SfP foi formulado pela presença de PcL (9 mg em 2 mL de água), SfP (90 mg em 9,5 mL de água), seguido de um breve aquecimento e adição do glicerol (0,5 mL). O segundo gel foi composto por PcL+Carbopol 940 (90 mg em 7,2 mL de água e 0,3 mL de NaOH 1 M, pH 7,2), PcL (9 mg em 2 mL de água) e glicerol (0,5 mL). Em todos os géis preparados PcL foi previamente filtrada em membranas com poros de 0,22 µm. Em paralelo, foi preparado um gel contendo apenas SfP (90 mg em 9,5 mL de água), onde os SfP foram previamente aquecidos seguidos da adição do glicerol (0,5 mL). A preparação do gel de SfP teve como finalidade comprovar a influência dos SfP na cicatrização e sua possível utilização como um veículo para aplicação de PcL. Para facilitar as aplicações dos géis durante o período a ser avaliado estes foram mantidos em seringas estéreis (Figura 1A).

A utilização do glicerol na preparação do gel se deve a sua aplicação pelas indústrias química, cosmética e farmacêutica com a finalidade de auxiliar na viscosidade do gel e por apresentar uma baixa toxicidade (Arruda et al., 2006).

Atualmente, vários polímeros vêm sendo utilizados pelas indústrias para a fabricação de géis hidrofílicos. Como exemplo, destaca-se o carbômero (Carbopol 940) que é constituído do polímero de ácido acrílico de alto peso molecular, onde uma forma de desenvolver o completo potencial de sua viscosidade é a adição de uma base orgânica ou inorgânica, como por exemplo a trietanolamina ou hidróxido de sódio (Corrêa et al., 2005).

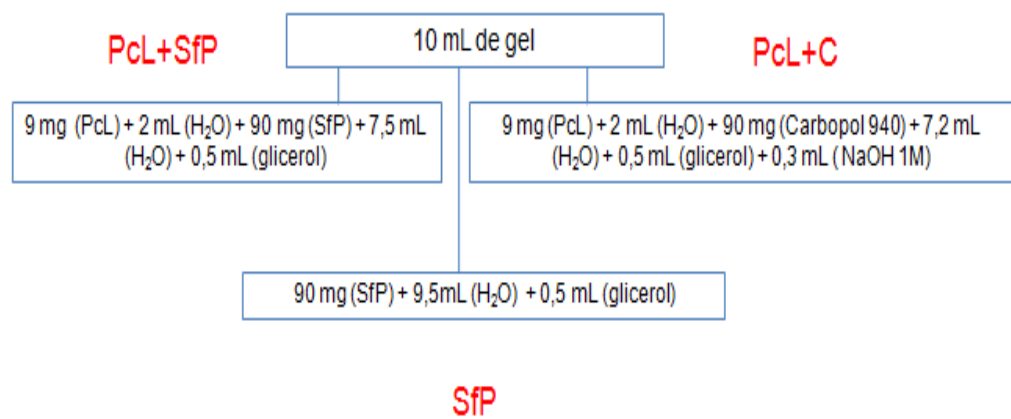


Figura 1- Esquema de preparação dos geis de PcL + SfP, PcL + C e SfP.

## **4.2 Propriedades reológicas dos géis**

A reologia tem sido assunto de grande e crescente importância para as indústrias cosmética e farmacêutica, tendo em vista que a consistência e o espalhamento dos produtos devem ser reproduzidos de lote para lote, assegurando a qualidade tecnológica do produto acabado. Assim, as características reológicas são propriedades importantes a serem consideradas na fabricação, estocagem e aplicação de produtos de uso tópico (Corrêa et al., 2005)

Os géis constituídos de SfP na presença ou ausência de PcL, foram submetidos a análise reológica de fluxo em viscosímetro rotacional cone-placa (Advanced Rheometer AR 550) equipado com banho-maria termostaticado. Inicialmente, as amostras foram equilibradas por 20 minutos para atingir a temperatura desejada e então submetidos a análise reológica através de um sistema programado de aumento linear seguido de uma diminuição linear. A viscosidade aparente e a taxa de cisalhamento foram obtidas através do programa computacional Rheology Advantage Instrument Control AR. As leituras foram feitas logo após a preparação das amostras onde uma quantidade utilizada foi suficiente para cobrir toda a superfície do sistema cone-placa, colocado sobre a placa e o excesso de amostra removido cuidadosamente com espátula. As medidas foram expressas analisando a variação da temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) x Viscosidade (Pa.s) e a Taxa de cisalhamento (s/1) x viscosidade (Pa.s).

## **4.3 Contagem de micro-organismos viáveis**

Diante da importância em aplicações farmacológicas, matérias-primas vegetais e formulações devem passar por análises microbiológicas segundo a Farmacopéia Brasileira IV ed. Portanto, esta metodologia visou realizar o controle de qualidade somente dos géis SfP e PcL+SfP, visto que foram formulados por moléculas oriundas de vegetais inferiores. Segundo Thompson,

2006 géis e cremes são utilizados para proteger a pele ou a mucosa de agente irritantes químicos ou físicos do ambiente, permitir o rejuvenescimento do tecido, promover a hidratação da pele ou causar um efeito emoliente além de seu uso como veículo para permitir a aplicação de um medicamento para ação local ou sistêmica.

O método utilizado consistiu em determinar o número total de bactérias e fungos presentes nas amostras segundo a metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira IV ed. Os SfP por não serem filtrados em membranas de 0,22 µm foram submetidos ao processo de Pasteurização que consiste em aquecer os SfP a 65 °C e mantê-los a esta temperatura por 30 minutos. Realizou-se a contagem das colônias em Ágar Muller-Hinton a 30-35 °C e em 7 dias em Ágar Sabouraud-dextrose a 20-25 °C. PcL foi filtrada em membranas de 0,22 µm. As amostras diluídas foram semeadas na superfície do meio solidificado de forma para que o número de colônias não ultrapasse 300 colônias/placa para o meio Ágar Muller-Hinton e 100 colônias/placa para o meio Sabouraud-dextrose. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias/MG de gel.

#### **4.4 Aplicação dos géis em feridas limpas induzidas em ratos através de trauma mecânico**

Para avaliação da atividade cicatrizante dos géis constituído de SfP em presença e ausência de PcL e constituído por Carbopol 940, foi utilizado o modelo de indução de lesão tecidual segundo a metodologia descrita por Schirato *et al.* (2006) com algumas modificações.

Inicialmente, o procedimento cirúrgico consistiu em anestésiar Ratos *Wistar* machos, pesando entre 180 e 200 g (n=6), por via intraperitoneal com cloral hidratado 10% e submetidos à tricotomia da região dorsal e à antissepsia utilizando-se álcool iodado 0,15%. Após 24 horas foi realizada a marcação da pele a ser excisada, com o auxílio de uma caneta dermatográfica e de um molde de papel adesivo (área= 1,2 cm<sup>2</sup>), onde as lesões (controle e teste) foram

produzidas por incisão da pele, divulsão da tela subcutânea e remoção das camadas derme e epiderme com o mínimo de sangramento, com tesoura de pontas tipo romba N° 17 e pinça de dissecação. Após o procedimento cirúrgico os animais foram randomizados em grupos experimentais, de acordo com o tratamento tópico diário de dez dias (0, 2, 4, 6, 8 e 10º dia).

Após três horas, grupos de animais (n=6) receberam topicamente: gel de SfP na presença e ausência de PcL e gel inerte de carbapol 940 em presença de PcL. Como controle positivo, foi utilizado kollagenase®. Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais sem contato com a maravalha e com livre acesso a água e ração (Figura 2).

As feridas induzidas foram do tipo lacerantes, cujo mecanismo da lesão é através de tração (rasgo ou arrancamento tecidual). Neste caso o tipo de cicatrização é de segunda intenção, onde ocorre perda excessiva de tecido com a presença ou não de infecção, onde as feridas são deixadas abertas e se fecharão por meio de contração e epitelização (Tazima et al., 2008).

Após tratamento tópico foram observados sinais flogísticos (edema, hiperemia, presença de crosta e exsudado) e os sinais de reepitelização (presença de tecido cicatricial, fechamento completo das feridas e percentual de contração da área da ferida).



Figura 2- Esquema do modelo de feridas experimentais

#### **4.5 Análise macroscópica das feridas**

As avaliações macroscópicas das feridas nos dorsos dos animais foram realizadas diariamente, iniciando após 24 horas da cirurgia e até o 10º dia do período pós-operatório (PO).

As feridas foram fotografadas (Sony câmera digital, 7.2 megapixels, zoom 1,7 x), mantidas em um suporte a uma distância constante de 10 cm, e a área (mm<sup>2</sup>) de cada lesão calculada usando Image J ® software. O percentual de contração da área das feridas foi expresso através da equação de Ramsey et al. (1995).

$$\% \text{ contração} = 100 [(W_o - W_i)/W_o],$$

onde  $W_o$  = area inicial da ferida e  $W_i$  = area final da ferida

#### **4.6 Dosagem da MPO de tecidos obtidos do ensaio das feridas**

A dosagem da MPO de tecidos obtidos do ensaio das feridas foi realizada de acordo com a metodologia descrita no capítulo 1 (item 4.7.2). Este procedimento foi importante para corroborar com os resultados obtidos da análise das feridas visto que se trata de um marcador da infiltração de neutrófilos (Roman et al., 2008).

