



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

**NATÁSSIA ALBUQUERQUE RIBEIRO**

**EFEITOS DE UMA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA SULFATADA DA ALGA  
MARINHA VERDE *Caulerpa racemosa* (FORSSKÅL) J. AGARDH NA  
NOCICEPÇÃO E INFLAMAÇÃO**

**FORTALEZA**

**2012**

NATÁSSIA ALBUQUERQUE RIBEIRO

EFEITOS DE UMA FRAÇÃO POLISSACARÍDICA SULFATADA DA ALGA MARINHA  
VERDE *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J. Agardh NA NOCICEPÇÃO E INFLAMAÇÃO

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

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

FORTALEZA

2012

Esta Dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários á obtenção do grau de Mestre 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.

---

NATÁSSIA ALBUQUERQUE RIBEIRO

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28 /02/2012

---

Dra. NORMA MARIA BARROS BENEVIDES

Depto. Bioquímica e Biologia Molecular-UFC

(Orientadora)

---

Dra. ERIKA FREITAS MOTA

Depto. de Biologia -UFC

---

Dra. ANA MARIA SAMPAIO ASSREUY

Centro de Ciências da Saúde -UECE

*À minha família*

## AGRADECIMENTOS

À Professora Norma Maria Barros Benevides, por ter me recebido em seu laboratório e ter me orientado durante os últimos cinco anos, sempre com muita disposição, energia e alegria.

À Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra, da Faculdade de Medicina da UFC – Campus Sobral, por ter-me recebido em seu laboratório de braços abertos.

À Profa. Hellíada Vasconcelos Chaves, da Faculdade de Odontologia da UFC – Campus Sobral, por toda a atenção, pelo apoio imprescindível prestado na realização dos ensaios biológicos e por sua energia contagiante.

Às Professoras Ana Maria Sampaio Assreuy da Universidade Estadual do Ceará e Erika Freitas Mota da Universidade Federal do Ceará, por gentilmente integrarem a banca examinadora deste trabalho.

Á todos que fizeram ou fazem parte do Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CARBOLEC) com quem tive ou tenho o prazer de conviver diariamente: Ticiane Abreu, Ticiane Lima, Jane Teixeira, Ismael Nilo, Neto Silva, Ana Luiza Quinderé, Trycia Magalhães, Gabrielle Freitas, Érika Bessa, Luana Maria, Marjory Holanda, Edfranck Vanderlei, Ianna Araújo, Edna Maria, José Ariévilho, Chistiane Coura, Ygor Eloy, Gardênia Prado, Bruno Fontes, Ricardo Bastos, Gabriela de Paula, Willame Alves, José Gerardo, Valdécio Silvano, Fabíola Moura e Felipe Barros. Todos vocês foram essenciais nessa minha caminhada e contribuíram de alguma forma para a elaboração desta dissertação, vocês me ajudaram a vencer uma etapa muito importante!

Em especial agradeço a Ticiane Abreu, que desde o primeiro momento deste trabalho esteve presente ao meu lado, na bancada, nos congressos e na vida e a Danilo Ricarte que mesmo não estando mais no laboratório, está mais do que presente no meu dia-a-dia, obrigado por todo o apoio e carinho.

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

Aos meus amigos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial Débora Moura e Juliana Gomes.

Em especial dedico:

Aos meus pais Francisco Edson de Alcântara Ribeiro e Elisa Albuquerque Ribeiro, por todo o amor e apoio que sempre recebi.

Á minha avó Zilmar Sampaio por todo o apoio e carinho.

Ás minhas irmãs Andressa A. Ribeiro e Katiusca A. Ribeiro, por quase sempre me compreenderem e me ajudarem em tudo.

Ao meu futuro cunhado Luiz Hiroshi e sua mãe Virginia Fukuda, por tornar nossa vizinhança mais alegre e por todo apoio.

Ás minhas amigas de infância e adolescência, Marina Xavier, Luciana Vasconcelos, Ana Elisa Garcia, Jordana Soares, Isabela Pimenta e Bia Albuquerque, que até hoje me ensinam sobre amizade.

Ás minhas queridas Nair Catarina e Raquel Facó.

Á minha grande amiga Thais Fontenelle por fazer meus dias mais alegres e coloridos.

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

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

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

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro dos projetos desenvolvidos no Laboratório de Carboidratos e Lectinas

FUNCAP – Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa, pelo custeio dos projetos desenvolvidos no Laboratório de Carboidratos e Lectinas.

## RESUMO

As algas marinhas são fontes abundantes de polissacarídeos sulfatados com várias atividades biológicas, dessa forma, suas biomoléculas são de grande interesse comercial, principalmente nas indústrias farmacêutica e alimentícia. No presente trabalho, investigou-se uma fração polissacarídica sulfatada obtida da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (CrII) quanto aos seus efeitos na nocicepção e inflamação. Inicialmente, a CrII (1,0 mg/kg; i.v.) foi avaliada quanto a toxicidade em camundongos utilizando um modelo por dose repetida (sete dias). Após o período experimental, a CrII mostrou-se atóxica. A atividade antinociceptiva foi avaliada através dos ensaios de contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina e da placa quente. Camundongos *Swiss* machos foram tratados com CrII (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg; i.v.) 30 min antes de receber os estímulos de dor (ácido acético 0,8% ou formalina 2%) ou exposição ao calor. Nos ensaios de contorções abdominais, induzidas por ácido acético CrII reduziu significativamente o número de contorções abdominais e no teste da formalina CrII também foi capaz de reduzir o tempo de lambadura da pata, na segunda fase do experimento. Em relação ao estímulo térmico, CrII não foi capaz de prolongar o tempo de reação dos animais. Com relação aos efeitos na inflamação, CrII (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg; i.v.) foi avaliada quanto seu potencial anti-inflamatório utilizando-se ratos *Wistar*. Foram utilizados ensaios de migração celular para a cavidade peritoneal induzida por carragenana (Cg - 700 µg/cavidade), de edema de pata induzido por Cg (700 µg/pata) ou dextrana (300 µg/pata). Com relação a migração celular para a cavidade peritoneal ocorreu uma redução significativa de neutrófilos em todos os grupos tratados com a CrII. No ensaio de edema de pata induzido por Cg ou dextrana, CrII também foi capaz de reduzir significativamente o edema em todas as doses utilizadas. O efeito anti-inflamatório da CrII foi confirmado através da redução dos níveis teciduais da mieloperoxidase do tecido das patas nos grupos com Cg. Além disso, foi realizado um ensaio de inibição da enzima Hemoxygenase-1 (HO-1), utilizando-se o inibidor ZnPP IX, com o intuito de avaliar se o efeito anti-inflamatório da CrII estava relacionado com a expressão dessa enzima. Os resultados demonstraram que a inibição da via HO-1 está associada à inibição da resposta anti-inflamatória da CrII. No intuito de avaliar se CrII também possui efeito pró-inflamatório, CrII (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg; i.pl) foi injetada na pata de ratos *Wistar*, onde, o resultado obtido demonstrou um processo inflamatório apenas para animais que receberam a dose de 1,0 mg/kg. Portanto, os possíveis mediadores que poderiam estar envolvidos com o processo inflamatório da CrII, foram avaliados utilizando-se o ensaio de edema de pata induzido por CrII. Os resultados demonstraram que a ação pró-inflamatória da CrII pode estar relacionada com a liberação de mediadores provindos da via da ciclooxigenase (COX-2, prostaglandinas e tromboxanos). A CrII quando utilizada como agente anti-inflamatório não foi capaz de inibir seu efeito pró-inflamatório no ensaio de edema de pata, em nenhuma das doses utilizadas (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg; i.v.), confirmando que sua ação anti-inflamatória está relacionada com a via da HO-1.

Palavras-chave: Algas marinhas verdes, polissacarídeos sulfatados, nocicepção e inflamação.

## ABSTRACT

Marine algae are abundant sources of sulfated polysaccharides with various biological activities, thereby altering its biomolecules are great of commercial interest, especially in the pharmaceutical and food industries. In this study, we investigated a sulfated polysaccharide obtained from the green seaweed *Caulerpa racemosa* (CrII) as to its effects on nociception and inflammation. Initially, the CrII (1.0 mg/kg, i.v.) was evaluated for toxicity in mice using a repeated dose model (seven days). After the trial period, the CrII proved to be nontoxic. The antinociceptive activity was evaluated by the writhings of abdominal constrictions induced by acetic acid, formalin test and hot plate. Swiss male mice were treated with CrII (0.01, 0.1 and 1.0 mg/kg, i.v.) 30 min before receiving pain stimuli (acetic acid 0.8% or 2% formalin) or heat exposure. In trials of abdominal constrictions induced by acetic acid, and the formalin test, CrII significantly reduced the number of abdominal writhing and paw licking time in the second phase of the experiment, respectively. In relation to thermal stimulation, CrII was unable to prolong the reaction time of animals. With respect to effects on inflammation, CrII (0.01, 0.1 and 1.0 mg/kg, i.v.) was evaluated for its potential antiinflammatory using *Wistar* rats. We used assays of cell migration into the peritoneal cavity induced by carrageenan (Cg - 700 mg/cavity), paw edema induced by Cg (700 µg/paw) or dextran (300 µg/paw). With respect to cell migration into the peritoneal cavity there was a significant reduction of neutrophils in all groups treated with the CrII. In the test paw edema induced by dextran or Cg, CrII was also able to significantly reduce the swelling at all doses used. The anti-inflammatory effect of CrII was confirmed by reducing the tissue levels of myeloperoxidase in the tissue of the paws Cg groups. In addition, we performed an enzyme inhibition assay Hemo-oxygenase-1 (HO-1), using the inhibitor ZnPP IX, in order to assess whether the anti-inflammatory effect of CrII was related to the expression of this enzyme. The results showed that the inhibition of the HO-1 is associated with inhibition of the inflammatory response of CrII. In order to assess whether CrII also has pro-inflammatory effect, CrII (0.01, 0.1 and 1.0 mg/kg; i.p.) was injected into the paw of the rats, where the result demonstrated a process inflammation only for animals which received the dose of 1.0 mg/kg. Therefore, the potential mediators that could be involved in the inflammatory process of CrII were evaluated using the test paw edema induced by CrII. The results showed that the pro-inflammatory effect of CrII may be related to the release of mediators emanating from the path of cyclooxygenase (COX-2, prostaglandins and thromboxanes). The CrII when used as anti-inflammatory agent was unable to inhibit pro-inflammatory effect in the paw edema test in any of the doses (0.01, 0.1 and 1.0 mg/kg, i.v.), confirming that its anti-inflammatory effect is related to HO-1.

**Keywords:** Green seaweed, sulfated polysaccharides, nociception and inflammation.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Mediadores inflamatórios ativando e sensibilizando os nociceptores .....	27
FIGURA 2	O caminho no qual a dor percorre, da periferia até o cérebro .....	28
FIGURA 3	Sequência de eventos leucocitários na inflamação .....	36
FIGURA 4	Biossíntese dos produtos do ácido araquidônico .....	39
FIGURA 5	Biossíntese do NO.....	41
FIGURA 6	Espécime da alga <i>Caulerpa racemosa</i> (Forsskål) J. Agardh (A) e sua classificação taxonômica (B) .....	50
FIGURA 7	Fluxograma de extração dos polissacarídeos sulfatados totais .....	52
FIGURA 8	Comportamento de um camundongo apresentando contorção abdominal seguida por extensão das patas posteriores induzida por ácido acético a 0,8% .....	54
FIGURA 9	Comportamento de um camundongo lambendo a pata traseira após aplicação de formalina a 2%.....	55
FIGURA 10	Comportamento do animal durante o teste da placa quente .....	56
FIGURA 11	Cromatografia de troca iônica dos Cr-PST em coluna de DEAE-celulose ....	64
TABELA 1	Composição química dos PS da alga <i>Caulerpa racemosa</i> .....	64
FIGURA 12	Eletroforese em gel de agarose 0,5% dos Cr-PST e das frações F I, F II e F III da alga <i>Caulerpa racemosa</i> obtidas por cromatografia em DEAE-celulose, corada com azul de toluidina .....	64
FIGURA 13	Atividade antinociceptiva da CrII em modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	67
FIGURA 14	Atividade antinociceptiva no teste da formalina da CrII.....	69
FIGURA 15	Efeito da CrII no teste da placa quente em camundongos.....	71
FIGURA 16	Efeito da CrII no modelo de peritonite induzida por carragenana .....	72

FIGURA 17	Efeito da CrII no modelo de peritonite induzida por carragenana, na migração de neutrófilos.....	73
FIGURA 18	Efeito da CrII no modelo de edema de pata induzido por carragenana (Cg) .	75
FIGURA 19	Efeito da CrII na terceira hora após a administração do estímulo carragenana .....	76
FIGURA 20	Atividade da mieloperoxidase (MPO) no sobrenadante do tecido da pata ....	78
FIGURA 21	Efeito da CrII no modelo de edema de pata induzido por dextrana.....	79
FIGURA 22	Efeito da CrII após 1 h da administração do estímulo dextrana .....	79
FIGURA 23	Atividade da HO-1 no edema de pata induzido por carragenana em ratos ....	81
FIGURA 24	Efeito da injeção intraplantar da CrII no modelo de edema de pata .....	82
FIGURA 25	Efeito do pré-tratamento com anti-inflamatórios no modelo de edema de pata induzido por CrII.....	84
FIGURA 26	Efeito do pré-tratamento com CrII (i.v.) no modelo de edema de pata induzido por CrII (i.pl.).....	85
TABELA 2	Análises bioquímicas e do peso corporal e dos órgãos de camundongos submetidos ao ensaio de toxicidade por dose repetida.....	87
FIGURA 27	Fotomicrografias de luz de 4 µm de espessura dos órgãos .....	89

## LISTA DE ABREVIACOES

$\mu\text{L}$	Microlitro
5-HT	5-hidroxitriptamina
AA	Ácido araquidônico
AINEs	Antiinflamatórios não-esteroidais
ATP	Adenosina trifosfato
Cg	Carragenana
COX	Ciclooxigenases
CPC	Cloreto de cetilpiridínio
CrII	Fração polissacarídica sulfata eluída com 0,75 M de NaCl da alga <i>C. racemosa</i>
Cr-PST	Polissacarídeos sulfatados totais da <i>C. racemosa</i>
DEAE	Dietilaminoetil-celulose
Dexa	Dexametasona
g	Gramma
GAGS	Glicosaminoglicanos sulfatados
GR	Receptores de glicocorticóides
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Água oxigenada
HO-1	hemoxigenase-1
HSV-1	Vírus herpes simplex tipo 1
IL	Interleucina
Indo	Indometacina
iNOS	Óxido nítrico sintase reduzida
kDa	Kilodaltons

kg	Kilo
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Morf	Morfina
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
NO	Óxido Nítrico
O	Oxigênio
PAF	Fator de ativação plaquetária
Pentoxi	Pentoxifilina
PG's	Prostaglandinas
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
PS	Polissacarídeos sulfatados
PT	Tempo de protrombina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TNF	Fator de necrose tumoral
TT	Tempo de trombina
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada
v/v	Volume/volume
ZnPP IX	Protoporfirina de zinco

## SÚMARIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1 Algas marinhas</b> .....	14
<i>1.1.1 Considerações gerais</i> .....	14
<i>1.1.2 Importância econômica</i> .....	15
<b>1.2 Polissacarídeos sulfatados</b> .....	16
<i>1.2.1 Considerações gerais</i> .....	17
<i>1.2.2 Polissacarídeos de algas marinhas: características estruturais</i> .....	18
<i>1.2.3 Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas</i> .....	20
<i>1.2.3.1 Atividades biológicas de galactanas sulfatadas</i> .....	20
<i>1.2.3.2 Atividades biológicas de fucoïdanas sulfatadas</i> .....	22
<i>1.2.3.3 Atividades biológicas de ulvanas e arabino-galactanas</i> .....	23
<i>1.2.3.3.1 Atividades biológicas da alga marinha verde <i>Caulerpa racemosa</i></i> .....	25
<b>1.3 Dor e nocicepção</b> .....	26
<b>1.4 Inflamação</b> .....	29
<i>1.4.1 Eventos vasculares</i> .....	31
<i>1.4.2 Eventos celulares: Principais células envolvidas</i> .....	32
<i>1.4.3 Mediadores químicos</i> .....	37
<i>1.4.4 A via da hemoxigenase</i> .....	41
<b>1.5 Fármacos utilizados na Dor e na Inflamação</b> .....	43
<b>2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA</b> .....	47
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	49
<b>3.1 Geral</b> .....	49
<b>3.2 Específicos</b> .....	49
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	50
<b>4.1 Materiais</b> .....	51

4.1.1 Alga marinha.....	50
4.1.2 Animais .....	50
4.2. Métodos .....	51
4.2.1 Extração, fracionamento e análises bioquímicas dos polissacarídeos sulfatados..	51
4.2.1.1 Extração dos polissacarídeos sulfatados totais .....	51
4.2.1.2 Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados.....	52
4.2.1.3 Análise da composição química.....	53
4.2.1.4 Eletroforese em gel de agarose .....	53
4.2.2 Atividade antinociceptiva.....	53
4.2.2.1 Testes de contorções induzidas por ácido acético .....	54
4.2.2.2 Teste da formalina.....	55
4.2.2.3 Teste da placa quente .....	55
4.2.3 Modelos de inflamação.....	56
4.2.3.1 Modelo de Peritonite.....	56
4.2.3.2 Modelo de edema de pata.....	57
4.2.3.3 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase .....	58
4.2.3.4 Edema de pata induzido por dextrana .....	58
4.2.3.5 Análise do envolvimento da via da hemoxigenase-1 (HO-1) na atividade anti-inflamatória da fração CrII .....	59
4.2.3.6 Avaliação do efeito da CrII.....	59
4.2.3.7 Participação de mediadores inflamatórios no edema de pata induzido por CrII	59
4.2.3.8 Avaliação do potencial antiinflamatório da CrII em modelo de edema de pata induzido por CrII .....	60
4.2.4 Avaliação da toxicidade por dose repetida .....	60
4.2.4.1 Análise Bioquímica Enzimática do Plasma .....	61
4.2.3 Análise Estatística .....	62
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	63
5.1 Rendimento parcial e purificação dos polissacarídeos sulfatados totais.....	63

<b>5.2</b>	<b>Análise da composição química .....</b>	<b>64</b>
<b>5.3</b>	<b>Eletroforese em gel de agarose.....</b>	<b>65</b>
<b>5.4</b>	<b>Atividade antinociceptiva.....</b>	<b>66</b>
<b>5.4.1</b>	<b><i>Testes de contorções induzidas por ácido acético .....</i></b>	<b>66</b>
<b>5.4.2</b>	<b><i>Efeito da fração CrII da alga C. racemosa sobre no tempo de lambadura induzido por formalina.....</i></b>	<b>68</b>
<b>5.4.3</b>	<b><i>Efeito da fração CrII da alga C. racemosa no teste da placa quente .....</i></b>	<b>69</b>
<b>5.5</b>	<b>Atividade antiinflamatória.....</b>	<b>71</b>
<b>5.5.1</b>	<b><i>Ensaio de migração celular induzida por carragenana (Cg).....</i></b>	<b>71</b>
<b>5.5.2</b>	<b><i>Edema de pata induzido por carragenana (Cg).....</i></b>	<b>74</b>
<b>5.5.3</b>	<b><i>Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase .....</i></b>	<b>77</b>
<b>5.5.4</b>	<b><i>Edema de pata induzido por dextrana .....</i></b>	<b>78</b>
<b>5.5.5</b>	<b><i>Análise do envolvimento da via da hemoxigenase (HO-1) na atividade antiinflamatória da fração CrII .....</i></b>	<b>80</b>
<b>5.6.</b>	<b><i>Avaliação do efeito da CrII .....</i></b>	<b>81</b>
<b>5.6.1</b>	<b><i>Participação de mediadores inflamatórios no modelo de edema de pata induzido por CrII .....</i></b>	<b>83</b>
<b>5.6.2</b>	<b><i>Avaliação do potencial antiinflamatório da CrII (i.v.) em modelo de edema de pata induzido por CrII (i.pl).....</i></b>	<b>84</b>
<b>5.7</b>	<b>Avaliação da toxicidade por dose repetida.....</b>	<b>85</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>91</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>92</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Algas marinhas

### *1.1.1 Considerações gerais*

As algas são talófitas (plantas sem raízes, caules e folhas) que têm a clorofila A como seu pigmento fotossintético principal (LEE, 1997).

O termo alga indica um grupo polifilético, pois inclui organismos que não compartilham uma origem comum, mas que seguem múltiplas e independentes linhas evolucionárias. A classificação desses organismos está sob constante revisão à medida que mais evidências genéticas e de ultra-estruturas são acumuladas (BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

Atualmente as algas marinhas são classificadas como pertencentes ao reino protista. Elas estão divididas em três grandes grupos: algas verdes (Chlorophyta), algas pardas ou marrons (Phaeophyta) e algas vermelhas (Rhodophyta) (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

As algas verdes podem ser unicelulares ou pluricelulares, ocorrendo vastamente em água doce e do mar, mas também podem ser encontradas em uma ampla variedade de habitat, como a superfície da neve, os troncos de árvores, o solo e em simbiose com fungos (constituindo os líquens), protozoários e celenterados. Apresentam o amido como polissacarídeo de reserva e sua parede celular é constituída de celulose. Elas são consideradas o grupo a partir do qual as plantas evoluíram. As algas pardas são pluricelulares e predominantemente marinhas. Compreendem as algas mais conspícuas das águas temperadas, boreais e polares, mas também são encontradas em regiões tropicais. Existem somente cerca de 1.500 espécies, que variam de formas microscópicas até as maiores macroalgas, que podem chegar a 60 metros de comprimento e pesar mais de 300 quilogramas. Apresentam a laminarina como polissacarídeo de reserva e sua parede celular são constituídas de celulose e algina. As algas vermelhas são pluricelulares, particularmente abundantes em águas tropicais quentes. Porém, o número de espécies marinhas excede a soma de espécies pertencentes às



divisões Phaeophyta e Chlorophyta. As algas vermelhas possuem 4.000 a 6.000 espécies distribuídas em aproximadamente 680 gêneros, dentre os quais poucas são unicelulares (RAVEN *et al.*, 2007).

As algas representam a base da cadeia alimentar nos oceanos e sustentam mais de dois terços da biomassa mundial e são ainda responsáveis por aproximadamente metade da atividade fotossintética global (DAY *et al.*, 1999).

Segundo Cardozo *et al.* (2010), micro e macroalgas são essenciais para o desenvolvimento da aquicultura, uma vez que fornecem os micronutrientes principais para muitos organismos aquáticos, incluindo vitaminas, compostos contendo nitrogênio, esteróis, ácidos graxos específicos, etc.

### ***1.1.2 Importância econômica***

Além de sua importância ecológica, as algas são consideradas excelentes fontes de proteínas e carboidratos, possuindo baixos teores de lipídios (MABEAU *et al.*, 1992).

As algas têm sido usadas como um componente importante na dieta há séculos em países como China, Japão e Coreia. No entanto, elas estão atraindo cada vez mais atenção como uma valiosa fonte de alimento em outras partes da Ásia, África, e também em outras partes ocidentais do mundo, é crescente o interesse de explorar todas as intervenções possíveis que as algas possam oferecer incluindo o desenvolvimento de produtos alimentícios. Para este fim, diversos outros países além da China, Japão e Coreia do Sul estão explorando comercialmente sistemas abertos e fechados de cultivo de algas em grande escala. É esperado que estes países possam aumentar a cultura de algas ao longo dos próximos anos. Avanços na ciência e na tecnologia têm proporcionado a formação de pesquisadores de *know-how* necessários que possam contribuir com poderosas ferramentas analíticas para melhor caracterizar as funções fisiológicas de compostos bioativos de algas marinhas na prevenção de doenças e na melhoria da saúde (MENDIS; KIM, 2011).

A atual aplicação de compostos químicos isolados de diversas classes de algas marinhas é de interesse crescente. Desde 1975, algumas pesquisas com algas começaram a surgir abordando toxinas, bioprodutos e ecologia química. Mais de 15.000 novos compostos

tiveram sua estrutura química determinada. Os ficocolóides (ágar, alginato e carragenana) vêm sendo extraídos de algas marinhas para o uso nas indústrias farmacêutica, de cosmético e alimentícia. As propriedades físico-químicas distintas dos alginatos confere-lhes aplicações na indústria alimentícia como agentes gelificante e espessante (CARDOZO *et al.*, 2007); farmacêutica, como microsferas para a liberação de drogas (CHAN *et al.*, 2002) e nas indústrias de papel e têxtil como espessante de corantes (TURK; SCHNEIDER, 2000).

As algas também podem ser utilizadas diretamente como fertilizantes além de fornecerem substâncias intensamente exploradas na indústria de cosméticos (VAN *et al.*, 1989).

As algas têm atraído grande interesse por serem uma fonte alternativa existente de energia renovável aos combustíveis fósseis nos últimos anos (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011). Estes organismos fotossintéticos são conhecidos por produzirem produtos de alto rendimento do petróleo e de biomassa, podendo serem cultivados dentro de fontes de água doce não incluindo o sal e águas residuais. As algas podem tolerar e adaptar-se a uma variedade de condições ambientais, e também são capazes de produzir vários tipos de bicomustíveis (JONES; MAYFIELD, 2011). Algas e outras plantas usam a fotossíntese para converter energia solar em energia química. Elas armazenam esta energia na forma de óleos, carboidratos e proteínas. Vale ressaltar que, o óleo vegetal pode ser convertido em biodiesel (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011).

Produtos naturais, em geral, desempenham um papel inestimável na descoberta de novas drogas (CRAGG *et al.*, 1997). Assim, a investigação de novos compostos químicos de algas demonstrou ser uma área promissora de estudos farmacêuticos. Muitos trabalhos foram publicados sobre compostos isolados de algas com atividade biológica, demonstrando assim, a sua capacidade de produzir metabólitos diferentes daqueles encontrados em espécies terrestres, possuindo alta complexidade e diversidade ilimitada de propriedades farmacológicas e/ou propriedades biológicas. Nas últimas décadas a ênfase passou da extração de bancos naturais para maricultura e cultivo controlado para, dessa maneira, produzir novos produtos em grande escala (CARDOZO *et al.*, 2007).

## **1.2 Polissacarídeos sulfatados**

### 1.2.1 Considerações gerais

Os carboidratos ou sacarídeos (do grego *sakcharon*, açúcar) são as moléculas biológicas mais abundantes do planeta. Quando os carboidratos estão na forma de polímeros eles são conhecidos como polissacarídeos e constituem um dos principais quatro grupos de macromoléculas que compõem os seres vivos. Até 1960 acreditava-se que eles desempenhavam apenas funções passivas como fontes de energia (glicose, amido, glicogênio) e como materiais estruturais (celulose) (LEHNIGER *et al.*, 2006), contudo, os carboidratos podem ser encontrados na natureza desempenhando as mais variadas funções quando associados a moléculas orgânicas como: proteínas (peptideoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas) e lipídeos (lipopolissacarídeos e glicolipídeos) (BUSH *et al.* 1999; ROSEMAN, 2001; IOZZO, 1998; GAHMBERG, 1996).

Os polissacarídeos sulfatados (PS) compreendem um grupo complexo de macromoléculas amplamente distribuídas entre os seres vivos e com uma gama de propriedades biológicas importantes (PAINTER, 1983). Estes polímeros apresentam grande variedade estrutural e caracterizam-se por apresentarem uma alta densidade de cargas negativas devido à presença de ésteres de sulfato e em alguns casos, de resíduos de ácido hexurônico. Estes polímeros aniônicos são encontrados em organismos tão diversos quanto vertebrados, invertebrados e algas marinhas (MATHEWS, 1975).

Podem ocorrer nos invertebrados marinhos como polissacarídeos simples, de estrutura linear, formada por unidades oligossacarídicas repetitivas ou como um grupo de compostos de estrutura similar aos glicosaminoglicanos de tecidos de mamíferos, mas com diferenças em relação a presença de ramificações e ao padrão de sulfatação (ALVES *et al.*, 1997).

O primeiro grupo de PS estudados foram os encontrados em animais. Nesses seres vivos os principais PS encontrados são os glicosaminoglicanos sulfatados (GAGS). Esses polímeros são polissacarídeos lineares com repetições de unidades dissacarídicas constituídas de um resíduo de açúcar não nitrogenado (ácido idurônico, ácido glucurônico, ou galactose) e de um resíduo de hexosamina (glucosamina ou galactosamina). Os GAGS se encontram ligados covalentemente a proteínas, formando um grupo de glicoconjugados complexos denominados de proteoglicanos (DIETRICH, 1984).

Nas algas marinhas estão presentes como estruturas complexas, altamente heterogêneas e muitas vezes ramificadas (MULLOY *et al.*, 1994).

### ***1.2.2 Polissacarídeos de algas marinhas: características estruturais***

Os PS estão presentes nas algas verdes, na forma predominante de arabino-galactanas (PERCIVAL; McDOWELL, 1967), nas algas pardas na forma de fucoidanas (BERTEAU; MULLOY, 2003) e nas algas vermelhas na forma de galactanas (PAINTER, 1983).

As algas marinhas são a fonte mais importante de PS de origem não-animal e sua estrutura química varia de acordo com as diferentes espécies de algas (COSTA *et al.*, 2010).

Polissacarídeos de algas verdes representam talvez o grupo mais diversificado dessas moléculas. São heteropolissacarídeos aniônicos não repetitivos, apresentando-se, geralmente, bastante ramificados, complexos e constituídos de unidades de monossacarídeos ou dissacarídeos constituídos de unidades de galactose e arabinose. Os generos *Cladophara*, *Chaetomorpha*, *Caulerpas* e *Codium* apresentam polissacarídeos sulfatados constituídos por D-galactose, L-arabinose e D-xilose em diferentes proporções, denominados arabino-galactanas (PERCIVAL; McDOWELL, 1967).

Ulvana é um dos principais polissacarídeos solúveis em água encontrados nas algas verdes da ordem *Ulvales* que tem o grupo sulfato, ramnose, xilose, ácidos idurônico e glicurônico como principais constituintes. Entretanto, uma variedade de PS são sintetizados pelas algas verdes (JIAO *et al.*, 2011). As ulvanas representam cerca de 8-29% do peso seco das algas verdes. Entre as propriedades funcionais, elas formam soluções aquosas viscosas capazes de formar géis termoreversíveis na presença de cátions polivalentes e borato (LAHAYE; ROBIC, 2007).

As fucoidanas, que representam os PS de algas pardas são principalmente constituídas de  $\alpha$ -L-fucopirranose, são facilmente extraídas da parede celular com água quente ou solução ácida e podem ser responsáveis por mais de 40% do peso seco das células isoladas (BERTEAU; MULLOY, 2003). Elas podem diferir em estrutura entre as espécies de algas podendo variar até mesmo dentro da mesma espécie. Devido a essa heterogeneidade de estruturas, diferentes condições de extração utilizadas por pesquisadores podem dar origem ao

isolamento de formas distintas de fucoidanas. Esses PS contêm pequenas quantidades de outros monossacarídeos, incluindo glicose, galactose, manose, xilose, ácidos urônicos e também grupos acetil (JIAO *et al.*, 2011).

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

Galactanas de algas vermelhas são de grande importância comercial, são amplamente utilizados nas indústrias de alimentos devido as suas propriedades reológicas como gelificantes e espessantes, estes PS são principalmente classificados com base na sua estereoquímica em dois grupos, carragenanas e agaranas.

Carragenanas são normalmente classificadas de acordo com suas características estruturais, incluindo o seu padrão de sulfatação e da presença ou ausência de anidrogactana na D-unidade. Há pelo menos 15 diferentes estruturas de carragenanas (JIAO *et al.*, 2011). Dentre as carragenanas existentes, as mais comuns 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).

A classificação das agaranas não é tão específica quanto à das carragenanas (STORTZ; CERESO, 2000). As agaranas podem ter quantidades variáveis de diferentes grupos O-ligados, principalmente éter metílico, éster sulfato, acetal de ácido pirúvico ou resíduos  $\beta$ -D-xilopiranosil. A proporção e distribuição dos substituintes mencionados na cadeia do esqueleto das galactanas modificam as propriedades físico-químicas dos polissacarídeos (LAHAYE; ROCHAS, 1991; RODRIGUEZ *et al.*, 2009). O maior grau de substituição por grupos sulfatos, por exemplo, produz géis de menor força (VILLANUEVA *et al.*, 2010).

Uma das agaranas mais estudada em relação a estrutura química é a porfirina, obtida de espécies de algas vermelhas do gênero *Porphyra* incluindo *Porphyra capensis* e *P. haitanensis*. Além de carragenanas e agaranas as algas vermelhas possuem outros PS que são

chamados de DL-híbridos e outros com várias substituições envolvendo grupos sulfatos, ácido pirúvico e grupos metoxila (JIAO *et al.*, 2011).

### ***1.2.3 Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas***

Além de usos industriais, os polissacarídeos derivados de algas marinhas têm surgido nos últimos anos como uma fonte rica e importante de compostos naturais bioativos e, por esta razão, a produção e as aplicações desses polissacarídeos como agentes terapêuticos têm sido cada vez mais importantes temas de intensas pesquisas (NA *et al.*, 2010), principalmente por estes compostos apresentarem baixo risco de contaminação por partículas virais por serem de origem não-animal (LEITE *et al.*, 1998) e toxicidade relativamente mínima (TALARICO *et al.*, 2005).

Novas técnicas de extração e separação, foram recentemente aplicadas na purificação de PS de algas marinhas. As atividades biológicas dessas biomoléculas dependem da sua estrutura química, peso molecular e cadeia de conformação. Portanto, para a sua purificação eficiente, com tamanhos moleculares desejados e manutenção de suas propriedades funcionais, um método adequado é o uso de um sistema de membranas de ultrafiltração (WIJESEKARA, *et al.*, 2011).

Estudos recentes têm fornecido evidências de que os polissacarídeos derivados de algas marinhas desempenham um papel vital na saúde humana e na nutrição. Além disso, o processamento dos subprodutos das algas pode ser facilmente utilizado para a produção de ingredientes funcionais. As possibilidades da concepção de novos alimentos funcionais e produtos farmacêuticos para apoiar a redução ou regulação da dieta relacionada a disfunções crônicas são promissores. Até agora, a maioria das atividades biológicas dos PS de algas marinhas foram observadas *in vitro* ou em modelos animais (WIJESEKARA, *et al.*, 2011).

#### ***1.2.3.1 Atividades biológicas de galactanas sulfatadas***

Como a heparina e outros PS, as galactanas são potentes anticoagulantes que dependem não só da densidade de cargas, como também, das posições do radical sulfato na molécula (PEREIRA *et al.*, 2005; FONSECA *et al.*, 2008).

Além de valiosas propriedades físico-químicas, os PS das algas vermelhas são promissores polímeros biologicamente ativos. Diversas atividades biológicas de PS com potencial na aplicação médica já foram descritas para galactanas sulfatadas, segue abaixo alguns exemplos.

As carragenanas são conhecidas como poderosos agentes que causam a inflamação, dessa maneira, o edema de pata induzido por carragenana constitui um modelo clássico amplamente utilizado no desenvolvimento de medicamentos anti-inflamatórios. Foi demonstrando na investigação comparativa de três carragenanas comerciais indutoras de edema de pata, que  $\iota$  e  $\lambda$  carragenanas têm maior potencial inflamatório do que a  $\kappa$ -carragenana, provavelmente devido ao seu elevado teor de sulfato (USOV, 2011). Apesar disso, recentemente uma fração polissacarídica sulfatada da alga vermelha *Gracilaria birdiae* apresentou um efeito anti-inflamatório, fornecendo evidências, pela primeira vez, que a ação anti-inflamatória está relacionada com a integridade da via da hemoxigenase, dando uma nova visão sobre os mecanismos de ação das galactanas sulfatadas (VANDERLEI *et al.*, 2011)

Segundo Araújo *et al.* (2011), uma fração polissacarídica sulfatada da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* demonstrou efeito antinociceptivo em modelos experimentais de nocicepção. No entanto, em modelos inflamatórios possuiu efeito pró-inflamatório sugerindo o envolvimento de mediadores inflamatórios tais como: prostaglandinas, óxido nítrico (NO) e citocinas primárias (IL-1 e TNF- $\alpha$ ).

O primeiro relato de atividade antiviral de PS de algas marinhas foi de uma galactana sulfatada da alga *Gelidium cartilagenium*, com o trabalho de Gerber e colaboradores (1958), observaram que os PS protegiam os ovos embrionários contra a Influenza B ou vírus da caxumba. Atualmente, vários trabalhos foram publicados relatando atividade antiviral de galactanas sulfatadas (TALARICO *et al.*, 2004; DUARTE *et al.*, 2004; HARDEN *et al.*, 2009; YASUHARA-BEL; LU, 2010).

A formação de células cancerosas no corpo humano pode ser diretamente induzida por radicais livres e drogas naturais anticâncer, dessa forma, agentes preventivos ganharam uma popularidade positiva no tratamento de câncer. A  $\lambda$ -carragenana de *Chondrus ocellatus*, uma

alga de importância econômica na China, após fracionamento, apresentou cinco produtos de massas moleculares diferentes: 650, 240, 140, 15 e 9,3 kDa. Esses produtos apresentaram atividades antitumorais e imuno-moduladoras em diferentes graus (ZHOU *et al.*, 2004).

O primeiro relato de uma galactana sulfatada a apresentar efeitos em modelos gastrointestinais utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo* foi demonstrado para a espécie de alga *Halymenia floresia* pertencente à família *Halymeniaceae*. Onde, uma fração polissacarídica apresentou efeito na miocontratilidade no duodeno e redução da distensão gástrica em ratos (GRAÇA *et al.*, 2011).

### **1.2.3.2 Atividades biológicas de fucoïdanas sulfatadas**

Provavelmente, a bioatividade mais amplamente reconhecida e estudada dos PS é a atividade anticoagulante exibida por fucoïdanas. Esta atividade foi relatada, pela primeira vez, para a fucoïdana da alga *Fucus vesiculosus* que apresentou inibição da formação de coágulos de fibrina e atividade antitrombina. Desde então, os estudos sobre fucanas de algas veem sendo intensificadas (JIAO *et al.*, 2011).

Chevolot *et al.* (1999), estudando a influencia da massa molecular e do conteúdo de sulfatação da alga parda *Ascophyllum nodosum* na atividade anticoagulante, demonstraram que esses são parâmetros importantes para esta atividade.

A atividade anticoagulante de um polissacarídeo sulfatado purificado a partir de um extrato enzimático da alga parda, *Ecklonia cava*, foi investigada tanto *in vitro* como *in vivo*. O polissacarídeo sulfatado de *E. cava* mostrou atividade anticoagulante comparável à de fucoïdanas comerciais em relação ao tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), tempo de trombina (TT) e tempo de protrombina (PT) em ensaios de coagulação *in vitro*. Ensaios realizados *in vivo*, mostraram um tempo de sangramento prolongado em relação ao grupo controle salina (WIJESINGHE *et al.*, 2011).

A estrutura química incluindo o grau de sulfatação, peso molecular, constituição de açúcares, conformação e dinâmica estereoquímica possuem um papel importante na determinação da atividade antiviral dos PS de algas. Polissacarídeos de algas, com baixo grau de sulfatação são geralmente inativos contra vírus (WIJESEKARA *et al.*, 2011).



A alga *Cladosiphon okamuranus*, possui uma fucoïdãna composta por ácido glucurônico e resíduos de fucoïse sulfatados, que foi capaz de inibir a infecção causada pelo vírus da dengue tipo 2. Também foi demonstrado que a referida fucoïdãna interage diretamente com uma glicoproteína do envelope e que tanto o ácido glucurônico quanto os resíduos sulfatados de fucoïse são necessários para a inibição da infecção (HIDARI *et al.*, 2008).

As fucoïdãnas são promissores agentes anti-inflamatórios. Os PS da alga parda *Turbinaria ornata* obtidos por extração aquosa, possuem potencial antioxidante e anti-inflamatório, onde, *in vitro* a atividade antioxidante foi investigada utilizando 1-difenil-2-picrilhidrazina, NO e inibição da peroxidação e, a avaliação da atividade anti-inflamatória, realizada utilizando os modelos de edema de pata e de permeabilidade vascular em ratos (ANANTHI *et al.*, 2010).

Também foi observado, que o efeito anti-inflamatório de um polissacarídeo sulfatado isolado da alga *Padina tetrastromatica* é elevado quando comparado ao diclofenaco ou outras drogas anti-inflamatórias, sugerindo-se que este polissacarídeo sulfatado poderia ser recomendado como um novo fármaco eficaz na inflamação (MOHSIN; KURUP, 2011).

Uma heterofucana obtida da alga parda *Lobopora variegata* apresentou a capacidade de inibir, a migração de leucócitos induzida por tioglicolato e o edema de orelha causado pelo óleo de cróton em animais sensibilizados (MEDEIROS *et al.*, 2008). Em estudo posterior com a mesma heterofucana, foi investigado os efeitos vasculares e celulares em outros modelos inflamatórios agudos (edema de pata e peritonite induzidos por carragenana), onde, foi demonstrado que o efeito anti-edematogênico estava relacionado com a inibição da síntese de NO e das ciclo-oxigenase (SIQUEIRA *et al.*, 2011).

Outros estudos também relatam que fucoïdãnas possuem atividade antiproliferativa em linhagens de células cancerígenas “*in vitro*”, assim como, atividade inibitória do crescimento do tumor em camundongos (ROCHA DE SOUZA *et al.*, 2007; YE *et al.*, 2008) e de metástase bloqueando as interações entre células cancerosas e da membrana basal (ROCHA *et al.*, 2005).

Uma fração polissacarídica sulfatada da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi* obtida por cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose apresentou efeito

antinociceptivo onde foi capaz de reduzir significativamente o tempo de lambadura da pata em camundongos em ambas as fases do ensaio da formalina (FARIAS *et al.*, 2011)

### ***1.2.3.3 Atividades biológicas de ulvanas e arabino-galactanas***

As ulvanas e arabino-galactanas possuem um amplo espectro de atividades biológicas, dentre as quais, as mais estudadas são as atividades anticoagulante e antitrombótica em função da procura de um substituto a Heparina que não cause tantos efeitos indesejados, como: desenvolvimento de trombocitopenia, efeito hemorrágico, deficiência de antitrombina etc, (PEREIRA *et al.*, 2002).

Oito diferentes PS foram isolados de diferentes espécies de algas verdes. Todos exibiram inibição da trombina através do co-fator II da heparina e seus efeitos sobre a inibição da trombina mostraram-se mais potentes do que os da heparina comercial ou dermatam sulfato. Em particular, uma maior inibição da trombina foi observada para o polissacarídeo sulfatado isolado da alga do gênero *Codiale* (HAYAKAWA *et al.*, 2000).

Para avaliar o potencial de novas drogas antivirais, PS de dez algas verdes (*Enteromorpha compressa*, *Monostroma nitidum*, *Caulerpa brachypus*, *C. okamurai*, *C. scapelliformis*, *Chaetomorpha crassa*, *C. spiralis*, *Codium adhaerens*, *C. fragile* e *C. latum*) e quatro xilanas sulfatadas sintéticas preparadas a partir da  $\beta$ -(1,3)-xilana de *C. brachypus*, foram testadas contra o vírus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1). Com exceção da *E. compressa* todas as outras mostraram-se potentes contra o HSV-1, tornando-se promissores agentes antivirais que podem agir em diferentes fases do ciclo de replicação do vírus (LEE *et al.*, 2004).

PS obtidos por extração aquosa a quente da alga verde *Ulva lactuca* possuem efeito hipocolesterolêmico e antioxidante em modelo animal induzido experimentalmente. A administração oral destes polissacarídeos causou diminuição significativa dos níveis séricos de lipídios totais, triglicérides, colesterol total, LDL-colesterol, VLDL-colesterol, transaminases e fosfatase alcalina (HASSAN *et al.*, 2011).

A alga *Ulva rigida* possui um polissacarídeo sulfatado ácido que pode ser usado como um imunoestimulante experimental para a análise de respostas inflamatórias relacionadas a

macrófagos. Além disso, este polissacarídeo pode também ser de interesse clínico com a finalidade de modificar certas atividades de macrófagos em doenças cuja função venha sendo prejudicada ou necessite ser impulsionada (LEIRO *et al.*, 2011).

Extratos com diversos solventes orgânicos obtidos da alga verde *Chlorococcum humicola* mostraram inibição do crescimento de cepas virulentas de bactérias e fungos patogênicos ao ser humano. Dentre estes, oito extratos mostraram-se efetivos contra os microrganismos selecionados. Dependendo da composição química dos diferentes extratos foi demonstrado diferenças na zona inibitória contra os micróbios (BHAGAVATHY *et al.*, 2011).

Em relação aos efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório existe apenas um único relato na literatura para polissacarídeos sulfatados de algas verdes. Onde, Rodrigues *et al.* (2012) isolaram uma fração polissacarídica da alga *Caulerpa cupressoides* obtida por cromatografia de troca iônica e esta foi capaz de reduzir: as contrações abdominais induzidas por ácido acético; o tempo de lambadura das patas dos camundongos em ambas as fases do teste da formalina; a migração neutrofilica no ensaio de peritonite e o edema de pata induzido por carragenana.

#### ***1.2.3.3.1 Atividades biológicas da alga marinha verde Caulerpa racemosa***

Devido ao fato da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (Forsskål) ser objeto de estudo no presente trabalho, serão descritas algumas atividades biológicas citadas na literatura.

PS da alga *C. racemosa* foram obtida por extração aquosa a quente. Estes polímeros, que contém galactose, glicose, arabinose e xilose como os principais açúcares componentes, mostraram-se ser um inibidor seletivo de cepas de referência TK - aciclovirus e de cepas resistentes do vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2) em células Vero. Estes polissacarídeos apresentaram concentração eficaz antiviral de 50% (EC50) com valores na faixa de 2,2 - 4,2 mcg/ml não possuindo efeitos citotóxicos. Além disso, esses polissacarídeos não exibiram propriedade anticoagulante em concentrações próximas a EC50 (GHOSH, *et al.*, 2004).

Segundo JI *et al.*, (2008), os PS de *C. racemosa* foram obtidos por extração aquosa a quente. Frações polissacarídicas foram obtidas por cromatografia de troca iônica por DEAE-celulose, onde foram avaliadas quanto a atividade antitumoral em ratos. Os resultados obtidos mostraram um potencial antitumoral, em diferentes doses, para as referidas frações polissacarídicas.

Frações polissacarídicas obtidas por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose da alga *C. racemosa* também foram avaliadas em relação ao seu potencial anticoagulante. Os ensaios anticoagulantes, realizados segundo o teste do TTPA, revelaram frações de PS capazes de modificar o tempo normal de coagulação. Porém esses compostos bioativos apresentaram baixo potencial anticoagulante (RODRIGUES *et al.*, 2010).

### 1.3 Dor e nocicepção

A dor é definida, segundo a Associação Internacional de Estudos sobre Dor (IASP, 2011), como uma experiência emocional ou sensorial desagradável, associada ao dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termo de tal lesão. Dessa forma, infunde sentimentos negativos e, como tal, é algo que geralmente tentamos evitar (MCDUGALL, 2011). A dor é uma experiência subjetiva difícil de definir, podendo ser uma resposta direta a um evento desfavorável, associado a danos teciduais, como lesão, inflamação ou câncer, ou, surgir de modo independente. Assim, a transmissão da dor ocorre através de um mecanismo que envolve uma interação muito complexa de estruturas periféricas e centrais da superfície da pele ao córtex cerebral central (FÜRST, 1999).

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

Nociceptores são receptores em tecidos que são ativados automaticamente por estímulos dolorosos específicos. Os estímulos geram informações que se propagam pelos receptores em um sinal elétrico e é transmitido da periferia para o sistema nervoso central ao longo de axônios. Assim, o sistema nociceptivo é um segmento do sistema nervoso. Há dois tipos de nociceptores, os de alto limiar, que respondem a deformações mecânicas e os

nociceptores polimodais, que respondem a uma variedade de mediadores inflamatórios como: íons de hidrogênio (prótons), citocinas, bradicinina, histamina, 5-hidroxitriptamina (5-HT), prostaglandinas e leucotrienos. Estes mediadores inflamatórios agem nos nociceptores, ativando-os e sensibilizando-os (Figura 1) (STEEDS, 2009). Estes nociceptores polimodais correspondem ao principal tipo de neurônio sensitivo periférico que responde a estímulos nocivos.

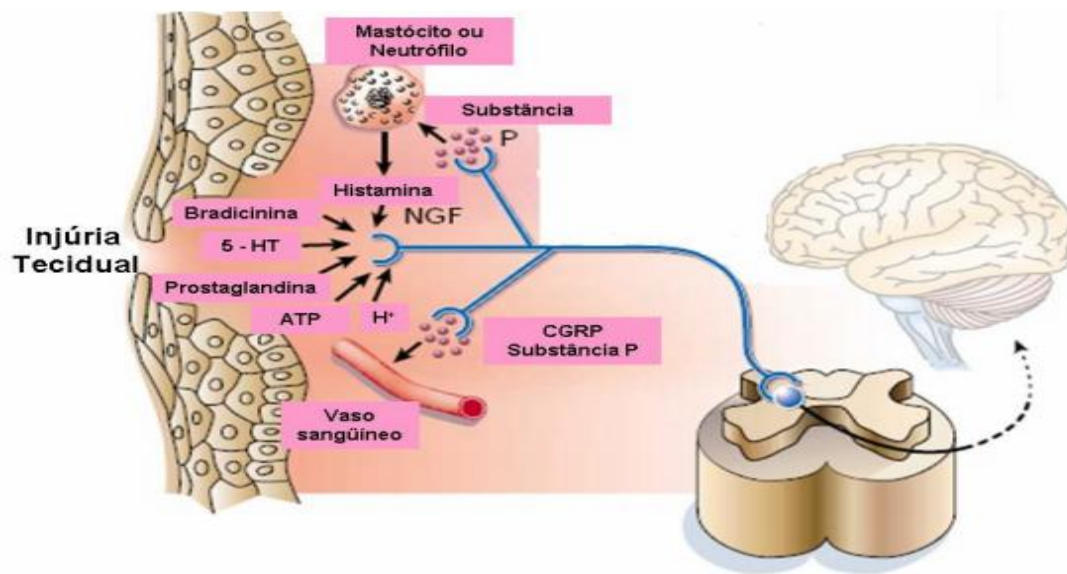


Figura 1 – Mediadores inflamatórios ativando e sensibilizando os nociceptores Modificado de Julius & Basbaum, 2001.

O sistema nociceptivo também possui fibras nervosas caracteristicamente distribuídas nos tecidos, sendo responsáveis pela informação dolorosa. Dentre estas fibras, a A-delta ( $A\delta$ ) e a C estão associadas a inflamação e são capazes de transduzir impulsos provenientes de estímulos químicos, térmicos e mecânicos, em impulsos elétricos, que são transmitidos ao sistema nervoso central, após a sua sensibilização. As fibras  $A\delta$  são mielinizadas e permitem uma rápida transmissão de estímulos (cerca de 12 a 30 m/segundo) que perdura por um curto período, enquanto que as fibras C, não mielinizadas, transmitem seus impulsos mais lentamente (cerca de 0,5 a 2 m/segundo) por um período mais longo (RANG *et al.*, 1991; JULIUS; BASBAUM, 2001). Vários metabólitos e substâncias são liberados de células lesadas ou isquêmicas ou de tecidos inflamados, incluindo ATP, prótons (produzidos por ácido láctico), (5-HT), histamina e  $K^+$ , muitos dos quais afetam as reações nociceptivas. O pH baixo excita os neurônios aferentes nociceptivos em parte por abertura de canais de cátions ativados por prótons e em parte por facilitação do receptor vanilóide (RANG *et al.*, 2007).

Os nociceptores têm a habilidade de detectar uma grande variedade de estímulos, incluindo os de natureza física e química, e de convertê-los em sinais eletroquímicos (JULIUS, BASBAUM, 2001). Ao entrar no corno dorsal da medula espinhal, estes impulsos são transmitidos através de neurônios de segunda ordem ao longo de vias ascendentes para o cérebro (Figura 2). Ao veicular esses impulsos para áreas específicas do cérebro, como o córtex somatosensorial e a amígdala os sinais eletroquímicos são moldados em uma experiência física que incorpora reflexos motores de proteção e respostas emocionais. Detalhes importantes de todo este processo ainda não são totalmente compreendidos (MCDUGALL, 2011).

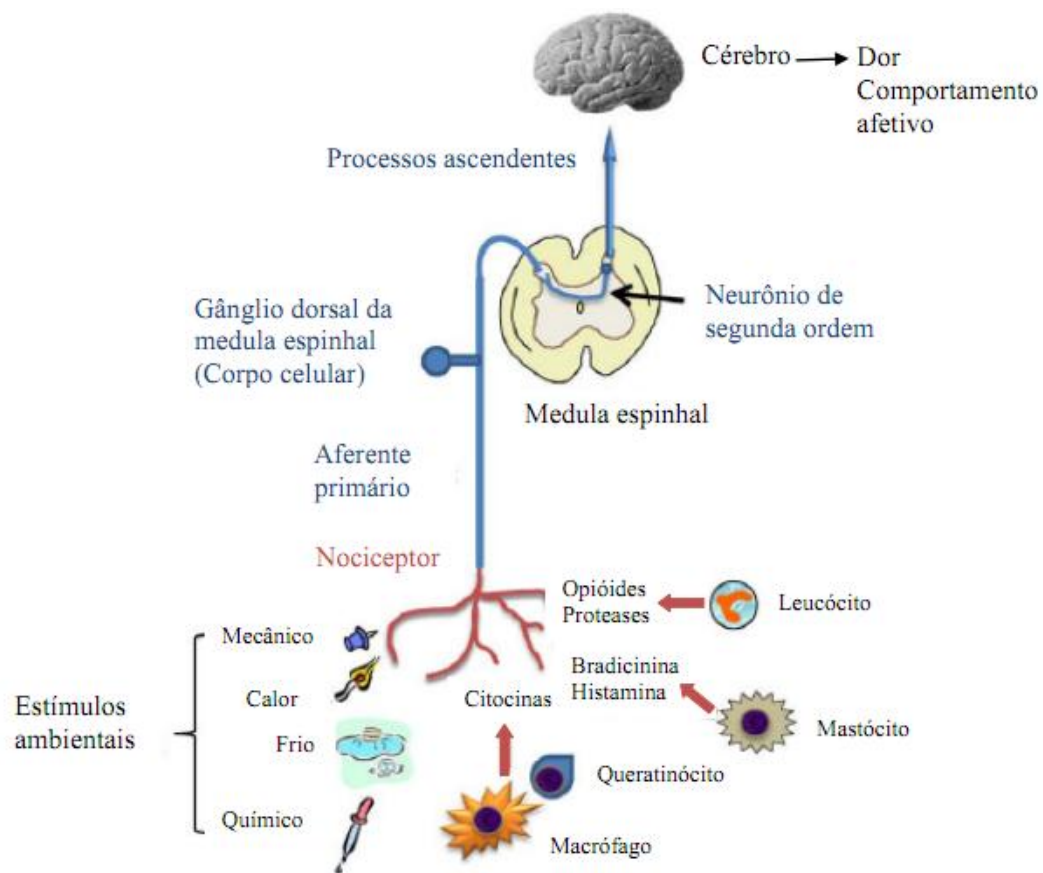


Figura 2 – O caminho no qual a dor percorre, da periferia até o cérebro. Estímulos nocivos podem ativar os nociceptores causando a sensação de dor. Varias células residentes nas proximidades das terminações nervosas podem liberar mediadores que podem tanto aumentar quanto reduzir o limiar de ativação dos nervos. Adaptado de McDougall (2011).

A dor pode ser de curta duração (aguda) ou mais prolongada (crônica). A dor aguda é geralmente benéfica para o indivíduo, uma vez que adverte de dano tecidual real ou iminente permitindo rápida ação reflexa. Esta dor nociceptiva surge na periferia com estímulos térmico ou químico. A dor aguda geralmente pode ser aliviada pela administração local de agentes

analgésicos (por exemplo, a lidocaína, um anti-inflamatório não-esteróidal) ou abordagens não farmacológicas (por exemplo, esfregando a área afetada ou aplicação de gelo no local) (MCDOUGALL, 2011). O desenrolar da dor aguda, embora bem entendido, continua a ser um complexo processo fisiológico. A sensibilização tecidual local pode ocorrer através de três mecanismos simples. O primeiro é que alguns nociceptores essencialmente agem como reservas e só se tornam ativos na presença de uma resposta tecidual local. Segundo, a sensibilização causada por citocinas inflamatórias e íons, na verdade, diminui o limiar de disparo de nociceptores periféricos. Nesta situação um estímulo menor é necessário para criar a mesma quantidade de transdução. Um terceiro mecanismo potencial envolve um processo de “*priming*” onde alguns nociceptores respondem a estímulos endógenos (MEYR; STEINBERG, 2008).

A dor crônica, por outro lado, tende a ser uma resposta a alguma patologia subjacente. A dor é considerada crônica se esta continua inabalável além de 3 meses e normalmente persiste, mesmo o indivíduo procurando se curar e/ou continua na ausência de dano tecidual aparente. A dor crônica é a principal razão pela qual as pessoas procuram atendimento médico, mas o arsenal de remédios eficazes disponíveis é limitado. Além disso, todos os analgésicos atualmente disponíveis têm algum grau de efeito indesejado associado a eles (MCDOUGALL, 2011).

A dor também pode surgir na ausência de estímulos, isto é conhecido como a dor fantasma. A relação complexa de dor e lesão faz com que a percepção da dor seja um tema de pesquisa importante. O cérebro e a medula espinhal desempenham um papel importante nos mecanismos de dor central. No entanto, o conhecimento dos mecanismos no cérebro ainda é relativamente limitado. O corno dorsal da medula espinhal é dotado de vários neurotransmissores e receptores, incluindo: a substância P, somatostatina, neuropeptídeo Y, aminoácidos excitatórios, inibidores de aminoácidos, o óxido nítrico, opióides endógenos, a adenosina, e as monoaminas, entre outros. A transmissão da dor para o cérebro está sob diversos controles fisiológicos. Sem dúvida, isso contribui para um difícil desafio na descoberta de formas de inibir as sensações de dor, sem causar efeitos colaterais (MCCURDY; SCULLY, 2005).

#### **1.4 Inflamação**

O termo inflamação ou flogose (do latim, *inflamare* e do grego *phlogos*, que significa pegar fogo) retrata como os povos mais primitivos comparavam uma região inflamada com algo relativo a chamas, quente ou ardido. Essa analogia deve ter surgido nos tempos do primeiro contato do homem com o fogo, antes mesmo do controle de sua produção e manipulação.