#### **4.7 Análise histológica das feridas**

A análise histológica foi realizada no 0, 4 e 6º dia PO, em cada grupo de animais. Amostras de tecido lesionado foram coletadas de cada animal destinado à análise histológica. Todos os animais submetidos à biópsia foram previamente anestesiados por via intraperitoneal e eutanaziados com superdosagem de cloral hidratado (200 mg/Kg).

As amostras de tecido foram fixadas em formaldeído 4% (v/v) em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,2, submetidas ao processamento histológico de rotina e incluídas em parafina. Os blocos resultantes foram cortados com 4  $\mu$ m de espessura.

Após microtomia, os cortes foram corados (Hematoxilina-Eosina) e examinados por microscopia óptica.

#### **4.8 Análise estatística**

Os dados são apresentados como médias  $\pm$  erros padrão (SEM) para seis animais por grupo. Uma análise de variância (ANOVA) foi realizada seguida por teste de Bonferroni e teste t de Student para valores não pareados. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Propriedades reológicas dos géis

No intuito de utilizar os polissacarídeos SfP como um possível veículo diante de sua capacidade de formar gel, justificou-se sua utilização através da administração tópica. Além disso, SfP foi obtido da alga marinha *Solieria filiformis* oriunda de cultivo experimental visando sua possível comercialização pela indústria.

Desta forma, visando averiguar a estabilidade da viscosidade dos géis frente aos parâmetros temperatura e taxa de cisalhamento foram realizadas análises reológicas. Durante a aplicação em feridas induzidas no dorso dos animais estes necessitaram de um período maior de espalhamento quando comparado com o gel cujo veículo foi o Carbopol 940, que pode variar de 0,5% a 1% (Corrêa et al., 2005).

Nos estudos de reologia existem os sistemas denominados Newtonianos e os não-Newtonianos onde as formulações que possuem partículas assimétricas, como a maioria dos produtos cosméticos e farmacêuticos, apresentam fluxo não-Newtoniano, que normalmente é representado por 3 tipos de curvas: plástica, pseudoplástica e dilatante (Ansel, 2000). No caso de formulações dermocosméticas, o fluxo pseudoplástico é o mais comum. Esses materiais têm sua viscosidade aparente diminuída gradualmente, à medida que aumenta a taxa de cisalhamento (Schott, 1995). A viscosidade é definida como a expressão de resistência do fluido ao fluxo: quanto maior a viscosidade, maior a resistência (Almeida & Bahia, 2003).

O resultado da análise deste trabalho (Figuras 3A e 3B) mostra os parâmetros reológicos analisados demonstrando que as amostras preparadas a base dos SfP apresentaram característica de um gel pseudoplástico. Observa-se na Figura 3 A uma diminuição da viscosidade de SfP quando comparado aos géis PCL+SfP e PCL+C, onde este último manteve sua viscosidade mais estável. Na figura 3B é observado uma diminuição da

viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento onde as amostras mantiveram o mesmo padrão.

Assim com base na importância desta análise, estudos sobre reologia de formulações farmacêuticas de uso tópico têm se tornado cada vez mais frequentes nas pesquisas realizadas pela comunidade científica, até mesmo porque atualmente verifica-se que a estabilidade física de uma formulação é fundamental para o controle de qualidade, aceitação pelo consumidor e eficácia da mesma (Corrêa et al., 2005).

Portanto, o estudo do comportamento reológico de formulações de géis permite uma melhor compreensão da natureza físico-química do veículo e controlar a qualidade de matérias-primas e produtos acabados.

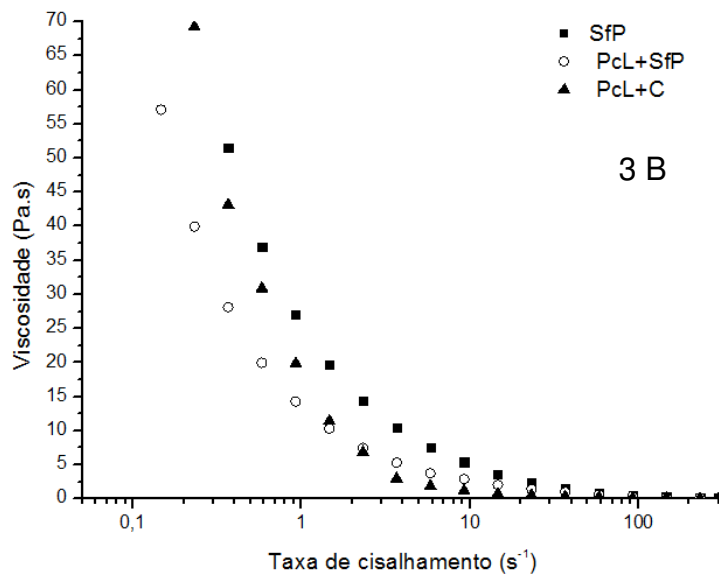
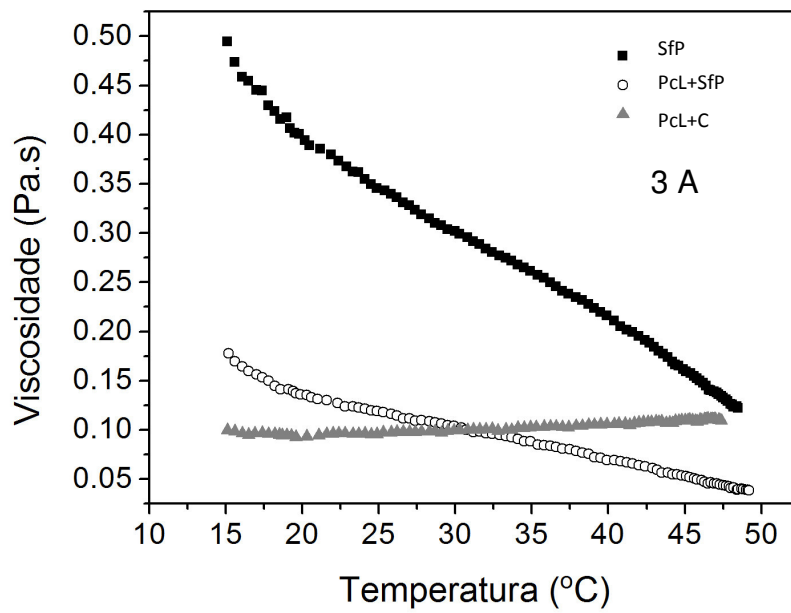


Figura 3- Análise reológica dos géis SfP, PcL+ SfP e PcL+C. A figura 3A representa o efeito da temperatura sobre a viscosidade dos géis a uma taxa de cisalhamento constante a 1 Hz, 3 Pa. A figura 3 B representa o efeito da taxa de cisalhamento sobre a viscosidade dos géis a 25º C, 1 Hz.

## 5.2 Qualidade microbiológica dos géis

Na contagem dos micro-organismos viáveis nos géis SfP e PcL+SfP foi evidenciado que na amostra pasteurizada a carga microbiana mostrou-se menor, em comparação com as amostras que não foram submetidas ao procedimento de pasteurização (Tabela 1). Sabe-se que a pasteurização destrói os microrganismos patogênicos, permanecendo uma microbiota viável de 0,1 a 0,5% da contagem inicial. Assim, quanto maior a contaminação microbiana antes da pasteurização, tanto maior será sua microbiota residual (Oliveira et al., 2006). Neste trabalho, objetivou-se a realização deste ensaio de controle diante da importância de se ter um controle microbiológico visto que bactérias e fungos podem ser danosos em feridas por ocasionarem possíveis infecções e em consequência alterar o processo de cicatrização.

Desta forma, mesmo tendo apresentado uma carga microbiana, dos géis que foram administrados ao longo dos 10 dias de tratamento não foram capazes de ocasionar nenhum dano aparente aos animais. A presença de micro-organismos nas amostras pode ser atribuída a falhas higiênicas de manipulação e ao acondicionamento dos produtos nos frascos. As amostras mostraram-se dentro dos padrões estando portanto, de acordo com os limites estabelecidos da Farmacopéia Brasileira IV ed. Segundo Pandit (2008) a estabilidade microbiológica do produto farmacêutico é uma medida de sua resistência à contaminação microbiana (por bactérias e fungos) proveniente do meio ambiente durante a estocagem e o uso. Tal contaminação e o subsequente crescimento microbiano podem comprometer gravemente a segurança do produto farmacêutico. O crescimento bacteriano ocorre principalmente em produtos com alto teor de umidade, como soluções, dispersões e semi-sólidos de base aquosa. Desta forma, a inclusão de um antimicrobiano na formulação é essencial para tais produtos diante de um possível interesse da indústria farmacêutica em utilizar PcL e SfP na formulação de um produto.