Os sinais cardeais visíveis da inflamação do tecido já foram descritos por Cornelius Celsus, e incluem: edema, eritema, calor, dor e perda da função já sendo conhecidos por civilizações antigas. Hieróglifos egípcios e textos antigos da Grécia e China já descreviam a inflamação. Séculos mais tarde, em 1794, John Hunter, um cirurgião escocês, escreveu que "A inflamação em si não deve ser considerada como uma doença, mas como uma operação salutar conseqüente a alguma violência ou alguma doença" (SERHAN, 2007).

O processo inflamatório é um importante mecanismo de defesa do organismo e se constitui de uma resposta complexa de um tecido vascularizado contra estímulos agressores de origem química, física ou biológica tendo como objetivo destruir, imobilizar ou diluir o agente lesivo, isolar a lesão, inativar as toxinas e preparar o tecido ou órgão para a cicatrização e reparação (ROBBINS *et al.*, 2005). No entanto, a inflamação excessiva ou inadequada é a causa de inúmeras doenças, incluindo artrite reumatóide, psoríase e doença inflamatória intestinal. Além disso, a inflamação é o maior componente dos danos causados por doenças auto-imunes, e é um colaborador fundamental para doenças como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (LUCAS *et al.*, 2006).

Vários são os mediadores químicos envolvidos no desenvolvimento do processo inflamatório, podendo ser de origem tissular, como as aminas vasoativas, fator de ativação plaquetária (PAF), eicosanóides, citocinas, radicais livres superóxidos, NO e neuropeptídeos; ou de origem plasmática, como os sistemas de coagulação, do complemento e das cininas (SPINOSA *et al.*; GILMAN *et al.*, 2006).

O processo inflamatório é composto de três fases, cada qual mediada por diferentes mecanismos: a fase inicial, chamada de fase aguda que é caracterizada principalmente por vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular, geralmente tem duração relativamente curta e as primeiras manifestações clínicas observadas incluem os sinais cardinais da inflamação. Além disso, esta fase apresenta infiltrado predominantemente neutrofílico; uma fase tardia, com a infiltração de leucócitos e células fagocitárias; e a fase



proliferativa crônica, na qual ocorre degeneração tecidual e fibrose (SPINOSA *et al.*; GILMAN *et al.*, 2006).

A resposta inflamatória aguda para ser bem sucedida deve resultar na eliminação dos agentes infecciosos seguido por uma resolução e fase de reparação, que é mediada principalmente por macrófagos recrutados e macrófagos residentes nos tecidos (MEDZHITOV, 2008). Devido à sua localização estratégica, próximo ao local da lesão, as células residentes do tecido são os indutores primários da reação inflamatória (SCHRODER; TSCHOPP, 2010). A resposta de fase aguda também compreende mudanças na concentração plasmática de proteínas hepáticas (proteínas de fase aguda), hormônios, metabólitos intermediários, neutrofilia e alteração do *set point* cerebral de controle dos sinais de doença, sendo coletivamente chamados de “comportamento de doença”. Esse comportamento inclui o desenvolvimento de febre, perda do apetite, aumento do ciclo de sono, diminuição da atividade motora, redução da libido e diminuição do comportamento de alerta (ROTH *et al.*, 2009).

No caso de uma evolução favorável, o processo inflamatório passa então para a fase de reparação havendo a eliminação do agente causal, a formação de tecido de granulação e a cicatrização. Se a evolução for desfavorável, pode ocorrer supuração, ou seja, os micro-organismos superam as defesas orgânicas, lisando as células leucocitárias, formando coleção purulenta ou pode haver a cronificação do processo (SPINOSA *et al.*, 2006; GILMAN *et al.*, 2006; KATZUNG, 2006). Assim, a fase crônica depende ou não da resolução do processo da fase aguda, ou seja, o processo inflamatório persiste e adquire novas características: presença de macrófagos e linfócitos T, além de angiogênese e proliferação de tecido conjuntivo. A inflamação crônica é considerada um processo prolongado que pode ter semanas ou até anos de duração (BAUHMANN; GAUDIE, 1994).

Os eventos que levam à inflamação crônica localizada, especialmente em infecções crônicas e doenças auto-imunes, são parcialmente compreendidos. Muito menos é conhecido sobre as causas e os mecanismos sistêmicos de inflamação crônica que ocorre em uma ampla variedade de doenças. Estes estados de inflamação crônica não parecem ser causados por instigadores clássicos da inflamação como infecções e lesões. Em vez disso, eles parecem estar associados ao mau funcionamento dos tecidos, isto é, com o desequilíbrio homeostático de um dos vários sistemas fisiológicos que não estão diretamente relacionadas funcionalmente a defesa do hospedeiro ou reparo tecidual (MEDZHITOV, 2008).

As características apresentadas tanto pela inflamação aguda como crônica podem ser divididas em eventos vasculares e celulares.

#### ***1.4.1 Eventos vasculares***

As células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos regulam uma variedade de funções como tônus vascular, coagulação do sangue, inflamação, angiogênese e a homeostasia do sangue. Um aumento significativo e duradouro da permeabilidade vascular é uma marca registrada de doenças inflamatórias agudas, como acidose, é um componente essencial de metástase do tumor, angiogênese, e arteriosclerose. A seletividade da barreira em relação as proteínas plasmáticas e outros solutos é um fator chave na manutenção do equilíbrio de fluidos dos tecidos (WANG; DUDEK, 2009).

Logo após a lesão tecidual, os vasos sanguíneos locais sofrem uma vasoconstrição transitória seguida de vasodilatação por ação de uma variedade de mediadores inflamatórios produzidos no plasma e/ou pela interação do microrganismo com células teciduais (VANE, 1994). Devido a vasodilatação ocorre um aumento do fluxo sanguíneo, o que provoca calor e eritema. Posteriormente, como resultado do aumento de permeabilidade da microvasculatura e conseqüente extravasamento de líquidos e proteínas para o interstício ocorrem à estase sanguínea.

O aumento da permeabilidade vascular pode ser originado de mecanismos diretos, em que o próprio agente agressor atua sobre a parede vascular, ou indiretos, em que há ação de mediadores químicos que podem ativar receptores nas células endoteliais. Neste processo, estão envolvidos citocinas como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) que causam reorganização citoesquelética endotelial; histamina e leucotrienos que causam contração endotelial e fator de crescimento endotelial, que promove transcitose e neovascularização, que aumenta o extravasamento de fluidos. Portanto, são várias as substâncias químicas produzidas durante a inflamação que modulam os processos vasculares e a ativação leucocitária, como por exemplo: o sistema de coagulação (trombina, fator Xa), o sistema fibrinolítico e o sistema das cininas (ROBBINS *et al.*, 1994) e proteases do plasma provenientes do sistema do complemento.

#### ***1.4.2 Eventos celulares: Principais células envolvidas***

Dentre as células envolvidas na inflamação, algumas estão presentes nos tecidos como as células endoteliais vasculares, mastócitos e macrófagos, enquanto plaquetas e leucócitos polimorfonucleares (PMN - neutrófilos, basófilos e eosinófilos) e mononucleares (monócitos e linfócitos) têm acesso à área de inflamação a partir do sangue (BEVILACQUA *et al.*, 1994).

As células endoteliais são células achatadas de espessura variável que recobre o interior dos vasos sanguíneos, especialmente os capilares, formando parte da sua parede. Essas células atuam principalmente na homeostasia, regulando a angiogênese, participando da resposta imune, gerando citocinas que modulam a atividade dos linfócitos, entre outros.

Os mastócitos por sua vez, caracterizam-se por serem células globulosas, grandes, com o citoplasma carregado de grânulos que contém mediadores químicos da inflamação como a heparina, histamina, serotonina e fator quimioestático para neutrófilos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Eles estão intimamente envolvidos com a patogenia da inflamação aguda, principalmente pela liberação da histamina que produz a vasodilatação venular (BOCHSLER; SLAUSON, 2002) e PAF que promove a adesão leucocitária dependente de CD18 (MCNEIL, 1996). Os mastócitos também produzem as substâncias necessárias para os três fatores essenciais do recrutamento dos leucócitos que incluem selectinas, moléculas de adesão e fatores quimiotáticos. Em leucócitos recrutados para os tecidos, os mastócitos liberam diversos produtos como GM-CSF, IL-5 e IL-3, que previnem a apoptose dessas células, prolongam o tempo de sobrevivência e estimulam funções efetoras (MCNEIL, 1996).

O Sistema Mononuclear Fagocitário é formado pelos macrófagos que colonizam os vários órgãos e tecidos. Os macrófagos se originam dos monócitos do sangue, e recebem várias denominações dependendo de suas características. O macrófago tem papel central nas reações imunológicas, sendo a célula processadora e apresentadora de antígeno aos linfócitos (ROBBINS *et al.*, 1994). Quando ativados, sofrem modificações morfológicas, metabólicas e funcionais, como: aumento de tamanho, alteração da membrana plasmática, maior formação de pseudópodos, aumento no número de vesículas pinocíticas, maior metabolismo de glicose, migração mais vigorosa, maior capacidade de matar microorganismos intracelulares facultativos e células tumorais (STITES; TERR., 1992).

Considerando as plaquetas, essas são citoplastos anucleadas que têm uma vida útil de 8 a 12 dias, são bem conhecidos por terem um papel fundamental na hemostasia e trombose. Mais recentemente, entretanto, tornou-se aparente que elas desempenham um papel importante na inflamação produzindo um grande número de mediadores lipídicos e citocinas pró-inflamatórias, desempenhando um papel vital no recrutamento de leucócitos no tecido inflamado, posteriormente as plaquetas potencializam o processo inflamatório por apoptose inibição de PMNs, monócitos e eosinófilos (O'SULLIVAN; MICHELSON, 2006).

Os glóbulos brancos ou leucócitos são um grupo diversificado de tipos de células que medeiam a resposta imune do organismo. Eles circulam através do sistema sanguíneo e linfático e são recrutados para os locais da lesão tecidual e infecção. Subtipos de leucócitos são distinguidos por características físicas e funcionais. Eles têm uma origem comum em células-tronco hematopoiéticas e desenvolvem ao longo de distintas vias de diferenciação em resposta a estímulos externos e internos. O sistema mononuclear fagocitário representa um subgrupo de leucócitos originalmente descritos como uma população de células mielóides derivadas da medula óssea que circulam no sangue, como monócitos ou residem nos tecidos como os macrófagos (GEISSMANN *et al.*, 2010.)

Os neutrófilos têm núcleos formados por 2 a 5 lóbulos (mais freqüentemente 3 lóbulos) (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004) e constituem na primeira linha de defesa celular contra a invasão de microorganismos, já que são os primeiros leucócitos a alcançarem a área de inflamação, sendo fagócitos ativos de partículas de pequenas dimensões (RANG *et al.*, 2007).

São os leucócitos as células predominantes na circulação, possuem vida curta sendo produzidos na medula óssea e considerados os principais elementos celulares em muitas formas de inflamação aguda principalmente durante o estágio inicial da resposta inflamatória e suas funções são: manutenção da defesa normal do hospedeiro contra microorganismos invasores, remover restos teciduais e agir nos meios extra e intracelular para matar e degradar microorganismos através de enzimas digestivas presentes nos seus grânulos citoplasmáticos (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004). Possuem atividade microbicida e fagocitária nos locais de inflamação, pois funcionam como descarregadores do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos nos vacúolos fagocitários, além de reconhecer, aderir e englobar partículas (fagocitose) (HAMPTON *et al.*, 1998). Durante a fagocitose há um aumento brusco e acentuado no consumo de oxigênio, havendo produção de peróxido de hidrogênio e ânion

superóxido pelos neutrófilos, que provavelmente são responsáveis pela morte de bactérias fagocitadas (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004).

Os basófilos por sua vez, estão localizados imediatamente na parte externa de muitos dos capilares do organismo e diferentemente dos demais granulócitos, não são encontrados no tecido conjuntivo e é a menor célula granulocítica, possuindo um núcleo volumoso, bilobado ou multilobado, cromatina nuclear perifericamente condensada em grânulos citoplasmáticos menores do que os outros granulócitos. Constituem menos de 1% dos leucócitos do sangue, sendo difíceis de ser encontrados nos esfregaços de sangue, apresentando a função de secretar mediadores inflamatórios que aumentam a permeabilidade vascular e fatores quimiotáticos que recrutam outras células inflamatórias (RANG *et al.*, 2007).

Os eosinófilos são leucócitos multifuncionais e residem principalmente na mucosa do trato gastrointestinal e, normalmente, constituem apenas 1-5% de células nucleadas do sangue. Eles desempenham um papel importante na defesa do hospedeiro contra infecções parasitárias e são importantes efetores em uma variedade de reações alérgicas (ROTHENBERG *et al.*, 2001; VENGE, 2004). Liberam também citocinas pró-inflamatórias, como na regulação do sistema de adesão, modulação na migração celular, ativação e regulação da permeabilidade vascular, secreção do muco e constrição do músculo liso. Além disso, os eosinófilos podem iniciar respostas imunes antígeno-específica pela ativação das células apresentadoras de antígenos (RORHENBERG; HOGAN, 2006).

Os monócitos são células de núcleo ovóide em forma de rim ou de ferradura, que representam o estágio mais maduro. Os monócitos do sangue representam uma fase na maturação da célula mononuclear fagocitária originada na medula óssea. Essa célula passa para o sangue, onde permanece por alguns dias, e atravessando a parede dos capilares e vênulas, penetram no tecido conjuntivo e em alguns órgãos, transformando-se em macrófagos, o que constitui uma fase mais avançada da célula mononuclear fagocitária. Assim, o monócito faz parte do sistema mononuclear fagocitário (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004).

Os linfócitos têm núcleo esférico e citoplasma escasso, que aparece como anel delgado em volta do núcleo. São divididos de acordo com suas propriedades e nos receptores localizados em suas membranas em 2 tipos: Linfócito B e Linfócito T. Quando entra em contato com antígenos, os linfócitos B se dividem e se diferenciam em células plasmáticas, que sintetizam e secretam anticorpos para o sangue, linfa e fluido intercelular. Os linfócitos T

são os responsáveis pelas respostas imunitárias de base celular, que não dependem dos anticorpos circulantes (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004).

Os fenômenos celulares da inflamação envolvem a ativação das capacidades celulares de movimentação, adesão e englobamento de partículas. O principal fenômeno é a saída de leucócitos da luz vascular e sua migração para o local lesado (Figura 3). Os leucócitos podem sair do interior do vaso para o foco infeccioso atraídos por agentes quimiotáticos, tanto de origem endógena (produtos liberados pelas próprias células através da cascata do sistema do complemento, da lipoxigenase, citocinas, etc.) quanto de origem exógena (agentes liberados pelo microrganismo invasor). Além disso, os agentes quimiotáticos podem ser de ação direta, que atraem diretamente a célula imune ou de ação indireta, que agem estimulando as células residentes (macrófagos, mastócitos, fibroblastos, etc) a liberar agentes quimiotáticos como o lipopolissacarídeo bacteriano, IL-1 e TNF- $\alpha$  (RIBEIRO *et al.*, 1991).

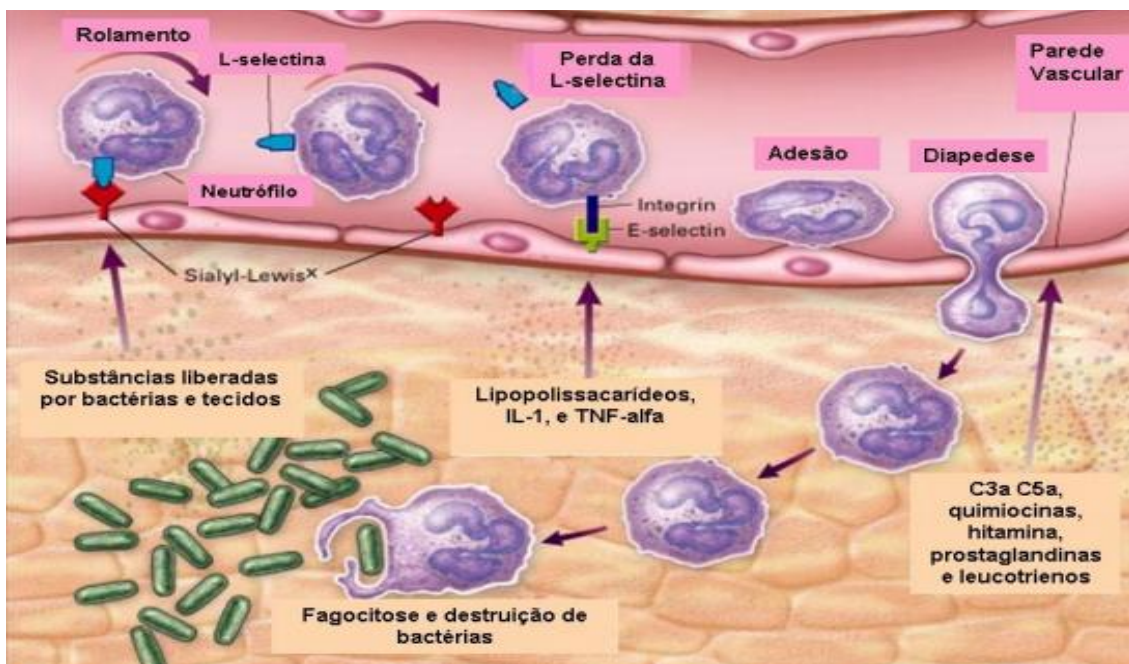


Figura 3 - Seqüência de eventos leucocitários na inflamação. A figura representa às etapas de rolamento, adesão e migração celular ativadas após a invasão tecidual por bactérias, bem como a liberação de mediadores locais, que estarão estreitamente relacionados aos eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória, adaptado de DELVES;ROITT, (2000).

Com a descoberta de integrinas, selectinas e seus ligantes respectivos, e quimiocinas e seus receptores, a cascata de adesão leucocitária emergiu como um conceito que começou a explicar o recrutamento de subconjuntos de leucócitos para locais específicos (LEY *et al.*, 2007). Os leucócitos são recrutados para o local da inflamação em uma série de passos adesivo que permitem que eles se locomovam ao longo da fronteira das paredes endoteliais,

atravessam o endotélio e a membrana basal endotelial e migram através do tecido intersticial (MULLER, 2011).

A migração celular é iniciada com o rolamento dos leucócitos ao longo do endotélio por interações com receptores, principalmente da família das selectinas, mas também ICAM 1 e 2, VCAM-1, PCAM, CD31 e JAM, entre outros receptores. As selectinas são glicoproteínas transmembranares do tipo 1, dependentes de cálcio, sendo denominadas em relação às células onde são predominantemente expressas. A P-selectina, expressada constitutivamente, é estocada em plaquetas e no endotélio, sendo liberada imediatamente após o estímulo. Já a E-selectina é sintetizada de novo e expressa no endotélio a partir da estimulação por mediadores pró-inflamatórios, sendo de grande importância no recrutamento de células inflamatórias, principalmente na inflamação crônica da artrite reumatóide (AR). A L-selectina é a única que medeia recrutamento de linfócitos em vênulas maiores de tecidos linfáticos, sendo que em condições inflamatórias parece exercer um papel secundário às demais selectinas (KELLY *et al*, 2007).

Assim, a tradicional cascata de adesão de leucócitos tem sido tema de diversos trabalhos, onde novos dados juntam-se aos antigos aumentando a cascata em diversos passos, incluindo rotação lenta, o fortalecimento da adesão, rastejamento intraluminal e paracelular e transmigração celular (MULLER, 2011).

### **1.4.3 Mediadores químicos**

Vários são os mediadores químicos envolvidos no desenvolvimento do processo inflamatório. Eles podem ser de origem tissular, como aminas vasoativas (histamina e serotonina), fator de ativação plaquetária, eicosanóides, citocinas, radicais livres superóxidos, óxido nítrico e neuropeptídeos (BOOTHE, 1989; ADAMS, 1992; GUYTON; HALL, 1997; TASAKA, 2002), ou de origem plasmática (proteases plasmáticas), como o sistema de coagulação-fibrinolítico, o sistema do complemento e o sistema das cininas (TASAKA, 2002).

Histaminas e serotoninas são liberadas na degranulação de mastócitos e plaquetas e apresentam efeitos complexos sobre a vasculatura, provocando aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação ou vasoconstrição. As consequências imediatas de sua liberação

podem resultar em problemas vascular e respiratório durante o choque anafilático (MEDZHITOV, 2008).

O fator de ativação plaquetária (acetil-gliceril-éter-fosfricolina - PAF) é um potente mediador lipídico pró-inflamatório que atua em concentrações extremamente baixas. Apesar da denominação, o PAF tem ação sobre diferentes tipos de células e é importante para o processo inflamatório tanto agudo quanto crônico. O PAF foi o primeiro mediador inflamatório lipídico, derivado de fosfolipídios a ser descoberto (BENVENISTE, 1974), que funciona como um mediador intercelular e também como mensageiro intracelular (SNYDER, 1994). A sinalização do PAF resulta da sua ligação a receptores específicos acoplados à proteína G e não de efeitos diretos sobre a membrana plasmática de células alvo. A ligação do PAF aos seus receptores promove amplas ações, sendo capaz de produzir muito dos fenômenos da inflamação, incluindo ativação de neutrófilos e quimiotaxia, alteração da permeabilidade vascular e ativação plaquetária. É pelo menos 1.000 vezes mais potente que a histamina (MONTRUCCHIO *et al.*, 2000).

Os eicosanóides são oriundos do metabolismo do ácido araquidônico (AA), mas para que isso ocorra o AA deve estar na forma livre, e sua liberação ocorre através de hidrólise catalisada por fosfolipases específicas (Figura 4). Isso ocorre devido a algum estímulo hormonal, ou a outros, como por exemplo, uma fosfolipase específica presente na maioria dos tipos celulares de mamíferos, que vai hidrolisar os fosfolipídios de membrana liberando o ácido araquidônico (SILVA *et al.*, 2002). O ácido araquidônico livre pode ser metabolizado por duas classes principais de enzimas, as ciclooxigenases (COX) e pelas lipoxigenases (COUTINHO *et al.*, 2009). Os eicosanóides são os mediadores químicos mais estudados até hoje. Eles são lipídios insaturados, derivados da cisão do AA, a partir de enzimas específicas. Ao contrário da histamina, os eicosanóides não são pré-formados nos tecidos, sendo a sua produção vinculada a uma série de estímulos. Desta forma, uma lesão qualquer que danifique a membrana das diferentes células do organismo será capaz de liberar frações de fosfolipídios, através da ação enzimática da fosfolipase A2 (PLA2) que, no estado não ativado, encontra-se na forma esterificada, ligada à membrana celular (BOCHSLER; SLAUSON, 2002). Sendo responsáveis por um amplo espectro de atividades biológicas, os eicosanóides são potentes mediadores pró-inflamatórios e a sua supressão tem sido um importante alvo terapêutico (KATZUNG, 2006). A enzima ciclooxigenase tem papel fisiológico importante na produção de PG's, uma classe de composto com ações fisiológicas importantes, produzidas por todos os tecidos dos mamíferos (KVATERNICK *et al.*, 2007). Com grande diversidade de receptores



específicos e vários mecanismos reguladores, as PGs atuam como: papel central na inflamação, coagulação sanguínea, angiogênese, ovulação, parturição, metabolismo ósseo, crescimento e no desenvolvimento neuronal, na cicatrização de feridas, na função renal, no tônus vascular e nas respostas imunes (KUMMER; COELHO, 2002; KVATERNICK *et al.*, 2007). As lipoxigenases, presentes principalmente no citosol, são encontradas nos pulmões, plaquetas, mastócitos e leucócitos. A principal enzima do grupo é a 5-lipoxigenase, que atua sobre o ácido araquidônico produzindo o ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE), que é convertido em leucotrieno A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>). O LTA<sub>4</sub> pode ser convertido em leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) que é um importante agente responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, causa aderência, quimiotaxia e ativação de polimorfonucleares e monócitos, além de estimular a proliferação de macrófagos e linfócitos e a produção de citocinas por essas células (GOODMAN *et al.*, 2009).

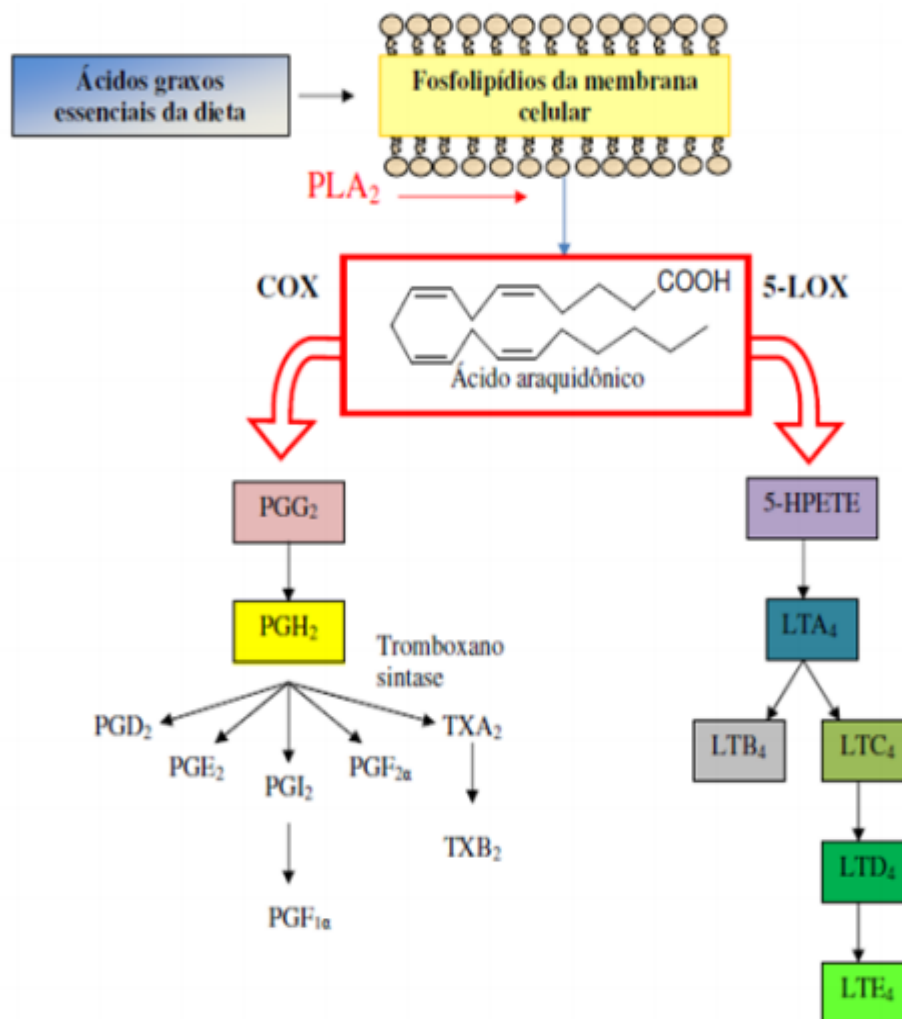


Figura 4 – Biossíntese dos produtos do ácido araquidônico (Adaptado de RANG *et al*; MORROW; ROBERTS, 2007).

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, variando entre 8 e 30 kDa. São produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico através da ativação de proteinoquinases ativadas por mitógenos. Diferentemente dos hormônios clássicos, as citocinas não são armazenadas como moléculas preformadas e atuam especialmente por mecanismos parácrino (em células vizinhas) e autócrino (nas próprias células produtoras) (LIN *et al.*, 2000; SOMMER *et al.*, 2010). Diferentes tipos de células secretam citocinas, e uma única citocina pode agir em diversos tipos de células, fenômeno denominado pleiotropia. As citocinas são redundantes em suas atividades, ou seja, ações semelhantes podem ser desencadeadas por diferentes citocinas. Com frequência, são formadas em cascata, ou seja, uma citocina estimula suas células-alvo a produzir mais citocinas (ZHANG; AN, 2007). Essas substâncias se ligam a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica. Dessa forma, as citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória. Algumas citocinas podem ter ações pró- (Th1) ou anti-inflamatórias (Th2), de acordo com o microambiente no qual estão localizadas. Dentre as consideradas pró-inflamatórias, temos as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 e TNF- $\alpha$ . As anti-inflamatórias são IL-4, IL-10, IL-13 e FTC- $\beta$  (fator transformador de crescimento  $\beta$ ) (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

As principais espécies reativas de oxigênio (ROS) formadas “*in vivo*” incluem o O<sub>2</sub> (superóxido ânion radical), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ácido hipocloroso (HOCl) e o radical hidroxila (HO $\cdot$ ). O radical superóxido é uma das ROS formados durante o *burst* oxidativo que ocorrem em numerosos eventos fisiológicos. Valko, (2007) descreve que a ROS desencadeia alguns sinais de transdução, ou seja, são capazes de transmitir sinais para dentro da célula e podem atuar em diferentes níveis da cascata de sinalização dos mediadores químicos. Em concentrações moderadas, essas moléculas participam de funções importantes em nosso organismo como na mediação de processos de sinalização celular, eliminação de micro-organismos invasores e modulação dos processos inflamatórios (DROGUE, 2002).