Tabela 1 -. Qualidade microbiológica dos geis SfP e PcL+SfP

<b>Agar Muller Hinton</b>		<b>UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS* (UFC/mL)</b>		
<b>DILUIÇÕES</b>	<b>SfP</b>	<b>SfP Pasteurizado</b>	<b>PcL+SfP</b>	
10 <sup>-1</sup>	60	25	130	
10 <sup>-2</sup>	100	-	100	
10 <sup>-3</sup>	-	-	-	

<b>Ágar Sabouraud</b>		<b>UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS* (UFC/mL)</b>		
<b>DILUIÇÕES</b>	<b>SfP</b>	<b>SfP Pasteurizado</b>	<b>PcL+SfP</b>	
10 <sup>-1</sup>	30	30	20	
10 <sup>-2</sup>	-	-	-	
10 <sup>-3</sup>	-	-	-	

\* Valores expressos em UFC/mL

(-) ausência de micro-organismos

### 5.3 Aplicação e análise macroscópica das feridas

As células epiteliais começam a proliferação alguns dias após a ocorrência da lesão, a partir das bordas da ferida ou de ilhas epiteliais (não lesadas) dentro da ferida, estimuladas por fatores de crescimento liberados, principalmente, pelos macrófagos. A proliferação das células epiteliais recebe influência direta da concentração de íons inorgânicos no tecido em cicatrização (Candido, 2001).

Os fibroblastos que migram para o interior da ferida a partir do tecido circundante são responsáveis pela produção do colágeno, proteína de grande importância na matriz extracelular. Além dos fibroblastos é possível encontrar na fase proliferativa as células endoteliais, responsáveis pela angiogênese e os miofibroblastos responsáveis pela aproximação das bordas da ferida (contração) (Robbins, 2005).

Segundo Balbino et al. (2005) a maioria das formas de lesão a que os organismos vivos estão sujeitos leva a alterações nas junções e/ou nas células endoteliais. Em alguns casos, ocorre ruptura de vasos sanguíneos e o extravasamento de seus constituintes. Os eventos iniciais do processo de reparo estão, nos primeiros momentos, voltados para o tamponamento desses vasos. Quase concomitante ao estímulo lesivo, e devido à influência nervosa (descargas adrenérgicas) e ação de mediadores oriundos da degranulação de mastócitos, ocorre vasoconstricção como primeira resposta. Assim, através de análise macroscópica foi possível verificar que os géis administrados foram eficientes nos primeiros dias de administração.

Neste estudo, observou-se que a aplicação tópica de SfP não contribuiu significativamente para a diminuição da extensão da ferida, provavelmente conferindo umidade a ferida. No entanto, de acordo com Araújo et al (2011), oligossacarídeos obtidos a partir de *S. filiformis* foram capazes de reduzir o efeito da dor em ensaios clássico de contorções, formalina e testes da placa quente.

Para a aplicação tópica, muitos polissacarídeos têm sido identificados como veículos de interesse apesar da literatura relatar efeito pró-inflamatório de carragenanas (Silva et al., 2010). Segundo Valenta & Schultz (2004), formulações a base de carragenanas apresentaram efeito satisfatório na pele quanto a uma boa capacidade adesiva. Assim, misturas com carragenanas podem ser consideradas como alternativas promissoras como sistema de carregamento de drogas para aplicação tópica na área farmacêutica e cosmética.

Neste estudo, o ensaio das feridas utilizando os géis a base de SfP na presença e ausência de PcL e o gel PcL+Carbopol 940 permitiu verificar que o gel SfP não contribuiu de forma direta no processo de cicatrização. Enquanto, os géis PcL+SfP e PcL+C garantiram umidade as feridas proporcionando condições mais favoráveis para o processo de cicatrização.

Na análise macroscópica das feridas foi observado uma variação no tamanho das lesões ao longo do tratamento (10 dias) (Tabela 2). A Figura 4 A representa o grupo de animais que não receberam qualquer tratamento nos dias 0, 2, 4, 6, 8 e 10<sup>o</sup>. A Figura 4B / 4C / 4D / 4E apresenta os grupos de animais que receberam tratamento. No quarto dia de administração, houve uma diminuição no tamanho das lesões (17%, 16%, 18% e 32%, respectivamente). O grupo não tratado apresentou uma redução de apenas 6,5%. A redução nas lesões de todos os grupos tratados quando comparados com o grupo controle se tornaram mais evidentes no sexto dia, resultando em 56% (Figura 4B), 47% (Figura 4C), 53,5% (Figura 4D) e 60% (Figura 4E) de redução, respectivamente. No dia 8, não houve diferença significativa entre os grupos tratados, e não foi detectada secreção e exsudato na área da ferida (Figura 5). Além disso, a avaliação macroscópica permitiu evidenciar sinais flogísticos menos acentuados nos grupos que receberam tratamento quando comparados aos do grupo controle negativo (-).

Quando PcL foi administrada com SfP causou uma redução da área da ferida quando comparado com SfP. Por outro lado, o uso de PcL combinado com Carbopol 940 causou uma redução significativa da área da

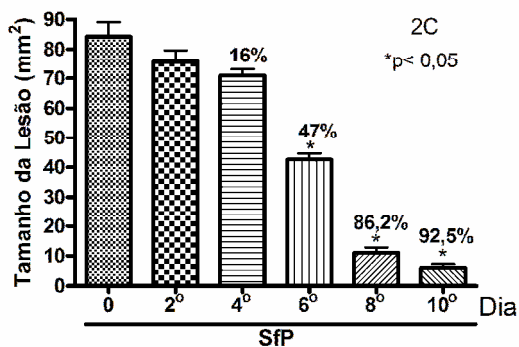
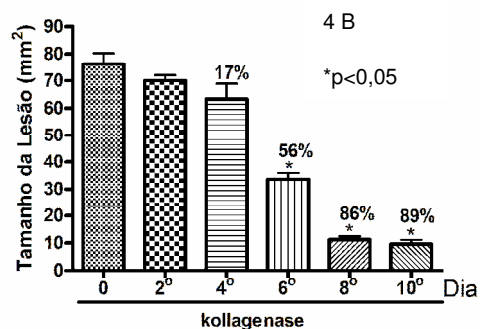
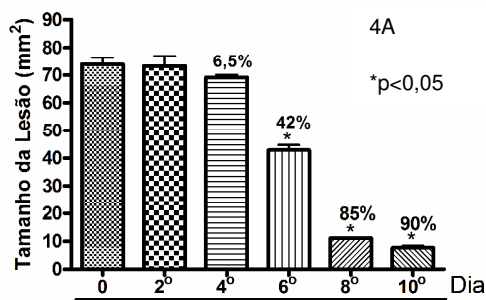
ferida no 6º dia. Resultados semelhantes foram obtidos por Melo et al (2011) ao aplicar a lectina 1,4 Cramoll extraída das sementes de *Cratylia mollis* Mart onde foi notado tecido cicatricial no 5º dia. O óleo das sementes de *Caryocar coriaceum* (FOCC) também foi usado no modelo de cicatrização de feridas evidenciando formação de tecido de granulação facilmente perceptível nas bordas da ferida em todos os grupos no 3º dia onde todas as feridas diminuíram caracterizando assim a cicatrização e no 7º dia, a porcentagem de contração da ferida foi significativamente maior (96,54%) (Oliveira et al., 2010). A aplicação de extrato de *Coronopus didymus* também mostrou-se eficiente na cura das feridas cutâneas em ratos, promovendo um aumento do número de fibroblastos e fibras colágenas (Nitzs et al., 2006). Shivhare et al (2010) demonstraram um aumento significativo na porcentagem de contração da ferida e um período maior de epitelização após a aplicação do extrato metanólico de *Trichosanthes dioica*, onde foi observado uma redução de 84,5% de feridas no 6º dia de aplicação. A lectina ConBr influenciou a expressão de proteases com atividade colagenolítica interferindo no processo de cicatrização, proporcionando sinais de inflamação menos intensos (Silva et al., 2009). Além disso, os autores acreditam que esta lectina ao ser aplicada topicamente promove a ativação de células envolvidas no processo de cicatrização onde a diferença observada entre os grupos ConBr e ConBr-manose durante a fase de fibroplasia sugere um possível envolvimento do sítio ligante a carboidratos na ativação de células envolvidas na evolução do processo cicatricial na fase de fibroplasia.

O processo de cicatrização envolve três fases: inflamação, proliferação e maturação. Este trabalho se concentrou nas duas primeiras fases. A primeira fase começa dentro de 24 h após uma lesão a qual é caracterizada por rubor, calor e dor onde neutrófilos e macrófagos têm um papel fundamental. Os macrófagos servem como uma primeira linha de defesa contra a infecção por bactérias fagocitando materiais estranhos. Além disso, a angiogênese ocorre para formar novos vasos sanguíneos e substituir os folículos capilares previamente danificados, fornecendo alimento para a matriz (Stephanie et al., 2010). De acordo com Stephanie et al (2010), tecido de granulação é também formado, proporcionando epitelização.



Assim, o bom resultado obtido pela aplicação da PcL foi provavelmente devido à melhor dispersão do material na presença do Carbopol 940 como veículo onde SfP necessitou de um maior tempo para o espalhamento do gel. Os dois veículos, SfP e Carbopol 940, mantiveram o ferimento hidratado o que foi essencial para a cicatrização. Sabe-se que para o processo de cicatrização ocorrer de forma satisfatória, o material curativo deve ser capaz de manter alta umidade na interface da ferida (Lloyd et al., 1998). Assim, acredita-se que a administração tópica de PcL através de um veículo em forma de gel apresenta melhores resultados conferindo efeitos satisfatórios sobre o processo de cicatrização de feridas.

Desta forma, os resultados da análise macroscópica com as medições da área de contração da ferida revelou a necessidade de examinar a atividade de MPO nos tecidos removidos das feridas nos primeiros dias do processo de cura.



4 C  
\*p<0,05

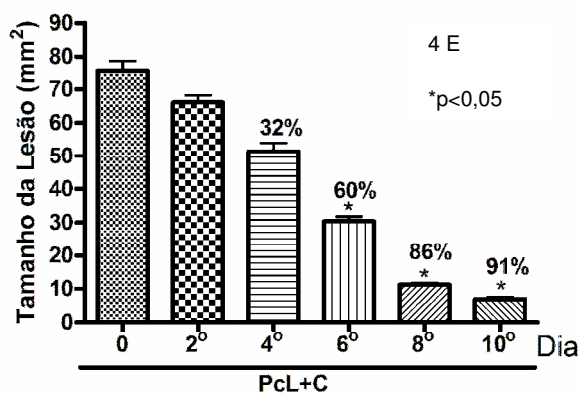
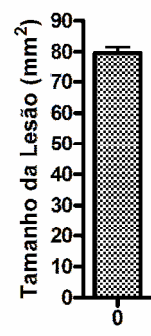


Figura 4 - Percentual de redução das lesões (mm<sup>2</sup>). 4A/4B/4C/4D/4E representam a porcentagem de contração da ferida no controle, Kollagenase®, SfP, PcL+ SfP e PcL+C grupos, respectivamente. Os dados são expressos em média ± S.E.M. de seis ratos para cada grupo. \* p < 0,05 indica diferença significativa de cada grupo em relação ao dia 0. (ANOVA, teste de Bonferroni).

Tabela 2 - Tamanho da ferida (mm<sup>2</sup>) no modelo de excisão.

Dias	Tamanho da ferida (mm <sup>2</sup> )				
	-	kollagenase <sup>®</sup>	SfP	PcL+SfP	PcL+C
0	73,87±2,4	76,20±4,0	84,22±5,0	79,58±2,0	75,40±3,3
2 <sup>o</sup>	73,16±4,0	70,04±2,0	75,61±4,0	77,20±6,0	66,05±2,1
4 <sup>o</sup>	69,08±1,0	63,30±5,0	70,89±2,2	65,10±3,3	51,42±2,5
6 <sup>o</sup>	42,82±2,0	33,60±2,3	42,47±2,1	39,46±2,5	30,36±1,4
8 <sup>o</sup>	11,10±0,2	11,20±1,2	10,98±2,0	11,08±0,1	11,21±0,5
10 <sup>o</sup>	7,60±0,6	9,57±1,5	6,01±1,2	4,29±1,0	6,9±0,54

Valores são apresentados como média ± S.E.M. Teste t de Student para valores não pareados. (-) Indica animais que não receberam nenhum tipo de tratamento. SfP=polissacarídeos sulfatados totais de *Solieria filiformis*, PcL= Lectina da alga marinha *Pterocladia capillacea*, C=Carbopol 940.

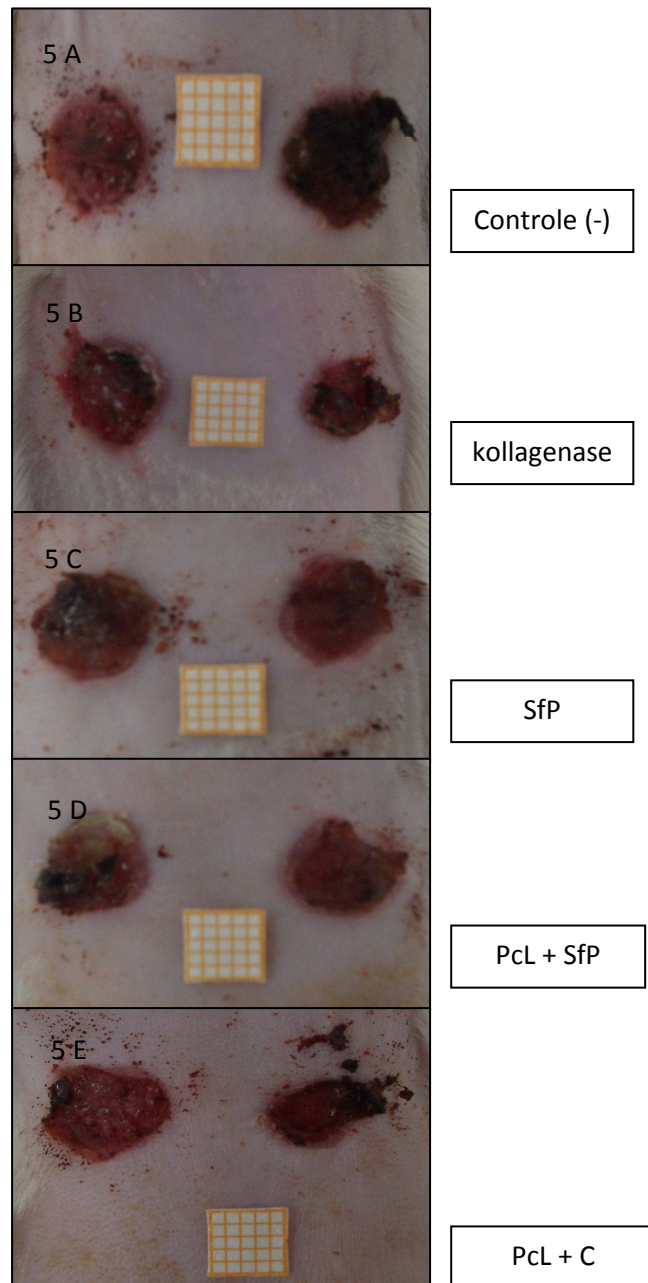


Figura 5- Fotografia das feridas através de análise macroscópica (5 A/5B/5C/5D/5E). A figura mostra o processo de cicatrização dos grupos no 6º dia. (5A) não tratada; (5B) K; (5C) SfP; (5D) PcL + SfP e (5E) PcL+C. A ferida esquerda representa o controle, que não recebeu tratamento em conjunto com o grupo de animais em (4A) que não recebeu tratamento em nenhuma uma das feridas e as da direita receberam tratamento. SfP=polissacarídeos sulfatados totais de *Solieria filiformis*, PcL= Lectina da alga marinha *Pterocladia capillacea*, C=Carbopol 940.

## 5.4 Dosagem de MPO

A mieloperoxidase (MPO) desempenha um papel importante no sistema de defesa. Trata de uma proteína de 140 kDa, composta por duas cadeias de 53kDa e duas cadeias de 15 kDa e foi descoberta pela primeira vez na década de 1960 (Nicholls et al., 2005; Olsen et al., 1983).

A atividade da MPO foi medida utilizando os tecidos das feridas nos dias 0, 4 e 6. No dia 0, a atividade de MPO estava em níveis basais. No 4º e 6º dia a atividade da MPO diminuiu em comparação com os níveis basais, (Figuras 6 A/6B/6C). Além disso, foi observado um aumento da enzima no 4º dia, quando comparado com o dia 0 e um diminuição no 6º dia. Os dias 0, 4 e 6 foram escolhidos para determinar se a atividade anti-inflamatória da PcL realmente pode ocorrer nos primeiros dias do processo de reparo, pois segundo a literatura a inflamação é um estágio inicial.

A aplicação tópica de PcL através de um veículo pode ser uma alternativa promissora aos anti-inflamatórios não esteróides (AINE). Segundo Santos *et al* (2006), os AINES interferem diretamente na síntese de colágeno e automaticamente reduzem a resistência à tração da ferida.

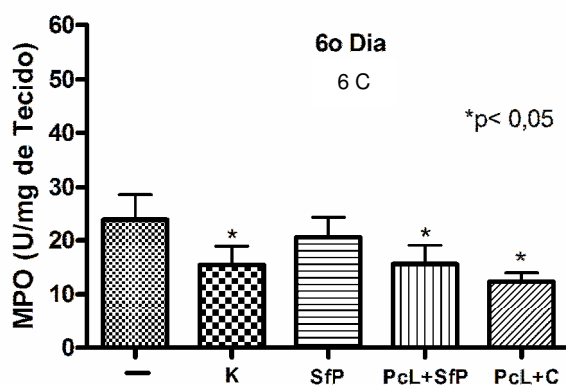
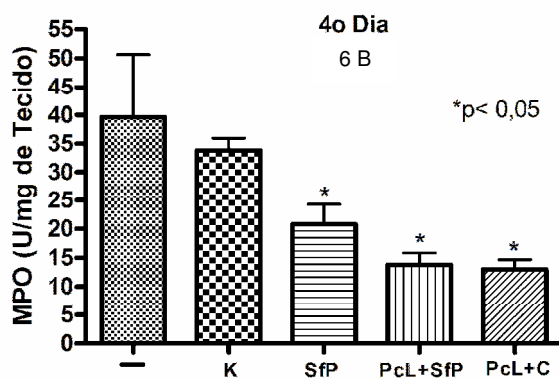
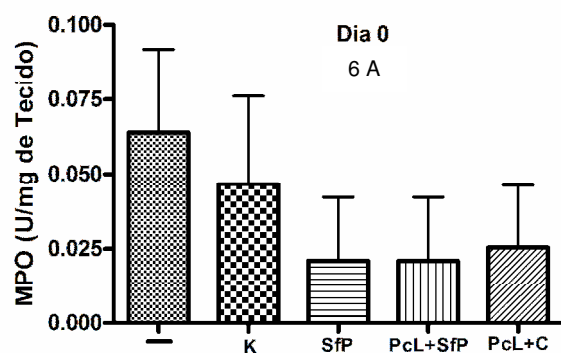


Figura 6- Medição da atividade MPO (mieloperoxidase) em tecido obtido das lesões de animais sacrificados nos dias 0 (6A), 4 (6B) e 6 (6C). Os dados são expressos em média  $\pm$  S.E.M. de seis ratos para cada grupo. \*  $p < 0,05$  indica diferença significativa do grupo que não recebeu nenhum tratamento. (ANOVA, teste de Bonferroni). (-) Indica animais que não receberam nenhum tipo de tratamento. SfP=polissacarídeos sulfatados totais de *Solieria filiformis*, PcL= Lectina da alga marinha *Pterocladia capillacea*, C=Carbopol 940.