O óxido nítrico é um mediador de pequeno peso molecular com diversas funções que incluem vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e remodelação vascular. Ele é um radical livre formado endogenamente por uma família de enzimas, óxido nítrico sintases (NOS, EC 1.1413.399) (EISERICH *et al.*, 1998), através da conversão de L-arginina em L-citrulina (Figura 5). Nos líquidos orgânicos, o NO produzido se oxida nos ânions nitrito (NO<sup>2-</sup>

) e nitrato ( $\text{NO}^{3-}$ ), sequencialmente (IGNARRO, 1990, MONCADA *et al.*, 1991). Foram identificadas três diferentes isoformas de NOs em células de mamíferos (produtos de diferentes genes): NOS endotelial (eNOS ou NOS III) em células endoteliais, epiteliais e miócitos cardíacos; NOS neuronal (nNOS ou iNOS) em neurônios, células musculares esqueléticas e neutrófilos (GREENBERG *et al.*, 1998) e a NOS induzida (iNOS ou NOS II), em macrófagos, hepatócitos, células musculares lisas (TITHERADGE, 1999). O NO está envolvido em diversos processos fisiológicos e patológicos. Sua importância biológica é representada pela capacidade de atuar como um importante segundo-mensageiro, ativando ou inibindo moléculas-alvo envolvidas em diferentes processos como regulação do tônus vascular, controle imunológico e neurotransmissão (RÄTHEL *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2005).

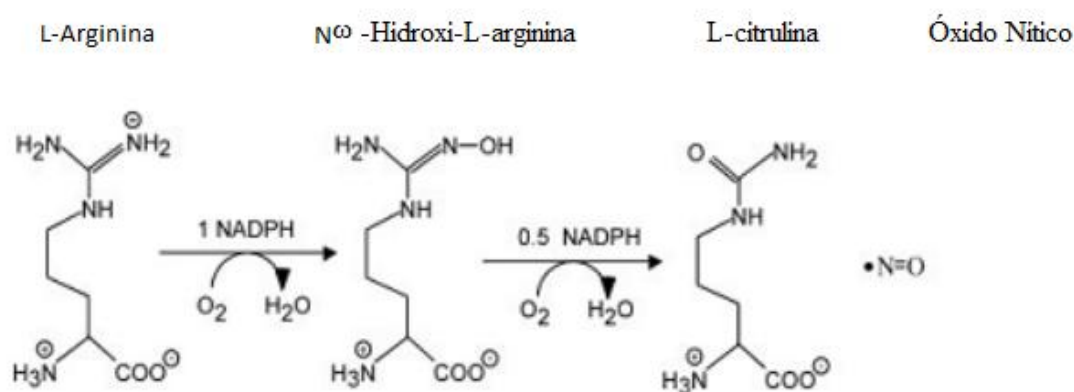


Figura 5 - Biossíntese do NO, adaptado de AKTAN, 2004.

Os neuropeptídeos liberados de neurônios sensitivos contribuem para as reações inflamatórias, constituindo a inflamação neurogênica. Essas substâncias podem ser armazenadas de forma ativa em vesículas secretoras (por exemplo, a substância P) ou geradas por processamento proteolítico de precursores inativos no fluido extracelular (por exemplo, por produtos de degradação de cininas, fibrinopeptídeo A, fibrinopeptídeo B e fibrina). A substância P é liberada pelos neurônios sensoriais e podem causar degranulação dos mastócitos, liberando histamina e outros mediadores e produzem contração da musculatura lisa e aumento da secreção de muco. Outros peptídeos vasoativos são gerados através da proteólise pelo fator de Hageman, da trombina ou plasmina e causam vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (seja diretamente ou induzindo a liberação de histamina por mastócitos). O fator Hageman tem um papel fundamental na coordenação desta resposta, e atua em ambas como um sensor de dano vascular e indutor da inflamação. O fator Hageman

ativa a cascata de caliceína, cininas e o principal produto desta cascata, a bradicinina, afeta o sistema vascular, bem como tendo um potente efeito pró-álgico (estimulando a dor).

#### ***1.4.4 A via da hemoxigenase***

A enzima hemoxigenase (HO; codificadas pelos genes HMOX) são evolutivamente conservadas, esta enzima catabolizam grupamentos heme originando produtos como: ferro (Fe), monóxido de carbono (CO) e biliverdina (que é convertida em bilirubina). A expressão de genes HMOX onipresente na maioria dos organismos vivos sugere que esta reação enzimática apareceu cedo durante a evolução. O substrato da enzima HO existe essencialmente como um grupo prostético de hemoproteínas, uma estratégia evolutivamente conservada, que permite a incorporação de Fe<sup>2+</sup> na estrutura terciária de proteínas (GOZZELINO *et al.*, 2010).

Três isoformas da HO já foram identificadas em mamíferos: HO-1, HO-2 e HO-3. As três enzimas são produtos de diferentes genes e seus padrões de expressão variam amplamente entre diferentes tipos celulares e tecidos. As hemoxigenases estão ancoradas no retículo endoplasmático por uma seqüência hidrofóbica de aminoácidos localizada na extremidade carboxi-terminal da proteína (TERRY *et al.*, 2002).

Em condições fisiológicas normais a maioria das células expressa níveis baixos ou indetectáveis de HO-1. Por outro lado, HO-2 encontra-se expressa constitutivamente e a expressão de HO-3 necessita ainda de maior caracterização. Os níveis transcricionais de HO-2 são regulados positivamente apenas como resultado da ação de poucos agentes, como opiatos e glicocorticóides adrenais (LI;CLARK, 2000; LIU *et al.*, 2002).

Grupamentos heme livre podem ser moléculas citotóxicas envolvidas na patogênese de um amplo espectro de doenças. Vários mecanismos ocorrem para proteger o indivíduo contra estes grupamentos livres. As enzimas HO-1 atuam com o único mecanismo conhecido que permite a extração eficiente do átomo de Fe reativo heme, fornecendo os meios para a neutralização subsequente e, eventualmente, o reaproveitamento desse átomo de Fe. Por esta razão, a expressão da HO-1 parece ser essencial, apesar da existência de outros mecanismos, para proteger contra os grupamentos heme livres e, portanto, exercem efeitos contra a

patogênese de uma variedade de doenças auto-imunes inflamatórias (GOZZELINO *et al.*, 2010).

De acordo com os resultados encontrados por Gomes *et al.* (2010) a via da hemoxigenase desempenha um papel protetor contra danos gástricos induzidos por etanol devido a mecanismos que podem ser dependentes (CO) ou independentes (biliverdina) através da ativação de GC. Embora existam muitos mecanismos através dos quais esse efeito pode ocorrer, os dados encontrados suportam a hipótese de que a diminuição da produção de radicais livres é de primordial importância.

Muitas evidências indicam um papel chave da HO-1 no processo anti-inflamatório e como agente imunomodulador, dessa forma, a indução de HO-1 em células mielóides e endoteliais possuem grande potencial terapêutico para o tratamento de doenças inflamatórias (PAINE *et al.*, 2010).

Outro aspecto de regulação dessa via refere-se a inibição de sua atividade por meio de substâncias denominadas metaloporfirinas que são produzidas sinteticamente e representam uma classe de compostos onde, no lugar do átomo de ferro do anel heme há outro metal inserido. Esta substituição do ferro pode ser por cobalto, zinco, estanho e outros. Estes compostos foram identificados como inibidores competitivos da via da hemoxigenase (MITRIONE *et al.*, 1988).

Zinco protoporfirina (ZnPP) é uma metaloporfirina (MP) encontrada em concentrações mais elevadas no organismo em anemia de desordens crônicas, deficiência de ferro, e intoxicação por chumbo. Além disso, ZnPP são potentes inibidores da hematopoiese em animais e na medula óssea em humanos. Um mecanismo pelo qual a ZnPP poderia alterar o ciclo celular é via heme oxigenase (HO-1), onde o ZnPP compete com a heme (substrato natural) pelo sítio ativo da enzima HO-1, dessa forma tornando-a inibida (BLUMENTHAL *et al.* 2005).

### ***1.5 Fármacos utilizados na Dor e na Inflamação***

Substâncias derivadas de produtos naturais têm sido utilizadas desde o início dos tempos para várias finalidades incluindo o tratamento da dor. A farmacologia da dor tornou-se

um campo complexo e com grande potencial a ser explorado, dessa forma, novos alvos de drogas estão sendo identificados (MCCURDY; SCULLY, 2005).

Os principais grupos de fármacos que são usados no combate a dor e nos distúrbios inflamatórios são os opióides, anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) e glicocorticóides.

Opióides é o nome comum para todos os compostos que têm a mesmo mecanismo de ação dos componentes do ópio, obtidos da semente de papoula, *Papaver somniferum* (MCCURDY; SCULLY, 2005). Eles são usados para o tratamento da dor que não é sensível a outros analgésicos, incluindo a dor moderada, severa e dor neuropática (MOORE, 2009). Os opióides apresentam 3 tipos de receptores: receptor  $\mu$ , que é responsável pela maioria dos efeitos analgésicos; receptor  $\delta$ , que são mais importantes a nível periférico, mas também pode contribuir para a analgesia; receptor  $\kappa$ , que contribui para analgesia a nível espinhal e podem desencadear sedação e disforia, mas produzem menos efeitos adversos e não contribuem para a dependência. Os receptores  $\sigma$  não são verdadeiros receptores de opióides, mas se encontram em locais de interação de alguns opióides. Esses receptores são amplamente distribuídos nos mamíferos e têm sido encontrados em todos os vertebrados. Há uma densidade relativamente alta no cérebro e na medula espinhal mais também são encontradas no sistema gastrointestinal e nas células do sistema imunológico (MCCURDY; SCULLY, 2005). Os opióides variam não somente em sua especificidade para os receptores, mas também em sua eficácia nos diferentes tipos de receptor. Deste modo, alguns agentes atuam como agonistas em um tipo de receptor e como antagonista em outro. Os agonistas puros são substâncias semelhantes à morfina e têm afinidade pelos receptores  $\mu$  e em geral, afinidade mais baixa pelos sítios  $\delta$  e  $\kappa$ . A morfina é um dos opióide mais utilizados que promove analgesia intensa e de longa duração, sem provocar bloqueio simpático ou motor, além de ser antinociceptiva, a morfina também reduz o componente afetivo da dor (RANG *et al.*, 2007). No entanto, a morfina ocasiona alguns efeitos indesejáveis, como: euforia, náuseas, vômitos, depressão respiratória, dependência física e psicológica, redução da motilidade gastrointestinal e espasmos do músculo liso, levando a constipação e algumas vezes espasmo biliar e uretral (SILVA *et al.*, 2004).

Os AINEs possuem várias ações terapêuticas. Estas podem ser de caráter periférico, como efeito antitrombótico e antiendotóxico, ou podem atuar sobre o sistema nervoso central, na forma de antipiréticos e também de analgésicos. Estas ações decorrem, na sua maioria, da ação inibitória sobre as enzimas que degradam o ácido araquidônico: a cicloxigenase (COX-1 e COX-2) e lipoxigenase (TASAKA, 2002). A inibição da síntese de prostanóides

(prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos) como mecanismo de ação dos AINEs foi inicialmente descritas por John R. Vane em 1971 (KATZUNG, 2004). A aspirina (ou ácido acetilsalicílico) é derivada do ácido salicílico, extraído da casca da árvore de salgueiro. Ela foi o primeiro anti-inflamatório não-esteroidal estudado com efeitos não seletivos para a COX-2, porém, existe diversos outros anti-inflamatórios como o paracetamol, que apesar de apresentar fraca atividade anti-inflamatória possui menores efeitos adversos. A indometacina também se destaca como importante ferramenta farmacológica atuando em modelos clássicos de nocicepção e inflamação utilizando animais em laboratório. Esse fármaco é derivado do ácido indolacético, que apresenta propriedades, analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas, inibem a enzima COX-2, necessária para a formação de PG's e outros autacóides (RAFFIN *et al.*, 2003).

Os glicocorticóides ou anti-inflamatórios esteroidais, ou hormonais, são amplamente utilizados no tratamento de distúrbios inflamatórios, alérgicos, hematológicos entre outros. Os glicocorticóides são substâncias imunossupressoras e anti-inflamatórias potentes, eficazes e amplamente utilizadas em processos inflamatórios agudos e crônicos (PERRETTI; GETTING, 2000). Os efeitos dos glicocorticóides são mediados, em sua maioria, por receptores de glicocorticóides (GR) amplamente distribuídos, pertencentes à superfamília dos receptores nucleares. Evidências sugerem que o GR suprime a inflamação por três mecanismos: efeitos genômicos diretos e indiretos e não genômicos (KATZUNG, 2004; RHEN; CIDLOWSKI, 2005). O complexo GR-glicocorticóide interage com regiões promotoras de genes alvos e regulam sua transcrição. Na ausência do ligante hormonal, o GR encontra-se principalmente no citoplasma em complexos oligoméricos com proteínas do choque térmico (Hsp). A ligação do ligante ao receptor permite a dissociação do receptor das Hsp. Posteriormente, o complexo ligante-receptor é transportado para o núcleo, onde interage com o DNA e proteínas nucleares. No núcleo, o complexo se liga como homodímeros à seqüências de DNA conhecidos como elementos de resposta dos glicocorticóides. O complexo resultante recruta proteínas co-ativadoras ou co-repressoras que modificam a estrutura da cromatina, facilitando ou inibindo o início da transcrição gênica pela RNA polimerase II (HEBBAR; ARCHER, 2003). Os glicocorticóides podem agir também por mecanismo não genômicos, através de receptores na membrana celular e segundos mensageiros. A ativação da NOS endotelial via PI3K-Akt- e NOS e também a liberação da anexina-I, são mecanismos não genômicos dos glicocorticóides (RHEN; CIDLOWSKI, 2005). A eficácia dos glicocorticóides em aliviar desordens inflamatórias resulta dos efeitos

pleiotrópicos do receptor de glicocorticóide. No entanto, esses efeitos pleiotrópicos promovem diversos efeitos adversos como retardo do crescimento em crianças, imunossupressão, hipertensão, inibição da cicatrização, osteoporose e distúrbios metabólicos. Esses efeitos adversos limitam a terapia prolongada com glicocorticóides (KATZUNG, 2004; RHEN; CIDLOWSKI, 2005; GOODMAN *et al.*, 2006).



## 2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A natureza tem sido uma fonte de medicamentos por milênios, e durante o século passado, muitos medicamentos úteis têm sido desenvolvidos a partir de fontes naturais, em particular as plantas (NEWMAN; GRAGG, 2010). A importância de substâncias ativas derivadas de vegetais está citada na literatura desde 1990 onde, segundo Barreiro (1990) medicamentos essenciais foram originados a partir de substâncias naturais bioativas como: morfina, cujos derivados diretos são utilizados por suas propriedades analgésicas e sedativas; digitoxina utilizada como cardiotônico desde 1250; quinina, largamente utilizada na quimioterapia; atropina, responsável pela introdução de diversas substâncias sintéticas com propriedades antiespasmódicas; cocaína substância protótipo dos anestésicos locais, dentre outros.

As plantas possuem macromoléculas de grande interesse biotecnológico que 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 *in vivo* (ORZECOWSKI *et al.*, 2002). Portanto, a bioprospecção de novos compostos biológicos, principalmente de organismos aquáticos, com possíveis usos nas ciências médicas e na biotecnologia, vem se expandindo nos últimos anos (TARANTINO, 2005). Segundo Haefner. (2003), esses bioprodutos tornaram-se candidatos a novas drogas, onde a maioria dessas moléculas já se encontra no estágio pré-clínico e algumas já estão no mercado, como a citarabina, ou previstas para serem aprovadas em breve, como ET743 (Yondelis<sup>TM</sup>).

Para encontrar novos anti-inflamatórios e analgésicos, os cientistas continuam a usar bioprodutos para promover as várias fases da inflamação (PATHER, *et al.*, 2011). Segundo Cardozo *et al.* (2007), a aplicação de compostos isolados de diversas classes de algas tem visado a obtenção de importantes novos agentes, citando-se, como exemplo, os PS, os quais apresentam diversas atividades biológicas, como a anti-inflamatória e antinociceptiva por serem substâncias não tóxicas (ANANTHI, *et al.*, 2010). Diante disso, acredita-se que as algas marinhas sejam importantes fontes alternativas na geração de tais medicamentos.

Assim, o papel biológico e farmacológico dos PS de algas marinhas fazem parte de uma área de estudos ainda considerada pouco explorada quando comparada aos estudos realizados com plantas superiores. Principalmente com algas marinhas verde, onde existe

apenas um único relato na literatura dessas algas possuírem atividades anti-inflamatória e antinociceptiva. Portanto, pesquisas adicionais tornam-se necessárias para investigação de suas atividades biológicas e seus mecanismos de ação.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Isolar, fracionar e avaliar os efeitos na nocicepção e inflamação de uma fração polissacarídica da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* em modelos clássicos de nocicepção (em camundongos) e inflamação aguda (em ratos).

#### 3.2 Específicos

- ✓ Extrair por digestão enzimática e avaliar o rendimento dos polissacarídeos sulfatados totais da alga *C. racemosa* (Cr-PST);
- ✓ Fracionar os Cr-PST por procedimentos de cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose;
- ✓ Determinar a composição química dos Cr-PST e das frações obtidas por cromatografia (DEAE-celulose);
- ✓ Investigar o efeito antinociceptivo de uma fração obtida por cromatografia em DEAE-celulose (CrII), em camundongos, através dos testes de contorções abdominais, placa quente e formalina;
- ✓ Avaliar os efeitos antiinflamatório e pró-inflamatório da CrII, em ratos, utilizando o modelo de peritonite e edema de pata;
- ✓ Avaliar a toxicidade da CrII por dose repetida em camundongos, através da análise de parâmetros bioquímicos e histológicos dos órgãos (coração, fígado, baço, timo, linfonodo e rim).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Alga marinha

A alga marinha *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J. Agardh foi coletada na praia de Pedra Rachada no município de Paracuru-Ce em maré de sizígia (Figura 6). Após a coleta as algas foram acondicionadas em sacos plásticos sendo transportadas para o laboratório de algas marinhas da Universidade Federal do Ceará (UFC) onde foram lavadas, para a remoção de areia e epífitas, secas à temperatura ambiente (25 °C) e posteriormente maceradas com nitrogênio líquido, sendo acondicionadas em potes de vidro à temperatura ambiente.

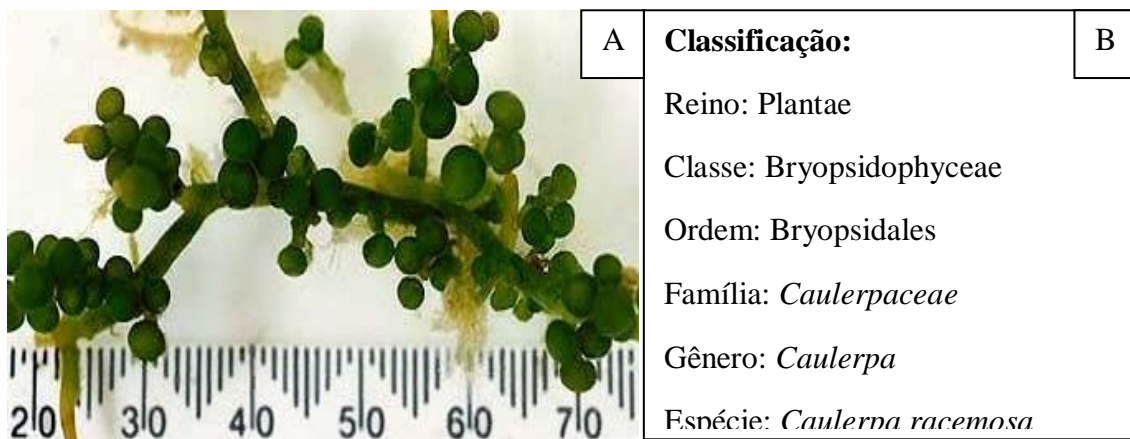


Figura 6: Espécime da alga *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J. Agardh (A) e sua classificação taxonômica (B).

#### 4.1.2 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* (machos e fêmeas) pesando entre 20 e 25 g, e ratos *Wistar* (machos) pesando entre 180 e 250 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, e somente foram iniciados após aprovação da comissão de ética em pesquisa animal (CEPA) desta instituição, como parte do projeto “Bioprospecção de polímeros de algas marinhas com potencial biotecnológico” aprovado sob o processo de número 80/10.

## **4.2. Métodos**

### ***4.2.1 Extração, fracionamento e análises bioquímicas dos polissacarídeos sulfatados***

#### ***4.2.1.1 Extração dos polissacarídeos sulfatados totais***

Para extração dos polissacarídeos sulfatados totais, 5 g de alga seca foram hidratadas em 250 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 6,0 com 1020 mg de papaína, 5 mM de cisteína e 5 mM de EDTA, mantendo-se em banho a 60 °C por 6 horas e posteriormente filtrado. O resíduo obtido foi lavado com água destilada, submetido à outra filtragem e o filtrado obtido reunido ao da primeira filtragem. Os polissacarídeos sulfatados foram precipitados com 16 mL de uma solução a 10% de cloreto de cetilpiridínio (CPC), por 2 horas à temperatura ambiente. A solução foi então centrifugada (2.560 x g; 20 min, 5 °C), o sobrenadante foi descartado e o precipitado obtido foi lavado com 610 mL de uma solução 0,05% de CPC, centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente e dissolvido em 172 mL de uma solução de NaCl 2 M: etanol (100:15,v/v). Seguidamente os PS foram precipitados novamente com 305 mL de etanol absoluto (24 hs a 4 °C). O precipitado obtido após centrifugação foi lavado duas vezes com 305 mL de etanol 80% e uma vez com etanol absoluto, sempre seguido de centrifugações nas mesmas condições descritas anteriormente (Figura 7). O material obtido foi então dialisado contra água destilada, liofilizado e denominado de polissacarídeos sulfatados totais (Cr-PST) (FARIAS *et al.*, 2000).

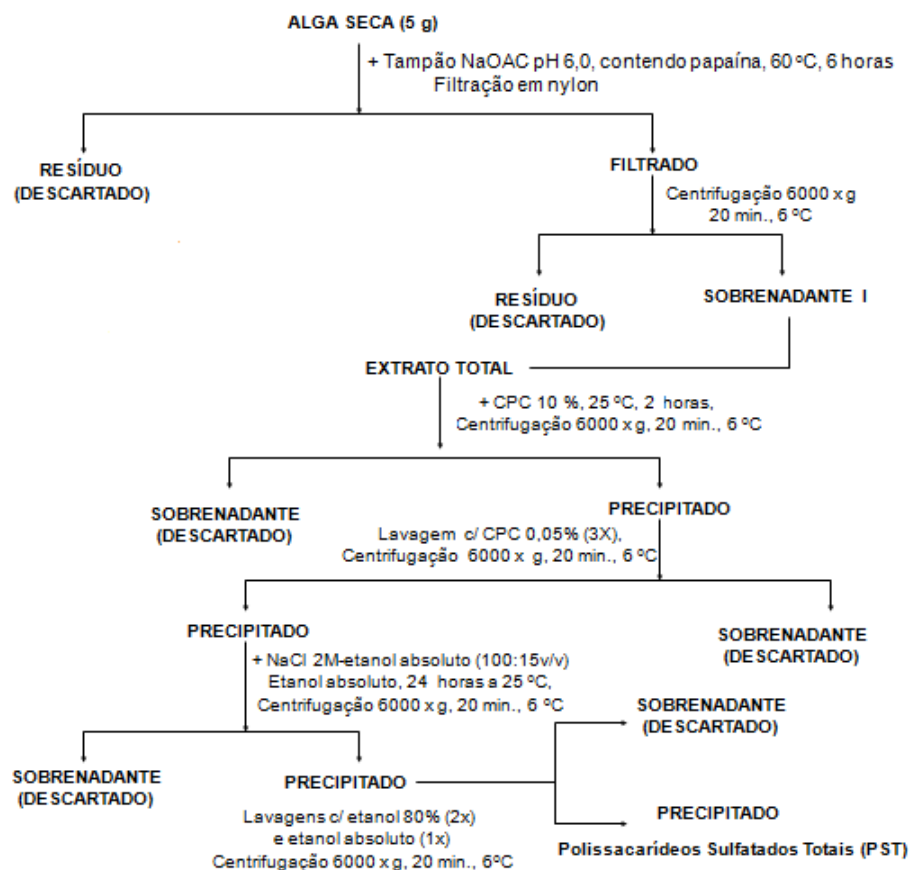


Figura 7 – Fluxograma de extração dos polissacarídeos sulfatados totais.

#### 4.2.1.2 Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados totais

Cerca de 5 mg dos Cr-PST foram dissolvidos em 10 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0, a solução foi centrifugada 2x e o precipitado descartado, o sobrenadante obtido foi aplicado em coluna de DEAE-celulose equilibrada com o mesmo tampão. A coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio e as frações de polissacarídeos sulfatados foram eluídas por “step wise” com NaCl nas concentrações de 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,5 M adicionado ao tampão de equilíbrio. As frações foram monitoradas através da propriedade metacromática usando o azul de 1,9-dimetilmetileno e as leituras realizadas em espectrofotômetro (Armstrong Biosciences Ultrospec 1100 pro) a 525 nm (FARNDALE *et al.*, 1986). As frações sulfatadas majoritárias foram dialisadas contra água destilada, liofilizadas e estocadas para uso posterior.

#### **4.2.1.3 Análise da composição química**

Para a análise dos percentuais de carboidratos totais nos Cr -PST e frações obtidas por DEAE- celulose, foi utilizado o método de DUBOIS *et al.* (1956). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Armstrong Biosciences Ultrospec 1100 pro) a 490 nm, utilizando-se a D-galactose como padrão.

O teor de sulfato total, tanto do Cr-PS como das frações obtidas por DEAE- celulose, foi determinado por hidrólise ácida (2-4 mg/mL de HCl 1 M, 5 horas, 105 °C) por turbidimetria a 360 nm pelo método da gelatina-bário (DODGSON, 1961). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Armstrong Biosciences Ultrospec 1100 pro) a 360 nm, utilizando-se o sulfato de sódio como padrão.

A avaliação de contaminantes protéicos foi realizada segundo o método de Bradford (1976). A concentração de proteínas foi estimada em relação a uma curva padrão, obtida com albumina sérica bovina.

#### **4.2.1.4 Eletroforese em gel de agarose**

As frações do Cr-PST (10 µg) foram analisadas em eletroforese em gel de agarose 0,5% em tampão 1,3 - acetato diaminopropano 0,05 M (pH 9,0). As frações foram aplicadas no gel e a corrida foi realizada em voltagem constante (110 V) durante 60 min. Após a corrida, os PS presentes no gel foram fixados com uma solução de N-cetil-N,N,N-brometo de trimetilamônio 0,1% ( cetavlon) por 24 horas. Em seguida, o gel foi corado com azul de toluidina 0,1% e, finalmente, descorado com uma solução contendo etanol absoluto, água destilada e ácido acético concentrado (4,95: 4,95: 0,1; v/v/v) como descrito por Farias *et al.* (2000).

#### **4.2.2 Modelos de nocicepção**

Os ensaios de nocicepção foram realizados utilizando camundongos Swiss machos pesando entre 20-30 g com um n=6. Os animais receberam os seguintes tratamentos 30 min antes do estímulo nociceptivo: CrII (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg; i.v.), salina estéril (NaCl 0,15 M; i.v.) como controle negativo, indometacina (5 mg/kg; s.c.), um anti-inflamatório não-esteroidal, e morfina (5 mg/kg; s.c.), um agonista opióide, como controles positivos.

#### 4.2.2.1 Testes de contorções induzidas por ácido acético

A finalidade deste teste é avaliar a atividade analgésica periférica da fração CrII administrada por via endovenosa sobre a indução dos estímulos nociceptivos, através de um modelo de nocicepção química (KOSTER *et al.*, 1959).

O teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético é um modelo clássico de nocicepção periférica, onde, após a injeção intraperitoneal do agente nociceptivo, observam-se respostas que consistem em uma sequência de contorções no abdômen acompanhadas por extensão dos membros inferiores (Figura 8).



Figura 8 – Comportamento de um camundongo apresentando contorção abdominal seguida por extensão das patas posteriores induzida por ácido acético a 0,8%.

As contorções abdominais foram induzidas através da injeção de ácido acético 0,8% (v/v) administrado i.p. (0,1 mL/10g de peso corporal). Logo após a administração do ácido acético foi feita a contagem do número de contorções abdominais durante 30 min consecutivos.



O percentual de inibição da nocicepção foi calculado através da comparação das médias das contorções obtidas do grupo controle positivo (injetado apenas com ácido acético) com o grupo experimental (pré-tratado com CrII).

#### **4.2.2.2 Teste da formalina**

É caracterizado por apresentar resposta bifásica distinta, sendo a primeira fase considerada neurogênica e a segunda fase inflamatória em resposta a um estímulo químico (BRAGGIO *et al.*, 2002).

Este teste foi realizado seguindo a metodologia de Dubuisson; Dennis (1977) modificado por Hunskaar *et al.* (1985), sendo caracterizado por uma injúria tecidual local da pata, que induz dor tônica e inflamatória localizada. Para isto, 20  $\mu$ L da solução de formalina 2% foi injetada na pata direita de camundongos *Swiss* machos e o tempo de lambedura foi registrado simultaneamente durante os primeiros 5 min (1ª fase, que corresponde ao estímulo químico direto dos nociceptores – fase inicial) e durante 5 min, após um período de 20 min (2ª fase, que envolve a inflamação – fase tardia) (Figura 9).

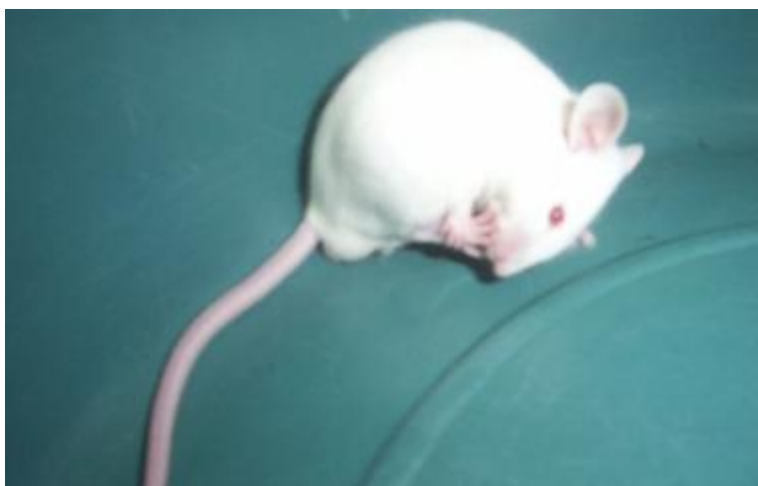


Figura 9 – Comportamento de um camundongo lambendo a pata traseira após aplicação de formalina a 2%.

#### **4.2.2.3 Teste da placa quente**

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



Figura 10 - Comportamento do animal durante o teste da placa quente.

### ***4.2.3 Modelos de Inflamação***

Os ensaios de inflamação foram realizados utilizando ratos Wistar (machos, 180-250 g, n=6). Os animais receberam os seguintes tratamentos, 30 min antes do estímulo inflamatório, CrII (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg; i.v.), salina estéril (NaCl 0,15 M; s.c.) como controle negativo e dexametasona 1 h antes (1 mg/kg; s.c.), um glicocorticóide, como controle positivo.

#### ***4.2.3.1 Modelo de Peritonite***

Os animais receberam por via i.p, o estímulo inflamatório Carragenana (Cg) (700 µg/cavidade) dissolvidos em salina estéril. Após 4 horas da injeção de carragenana, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

Em seguida, o líquido da cavidade peritoneal foi coletado através de uma lavagem, por injeção de 10 mL de salina (NaCl 0,15 M), contendo 5 UI/ml de heparina. Os abdomens dos animais foram levemente massageados e através de uma incisão foram recuperados entre 7 e 10 mL de fluido peritoneal, com pipeta Pasteur plástica.

A contagem total dos leucócitos foi realizada conforme metodologia descrita anteriormente por Souza; Ferreira (1985). Neste procedimento, 20 µL do fluido coletado de cada animal foram diluídos em 380 µL do reagente de Turk e posteriormente usado para a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer.

A contagem diferencial das células, neutrófilos, foi realizada através de esfregaços corados em lâminas. Para tanto, 50 µL do exsudato foram centrifugados em citocentrífuga durante 10 min. Após este processo, os esfregaços foram corados por Hematoxilina e Eosina (HE) e as células contadas através de microscopia óptica. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. do número de células x 10<sup>3</sup> /mm<sup>3</sup> de fluido peritoneal.

#### ***4.2.3.2 Modelo de edema de pata***

O edema de pata induzido por carragenana foi realizado segundo o método de Winter *et al.* (1962). A carrageana (700 µg/pata) foi administrada por via subcutânea. Um grupo adicional recebeu apenas solução salina estéril (NaCl 0,15 M), grupo controle. Os volumes da pata direita traseira de cada animal foram medidos através de um plestismômetro antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero) e nos intervalos de 30 minutos, 1, 2, 3, 4 e 5 horas após administração do agente inflamatório. O edema foi calculado como a diferença entre o volume do líquido deslocado pela pata no tempo zero e em um determinado tempo após o estímulo. Ao término do ensaio, os animais foram eutanasiados com cloral hidratado (20%) e a porção inferior da pata foi extraída e congelada a (-80 °C) para posterior dosagem da mieloperoxidase.

#### **4.2.3.3 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase**

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e, portanto, tem sido amplamente utilizada como um marcador bioquímico da infiltração de neutrófilos em vários tecidos.

A determinação da atividade da MPO no tecido foi realizada segundo Bradley *et al.* (1982). Dessa forma, cada 50 mg de tecido da pata foi homogeneizado em 1 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, contendo 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio, utilizando um homogeneizador Polytron (dois ciclos de 10 s). Após centrifugação a 4000 g por 12 min a 4 °C, amostras dos sobrenadantes (7 µL) foram adicionadas ao tampão fosfato (200 µL) contendo diidrocloreto de o-dianisidina 1 mM e peróxido de hidrogênio 0,0005% em microplaca de 96 poços. A absorbância foi medida a 450 nm, tomando duas leituras em intervalos de 60 s. Durante o ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio é degradado ocorre a produção do ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianisidina em um composto de coloração marrom. Foi considerado que 1 unidade de MPO converte 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 1 min a 22 °C causando uma mudança na absorção de  $1,13 \times 10^{-2}$  nm/min. Os resultados foram expressos como unidade de MPO/mg de tecido.

#### **4.2.3.4 Edema de pata induzido por dextrana**

O modelo de edema de pata induzido por dextrana foi realizado segundo Maity *et al.* (1998). A dextrana (300 µg/pata) foi administrada por via intraplantar. Os volumes da pata direita traseira de cada animal foram medidos através de plestimômetro antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero) e nos intervalos de 30 min, 1, 2, 3 e 4 horas após a administração do agente inflamatório. O edema foi calculado como a diferença entre o volume de líquido deslocado pela pata no tempo zero e em um determinado tempo após o estímulo.

#### ***4.2.3.5 Análise do envolvimento da via da hemoxigenase-1 (HO-1) na atividade anti-inflamatória da fração CrII***

A análise do envolvimento da via da hemoxigenase (HO-1) na atividade anti-inflamatória da fração CrII, foi realizada segundo metodologia descrita por Vanderlei *et al.* (2011), na qual os animais foram pré-tratados (s.c.) com ZnPP IX (3 mg/kg), seguido de injeção (i.v.) da fração CrII (0,1 mg/kg) 60 min após a aplicação do ZnPP IX. Passado 30 min, carragenana (700 µg/pata) foi injetada (i.p.). O volume da pata foi medido imediatamente antes do estímulo (tempo zero) e nos seguintes intervalos de tempo (30 minutos, 1, 2, 3 e 4 h) usando um pletismômetro. Os resultados foram expressos como a variação no volume da pata (ml), calculado como a diferença para o volume basal (0 h).

#### ***4.2.3.6 Avaliação do efeito da CrII***

Para avaliar se a CrII possui um efeito edematogênico, ou não, foi realizado o ensaio de edema de pata utilizando a própria CrII na pata traseira direita do animal.

Utilizaram-se as doses (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg; i.pl.) e o volume da pata foi medido através de um plestimômetro antes da injeção da CrII ou salina estéril (NaCl 0,15 M; i.pl.) indicando o tempo zero e em intervalos de tempo selecionados (30 min, 1, 2, 3, 4, 5, e 6 horas). Os resultados foram expressos como a variação do volume da pata (mL), calculado como a diferença do volume basal (tempo zero).

#### ***4.2.3.7 Participação de mediadores inflamatórios no modelo de edema de pata induzido por CrII***

Para avaliar a participação de diferentes mediadores inflamatórios, foram realizados ensaios utilizando-se a maior dose de CrII (1,0 mg/kg; i.pl.). O volume da pata foi medido através de um plestimômetro antes da injeção da CrII ou salina estéril (NaCl 0,15 M s.c.)

indicando o tempo zero e posteriormente em intervalos de tempo selecionados (30 min, 1, 2, 3, 4, 5, e 6 horas). Como controles positivos foram utilizados os mediadores inflamatórios: indometacina (5 mg/kg; s.c. 1 h), pentoxifilina (90 mg/kg; s.c; 1 h), meclizina (40 mg/kg; s.c.; 1 h) L-name (30 mg/kg; i.v.;30 min) ou dexametasona (1 mg/kg; s.c.; 1 h) antes da aplicação da CrII. Os resultados foram expressos como a variação do volume da pata (mL), calculado como a diferença do volume basal (tempo zero).

#### ***4.2.3.8 Avaliação do potencial anti-inflamatório da CrII em modelo de edema de pata induzido por CrII***

A CrII (1 mg/kg/pata) foi administrada por via intraplantar e como pré-tratamento os animais receberam a CrII (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg; i.v.) 30 min antes da aplicação do estímulo edematogênico. Os volumes da pata direita traseira de cada animal foram medidos através de plestímetro antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero) e nos intervalos de 30 min, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas após a administração do agente inflamatório. O edema foi calculado como a diferença entre o volume de líquido deslocado pela pata no tempo zero e em um determinado tempo após o estímulo.

#### ***4.2.4 Avaliação da toxicidade por dose repetida***

Para a avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas, a CrII foi administrada por um período de curta duração. Dessa forma, grupos com 6 camundongos machos (20-25 g) foram tratados por via i.v com CrII nas doses repetidas de 1,0 mg/kg durante sete dias consecutivos onde era feita a observação de alguma mudança física, sendo mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica com livre acesso a água e ração. No sétimo dia, os animais foram anestesiados e amostras de sangue foram coletadas do plexo retro orbitário e centrifugadas para a obtenção do plasma para posteriores dosagens bioquímicas de Ureia, Fosfatase Alcalina e Transaminases Glutâmico-Oxaloacético/AST e – Pirúvica/ALT. Em seguida, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical, seguido da retirada dos órgãos coração, baço, linfonodo, rim e fígado para posterior pesagem,

mantendo correlações com as respectivas massas corpóreas. Os órgãos removidos foram fixados com formalina 10%. O material foi então desidratado com concentrações crescentes de etanol (70 a 100%) e processado para inclusão em parafina. Os blocos foram cortados em secções de 5 µm de espessura, corados com hematoxilina e eosina e observados em microscópio trinocular.

Todos os parâmetros toxicológicos observados foram comparados a de animais que receberam apenas salina como controle negativo (NaCl 0,15 M) nas mesmas condições que os animais tratados e animais que não receberam nenhum tratamento (grupo sem tratamento).

#### ***4.2.4.1 Análises Bioquímica e Enzimática do Plasma***

Com a finalidade de observar possíveis alterações, após administração diária de CrII (1,0 mg/kg; i.v) durante sete dias, obteve-se o plasma a partir do sangue coletado e desse total, 50 µL de plasma foram utilizados para a dosagem de ureia, segundo a especificações descritas no Kit da Labtest® (Cat. 27, ANVISA 10009010011). As leituras foram realizadas utilizando-se a absorbância de 600 nm em espectrofotômetro Spectronic 20. Este ensaio baseia-se em um sistema enzimático-colorimétrico, cuja intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de ureia na amostra.

A dosagem de fosfatase alcalina foi realizada com a finalidade de observar possíveis alterações na função hepática dos animais, após administração diária de CrII 1,0 mg/kg; i.v durante sete dias, onde obteve-se o plasma a partir do sangue coletado e do qual, 25 µL de plasma foram utilizados para a dosagem, sendo esta realizada segundo as especificações descritas no Kit da Labtest® (Cat. 40, ANVISA 10009010081). Trata-se de um método colorimétrico, cuja absorbância foi medida no comprimento de onda a 590 nm em espectrofotômetro Spectronic 20.

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, sua mensuração é útil na detecção de lesão celular hepática.

O procedimento para a dosagem da enzima Transaminase Glutâmico Oxalacética (TGO/AST) consistiu em adicionar 50  $\mu\text{L}$  do substrato TGO (solução de 0,2 M de L-aspartato, 0,002 M  $\alpha$ -cetogluturato, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 e em seguida, colocá-lo em banho-maria a 37 °C por 2 min, seguido da adição de 10  $\mu\text{L}$  da amostra (plasma) de cada animal e incubado a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  do reagente de cor (solução 0,001 M de 2,4 Dinitrofenilhidrazina), a amostra foi homogeneizada e deixada em repouso à temperatura ambiente (20-30 °C), durante 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sódio 0,4 M e a solução foi deixada em repouso durante 5 minutos, a temperatura ambiente (20-30 °C). As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 505 nm. Para a dosagem de Transaminase Glutâmico Pirúvica (TGP/ALT), o procedimento consistiu em adicionar 50  $\mu\text{L}$  de substrato TGP (solução de 0,2 M de L-alanina, 0,002 M  $\alpha$ -cetogluturato, tampão de fosfatos 0,1 M pH 7,4) colocar em banho-maria a 37 °C, seguindo da adição de 10  $\mu\text{L}$  da amostra (plasma), homogeneização e incubação a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  do reagente de cor (solução 0,001 M de 2,4 Dinitrofenilhidrazina), homogeneizado e deixado em repouso à temperatura ambiente (20-30 °C), durante 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sódio 0,4 M e a solução deixada em repouso durante 5 min, a temperatura ambiente (20-30 °C). As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro Spectronic 20 a 505 nm.

#### **4.2.5 Análise Estatística**

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



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Rendimento dos polissacarídeos sulfatados totais e das frações obtidas por cromatografia de troca iônica

A partir da extração de 5 g de alga seca *C. racemosa*, obteve-se 110 mg de Cr-PST, perfazendo um rendimento de 2,2%. Este rendimento é considerado baixo quando comparado aos PS obtidos para algumas espécies de algas vermelhas e pardas. Como por exemplo, a alga vermelha *Halymenia pseudofloresia* utilizando-se o mesmo procedimento de extração enzimática, com exceção da secagem que foi realizada em estufa a 60 °C por 24 h, apresentou um rendimento de 40,5% (RODRIGUES *et al.*, 2009), e os PS totais da alga marinha parda *Lobophora variegata* obtidos por extração enzimática apresentaram 28,4% (ALENCAR, 2007).

Os PS totais da alga *C. racemosa*, obtidos por precipitação com etanol, diálise e liofilizados (JI *et al.*, 2008) apresentaram um rendimento entre 7 a 8% do peso seco da alga. Enquanto, Rodrigues *et al.*, (2010), utilizando o mesmo procedimento de extração enzimática do estudo em questão, obtiveram um rendimento de 4,1%. Como é possível observar, variações de rendimentos são encontradas na literatura podendo ser justificado por diferentes metodologias de extração empregadas e a variações sazonais das algas (Bird, 1988).

Segundo Rodrigues e Farias (2007) geralmente algas verdes (*Chlorophytas*) têm apresentado rendimentos inferiores aos obtidos para algas vermelhas e pardas, estando de acordo com os estudos realizados por Bezerra-Neto, (2005) onde a alga verde *Caulerpa sertularioides* apresentou um rendimento de (7,1%) e as espécies de algas *Codium fragile* e *Codium vermilara*, pertencentes ao gênero *Codium*, apresentaram um rendimento de 6,7 e 6,8% respectivamente (CIANCIA *et al.*, 2007).

Mais recentemente o polissacarídeo da alga marinha verde *Caulepa cupressoides* pertencente ao mesmo gênero da alga em estudo apresentou um rendimento de 3,17% (RODRIGUES *et al.*, 2012), corroborando assim, com o fato de algas marinhas verdes apresentarem um baixo rendimento de PS totais.

No presente estudo, o fracionamento dos Cr-PST foi realizado, através de cromatografia de troca-iônica em coluna de DEAE-celulose, resultando em três frações sulfatadas majoritárias denominadas de F I, F II e F III, eluídas respectivamente com 0,5; 0,75 e 1 M de NaCl. (Figura 11), cujo rendimentos obtidos após diálise e liofilização foram de 10,5; 20,5 e 17,6%, respectivamente.

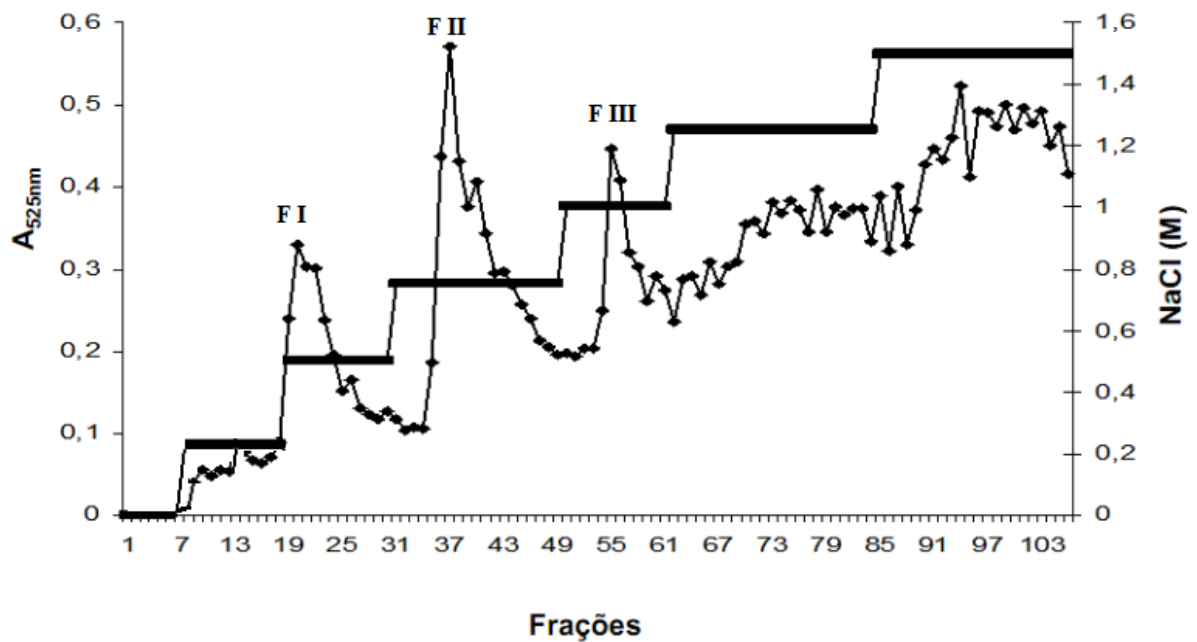


Figura 11 - Cromatografia de troca iônica dos Cr-PST em coluna de DEAE-celulose. As frações majoritárias foram eluídas por “step wise” com NaCl (—) nas concentrações de 0,5; 0,75 e 1 M e monitoradas por metacromasia com DMB (◆—◆).

## 5.2 Análise da composição química

Os teores de carboidratos totais nos Cr-PST e nas frações F I, F II e F III foram 55, 30, 53 e 49,3%, respectivamente. Os teores de sulfato nas amostras hidrolisadas de Cr-PST e nas frações F I, F II e F III foram de 15,17; 5,91; 20,84 e 28,39% respectivamente. Não foram encontrados teores de contaminantes protéicos em nenhuma das amostras avaliadas, comprovando dessa forma, a eficiência do método de extração empregado (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição química dos PS da alga *Caulerpa racemosa*.

<i>Caulerpa racemosa</i>	Carboidratos totais (%)	Sulfato livre (%)	Proteínas totais (%)
Cr-PST	55	15,17	0,05
Fração I	30	5,91	-
Fração II	53	20,84	-
Fração III	49	28,39	-

(-) Não detectado

### 5.3 Eletroforese em gel de agarose

O procedimento de eletroforese em gel de agarose mostrou diferentes padrões de densidade de cargas negativas entre os Cr-PST e as frações obtidas por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose (Figura 12). Como pode ser observado na Figura 2, a fração F II mostra-se mais concentrada, possivelmente por apresentar uma predominância de grupamentos urônicos e sulfatos na sua estrutura química, enquanto a F III encontra-se menos concentrada, possivelmente por apresentar um baixo teor de grupamentos urônicos na sua estrutura química. A ausência da revelação da fração F I no gel possivelmente foi ocasionada por haver menos grupos sulfatados na estrutura química do polissacarídeo desta fração.

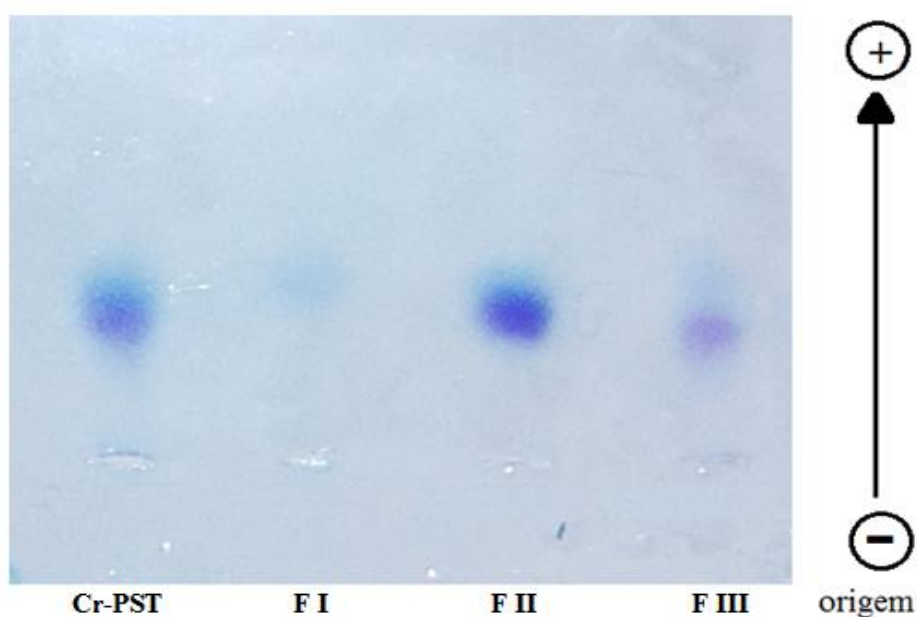


Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 0,5% dos Cr-PST e das frações F I, F II e F III da alga *Caulerpa racemosa* obtidas por cromatografia em DEAE-celulose, corada com azul de toluidina.

Como mostrado anteriormente, a fração F II apresentou um maior rendimento de PS após o fracionamento por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose, desta forma esta fração foi escolhida para ser utilizada nos ensaios de atividade antinociceptiva, anti-inflamatória e pró-inflamatória. Nas descrições posteriores, esta fração passará a ser denominada de CrII.

#### **5.4 Atividade antinociceptiva**

O efeito antinociceptivo da CrII foi investigado através da utilização de modelos clássicos de testes nociceptivos, induzidos por estímulos químicos como o das contorções abdominais induzidas por ácido acético e do tempo de lambertura da pata induzida por formalina 2%, bem como estímulo físico induzido pelo calor, através do teste da placa quente. Vale salientar, que é frequente o uso de biofármacos utilizando-se estes modelos na averiguação da verdadeira natureza da substância investigada. Os estímulos químicos utilizados neste trabalho provavelmente são os que mais se aproximam da dor clínica aguda (LE BARS *et al.*, 2001).

##### ***5.4.1 Testes de contorções induzidas por ácido acético***

O pré-tratamento (i.v.) dos animais com a CrII nas doses de 0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg foi capaz de reduzir ( $p < 0,05$ ) o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8% em 32; 49 e 60%, respectivamente quando comparados ao grupo controle (Figura 13), demonstrando assim, que a CrII foi capaz de inibir de forma dose-dependente as contorções. A morfina e indometacina, utilizadas como controles positivos, reduziram as contorções em 96 e 45%, respectivamente.

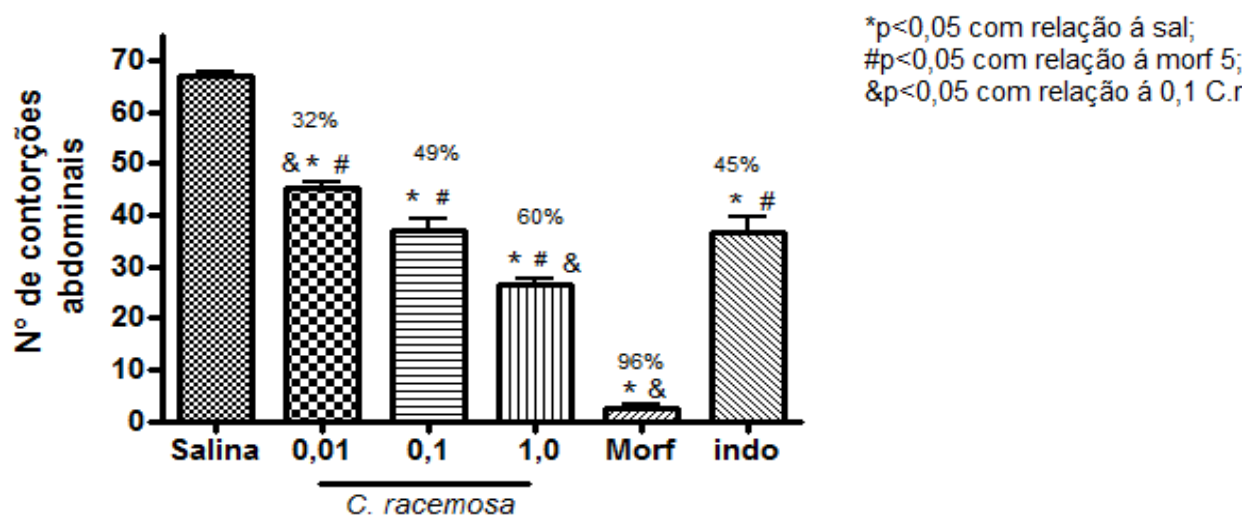


Figura 13 - Atividade antinociceptiva da fração CrII em modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os animais foram tratados 30 min antes da aplicação de ácido acético (0,8%; i.p.) com salina (NaCl 0,15 M; i.v.), morfina (5 mg/kg; s.c.), indometacina (5 mg/kg; s.c.) e CrII (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg; i.v.). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M (n=6) do número de contorções. \* indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle salina (ANOVA; Bonferroni).

Portanto, os resultados demonstraram que a CrII foi capaz de reduzir a nocicepção causada por um estímulo químico obtendo um resultado melhor que a indometacina na dose de 1,0 mg/kg, onde está, diferiu estatisticamente indometacina.

A CrII na dose de 1,0 mg/kg (60%) apresentou resposta antinociceptiva semelhante quando comparada aos polissacarídeos sulfatados (3,0 mg/kg.) obtidos da alga marinha verde *C. cupressoides*, pertencente ao mesmo gênero (57%) (Rodrigues *et al.*, 2012).

No entanto a alga marinha vermelha *Champia feldmannii*, quando utilizada na dose de 1,0 mg/kg (i.p.), mostrou um maior efeito na inibição das contrações abdominais, apresentando 80% de inibição (ASSREUY *et al.*, 2008).

Este teste é um modelo típico de dor inflamatória, largamente utilizado na busca por novos agentes com propriedades analgésicas periféricas e anti-inflamatórias (LE BARS *et al.*, 2001). Trata-se de um modelo de nocicepção periférica, no qual a irritação local desencadeia a liberação de vários mediadores como a bradicinina, substância P e prostaglandinas, bem como citocininas. Tais mediadores ativam nociceptores quimiossensíveis que contribuem com o desenvolvimento da dor de origem inflamatória, sendo uma ferramenta para a avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória de novos compostos (IKEDA *et al.*, 2001). Contudo, o modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético também é conhecido por ser

inespecífico (HENDERSHOT; FORSAITH, 1959). Assim, com a finalidade de averiguar melhor os efeitos analgésicos da CrII, esta foi avaliada no teste da formalina (2%).

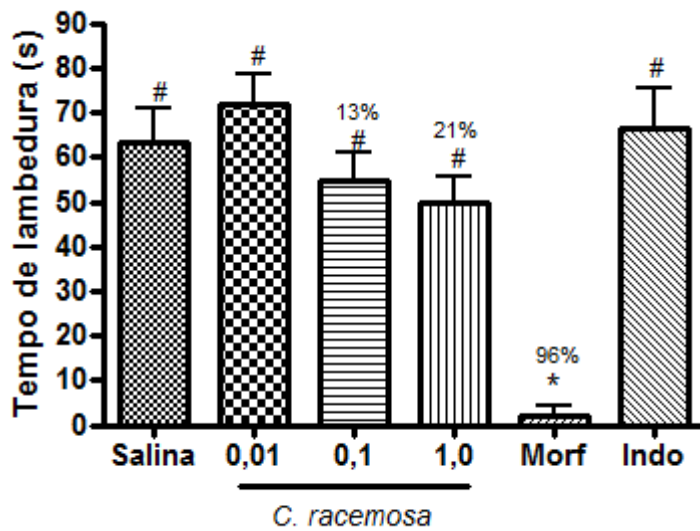
#### ***5.4.2 Efeito da CrII sobre o tempo de lambedura da pata induzido por formalina***

O modelo de nocicepção induzida por formalina, amplamente utilizado como modelo de dor persistente (SHIELDS *et al.*, 2010), foi utilizado neste estudo para avaliar a propriedade antinociceptiva de CrII. Segundo Braggio *et al.* (2002), este teste é específico e caracteriza-se por apresentar resposta bifásica distinta, sendo a primeira chamada de neurogênica e a segunda denominada de inflamatória.

A figura 14 representa o efeito da CrII sobre o tempo de lambedura da pata. Na primeira fase do teste da formalina, a CrII não reduziu significativamente o tempo de lambedura em relação ao controle, tendo esta demonstrado efeito somente na segunda fase do teste na qual as doses de 0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg reduziram o tempo de lambedura em 97; 97 e 98%, respectivamente. Como esperado, o controle positivo morfina (5 mg/kg; s.c.) reduziu significativamente a resposta ao estímulo em ambas as fases, onde a redução do tempo de lambedura variou de 96% na primeira fase a 99% na segunda fase. Enquanto, o controle positivo indometacina utilizada na mesma dose (5 mg/kg; s.c.) apresentou redução no tempo de lambedura somente na segunda fase (92%).