## 5.5 Análise histológica

Diante da importância da análise histológica dos tecidos obtidos das feridas, no dia 0 todas as amostras encontraram-se iguais com epiderme e derme integras (Figuras 7A/B 8A/B 9A/B 10A/B 11A/B). No grupo não tratado ainda foi evidenciado a presença de infiltrado inflamatório e de uma bolha até o 6º dia (Figura 7E/F). No grupo Kollagenase (Figuras 8) foi verificado no 4º dia a presença de crosta e angiogênese e uma diminuição significativa de células inflamatórias. Comparando o grupo tratado com SfP (Figura 9) ao grupo não tratado (Figura 7) não foram observadas diferenças significativas, também tendo sido observado a formação de bolha e a epiderme separada da derme no 4º dia. No 6º dia verificou-se a ausência de bolha e a reconstituição da epiderme, mas com considerado infiltrado celular (Figura 11). No grupo de animais que receberam como tratamento PcL+SfP (Figura 10) verificou-se semelhança considerando o 4º dia quando comparado aos grupos Kollagenase (Figura 8). No grupo de animais tratados com PcL+C (Figuras 11) verificou-se uma diminuição significativa do infiltrado inflamatório no 6º dia e a presença de fibroblastos. Este resultado mostrou-se semelhante ao grupo de animais tratados com kollagenase. Os resultados obtidos neste trabalho podem ser comparados aos da aplicação da lectina Cramoll 1,4 obtida de sementes de *Cratylia mollis* que mostrou-se eficiente na reparação de feridas (Melo et al., 2011).

A análise histológica mostrou o efeito da PcL pela presença significativa de fibroblastos, cuja função primária é sintetizar o colágeno na fase de inflamação celular. A deposição de colágeno é necessária para a chegada eficiente dos fibroblastos ao local da ferida. Sabe-se que o colágeno é uma proteína de alto peso molecular e é responsável pelo apoio e resistência à tração de tecido cicatricial (Tazima et al., 2008). Verificou-se ainda a presença de tecido de granulação em porções de tecido obtido após a administração de PcL. Este tecido de granulação é composto por fibroblastos, macrófagos, um arranjo frouxo de fibronectina colágeno e ácido hialurônico e faz parte da fase proliferativa que é composta de três grandes eventos que seguem o período

de maior atividade da fase inflamatória: neo-angiogênese, fibroplasia e epitelização (Tazima et al., 2008).

O processo de cicatrização é um processo altamente complexo cujo tecido sofre danos ou destruição, onde o mecanismo de defesa atua para manter a integridade da pele. O reparo de feridas é realizado através da regeneração espontânea do tecido dérmico ou a reparação do tecido conjuntivo. Ambos ocorrem independentemente do tipo de lesão quer seja menor, maior ou de trauma em tecidos moles (Belton, 2010). Além disso, existem três maneiras pelas quais uma ferida pode ser curada, dependendo da quantidade de tecido danificado e a presença ou ausência de infecção na categoria de primeiro, segundo e terceiro grau (Tazima et al., 2008).

Portanto, a cura das feridas observadas neste estudo foi considerada ser de segundo grau, onde a perda excessiva de tecido na ausência de infecção foi observada.



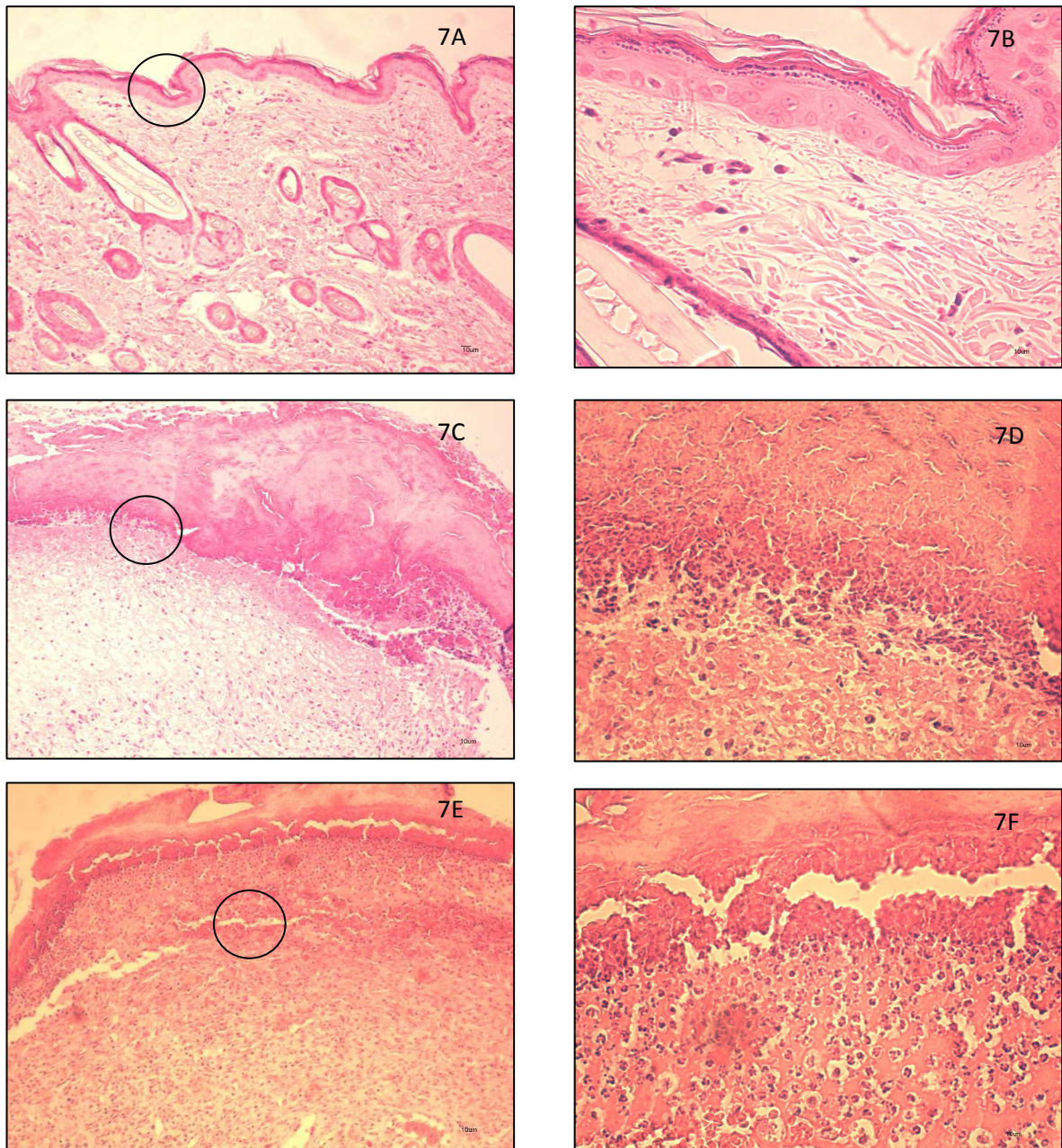


Figura 7- Fotomicrografia de uma secção transversal de 4  $\mu\text{m}$  de espessura obtidos de pele de ratos que não receberam tratamento nos dias 0 (7A/B), 4 (7C/D) e 6 (7E/F) dia. Coloração HE, e a área marcada com círculo representa os aumentos de 100 e 400 X, respectivamente.