Tem sido relatado que fármacos que agem primariamente no sistema nervoso central inibem igualmente ambas as fases, enquanto os que agem periféricamente como, anti-inflamatórios não-esteroidais e corticosteróides que inibem predominantemente a segunda fase (HUNSKAAR *et al.*, 1985; BITENCOURT *et al.*, 2008). Portanto, como o efeito da CrII ocorre somente na segunda fase do teste, com propriedades semelhantes aos anti-inflamatórios não-esteroidais e corticosteróides, sugerindo assim, um efeito periférico (dor inflamatória) sobre os nociceptores.

A



B

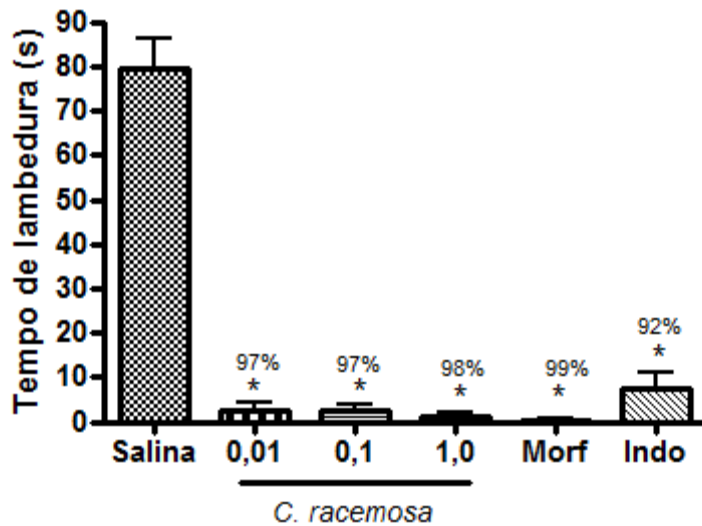


Figura 14 – Atividade antinociceptiva no teste da formalina da CrII. (A) Primeira fase. (B) Segunda fase. Os animais foram tratados 30 min antes da injeção de formalina (2,0%), salina (NaCl 0,15 M; i.v.), morfina (5 mg/kg; s.c.), indometacina (5 mg/kg; s.c) ou CrII (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg, i.v.). Imediatamente após a administração da formalina o tempo de lambedura foi registrado por cerca de 5 min (1ª fase) e de 20 à 25 min (2ª fase). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6) do tempo (s) de lambedura. \* indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) do controle salina, # indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) do controle morfina (ANOVA; Bonferroni).

Esses dados corroboram com os dados da literatura, onde, frações polissacarídicas sulfatadas das algas marinhas vermelha *Solieria filiformes* (9 mg/kg, i.v. – 86%) e *Acanthophora muscoides* (9 mg/kg, i.v. – 93%) apresentaram redução no tempo de lambedura de patas somente na segunda fase do ensaio da formalina (ARAÚJO *et al.*, 2011; QUINDERÉ, 2011). Vale salientar que a alga em estudo, apresentou um resultado semelhante

utilizando uma dose 900 vezes menor do que as utilizadas nos trabalhos de Araújo *et al.*, 2011 e Quinderé, 2011.

#### **5.4.3 Efeito CrII no teste da placa quente**

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

A morfina inibe a transmissão dos impulsos nociceptivos através do corno dorsal e suprime os reflexos nociceptores espinais, inibindo a liberação da substância P. Os efeitos mais importantes da morfina estão relacionados ao SNC e ao sistema gastrointestinal (RANG *et al.*, 2007).

Este ensaio mostrou que CrII em todas as doses avaliadas não promoveu aumento da média do tempo de reação ao estímulo térmico, quando comparado ao grupo controle morfina (5 mg/kg), que induziu um aumento significativo do tempo de reação ao estímulo térmico (Figura 15). Contrariamente ao observado com a salina (NaCl 0,15 M, i.v.), CrII (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg; i.v.) e indometacina (5 mg/kg; s.c), o controle positivo morfina (5 mg/kg; s.c), mostrou um elevado efeito antinociceptivo, justificado pelo aumento na média do tempo de reação durante os tempos de 0, 30, 60 e 90 min. Portanto, os resultados obtidos com a CrII neste modelo, sugerem que sua atividade antinociceptiva não está relacionada aos receptores opióides centrais e que possivelmente atue por mecanismo periférico. Estes resultados mostraram-se semelhantes aos obtidos para a atividade antinociceptiva de ação periférica de uma fração polissacarídica sulfatada da alga *Solieria filiformes* (ARAÚJO *et al.*, 2011), mas diferem da fração polissacarídica obtida por Rodrigues *et al.* (2012), em que, os PS da alga verde *Caulerpa cupressoides* foram capazes de prolongar significativamente o tempo, em segundos, da resposta aos estímulos térmicos.



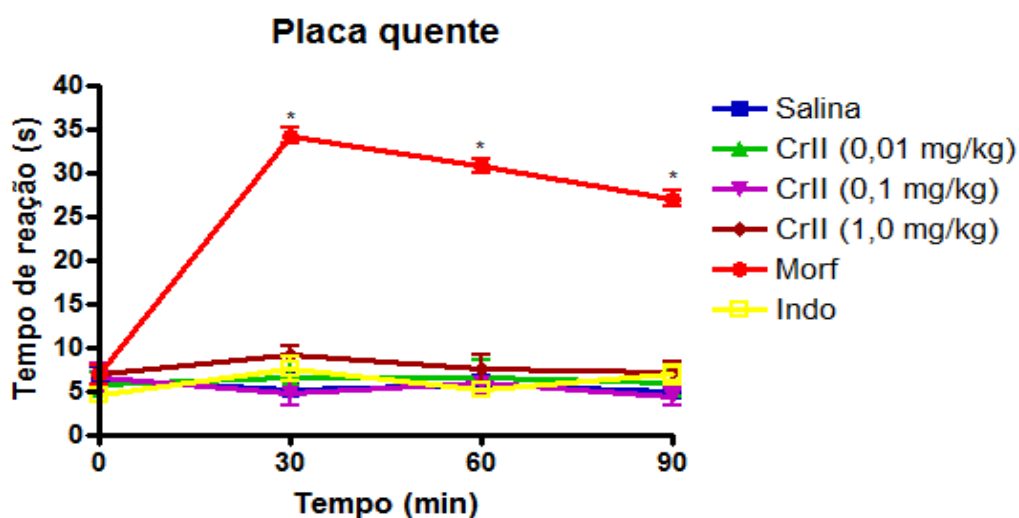


Figura 15 – Efeito da CrII no teste da placa quente em camundongos. Foram aplicados, morfina (5 mg/kg, s.c.), indometacina (5 mg/kg, s.c.), CrII (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg, i.v.) ou salina (NaCl 0,15 M, i.v.). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6) do tempo de reação (s). \*  $p < 0,05$  comparado com o controle salina. (ANOVA; Teste de Bonferroni).

## 5.5 Atividade anti-inflamatória

Considerando que o emprego comercial de fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais podem desencadear diversos efeitos indesejáveis, existe um grande interesse atual no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos a partir de fontes naturais (IWALEWA *et al.*, 2007; SIQUEIRA *et al.*, 2011).

Como neste estudo, os ensaios de nocicepção (ácido acético, formalina e placa quente) sugeriram efeitos antinociceptivos de ação periférica, tornou-se necessário a realização dos ensaios de inflamação.

### 5.5.1 Ensaio de migração celular induzida por carragenana (Cg)

O primeiro ensaio utilizado para avaliar o efeito anti-inflamatório da CrII foi a migração de neutrófilos induzida por Carragenana (Cg) em ratos.

O efeito inflamatório da carragenana envolve a ação de uma série de mediadores, com a liberação inicial de histamina, serotonina e bradicinina, seguida pelo aumento nos níveis de prostaglandinas que coincide por sua vez, com a migração de leucócitos, que amplificam a resposta inflamatória na medida em que desencadeiam a produção de outros mediadores (NANTEL *et al.*, 1999).

O modelo de peritonite é bem caracterizado como um modelo experimental de inflamação aguda que permite a quantificação e correlação de migração de células em conjuntos com vários mediadores inflamatórios (MONTANHER *et al.*, 2007). A CrII foi testada inicialmente neste modelo com a finalidade de avaliar possíveis alterações na quimiotaxia de leucócitos. A carragenana induz a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos por um mecanismo indireto, através da ativação de macrófagos e mastócitos residentes.

Neste modelo, a inflamação pode ser bloqueada por um pré-tratamento com fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais ou por inibidores seletivos da COX-2, como também podem ser inibidos por glicocorticoides, tais como a Dexametasona (Dexa).

A administração (i.v.) da CrII (0,01; 0,1 e 1,0 mg kg) 30 min antes do estímulo inflamatório, reduziu de forma significativa a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal, induzida por Cg, em 31; 48 e 42%, respectivamente (Figura 16), quando comparados ao grupo Cg. Além disso, todas as doses testadas não diferiram estatisticamente da dexametasona (47%).

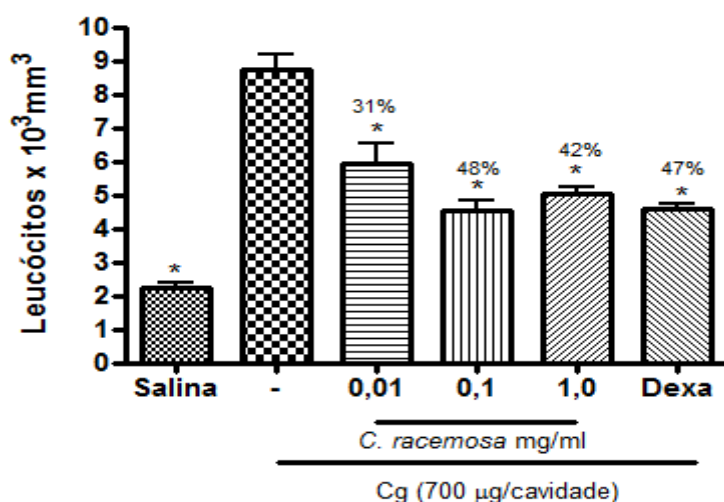


Figura 16 – Efeito da CrII no modelo de peritonite induzida por carragenana. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6) do total de células. \*  $p < 0,05$  comparado com o grupo controle carragenana (700  $\mu$ g). (ANOVA; Teste de Bonferroni).

A fim de confirmar que a redução de leucócitos presentes na cavidade peritoneal dos ratos era devido à redução de neutrófilos, foi realizado a contagem diferencial destas células. De acordo com a figura 17, CrII (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg) foi capaz de reduzir significativamente a quantidade de neutrófilos presentes na cavidade abdominal em todas as doses (46, 57 e 34%, respectivamente). Assim, sugere-se que o pré-tratamento dos ratos com CrII atenuou a interação leucócito-endotélio (rolamento e adesão) e a transmigração neutrofílica em resposta à injeção do estímulo inflamatório, indicando que CrII apresenta efeitos anti-inflamatórios, podendo portanto, atuar sobre a dor inflamatória.

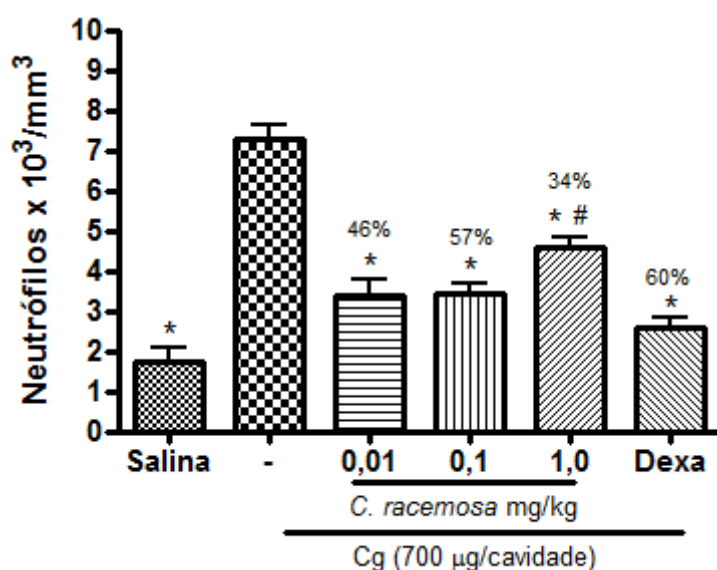


Figura 17 – Efeito da CrII no modelo de peritonite induzida por carragenana, na migração de neutrófilos. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6) da contagem de células. \*  $p < 0,05$  comparado com o grupo controle carragenana (700  $\mu$ g), #  $p < 0,05$  comparado com o grupo controle dexametasona. (ANOVA; Teste de Bonferroni).

Utilizando este mesmo modelo, os PS totais da alga marinha vermelha *Gracilaria córnea* quando injetados em uma dose trinta vezes maior (3 mg/kg) em relação a CrII (0,1 mg/kg) e por via distinta (s.c) também inibiram de forma significativa ( $p < 0,05$ ) a migração leucocitária (52,7%) (COURA *et al.*, 2011). Vale ressaltar ainda, que uma redução na migração leucocitária (52%) também foi obtida para uma fração polissacarídica sulfatada obtida por cromatografia de troca iônica da alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae*, em concentrações cem vezes maior (10 mg/kg), por via subcutânea (Vanderlei *et al.*, 2011).

Diferentemente ao obtido para CrII, Assreuy *et al* (2008) relataram que uma fração polissacarídica sulfatada obtida por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose da alga marinha vermelha *C. feldmannii* apresentou atividade pró-inflamatória (0,9 mg/kg; s.c.)

estimulando significativamente, em cerca de seis vezes, a migração de neutrófilos após 1 h de injeção do estímulo inflamatório.

Vale salientar que algas do gênero *Caulerpa* são descritas na literatura por possuírem atividade anti-inflamatória. Segundo Rodrigues *et al.*, (2011), a fração F II da alga verde *Caulerpa cupressoides* var. *lycopodium* nas doses (3; 9 e 27 mg/kg; s.c.) foi capaz de inibir significativamente ( $p < 0,05$ ) e de forma dose-dependente a migração de neutrófilos em 64; 69 e 73%, respectivamente, quando comparados ao grupo Cg. Em outro estudo, foi demonstrado que extratos alcoólicos e metanólicos da alga marinha verde *Caulepa mexicana*, utilizados no modelo inflamatório de peritonite induzido por Zymosan em camundongos, foram capazes de suprimir a migração de células para a cavidade peritoneal (BITENCOURT *et al.*, 2011).

Entretanto, estudos citados na literatura sobre inflamação relacionando espécies de algas verdes, pertencentes a outros gêneros, apresentaram atividade pró-inflamatória. Como por exemplo, polissacarídeos obtidos por extração aquosa da alga marinha verde *Ulva rígida* quando utilizado em ensaios imunoestimulantes foram capazes de induzir cerca de duas vezes a expressão de quimoquinas inflamatórias. Onde, macrófagos induziram a produção de óxido nítrico, sendo esse efeito dependente da sulfatação da molécula, um aumento na COX-2, estimulação da secreção de PGE2 e expressão de iNOS (LEIRO *et al.*, 2007). Da mesma forma, uma galactana sulfatada piruvatada isolada da alga marinha verde *Codium fragile* também ocasionou uma estimulação da produção de óxido nítrico sintase e a expressão de várias citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ ) (LEE *et al.*, 2010). Dessa forma, os efeitos encontrados para esses PS (*U. rígida* e *C. fragile*) podem estar associados a propriedades imunoestimulantes, dependentes da ativação de macrófagos.

Portanto, estudos ainda precisam ser realizados para um maior entendimento sobre os mecanismos de ação dos PS no processo de migração de células inflamatórias, e suas ações anti e pró-inflamatórias.

### **5.5.2 Edema de pata induzido por carragenana (Cg)**

O edema de pata induzido por carragenana também é considerado um modelo bastante utilizado na determinação da atividade anti-inflamatória de novos fármacos. Este edema é um fenômeno temporal e envolve a participação de vários mediadores. Dentre estes, histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas que estão envolvidas no aumento da permeabilidade vascular, seguido da infiltração celular, principalmente de neutrófilos, contribuindo para a resposta inflamatória (DIROSA *et al.*, 1971; POSADAS *et al.*, 2004).

A CrII (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg; i.v.) quando avaliada no modelo de edema de pata em ratos, também demonstrou ser capaz de diminuir o curso temporal do edema no decorrer de 5 horas do ensaio após a administração de Cg (700 µg) (Figura 18).

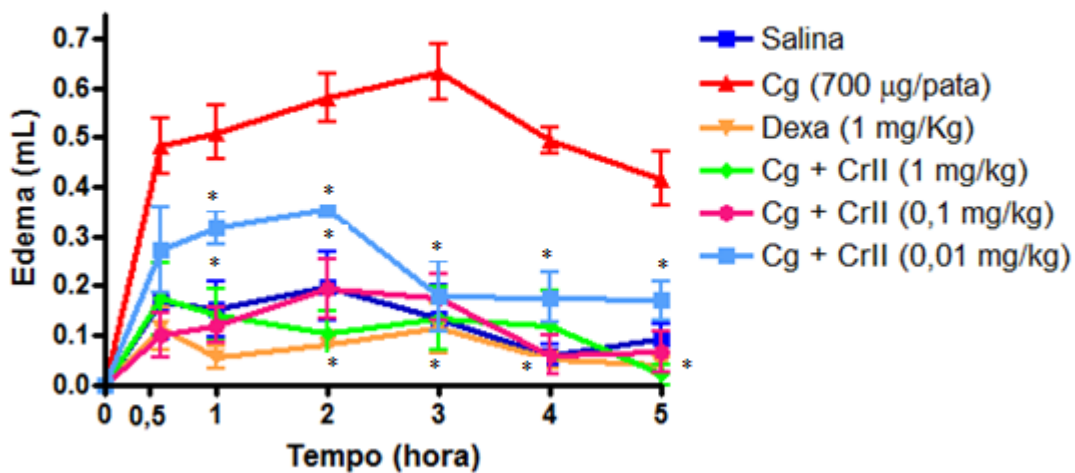


Figura 18 - Efeito da CrII no modelo de edema de pata induzido por carragenana (Cg). Os animais (6/grupo) foram tratados 30 min antes da injeção de carragenana (700 µg/pata; i.pl.) com solução salina (NaCl 0,15 M; i.v.), dexametasona (1 mg/kg; s.c.) e CrII (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg; i.v.). O edema de pata foi medido 30 min, 1, 2, 3, 4 e 5 h após injeção de Cg e expresso como o aumento do volume da pata (ml). As barras representam a média ± E.P.M. (n=6) do volume do edema. \* indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle carragenana (ANOVA; Bonferroni).

O edema provocado por Cg evolui em quatro fases distintas. A primeira hora, após a injeção desse agente flogístico, é caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, cujo evento parece ser mediado por histamina e serotonina. Enquanto na segunda hora, o processo de permeabilidade vascular é coordenado por citocinas inflamatórias. Observa-se que o pico de maior intensidade do curso do edema ocorre na terceira hora, sendo mediadas pelas prostaglandinas, enquanto na quarta hora, os principais mediadores são tromboxanos e leucotrienos (DI ROSA *et al.*, 1972). Esses mediadores são eicosanóides oriundos do ácido

araquidônico pela via da ciclo-oxigenase (COX) (RANG *et al.*, 2007), promovendo, assim, eventos inflamatórios caracterizados por migração de neutrófilos, edema e dor (CUNHA *et al.*, 2008).

O resultado obtido no edema induzido por carragenana apresentou seu pico na 3 h, estando de acordo com a literatura, neste tempo, CrII nas doses 0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg; i.v. reduziram significativamente o edema ( $p < 0,05$ ) em 60, 73 e 79, respectivamente (figura 19) e não diferiram significativamente entre si. Vale ressaltar que este efeito mostrou-se semelhante ao observado nos animais tratados com dexametasona (82%), sugerindo múltiplos mecanismos de ação para CrII, tais como, inibição das vias da cicloxigenase e lipossigenase, citocinas e expressão de moléculas de adesão.

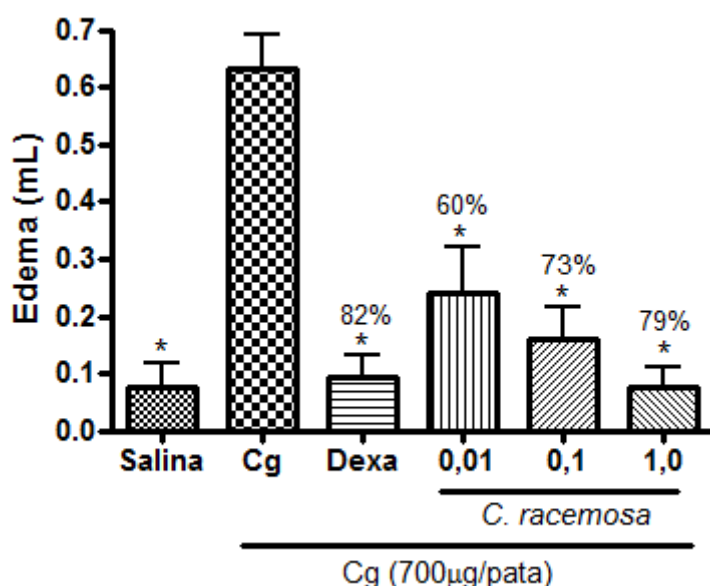


Figura 19 – Efeito da CrII na terceira hora após a administração do estímulo carragenana. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. ( $n=6$ ) do volume do edema. \* indica diferença estatística significante ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle carragenana (ANOVA; Bonferroni).

PS totais (2,5; 5; 10 ou 20 mg kg<sup>-1</sup>) da alga marinha parda *Turbinaria ornata*, quando administrados por via oral, também demonstraram ser capazes de inibir a formação do edema de pata induzido por Cg em ratos, em 34,59; 51,88; 60,09 e 43,02%, respectivamente (ANANTHI *et al.*, 2010).

O tratamento oral com frações polissacarídicas sulfatadas obtidas por cromatografia de troca iônica em DEAE-sepharose da alga marinha parda *Padina tetrastromaticae* (20mg/kg) também mostrou um efeito significativo na diminuição do edema de pata induzido por Cg. Os

resultados obtidos foram melhores quando comparados ao resultado de um fármaco comercial anti-inflamatório, o diclofenaco, utilizando na mesma dose (MOHSIN; KURUP, 2011).

Contrariamente ao resultado encontrado para a CrII, frações polissacarídicas, obtidas da alga marinha vermelha *Acanthophora muscoides*, não foram capazes de reduzir o edema induzido por carragenana nas doses utilizadas (1, 3 e 9 mg/kg; s.c.) (QUINDERE, 2011).

### **5.5.3 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase**

Para comprovar o efeito anti-inflamatório apresentado por CrII no modelo de edema de pata induzido por Cg, nossos estudos estenderam-se em correlacionar o influxo de neutrófilos através da atividade da MPO, como mostrado a seguir.

A infiltração neutrofílica pode ser avaliada pela determinação da atividade da MPO em tecidos, em que os níveis teciduais da MPO correlacionam-se com a severidade da doença (POSADAS *et al.*, 2004).

De acordo com a figura 20, os grupos tratados com CrII (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg; i.v.), foram capazes de inibir a atividade da MPO ( $p < 0,05$ ) em 45, 71 e 74%, respectivamente, comprovando a diminuição da infiltração de neutrófilos quando comparado com o grupo Cg. Como esperado, o grupo controle positivo dexametasona (Dexa, 1 mg/kg, s.c.) também inibiu significativamente a atividade da MPO em 79%. Os resultados obtidos corroboram com os dados encontrados no ensaio de edema de pata, induzido por Cg, que mostrou atividade anti-inflamatória para todas as doses de CrII (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg).

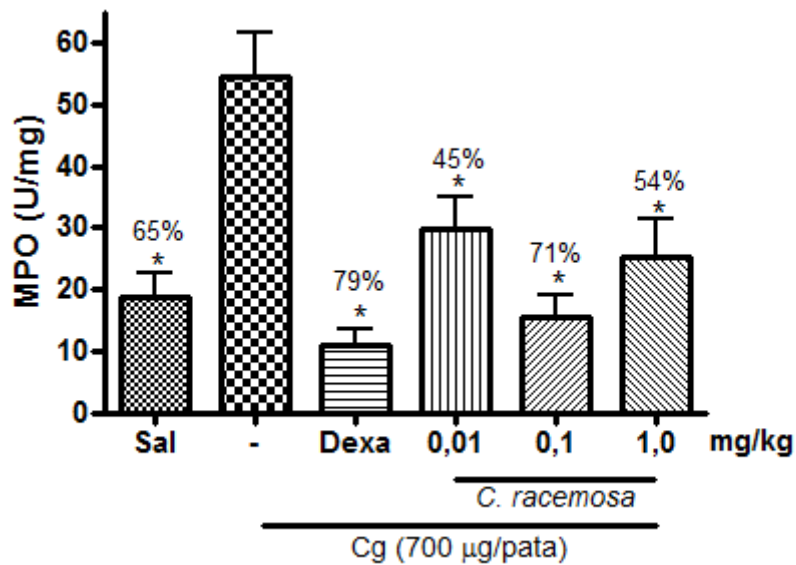


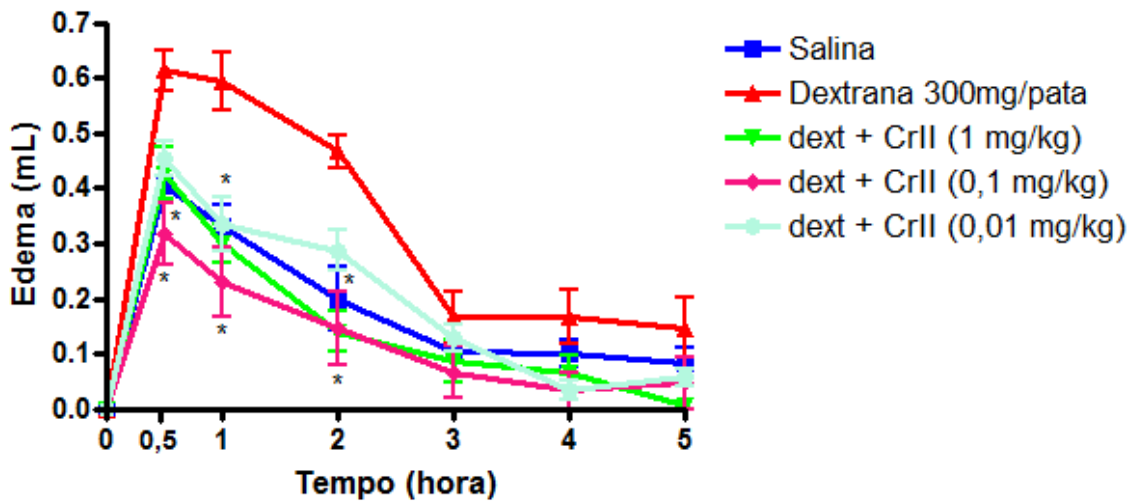
Figura 20 – Atividade da mieloperoxidase (MPO) no sobrenadante do tecido da pata. CrII (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg; i.v.), dexametasona (Dexta, 1 mg/kg, s.c.) ou salina estéril (NaCl 0,15; s.c.) foram administradas 30 min, 1 h e 1h, respectivamente, antes da injeção s.c. de carragenana (Cg) (40 µL; 700 µg/pata). Os resultados foram expressos em unidades de atividade da MPO/ mg de tecido. Os dados foram expressos como média ± E.P.M. (n=6). \*p < 0,05 comparando com o controle carragenana (ANOVA; Teste de Bonferroni).

#### 5.5.4 Edema de pata induzido por dextrana

A dextrana é um agente pró-inflamatório que promove a liberação de aminas vasoativas, como histamina e serotonina causando um edema osmótico, sendo caracterizada por um aumento da permeabilidade vascular e ocasionando baixos níveis de proteínas e de neutrófilos (LO *et al.*, 1982).

Como mostrado na Figura 21 o tratamento com CrII nas doses (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg; i.v.) demonstrou ser eficaz em reduzir a formação do edema induzido por dextrana de maneira significativa, principalmente na primeira hora do curso do edema, onde, CrII em todas as doses foi capaz de reduzir o volume deslocado pela pata em 47, 59 e 47%, respectivamente (Figura 22) e não diferiram estatisticamente entre si. Nos primeiros 30 min e na segunda hora, apenas as doses de 0,1 e 1,0 mg/kg apresentaram efeito anti-edematogênico significativo (p < 0,05).





\*p<0.05 com relação á dextrana

Figura 21 - Efeito da CrII no modelo de edema de pata induzido por dextrana. Os animais (6/grupo) foram tratados 30 min antes da injeção de dextrana (300 µg/pata; i.pl.) com solução salina (NaCl 0,15 M; i.v) ou CrII (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg; i.v.). O edema de pata foi medido 30 min, 1, 2, 3, 4 e 5 h após a injeção de dextrana e expresso como o aumento do volume da pata (ml). As barras representam a média ± E.P.M. (n=6) do volume do edema. \* indica diferença estatística significativa (p < 0,05) quando comparado ao grupo controle dextrana (ANOVA; Bonferroni).