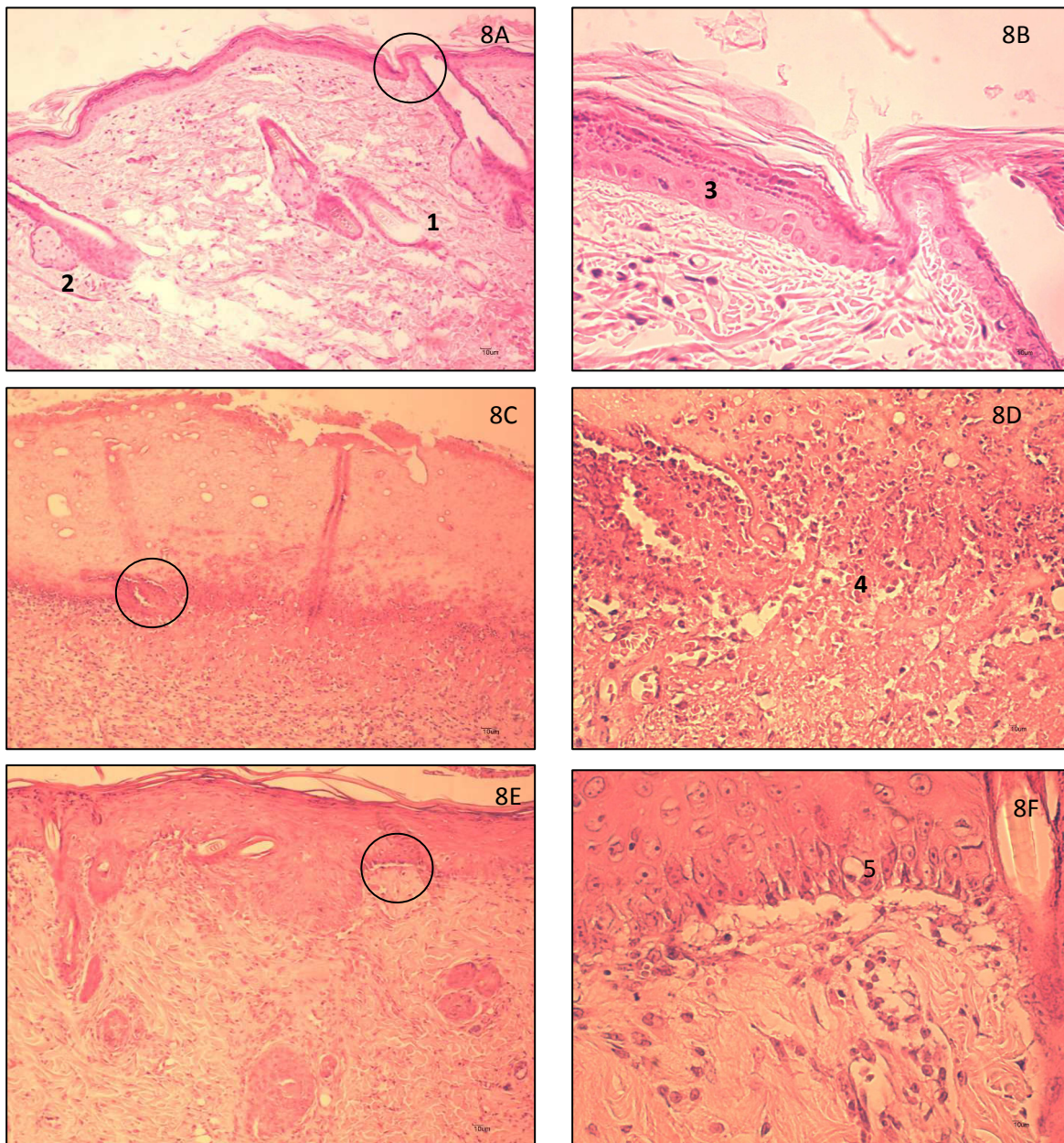


Figura 8- Fotomicrografia de uma secção transversal de 4 µm de espessura obtidos de pele de ratos que receberam tratamento com kollagenase nos dias 0 (8A/B), 4 (8C/D) e 6 (8E/F) dia. Coloração HE, e a área marcada com círculo representa os aumentos de 100 e 400 X, respectivamente. 1=folículo piloso; 2=glândula sebácea; 3=epiderme; 4=derme; 5= melanócitos.



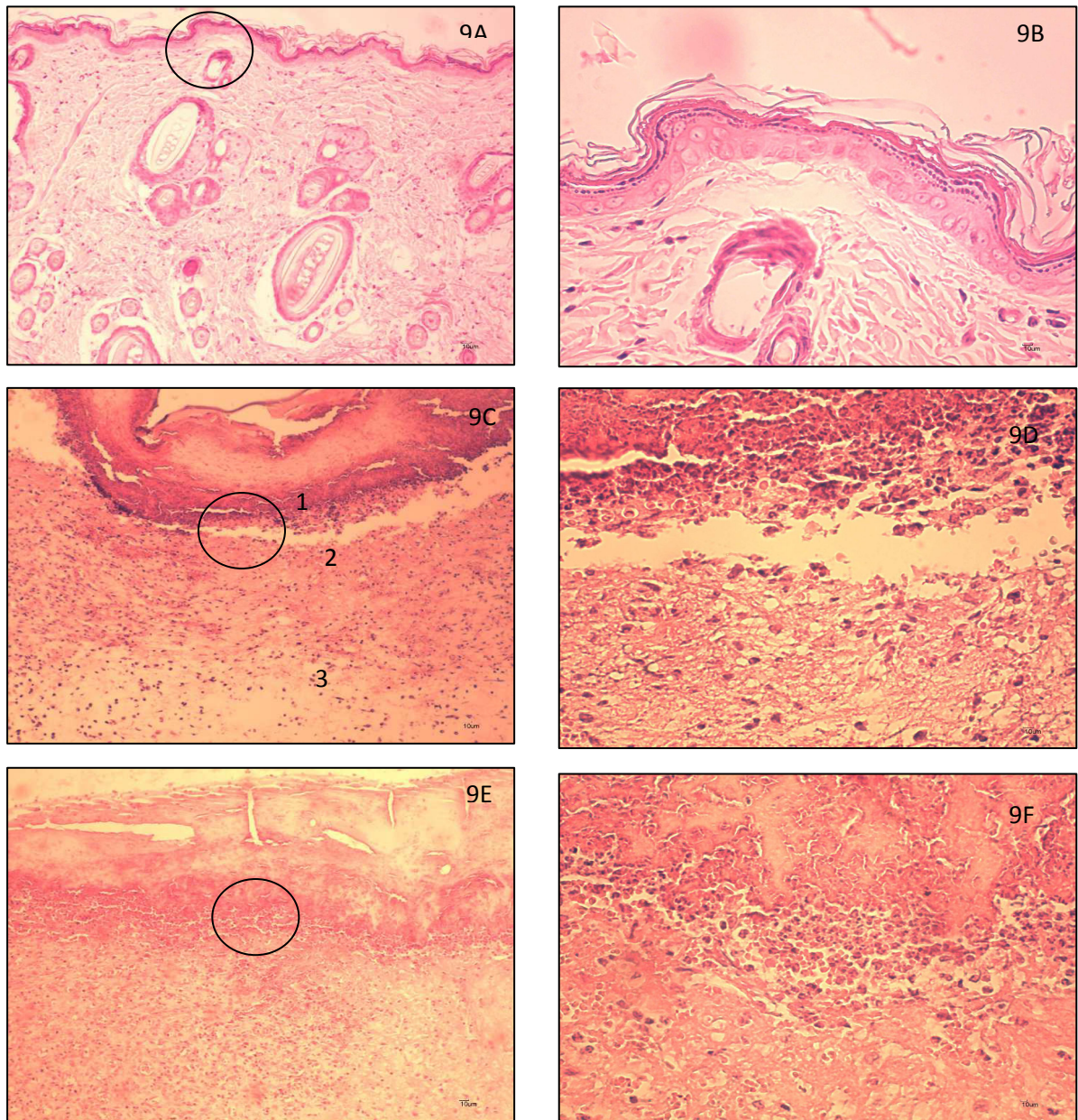


Figura 9- Fotomicrografia de uma secção transversal de 4 µm de espessura obtidos de pele de ratos que receberam tratamento com SfP nos dias 0 (9A/B), 4 (9C/D) e 6 (9E/F) dia. Coloração HE, e a área marcada com círculo representa os aumentos de 100 e 400X respectivamente. 1=epiderme; 2=separação; 3=derme.