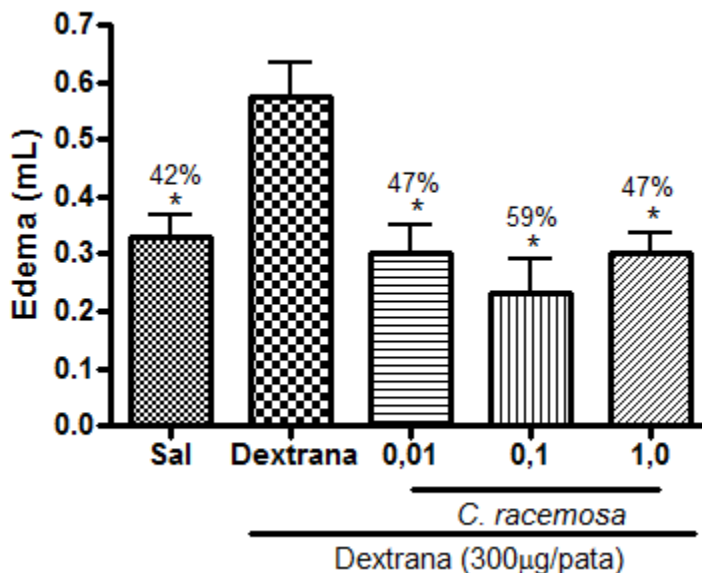


Figura 22– Efeito da CrII após 1 h da administração do estímulo dextrana. As barras representam a média ± E.P.M. (n=6) do volume do edema. \* indica diferença estatística significativa (p < 0,05) quando comparado ao grupo controle dextrana (ANOVA; Bonferroni).

Estudos realizados com plantas superiores demonstraram que o extrato bruto aquoso liofilizado das folhas de *Bryophillum calycinum*, administrado por via oral em diferentes

doses, apresentou efeito inibitório anti-inflamatório sobre o edema de pata induzido por dextrana, sendo, que este efeito, foi obtido apenas para a dose de 0,5 g/kg, apresentando uma inibição de 31,17% para o pico máximo do edema (SOUSA *et al.*, 2005). Segundo Sartori *et al* (2003), um granulado composto pelos extratos secos de duas plantas, *Calendula officinalis* e *Matricaria recutita*, nas doses de 100 mg/kg e 250 mg/kg inibiu o edema de pata induzido por dextrana em 50% e 35%, respectivamente.

Recentemente, os PS totais da alga vermelha *G. cornea* (3, 9, e 27 mg/kg) demonstraram ser eficazes em reduzir a formação do edema induzido por dextrana de maneira significativa ( $p < 0,05$ ). Sendo, o melhor resultado de inibição obtido para a dose de 3 mg/kg nos primeiros 30 min (52,8%) (COURA *et al.*, 2011).

Portanto, os resultados do efeito antiedematogênico, obtidos para CrII, sugerem que o edema de pata induzido por dextrana pode estar relacionado com os eventos inflamatórios que envolvem a inibição do edema osmótico, podendo estar relacionados com a inibição de vários mediadores, tais como, histamina, serotonina e bradicinina.

#### ***5.5.5 Análise do envolvimento da via da hemoxigenase (HO-1) na atividade anti-inflamatória da CrII***

Um dos mecanismos envolvidos na resolução da inflamação consiste na expressão da enzima hemoxigenase-1 (HO-1), uma proteína produzida em resposta a vários agentes oxidantes. Em condições inflamatórias, a HO-1 torna-se a enzima limitante no catabolismo dos grupos Heme livres dando origem a quantidades equimolares de monóxido de carbono (CO), ferro (Fe) e biliverdina (BV). Estes produtos reduzem a reação inflamatória e evitam o desenvolvimento de doenças inflamatórias (ROSARIO, 2008). Além disso, esses produtos mostram ação na proteção celular: a biliverdina, convertida para bilirrubina sob ação da biliverdina redutase, confere a ação antioxidante; a ferritina é a forma inativa do ferro e participa do desequilíbrio redox e finalmente o monóxido de carbono possui ação vasodilatadora. Entretanto, a base molecular para o efeito protetor da HO-1 é ainda complexa e provavelmente multifatorial (DEZOTI *et al.*, 2009).

Diante deste contexto, foi realizado um ensaio utilizando o ZnPP IX (zinco protoporfirina), como um inibidor seletivo da HO-1 com alta especificidade. De acordo com a figura 23, CrII (0,1 mg/kg; i.v.) quando administrada em ratos, que receberam um pré-tratamento com ZnPP IX (3 mg/kg; s.c.), não foi capaz de inibir o edema induzido por carragenana (700 µg/pata) em comparação ao grupo que recebeu apenas CrII (0,1 mg/kg; i.v.) isoladamente como pré-tratamento. Este resultado sugere que a inibição da via da hemoxigenase (HO-1) está associada à inibição da resposta anti-inflamatória da CrII.

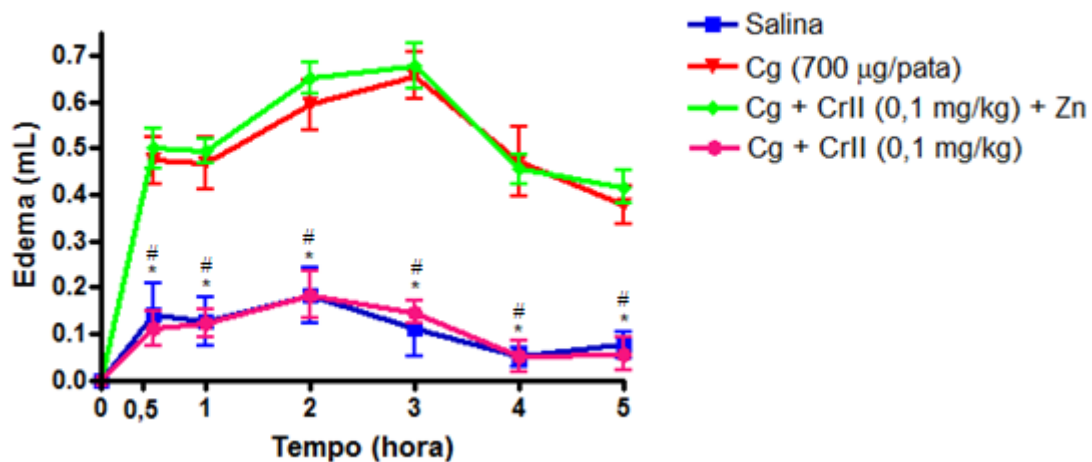


Figura 23 – Atividade da HO-1 no edema de pata induzido por carragenana em ratos. Antes de receber uma injeção de carragenana (700 µg/pata, i.pl.), os grupos de animais receberam CrII (0,1 mg/kg; i.v.) com ou sem ZnPP IX (3 mg/kg, s.c.). Outro grupo recebeu apenas solução salina sem Cg. As barras representam a média ± E.P.M. (n=6) do volume do edema. \* indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle carragenana. # indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo Cg + CrII (0,1 mg/kg) + ZnPP IX (3 mg/kg) (ANOVA; Bonferroni).

Segundo Vanderlei *et al.* (2011), alguns PS de algas marinhas podem apresentar ação anti-inflamatória pela via da hemoxigenase (HO-1), corroborando com os resultados encontrados no presente estudo.

## 5.6. Avaliação do efeito da CrII

Apesar dos nossos resultados demonstrarem que CrII apresentou atividade anti-inflamatória, em modelos de peritonite e edema de pata induzido por dextrana e carragenana,

resolvemos também investigar seu potencial pró-inflamatório, visto que, diversos PS de algas marinhas demonstraram apresentar o referido efeito.

A CrII na dose de 1 mg/kg por pata foi capaz de provocar edema de pata quando comparada aos animais que receberam o mesmo volume de salina estéril (NaCl 0,15 M) na pata. Entretanto, doses de concentrações menores (0,1 e 0,01 mg/kg por pata) não induziram efeito edematogênico (Figura 24)

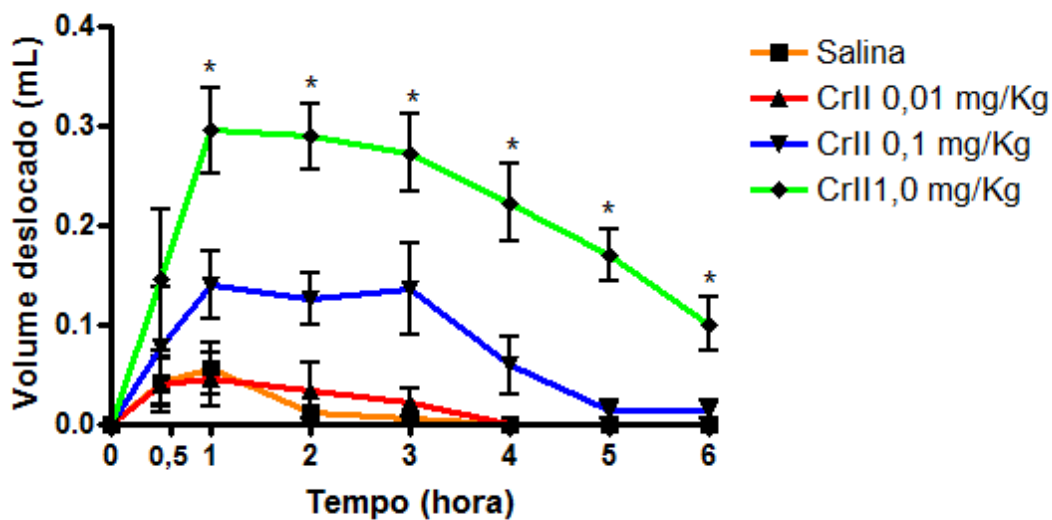


Figura 24 - Efeito da injeção intraplantar da CrII no modelo de edema de pata. Os animais receberam solução salina (NaCl 0,15 M; i.pl.) como controle negativo e CrII (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg por pata; i.pl.). O edema de pata foi medido 30 min, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h após a injeção intraplantar da CrII e expresso como o aumento do volume da pata (ml). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6) do volume do edema. \* indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle salina (ANOVA; Bonferroni).

O mesmo efeito edematogênico também foi observado para uma fração polissacarídica (0,1, 0,3 e 0,9 mg/kg) obtida por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose da alga marinha vermelha *C. feldmannii*, que se mostrou pró-inflamatória, induzindo a formação do edema em todas as doses testadas, sendo o efeito mais pronunciado na maior dose. Além disso, uma fração polissacarídica obtida por cromatografia de troca iônica da alga *S. filiformes* também se mostrou pró-inflamatória quando administrada por via s.c. na pata (1 mg/kg) (ASSREUY *et al.*, 2008; 2010). Mais recentemente, Araujo *et al* (2011), em estudos realizados com *S. filiformes*, demonstraram que esse efeito, provavelmente está relacionado com a liberação de prostaglandinas, NO e citocinas primárias (IL-1 e TNF- $\alpha$ ).

Respostas pró-inflamatórias também têm sido descritas para plantas superiores, como para o látex de *Cryptostegia grandiflora* apresentou um aumento na permeabilidade vascular,

na migração de neutrófilos para a cavidade abdominal e apresentou efeito edematogênico no ensaio de edema de pata (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009).

### ***5.6.1 Participação de mediadores inflamatórios no edema de pata induzido por CrII***

Com o intuito do melhor esclarecimento do efeito edematogênico da CrII, foi investigado a participação de mediadores inflamatórios no edema de pata induzido por injeção intraplantar da CrII.

Alguns mediadores inflamatórios originam-se a partir do citoplasma das células, sendo liberados na forma de precursores e ativados por proteólise. A maioria destes mediadores realiza suas funções quando ligados a receptores específicos presentes em células-alvo. Um mediador químico pode estimular a liberação de mediadores pela própria célula alvo, sendo que, uma vez ativados, podem ter efeitos diferentes, dependendo do tecido atingido. A maioria dos mediadores possui potencial de ocasionar efeitos nocivos às células.

Para um melhor entendimento sobre os mediadores inflamatórios que participam do processo inflamatório desencadeado pela administração da CrII (1 mg/kg por pata; i.pl.), no modelo de edema de pata, utilizou-se como pré-tratamento os anti-inflamatórios: indometacina (5 mg/kg; s.c. 1 h), um dos derivados dos ácidos indol-acéticos, que atua inibindo reversivelmente a ciclo-oxigenase (COX-2) que atua também na liberação de prostaglandinas; pentoxifilina (90 mg/kg; s.c; 1 h), inibidor de síntese de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6; meclizina (40 mg/kg; s.c.; 1 h), com ação anti-histamínica; L-NAME (30 mg/kg; i.v.;30 min), um análogo da L-arginina, que inibe de maneira competitiva e não específica as diferentes isoformas de NOS e dexametasona (1 mg/kg; s.c.; 1 h), um glicocorticóide com ação não específica para diversos mediadores químicos.

Os resultados demonstram que apenas a dexametasona e a indometacina foram capazes de inibir significativamente ( $p < 0,05$ ) a formação do edema em todos os tempos (Figura 25), sugerindo que sua ação inflamatória pode estar envolvida com a liberação de mediadores provindos da via das ciclo-oxigenase (COX-2, prostaglandinas e tromboxanos).

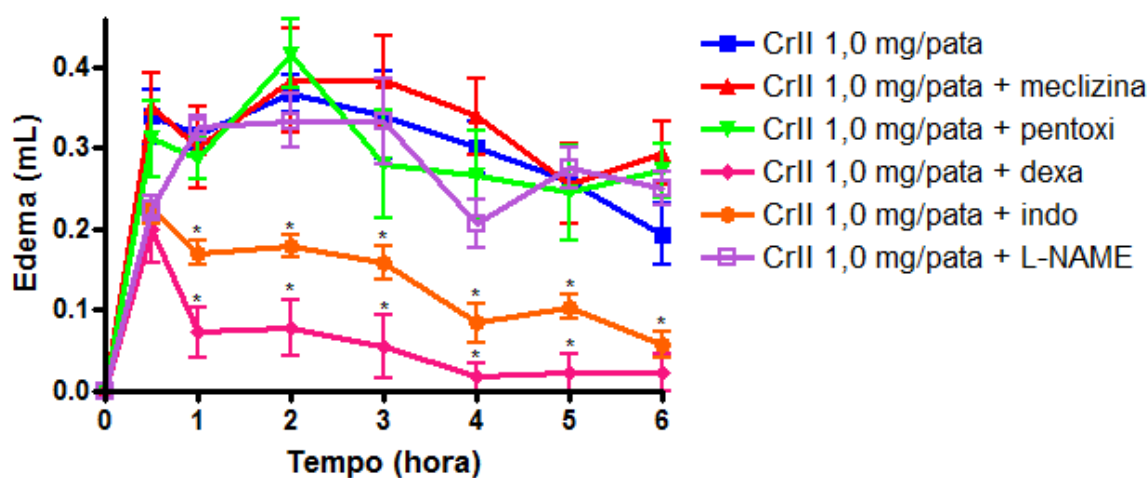


Figura 25 – Efeito do pré-tratamento com anti-inflamatórios no edema de pata induzido por CrII. Os animais receberam a CrII (1,0 mg/kg por pata; i.pl.) como agente inflamatório e como pré-tratamento meclizina (40 mg/kg; s.c.; 1 h), pentoxifilina (90 mg/kg; s.c.; 1 h), dexametasona (1 mg/kg; s.c.; 1 h), indometacina (5 mg/kg; s.c. 1 h) e L-NAME (30 mg/kg; i.v.;30 min). O edema de pata foi medido 30 min, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h após a injeção da CrII e expresso como o aumento do volume da pata (ml). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6) do volume do edema. \* indica diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle CrII 1,0 mg/kg por pata (ANOVA; Bonferroni).

### 5.6.2 Avaliação do potencial anti-inflamatório da CrII (i.v.) em modelo de edema de pata induzido por CrII (i.pl.)

Como, anteriormente CrII (i.v.) apresentou atividade anti-inflamatória em modelos clássicos de inflamação, resolvemos analisar o seu potencial anti-inflamatório no modelo de edema de pata induzido por CrII (1,0 mg/kg por pata).

De acordo com a figura 26, CrII em todas as doses utilizadas (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg; 30 min) por via endovenosa, não foi capaz de inibir o edema induzido na pata do animal quando administrada por via intraplantar (1,0 mg/kg por pata) em todos os tempos analisados (30 min, 1, 2, 3, 4, 5, e 6 h).

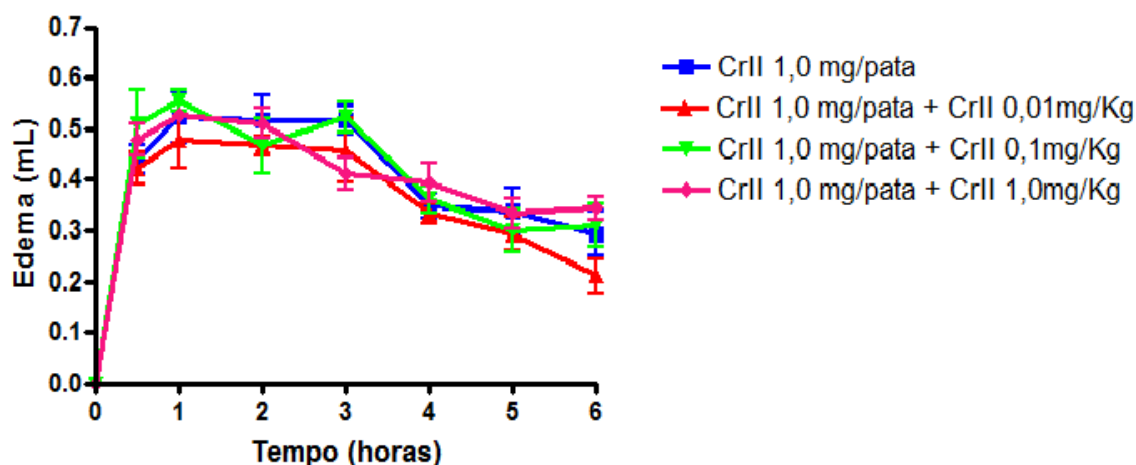


Figura 26 – Efeito do pré-tratamento com CrII (i. v.) no edema de pata induzido por CrII (i.pl.). Os animais receberam a CrII (1,0 mg/kg por pata; i.pl.) como agente inflamatório e a CrII (0,01; 0,1 e 1,0 mg/kg; i.v.; 30 min) como anti-inflamatório. O edema de pata foi medido 30 min, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h após a injeção intraplantar da CrII e expresso como o aumento do volume da pata (ml). As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. (n=6) do volume do edema.

Dessa forma, os resultados sugerem que a ação anti-inflamatória da CrII não está envolvida com a inibição dos mediadores inflamatórios provindos da via das ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2) e nem da inibição da liberação de prostaglandinas, corroborando com os resultados encontrados para a ação anti-inflamatória da CrII onde foi sugerido o envolvimento da expressão da enzima Heme Oxygenase-1 (HO-1).

### 5.7 Avaliação da toxicidade por dose repetida

No desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, os estudos de toxicidade com animais representam ferramentas importantes para avaliar a segurança desses novos produtos.

Dessa forma, após a realização dos testes de atividade antinociceptiva, anti-inflamatória e pró-inflamatória foram avaliados alguns parâmetros da toxicidade por dose repetida (7 Dias consecutivos) da CrII na maior dose utilizada nas atividades descritas anteriormente (1,0 mg/kg; i.v.). Não houve mortalidade entre os animais e os mesmos não apresentaram alterações físicas (ereção de pelos, mucosa, olhos, etc.) ou comportamentais.

Após o sacrifício e retirada dos órgãos, não foram observadas alterações significantes na massa corporal nos grupos que receberam CrII, quando comparados aos seus respectivos controles (Tabela 2).

Antes do sacrifício, os animais tiveram seu sangue coletado para a verificação de alterações enzimáticas importantes presentes no plasma sanguíneo. Observou-se através das análises bioquímicas obtidas pelas dosagens bioquímicas, que a CrII não alterou de forma significativa as concentrações de uréia, mostrando que ela não provocou possíveis alterações renais. Os resultados obtidos pelas dosagens das transaminases glutâmico oxaloacética, glutâmico pirúvica fosfatase alcalina mostraram ausência de alterações hepáticas e ósseas, uma vez que não houve diferença estatística entre o grupo controle salina, sem tratamento e CrII. (Tabela 2).

Como pode ser observado na tabela 2 os animais tratados com CrII não tiveram alterações significativas em relação ao peso relativo dos órgãos (fígado, coração, rim e linfonodo) em relação aos animais dos grupos controles, sem tratamento e salina. Contudo, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do peso do baço dos camundongos tratados com CrII em relação aos animais que não receberam tratamento (sem tratamento), para ambos os sexos. Entretanto, os animais que receberam salina não tiveram diferenças significativas em relação ao peso do baço dos camundongos tratados com CrII. Coura *et al.* (2011) em um ensaio de toxicidade subcrônica utilizando o PS total da alga *G. córnea*, obtiveram aumento no peso do baço quando comparado ao peso do baço do grupo controle salina, e sugeriram que esse aumento pode ser atribuído a imunoestimulação.



Tabela 2 – Análises bioquímicas e do peso corporal e dos órgãos de camundongos submetidos ao ensaio de toxicidade por dose repetida. Os animais foram pesados e injetados com CrII (1,0 mg/kg, i.v.) diariamente durante sete dias. Posteriormente, os animais foram anestesiados e amostras de sangue coletadas para dosagens bioquímicas (AST, ALT, ALP e uréia). Os animais foram eutanasiados e os órgãos pesados. Os dados foram expressos como média  $\pm$  E. P. M. (n=6).

Paramêtros	Tratamento (1 mg/Kg; i.v.)		
	Machos		
	Sem		
	tratamento	Salina	C. racemosa
Peso corporal médio (g) antes	32,03 $\pm$ 0,51	27,75 $\pm$ 0,60	30,29 $\pm$ 0,28
Peso corporal médio (g) depois	35,62 $\pm$ 0,78	29,83 $\pm$ 0,89	33,51 $\pm$ 0,52
Coração (g/ 100 g peso corporal)	0,61 $\pm$ 0,03	0,65 $\pm$ 0,03	0,69 $\pm$ 0,03
Fígado (g/ 100 g peso corporal)	6,32 $\pm$ 0,2	5,94 $\pm$ 0,11	5,83 $\pm$ 0,19
Baço (g/ 100 g peso corporal)	0,31 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,01	0,46 $\pm$ 0,03
Rim (g/ 100 g peso corporal)	0,90 $\pm$ 0,02	0,96 $\pm$ 0,03	0,96 $\pm$ 0,02
Timo (g/ 100 g peso corporal)	0,29 $\pm$ 0,03	0,30 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,04
Linfonodo (g/ 100 g peso corporal)	0,28 $\pm$ 0,03	0,27 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,02
Ureia (mg/dl)	51,08 $\pm$ 3,14	38,00 $\pm$ 2,59	45,37 $\pm$ 3,23
AST (UI/L)	99,48 $\pm$ 15,95	73,34 $\pm$ 17,97	83,81 $\pm$ 12,70
ALT (UI/L)	84,84 $\pm$ 19,83	57,11 $\pm$ 10,49	107,1 $\pm$ 26,59
ALP (UI/L)	106,30 $\pm$ 7,72	104,60 $\pm$ 4,44	99,71 $\pm$ 5,77
	Fêmeas		
	Sem		
	tratamento	Salina	C. racemosa
Peso corporal médio (g) antes	27,00 $\pm$ 0,25	27,86 $\pm$ 0,37	24,83 $\pm$ 0,30
Peso corporal médio (g) depois	29,12 $\pm$ 0,26	30,83 $\pm$ 0,57	26,51 $\pm$ 0,30
Coração (g/ 100 g peso corporal)	0,68 $\pm$ 0,05	0,75 $\pm$ 0,01	0,76 $\pm$ 0,02
Fígado (g/ 100 g peso corporal)	5,59 $\pm$ 0,14	5,70 $\pm$ 0,16	5,21 $\pm$ 0,11
Baço (g/ 100 g peso corporal)	0,36 $\pm$ 0,00	0,47 $\pm$ 0,03	0,54 $\pm$ 0,02
Rim (g/ 100 g peso corporal)	0,79 $\pm$ 0,02	0,82 $\pm$ 0,03	0,83 $\pm$ 0,01
Timo (g/ 100 g peso corporal)	0,31 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,05	0,42 $\pm$ 0,02
Linfonodo (g/ 100 g peso corporal)	0,3 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,02
Ureia (mg/dl)	35,95 $\pm$ 1,56	40,71 $\pm$ 2,37	35,07 $\pm$ 3,17
AST (UI/L)	71,83 $\pm$ 10,35	75,43 $\pm$ 8,28	93,72 $\pm$ 11,47
ALT (UI/L)	114,5 $\pm$ 8,95	54,37 $\pm$ 8,40	65,92 $\pm$ 10,50
ALP (UI/L)	107,5 $\pm$ 6,28	80,31 $\pm$ 6,60	104,5 $\pm$ 12,93

Adicionalmente, foram realizadas análises histológicas dos órgãos a fim de verificar, a presença ou não, de alguma anormalidade na morfologia das células e tecidos. Para tanto, os tecidos foram fixados, cortados, e corados com hematoxilina-eosina (HE) para observação de possíveis lesões em microscopia trinocular. Os resultados demonstraram que os órgãos: rim, timo, baço, linfonodo, coração e fígado não apresentaram alterações significativas em nenhum dos grupos avaliados.

Embora ainda seja restrito os relatos no que concerne à segurança de compostos de algas marinhas em animais, alguns estudos já foram descritos sobre os seus possíveis efeitos.

Araujo *et al* (2011) avaliaram o potencial tóxico dos PS da alga marinha vermelha *S. filiformes* em um ensaio de toxicidade subcrônica durante catorze dias. Os resultados mostraram que repetidas injeções de polissacarídeos sulfatados (9 mg/kg; i.p.) durante 14 dias consecutivos não produziram quaisquer sinais de toxicidade em camundongos. A massa corporal e os pesos úmido do fígado, rim e coração foram normais. Os níveis séricos dos marcadores enzimáticos da função hepática, ALT e AST, não diferiram dos respectivos controles. A redução nos níveis de uréia no plasma não indicaram toxicidade.

Os PS da alga marinha vermelha *G. cornea* também foram injetados em ratos (9 mg/kg, i.p.) por 14 dias consecutivos e estes não produziram sinais significativos de toxicidade (COURA *et al.*, 2011). Além destes, polissacarídeos sulfatados (10 mg/kg; i.p.) da *G. birdiae*, também apresentaram o mesmo padrão de ausência de toxicidade, com exceção de um aumento no peso do baço (VANDERLEI *et al.*, 2011).

As análises histológicas dos tecidos retirados dos órgãos dos animais não revelaram nenhum dano (Figura 27). Entratanto, o fígado apresentou uma Vacuolização citoplasmática discreta (setas brancas na Figura 27) principalmente na região em torno das veias central e região subcapsular do fígado . Este mesmo resultado foi visto por Vanderlei et al (2011) com polissacarídeos da *G. bidie* e foi sugerido pelos autores tratar-se de uma resposta a uma lesão e portanto ser reversível.

Podemos concluir, que diante dos dados bioquímicos obtidos para CrII, esta, não apresentou toxicidade.

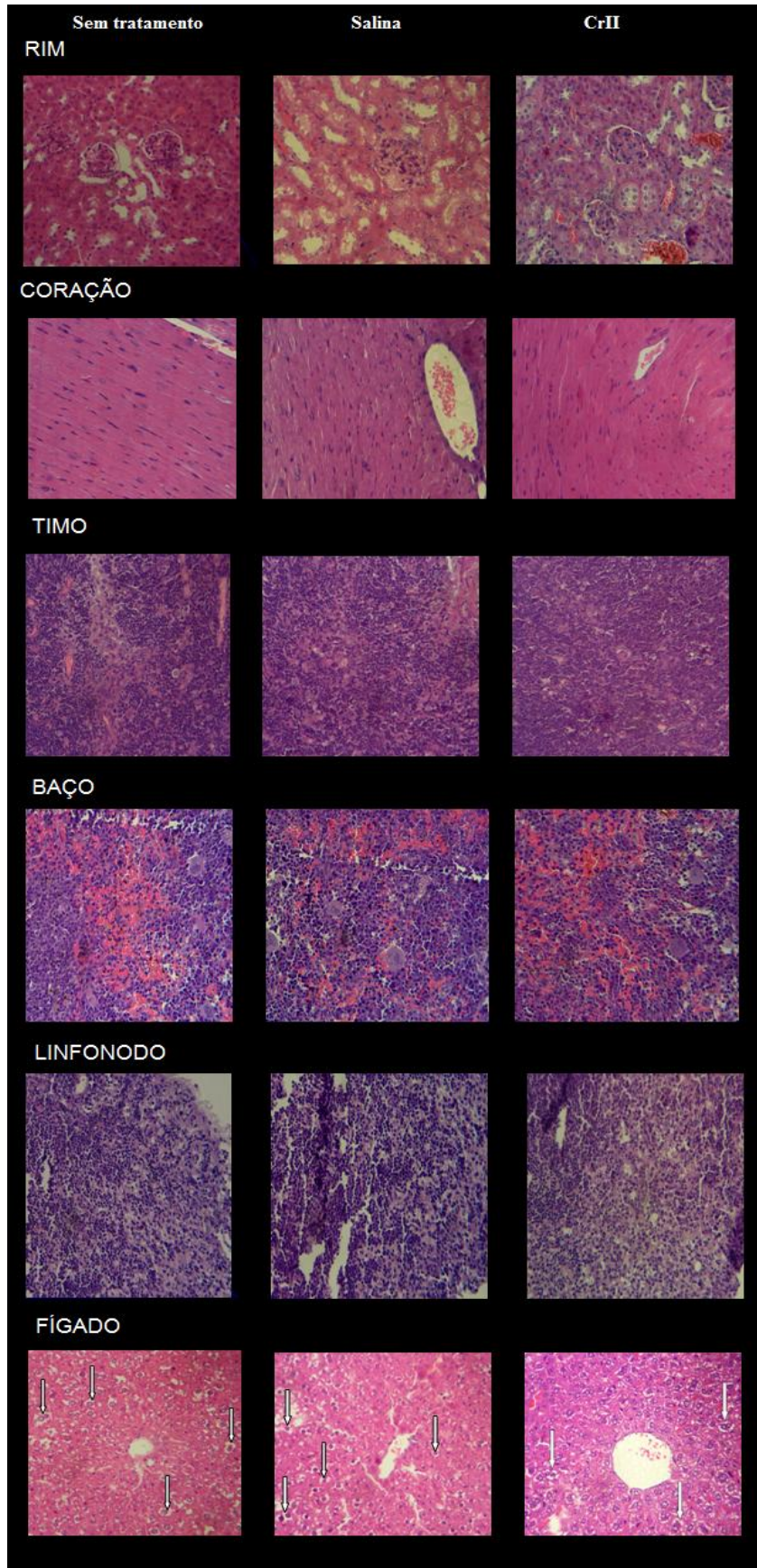


Figura 27 – Fotomicrografias de luz de 4  $\mu$ m de espessura dos órgãos. Rim, coração, timo, baço, linfonodo e fígado (notar discreta vacuolização citoplasmática indicado por setas brancas) de camundongo Swiss após 7 dias

de administração i.v.. da CrII (1,0 mg/kg) e salina (NaCl; 0,15 M) como também do grupo dos animais que não receberam nenhum tratamento. Aumento de 400X.