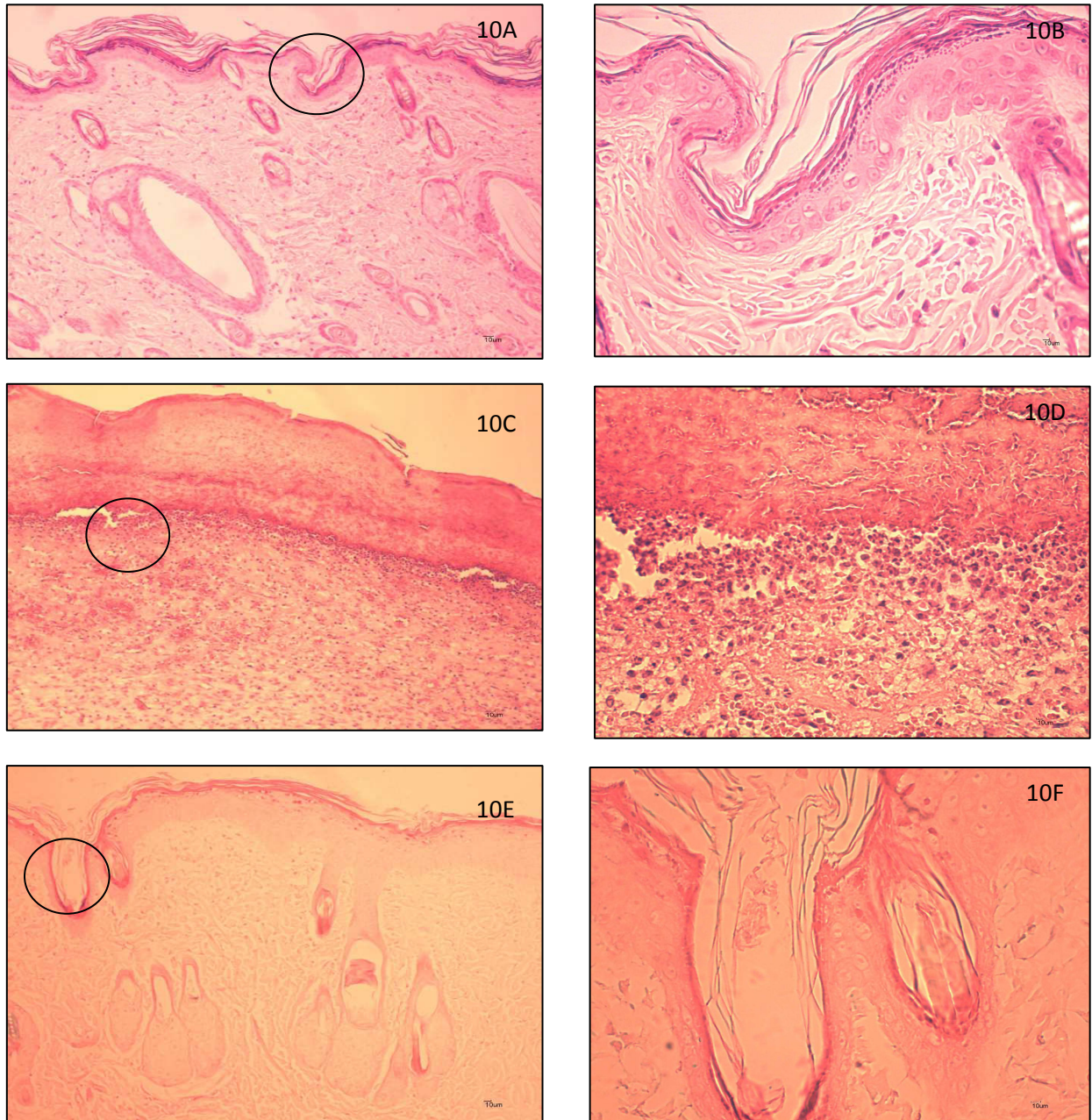


Figura 10- Fotomicrografia de uma secção transversal de 4  $\mu\text{m}$  de espessura obtidos de pele de ratos que receberam tratamento com PCL+SfP nos dias 0 (10A/B), 4 (10C/D) e 6 (10E/F) dia. Coloração HE, e a área marcada com círculo representa os aumentos de 100 e 400 X, respectivamente.



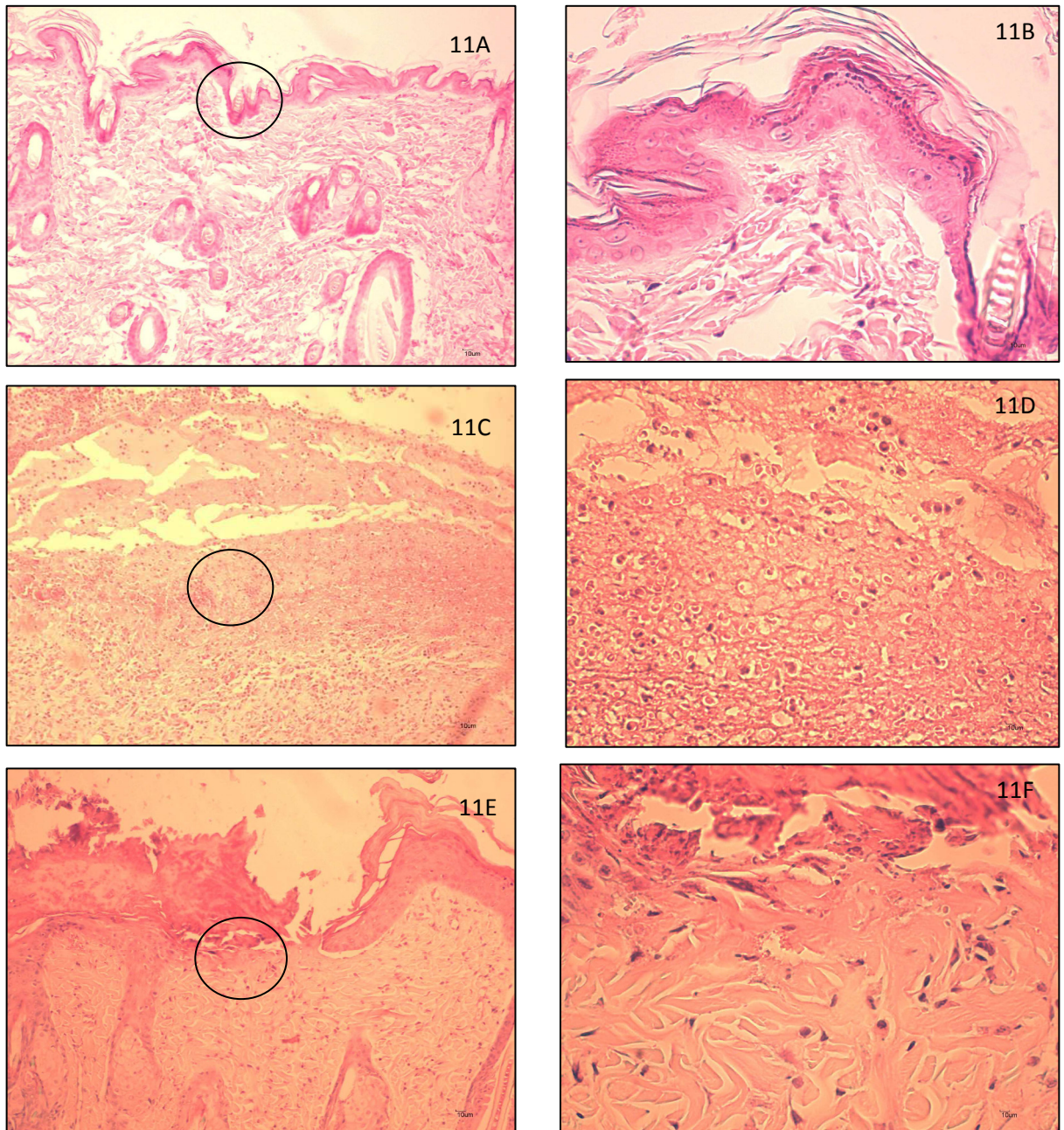


Figura 11- Fotomicrografia de uma secção transversal de 4  $\mu\text{m}$  de espessura obtidos de pele de ratos que receberam tratamento com PCL+C nos dias 0 (15 A), 4 (15 B) e 6<sup>o</sup> (15 C) dia. Coloração HE, e a área marcada com círculo representa os aumentos de 100 e 400 X, respectivamente.

## 6. CONCLUSÃO

- Os géis preparados SfP, PcL+SfP e PcL+C foram submetidos a análise reológica permitiu concluir que o gel a base de SfP apresentou um comportamento reológico de um pseudoplástico.
- A aplicação de PcL na presença de SfP e Carbopol 940 permitiu verificar efeito no processo de cicatrização visto que o uso do Carbopol 940 como veículo apresentou um melhor espalhamento.
- A partir do 4º dia foi verificado redução no tamanho das feridas. Entretanto, não foi observado diferença significativa na redução entre os grupos a partir do 8º dia.
- A dosagem da MPO confirmou uma redução no processo inflamatório nos animais cujo dorso foi tratado com o gel contendo PcL. Este resultado corroborou com o obtido pela análise histológica onde foi possível verificar a redução de infiltrado inflamatório nos grupos tratados com kollagenase e PcL na presença de SfP e Carbopol 940. Entretanto no grupo que foi administrado somente SfP ainda foram observadas células inflamatórias
- Conclui-se que o conjunto lectina e a umidade proporcionada pelos veículos SfP e Carbopol 940 proporcionaram efeito no processo de cicatrização de feridas na fase inicial.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, I.F., Bahia, M.F. Reologia: interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. **Cosmet. Toiletries**, v. 15, n.3, p. 96-100, maios/jun, 2003.

Ansel, H. C.; Popovich, N. G.; Allen Junior., L.V.. *Farmacotécnica – Formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos*. São Paulo: Premier, 2000. p.288-291.

Araújo, I.W.F., Vanderlei, E.S.O., Rodrigues, J.A.G., Coura, C.O., Quinderé, A.L.G., Fontes, B.P., Queiroz, I.N.L., Jorge, R.J.B., Bezerra, M.M., Silva, A.A.R., Chaves, H.V., Monteiro, M.A.S., Paula, R.C.M., Benevides, N.M.B. Effects of a sulfated polysaccharides isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation. **Carbohydrate polymers** v. 86, 1207-1215, 2011.

Arruda, P.V., Rodrigues, R.C.L.B., Felipe, M.G.A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**. v. 26, p. 56-62, 2007.

Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines – CXC and CC chemokines. **Adv. Immunol.** v. 55, 97–179, 1994.

Balbino, C. A., Pereira, L. M., Curi, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, p. 27-51, 2005.

Belton P. Basic science of wound healing. *Surgery*, v. 28, 409-412, 2010.

Biondo-Simões, M.L.P. Alcantara, E.MA., Dallagnol, JC., Yoshizumi, K.O., Torres, L.F.B. Borsato, K.S. Cicatrização de feridas: estudo comparativo em ratos hipertensos não tratados e tratados com inibidor da enzima conversora da angiotensina. **Rev. Col. Bras. Cir.** v. 33, 74-78, 2006.

Candido, L.C. Nova abordagem no tratamento de feridas. São Paulo: Senac, 2001.

Cardozo, K. H. M., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcão, V. R., Tonon, A.P., Lopes, N. P., Campos, S., Torres, M. A., Souza, A. O., Colepicolo., Pinto, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 146, p. 60-78, 2007.

Cavazana, W.C., Biondo Simões, M.L.P. Yoshii S, Sergio O., Bersani, A., Ciomar A., Roncada, E.V.M., Cuman, R.K.N. Estudo comparativo da reação inflamatória de feridas tratadas com açúcar (sacarose) e compostos com ácidos graxos essenciais, em ratos – estudo preliminar. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 36, 85-90, 2007.

Coelho, M.C.O.C. et al. Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, p. 11-13, 2002.

Corrêa, N. M., Júnior, F. B. C., Ignácio, R. F., Leonardo, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 74-78, 2005.

Courtois, J. Oligosaccharides from land plants and algae: production and applications in therapeutics and biotechnology. *Current Opinion in Microbiology*, v.12, 261–273, 2009.

Fellet et al. Artrite na mulher. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v. 59, 5; 307-317, 2002.

Henry, G., Garner, W.L. Inflammatory mediators in wound healing. **Surg Clin N Am**, v. 83, 483–507, 2003.

Holz, O., Seiler, T., Karmeier, A., Fraedrich, J., Leiner, H., Magnussen, H. et al. Assessing airway inflammation in clinical practice-experience with spontaneous sputum analysis. **BMC Pulm. Med.** 28:5, 2008.

Kayser, O., Kiderlen, A. F., Croft, S. L. Natural products as antiparasitic drug. **Parasitol Res**, v. 90, S55 S62, 2003.

Knill, C.J., Kennedy, J. F., Mistry, J., Mirafteb, M., Smart, G., Grocock, M. R., Williams. Alginate fibres modified with unhydrolysed and hydrolysed chitosans for wound dressings. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, p. 65-76, 2004.

Lloyd, L.L., Kennedy, J. F., Methacanon, P., Paterson, M., Knill, C.J. Carbohydrate polymers as wound management aids. **Carbohydrate Polymers** v.37, 315–322, 1998.

Lopes, A.R., Vargas, M.L.S., Cavalcanti, A.S.S., Silva, A.G. Plantas e seus extratos – administração e biodisponibilidade de fitoterápicos aplicados na pele. **Natureza Online** v. 4, p. 62-66, 2006.

Mandelbaum, S. H., DI Santis, E. P., Mandelbaum, M. H. S. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources Part I. **An Bras Dermatol**, v. 78, p. 393-410, 2003.



- Mandelbaum, S. H., DI Santis, E. P., Mandelbaum, M. H. S. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources Part II. **An Bras Dermatol**, v. 78, p. 525-542, 2003.
- Medeiros,R., Figueiredo,C.P.,Passos, G.F., Calixto, J.B. Reduced skin inflammatory response in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, 390–395, 2009.
- Melo C.M, Porto C.S, Melo-Júnior M.R, Mendes C.M, Cavalcanti C.C.B, Coelho, L.C.B.B, Porto A.L.F, Leão A.M.A.C, Correia, M.T.S. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **International journal of pharmaceutics**, v.408, 113-119, 2011.
- Mendes, A. Avaliação em larga escala do diclofenaco colestiromida em lesões traumáticas agudas. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v.58. n. 4, 249-256, 2001.
- Menke, M.N., Menke, N.B., Boardman, C.H., Diegelmann, R.F. Biologic therapeutics and molecular profiling to optimize wound healing. **Gynecology Oncology**, v. 111, p. S87-S91, 2008.
- Monteiro, E.C.A., Trindade, J. M.S. Duarte, A.L.B.P., Chahade, W.H. Os antiinflamatórios não estereodais. **Temas de Reumatologia Clínica** v. 9 ,53-63, 2008
- Monteiro, V.L.C., Coelho, M.C.O.C., Carrazzoni, R.A., Melo, F.A.D., Carvalho, E.C., Andrade, L.S.S. Cana-de-açúcar no tratamento de feridas cutâneas por segunda ou terceira intenção. **Medicina veterinária**, v.1, p. 1-8, 2007.
- Nathan, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p. 846-852, 2002.
- Nicholls, S. and Hazen, S.: Myeloperoxidase and Cardiovascular Disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**,v. 25, p.1102-1111,2005.
- Nitzs, A.C., Ely, J.B., d'Acampora, A.J., Tames, D.R., Corrêa, B.P. Estudo morfométrico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando: *Coronopu didymus* e *Calendula officinali*. **Arquivos Catarinenses de Medicina**,v. 35, 74-79, 2006.
- Oliveira MLM, Nunes-Pinheiro DCS, Tomé AR, Mota EF, Lima-Verde IA, Pinheiro F GM, Campello CC, Morais SM. In vivo topical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of *Caryocar coriaceum* Wittm. Seeds. **Journal of Ethnopharmacology**,1-7, 2010.
- Olsen, R.L. and Little, C., Purification and some properties of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase from human blood. **Biochem. J.** v. 209, p.781-787, 1983.

Orzechowski, A., Ostaszewski, P., Jank, M., Berwid, S. J. Bioactive substances of plant origin in food – impact on genomics. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 42,461-477,2002.

Pandit, N.K. Introdução às ciências farmacêuticas. Porto Alegre: Artmed, 2008, 424p.

Ramsey M.W, Goodfellow J, Jones C.J.H, Luddington, L.A., Lewis, M.J., Henderson, A.H. Endothelial control of arterial distensibility is impaired in chronic heart failure. **Circulation**, v.92, p. 3212-9, 1995.

Ratner, B. D., Bryant, S. J. Biomaterials: where we have been and where we are going. **Annual Review of Biomedical Engineering**,v. 6, 41-75, 2004.

Robbins, S.L. Patologia estrutural e funcional. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

Roman, R. M., Wendland, a. E., Polanczyk, C. A. Mieloperoxidase e doença arterial coronariana: da pesquisa à prática clínica. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. v.91, p. 11 e 12, 2008.

Santos, M.J., Vianna, L.A.C., Gamba, M.A. Avaliação da eficácia da pomada de própolis em portadores de feridas crônicas. **Acta Paul Enferm**. v.20, 199-204, 2007.

Schirato, G. V., Monteiro, F. M. F., Silva, F. O., Filho, J. L. L., Leão, A. M. A. C., Porto, A. L. F. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciência Rural**, v. 36: 149-154, 2006.

Shivhare Y, Singour PK, Patil UK, Pawar RS. Wound healing potential of methanolic extract of *Trichosanthes dioica* Roxb (fruits) in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 127, 614-619, 2010.

Schott, H. Reología. *In: Remington Pharmacia*. 19. ed. Phennsylvania: Mack Publishing Company, 1995. p. 426-455.

Scultz, G.S., Gary Sibbald, R., Falanga, V., Ayello, E.A., Dowsett, C., Harding, K., Romanelli, M., Stacey, M.C., Teot, L., Vanscheidt, W.Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. **Wound Rep. Reg.**, v. 11, p. 1-28, 2003.

Silva, F.O, Araújo, R.V.S., Schirato, G.V., Teixeira, E.H., Júnior, M.R.M., Cavada, B.S., Lima-Filho, J.L., Carneiro-Leão, A.M.A., Porto, A.L.F. Perfil de proteases de lesões cutâneas experimentais em camundongos tratados com a lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*. **Ciência Rural**, V. 20, 1808-1814, 2009.

Silva, J.A., Apolinário, A.C., Souza, M.S.Z., Damasceno, B.P.G.L., Medeiros, A.C.D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. V. 31, p. 125-131, 2010.

Silva, R.F.R., Dore, C.M.P.G., Marques, C.T., Nascimento, M.S., Benevides, N.M.B., Rocha, H.A.O., Chavante, S.F., Leite, E.L. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: Action of major types of commercial carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v. 79 26–33, 2010.

SMIT, A. J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, p. 245 - 262, 2004.

Stephanie B, Eric D, Sophie FM, Christian B, Yu G. Carrageenan from *Solieria chordalis* (Gigartinales): Structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions. **Carbohydrate Polymers**. v. 81, 448-460, 2010.

Tazima, M.F.G.S., Vicente, Y.A.M.V.A., Moriya, T. Biologia da ferida e cicatrização. Simpósio: Fundamentos em clínica cirúrgica 1ª parte capítulo II. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.41,p. 259-264, 2008.

Thompson, J.E. A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos. Porto Alegre: Artemed, 2006.

Valenta,C., Schultz,K. Influence of carrageenan on the rheology and skin permeation of microemulsion formulation. **Journal of Controlled Release**, v.95, 257-265, 2004.

Vitorino Filho, R.N.L., Batista, M.C.S., Verçosa, B.L.A., Silva, S.M.M.S., Machado, A.S.F., Bonfim, J.M., Brandão, A.A.C., Sousa, J.B.B. Avaliação do uso de pomada à base de semente de jaqueira (*Artocarpus heterophyllus* Lam) na terapêutica tópica de feridas. **Ver. Ciênc. Farm. Básica Apl.** v. 28, p. 279-286, 2007.

Wagner, J. G., Roth, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacol Rev.** v. 52, p. 349 - 374, 2000.

**ANEXO**