## 6. CONCLUSÃO

A alga marinha verde *Caulerpa racemosa* apresentou baixo rendimento de PS totais (2,2%) por digestão proteolítica. A cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) mostrou-se eficiente no fracionamento destes polissacarídeos

A CrII, por via endovenosa, demonstrou atividades: antinociceptiva em modelos clássicos de dor, mediante ação periférica; anti-inflamatória em modelos experimentais em ratos, induzido por agentes flogísticos, onde, sua ação provavelmente está relacionada a integridade da via da hemoxigenase (HO-1) e pró- inflamatória quando aplicada em patas de ratos, cuja ação pode estar relacionada com a liberação de mediadores provindos da via da ciclo-oxigenase (COX-2) e prostaglandinas.

A CrII (1 mg/kg; i.v.) mostrou-se atóxica em camundongos quando administrada ao longo de sete dias consecutivos.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, T. M.; ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, J. G.; FIGUEIREDO, I. S. T.; TEIXEIRA, C. M.; BITENCOURT, F. S.; SECCO, D. D.; ARAÚJO, E. S.; LEÃO, C. A. A. M.; RAMOS, M. V. Vascular permeability, neutrophil migration and edematogenic effects induced by the latex of *Cryptostegia grandiflora*. **Toxicon**, v. 53, p. 15–23, 2009.
- ADAMS, H. R. Prostaglandinas. In: BOOTH, N. H. & Mc DONALD, L. E. **Farmacologia e terapêutica veterinária**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 23. p. 363-381, 1992.
- AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sci**, v. 25, p. 639-653, 2004.
- ALENCAR, D.B. Extração, purificação e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Lobophora variegata* [Monografia de Graduação]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará, 2007.
- ALVES, A. P.; MULLOY, B.; DINIZ, J. A.; MOURÃO, P. A. S. Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrosomal reaction in sperms of sea urchins. **J. Biol. Chem**, v. 272, p. 6965-6971, 1997.
- ANANTHI, S.; RAGHAVENDRAN, H. R. B.; SUNIL, A. G.; GAYATHRI, V.; RAMAKRISHNAN, G.; VASANTHI, H. R. In vitro antioxidant and in vivo anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 187–192, 2010.
- 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 polysaccharide isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1207– 1215, 2011.
- ASSREUY, A. M. S., GOMES, D. M., SILVA, M. S. J., TORRES, V. M., SIQUEIRA, R. C. L., PIRES, A. F. Biological effects of a sulfated-polysaccharide isolated from the marine red algae *Champia feldmannii*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 691–695, 2008.
- ASSREUY, A. M. S., PONTE, G. C., RODRIGUES, N. V. F. C., GOMES, D. M., XAVIER, P. A., ARAUJO, G. S. Vascular effects of a sulfated polysaccharide from the red marine alga *Solieria filiformis*. **Natural Product Communications**, v. 5, p. 1267–1272, 2010.
- BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Química Nova** v13 1990.
- BARRETO, R. L.; CORREIA, C. R. D.; MUSCARÁ, M. N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1046-1054, 2005.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Algae – **Anatomy, Biochemistry and Biotechnology**. 1ª Ed. Boca Ratn: Taylor & Francis Group, LCC, 2006.
- BAUHMANN, H.; GAUDIE, J. The acute phase response. **Immunology Today**, v. 15, p. 74-80, 1994.
- BENVENISTE, J. Platelet activating factor, a new mediator of anaphylaxis and immune complex deposition from rabbit and human basophils. **Nature**, v. 249, p. 581–582, 1974.
- BERTEAU, O.; MULLOY, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. **Glycobiology**, v. 13, n. 6, pp. 29R-40R, 2003.

BEVILACQUA, M. P., NELSON, R. M., MANNORI, G. Endothelial- leukocyte adhesion molecules in human disease. **Annu. Rev. Med.**, v. 45, p. 361- 378, 1994.

BEZERRA-NETO, J.T.B. (2005). Extração, fracionamento, purificação e atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Caulerpa sertularioides* (*Caulerpales*, *Caulerpacae*). [Monografia de Graduação]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará.

BHAGAVATHY, S.; SUMATHI, P.; JANCY, S. B. I. Green algae *Chlorococcum humicola* - a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, S1-S7, 2011.

BIRD, K.T. Agar production and quality from *Gracilaria sp.* strain G-16: effects of environmental factors. **Botanica Marina**, v. 31, p. 33-39, 1988.

BITENCOURT, F. S.; FIGUEIREDO, J. G.; MOTA, M. R. L.; BEZERRA, C. C. R.; SILVESTRE, P.; VALE, M. R.; NASCIMENTO, K. S.; SAMPAIO, A. H.; NAGANO, C. S.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W. R. L.; CAVADA, B. S.; ASSREUY, A. M. S.; ALENCAR, N. M. N. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red alga *Hypnea cervicornis*. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 377, p. 139-148, 2008.

BITENCOURT, M. A. O.; DANTAS, G. R.; LIRA, D. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MIRANDA, G. E. C.; SANTOS, B. V. O.; SOUTO, J. T. Aqueous and Methanolic Extracts of *Caulerpa mexicana* Suppress Cell Migration and Ear Edema Induced by Inflammatory Agents. **Mar. Drugs**, v. 9, p. 1332-1345, 2011.

BLUMENTHAL, S. B.; KIEMER, A. K.; TIEGS, G.; SEYFRIED, S.; HÖLTJE, M.; BRANDT, B.; HÖLTJE, H.; ZÄHLER, S.; VOLLMAR, A. M. Metalloporphyrins inactivate caspase-3 and -8. **The FASEB Journal**, v. 19, p. 1272-1279, 2005.

BOCHSLER P.N.; SLAUSON, D.O. Inflammation and repair of tissue. In: SLAUSON, D.O. & COOPER, B.J. **Mechanisms of disease: a textbook of comparative pathology**. 3ª ed. St Louis: Mosby, v. 445 cap. 4. p. 140-245, 2002.

BOOTHE, D. M. The patogenesis and pharmacologic control of inflammation. **Veterinary Medicine**. v. 84, n. 7, p. 856-866, 1989.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophils content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol**, v. 78, p. 206-209, 1982.

BRAGGIO, M. M; MARTINS, A. R. S.; VALERO, V. B. Influência do manejo na produtividade e no desenvolvimento de camundongos (*Mus musculus*). **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 149-153, 2003.

BRAGGIO, M. M. et al. Atividades farmacológicas das folhas de *Sesbania virgata* (CAV.) **Pers. Arquivo do Instituto de Biologia**, v. 69, n. 4, p. 49-53, 2002.

BUSH, C. A.; PASTOR, M. M.; IMBERTY, A. Structure and conformation of complex carbohydrates of glycoproteins, glycolipids and bacterial polysaccharides. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, v. 28, p. 269-293, 1999.

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

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

CHEVOLOT, L.; FOUCAULT, A.; CHAUBET, F.; KERVAREC, N.; SINQUIN, C.; FISHER, A. M. Further data on the structure of brown seaweed fucans: Relationships with anticoagulant activity. **Carbohydrate Research**, v. 319, p. 154-165, 1999.

CIANCIA, M.; QUINTANA, I.; VIZCARGUENAGA, M. I.; KASULIN, L.; DIOS, A.; ESTEVEZ, J. M.; CEREZO, A. S. Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermilara* with controversial effects on hemostasis. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 41, p. 641-9, 2007.

COSTA, L. S., FIDELIS, G. P., CORDEIRO, S. L., OLIVEIRA, R. M., SABRY, D. A., CAMARA, R. B. G. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.64, pp. 21-28, 2010.

COURA, C. O.; DE ARAÚJO, I. W. F.; VANDERLEI, E. S. O.; RODRIGUES, J. A. G.; QUINDERÉ, A. L.; FONTES, B. P.; QUEIROZ, I. N. L.; MENEZES, D. B.; BEZERRA, M. M.; SILVA, A. A. R.; CHAVES, H. V.; JORGE, R. J. B.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of sulfated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 2011.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonóides: potenciais agentes terapêuticos. **Revista Virtual de Química, Rio de Janeiro**, v. 1, n. 3, 2009.

CUNHA, T.M.; JR., W.A.V.; SCHIVO, I.R.; NAPIMOGA, M.H.; PARADA,C.A.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M.M.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammation hyperniciception. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 4, p. 824-832, 2008.

DAY, J.G.; BENSON, E. E.; FLECK, R. A. In vitro cultura and conservation of microalga: applications for aquaculture, biotechnology and environmental research. **In vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, v.35, p.127-136, 1999.

DEMIRBAS, A.; DEMIRBAS, M. F. Energy Conversion and Management. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 163-170, 2011.

DEZOTI, C.; WATANABE, M.; PINTO, C. F.; NEIVA, L. B. M.; VATTIMO, M. F. F. Proteção funcional da enzima heme-oxigenase-1 na lesão renal aguda isquímica e tóxica. **Acta Paul Enferm**, v. 22, p. 490-493, 2009.

DIETRICH, C. P. A model of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. **Braz J Med Biol Res**, v. 17, p. 5-15, 1984.

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

DODGSON, K. S.; PRICE, R.G. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymatic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. **Biochemistry Journal**, v. 78, p. 312-319, 1961.

DROGUE W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v. 82, p. 47-95, 2002.

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

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical. Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.



DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 21, p. 161-174, 1977.

EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 107, 385-393, 1953.

EISERICH, J. P.; PATEL, R. P.; ÓDONNELL, V. B. O. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecule. **Molec. Aspects Med**, v. 19, p. 221-357, 1998.

FARIAS, W.R.; LIMA, P. C.; RODRIGUES, N. V.; SIQUEIRA, R. C.; AMORIM, R. M.; PEREIRA, M. G.; ASSREUY, A. M. A novel antinociceptive sulphated polysaccharide of the brown marine alga *Spatoglossum schroederi*. **Nat Prod Commun**, v. 6, p. 863-866, 2011.

FARIAS, W.R.L.; VALENTE, A. P.; PEREIRA, M. S.; MOURÃO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.

FARNDAL, R. W. et al. Improved quantitation and discrimination of sulfated glycosaminoglycans by use of dimethyl-methylene blue. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 883, p. 173-177, 1986.

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

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**, v. 48, p. 129-141, 1999.

GAHMBERG, C. G.; TOLVANEN, M. Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. **Trends Biochem Sci**, v. 21, p. 308-311, 1996.

GEISSMANN, F.; MANZ, M. G.; JUNG, S.; SIEWEKE, M. H.; MERAD, M.; LEY, K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. **Science**, v. 327, p. 656-661, 2010.

GERBER, P.; DUTCHER, J.; ADAMS, E.; SHERMAN, J. Protective effect of seaweed extracts for chicken embryos infected with influenza virus B or mumps virus. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 99, p. 590-593, 1958.

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

GILMAN, A. G.; GOODMAN, L. S.; RALL, T. W.; MURAD, F. Goodman & Gilman's **the pharmacological basis of therapeutics**. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2006.

GOMES, A. S.; GADELHA, G. G.; LIMA, S. J.; GARCIA, J. A.; MEDEIROS, J. V.; HAVT, A.; LIMA, A. A.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A.; CUNHA, F. Q.; SOUZA, M. H. Gastroprotective effect of heme-oxygenase 1/biliverdin/CO pathway in ethanol-induced gastric damage in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 10, p. 642(1-3):140-5, 2010.

GOODMAN, L. S. *et al.* **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11th. ed. New York: McGraw-Hill, 2006.

GOODMAN, L., TORRES, B., PUNKE, J., REYNOLDS, L., SPEAS, A., ELLIS, A., BUDSBERG, S. Effects of firocoxib and tepoxalin on healing in a canine gastric mucosal injury model. **J Vet Intern Med**, v. 23, p. 56-62, 2009.

GOZZELINO, R.; JENEY, V.; SOARES, M. P. Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase-1. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, v.50, p. 323–54, 2010.

GRAÇA, J. R. V.; BEZERRA, M. M.; LIMA, V.; RODRIGUES, J. A. G.; MONTEIRO, D. L. S.; QUINDERÉ, A. L. G.; AMORIM, R. C. N.; PAULA, R. C. M.; BENEVIDES, N. M. B. Effect of a Crude Sulfated polysaccharide from *Halymenia floresia* (Rhodophyta) on gastrointestinal smooth muscle contractility. **Braz. Arch. Biol. Technol**, v. 54, n. 5, p. 907-916, 2011.

GREENBERG, S.S.; OUYANG, J.; ZHAO, X.; GILES, T.D. Human and rat neutrophils constitutively express neural nitric oxide synthase mRNA. **Nitric Oxide**, v. 2, p. 203-212, 1998.

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

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Resistência do organismo à infecção: leucócitos, granulócitos, o sistema monócito-macrófago e inflamação. In: **Tratado de fisiologia médica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 33, p. 397-404, 1997.

HAEFNER, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug Discovery Today – DDT**, v. 8, n. 12, 2003.

HAMPTON, M. B., KETTLE, A. J., WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, n.9, p. 3007- 3017, 1998.

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

HAYAKAWA, Y.; HAYASHI, T.; LEE, J.; SRISOMPORN, P.; MAEDA, M.; OZAWA, T.; SAKURAGAW, N. Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides isolated from green algae. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, p. 86-94, 2000.

HEBBAR, P. B.; ARCHER, T. K. Chromatin remodeling by nuclear receptors. **Chromosoma**, v. 111, n. 8, p. 495-504, 2003.

HENDERSHOT, L.C.; FORSAITH, J. Antagonism of frequency of phenylquinone induced writhing in ten mouse by weak analgesics as non-analgesics. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutical**. v. 125, n. 3, p. 237-240, 1959.

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

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neurosciences Methods**, v. 14, n. 1, p. 69-76, 1985.

IGNARRO, L. J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. **Ann. Vet. Pharmacol. Toxicol**, v. 30, p. 535-560, 1990.

IKEDA, Y., UENO, A., NARABA, H., OH-ISHI. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sci**, v. 69, p. 2911-2919, 2001.

IOZZO, R. V. Matriz proteoglycans from molecular design to cellular function. **Annu Rev Biochem**, v. 67, p. 609-652, 1998.

IWALEWA, E. O.; MCGAW, L. J.; NAIDOO, V.; ELOFF, J. N. Inflammation: the foundation of diseases and disorders, A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 6 n. 25, p. 2868-2885, 2007.

JI, H.; SHAO, H.; ZHANG, C.; HONG, P.; XIONG, H. Separation of the Polysaccharides in *Caulerpa racemosa* and their chemical composition and antitumor activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 110, p. 1435–1440, 2008.

JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H. S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine Drugs**, v. 9, pp. 196-223, 2011.

JONES, C. S.; MAYFIELD, S. P. Algae biofuels: versatility for the future of bioenergy. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 1–6, 2011.

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

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2004.

KATZUNG, B. G. **Basic & clinical pharmacology**. 9<sup>a</sup> ed. New York: Lange Medical Books/McGraw Hill, 2004.

KELLY, H.; WANG, J.M.; KUBES, P.; Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, p. 3-10, 2007.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 412. 1959.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Anti-inflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase II (COX II): aspectos atuais. **Rev Bras Anestesiologia**, v. 5, n. 4, 2002.

KVATERNICK, V.; POLLMEIER, M.; FISCHER, J.; HANSON, P. D. Pharmacokinetics and metabolism of orally administered firocoxib, a novel second generation coxib, in horses. **J Vet Pharmacol Therap**, v. 30, p. 208-217, 2007.

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

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

LEE, J.; HAYASHI, K.; MAEDA, M.; HAYASHI, T. Antiherpetic Activities of Sulfated Polysaccharides from Green Algae. **Planta Med**, v. 70, p. 813-817, 2004.

LEE, R.E. **Phycology**. 2 ed. Cambridge University Press, New York, NY 10011-4211, USA, 1997.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 4. Ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

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

LEITE, E. L.; MEDEIROS, M. G. L.; ROCHA, H. A. O.; FARIAS, G. G. M.; SILVIA, L. F.; CHAVANTE, S. F.; ABREU, L. D.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schröderi*. **Plant Sci**, v. 132, n. 2, p. 215-228, 1998.

- LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature**, v. 7, p. 678-689, 2007.
- LI, X.; CLARJ, J. D. Chronic morphine exposure and the expression of heme oxygenase type 2. **Brain Res Mol**, v. 75, p. 179-184, 2000.
- LIN E.; CALVANO, S. E.; LOWRY S.F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, p. 117-126, 2000.
- LIU, X. M.; CHAPMAN, G. B.; WANG, H.; DUARTE, W. Adenovirus mediated heme oxygenase-1 gene expression stimulates apoptosis in vascular smooth muscle cells. **Circulation**, v. 105, p. 79-84, 2002.
- LO, T. N.; ALMEIDA, A. P.; BEAVEN, M. A. Dextran and carrageenin evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 221, p. 261-7, 1982.
- LUCAS, S. M.; ROTHWELL, N. J.; GIBSON, R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease. **Br J Pharmacol**, v. 147, p. S232-S240, 2006.
- MABEAU, S.; CAVALOC, E.; FLEURENCE, J.; LA HAYE, M. New seaweed based ingredient for the food industry. **International Food Ingredient**, v. 3, pp. 38 - 44, 1992.
- MAITY, T. K.; MANDAL, S. C.; MUKHERJEE, P. K.; SAHA, K.; DAS, J.; PAL, M.; SAHA, B. P. Studies on antiinflammatory effect of *Cassia tora* leaf extract (Fam. Legumiosae). **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 221-223, 1998.
- MATHEWS, M. B. **Polyanionic proteoglycans**. Em: Conective tissue: Macromolecular structure and evolution. Kleinzeller, A., Springer, G. F. and Witmann, H. G., eds. Springer-Verlag, Berlin, p. 93-125, 1975.
- MCCURDY, C. R.; SCULLY, S. S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). **Life Sci**, v. 78, p. 476-484, 2005.
- MCDOUGALL, J. J. Peripheral analgesia: hitting pain where it hurts. **Biochim Biophys Acta**, v. 1812, p. 459-467, 2011.
- MCNEIL, H.P. The mast cell and inflammation. Australian and New Zealand **Journal of Medicine**, v. 26, p. 216-225, 1996.
- MEDEIROS, V. P.; QUEIROZ, K. C.; CARDOSO, M. L.; MONTEIRO, G. R.; OLIVEIRA, F. W.; CHAVANTE, S. F.; GUIMARAES, L. A.; ROCHA, H. A.; LEITE, E. L. Sulfated galactofucan from *Lobophora variegata*: anticoagulant and anti-inflammatory properties. **Biochemistry (Mosc)**, v. 73 p. 1018-24, 2008.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **NATURE**, v. 454, p. 428-435, 2008.
- MENDIS, E.; KIM, S. K. Present and Future Prospects of Seaweeds in Developing Functional Foods. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 64, 2011.
- MEYR, A. J.; STEINBERG, J. S. – DPM. The Physiology of the Acute Pain Pathway. **Clin Podiatr Med Surg**, v. 25, p. 305-326, 2008.
- MITRIONE, S. M.; VILLALON, P.; LUTTON, J. D.; LEVERE, R. D.; ABRAHAM, N. G. Inhibition of human adult and fetal heme oxygenase by new synthetic heme analogues. **Am. J. Med. Sci**, v. 296, p. 180-186, 1988.
- MOHSIN, S.; KURUP, G. M. Mechanism underlying the anti-inflammatory effect of sulphated polysaccharide from *Padina tetrastratica* against carrageenan induced paw edema in rats. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 1, p. 294-301, 2011.

- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p. 109-142, 1991.
- MONTANHER, A.B. et al. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.281-288, 2007.
- MONTRUCCHIO, G.; ALLOATTI G.; CAMUSSI G. Role of Platelet-Activating Factor in Cardiovascular. **Pathophysiology Physiol.**, v. 80, p. 1669-1699, 2000.
- MOORE, N. D. In search of an ideal analgesic for common acute pain. *Acute Pain*, v. 11, p. 129-137, 2009.
- MULLER, W. A. Mechanisms of Leukocyte Transendothelial Migration. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis**, v. 6, p. 323-344, 2011.
- MULLOY, B.; RIBEIRO, A. C.; ALVES, A. P. VIEIRA, R. P.; MOURÃO, P. A. S. Sulfated fucans from echinoderms have a regular tetrasaccharide repeating unit defined by a specific patterns of sulfation at the O-2 and O-4 positions. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 22113-22123, 1994.
- NA, Y. S. et al. Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens*. **International Immunopharmacology**, v.10, pp.364–370, 2010.
- NANTEL, F., DENNIS, D., GORDON, R., NORTHEY, A., CIRINO, M., METTERS, K. M., CHAN, C.C., Distribution and regulation of cyclooxygenases-2 in carrageenan-induced inflammation. **British Journal Pharmacology**, v. 128, p. 853-850, 1999.
- NEMIROVSKY, A.; CHEN, L.; ZELMA, V.; JURNA, I. The antinociceptive effect of the combination of spinal morphine with systemic morphine or buprenorphine. **Anesthesiol Analgesic**, v. 93, p. 197-203, 2001.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products of Therapeutic Importance. **Chemistry and Biology**, v. 2, p. 623-650, 2010.
- OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e dor. *Rev. Bras. Anesthesiol*, v.61 n. 2, 2011.
- ORZECZOWSKI, A., OSTASZEWSKI, P., JANK, M., BERWID, S. J. Bioactive substances of plant origin in food – impact on genomics. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 42, p. 461-477, 2002.
- O'SULLIVAN, B. P.; MICHELSON, A. D. O papel inflamatório de plaquetas na Fibrose Cística. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**, v. 173, p. 483-490, 2006.
- PAINER, A.; EIZ-VASPER, B.; BLASCZYK, R.; IMMENSCHUH, S. Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochemical Pharmacology*, v. 80, p. 1895-1903, 2010.
- PAINTER, T. J. **Algal Polysaccharides**. In: *The Polysaccharides*, ASPINALL, G. O., Ed., 1st ed.; New York: Academic Press, v. 2, p 195-285, 1983.
- PATHER, N.; VILJOENB, A. M.; KRAMER, B. A biochemical comparison of the in vivo effects of *Bulbine frutescens* and *Bulbine natalensis* on cutaneous wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 364–370, 2011.
- PERCIVAL, E.; McDOWELL, R. H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. **Academic Press**, New York, 1967.
- PEREIRA, M. G. et al. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carbohydrate Research** v. 340, p.2015-2023, 2005.

- PEREIRA, M. S.; MELO, F. R.; MOURAO, P. A. S. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? **Glycobiology**, v. 12, p. 573–580, 2002.
- PERRETTI, M.; GETTING, S. J. Migration of specific leukocyte subsets in response to cytokine or chemokine application in vivo. **Methods in molecular biology**, v. 225, p. 139-46, 2003.
- POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, D.; RODRÍGUEZ-CARVAJAL, L.;FREILE-PELECRÍN, Y. Optimization of native Agar extraction from *Hydropuntia córnea* from Yucatán, México. **Bioresour Technol**, v. 98, p. 1278-1284, 2007.
- QUINDERE, A. L. G. Propriedades na nocicepção e na inflamação de uma fração polissacarídica sulfatada da alga marinha *Acanthophora muscoides*. [Dissertação]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará, 2011.
- RAFFIN, R.P. *et al.* Nanocápsulas Poliméricas Secas Contendo Indometacina: Estudo de Formulação e de Tolerância Gastrointestinal em Ratos. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 2, p. 163-172, 2003.
- RANG, H.P.; BEVAN, S.; DRAY, A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurons. **British Medical Bulletin**, v. 47, n. 3, p. 534-548, 1991.
- RANG, H. P. *et al.* **Farmacologia**, 6a ed., Rio de Janeiro: Elsevier, p. 920, 2007.
- RÄTHEL, T. R.; LEIKERT, J. F.; VOLLMAR, A. M.; DIRSCH, V. M. Application of 4,5-diaminofluorescein to reliably measure nitric oxide released from endothelial cells in vitro. **Biological Procedures Online**, v. 5, n. 1, p. 136-142, 2003.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1711-1723, 2005.
- RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. IL-8 cause in vivo neutrophyl migration by a cell dependent mechanism. **Immunol**, v. 73, p. 472-477, 1991.
- ROBBINS, S. L., COTRAN, R. S., KUMAR, V. **Pathologic basic of diseases**. 5ª Ed, Philadelphia: W. B. Saunders Co, 1994.
- ROCHA DE SOUZA, M. C.; MARQUES, C. T.; DORE, C. M. G.; FERREIRA DA SILVA, F. R.; ROCHA, H. A. O.; LEITE, E. L. Antioxidant activities of sulphated polysaccharides from brown and red seaweeds. **J. Appl. Phycol**, v.19, p. 153-160, 2007.
- ROCHA, H. A.; FRANCO, C. R.; TRINDADE, E. S.; VEIGA, S. S.; LEITE, E. L.; NADER, H. B. Fucan inhibits Chinese hamster ovary cell (CHO) adhesion to fibronectin by binding to the extracellular matrix. **Planta Medica**, v. 71, p. 628-633, 2005.
- RODRIGUES, J. A. G. *et al.* Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 2, p.224-231, 2009.
- RODRIGUES, J. A. G.; FARIAS, W. R. L. Purificação e atividade anticoagulante in vitro de galactanas sulfatadas extraídas da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. **Rev. Bras. Enga. Pesca**, v. 3, 2007.
- RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI, E. S. O.; QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. P.; BENEVIDES, N. M. B. Polissacarídeos sulfatados isolados das clorofíceas *Caulerpa racemosa* e *Caulerpa cupressoides* – extração, fracionamento e atividade anticoagulante. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 32, n. 2, p. 113-120, 2010.
- RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI, E. S. O.; SILVA, L. M. C. M.; ARAÚJO, I. W. F.; QUEIROZ, I. N. L.; PAULA, G. A.; ABREU, T. M.; RIBEIRO, N. A.; LIMA, V.; BEZERRA, M. M.; CHAVES, H. V.; JORGE, R.

- J. B.; MONTEIRO, H. S. A.; LEITE, E. L.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a sulfated polysaccharide isolated from the marine green seaweed *Caulerpa cupressoides*. **Pharmacological Reports**, 2012. *In press*
- RODRIGUEZ, M. C.; MATULEWICZ, M. C.; NOSEDA, M. D.; DUCATTI, D. R. B.; LEONARDI, P. I. Agar from *Gracilaria gracillis* (*Gracilariales*, Rhodophyta) of the Patagonic coast of Argentina – Content, structure and physical properties. **Bioresour Technol**, v. 100, p. 1435-n 1441, 2009.
- ROSÁRIO, A. A. F. C. Role of the protective gene Heme Oxygenase-1 in the control of T cell mediated responses. [Tese de Doutorado]. Lisboa - Portugal: Universidade de Lisboa .
- ROSEMAN, S. Reflections on glycobiology. **J Biol Chem**, v. 276, p. 4152-4154, 2001.
- ROTH, J., RUMMEL, C., BARTH, S.W., GERSTBERGER, R., HÜBSCHLE, T. Molecular aspects of fever and hyperthermia. **Immunol Allergy Clin N Am**, v. 29, p. 229-245, 2009.
- ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P.; The eosinophil. **Annu. Rev. Immunol**, v. 24, p. 147-174, 2006.
- ROTHENBERG, M. E.; MISHRA, A.; BRANDT, E. B.; HOGAN, S. P. Gastrointestinal eosinophils. **Immunol. Ver**, v. 179, p. 139-155, 2001.
- SARTORI, L.R.; FERREIRA, M.S.; PERAZZO, F.F.; MANDALHO LIMA, L.; CARVALHO, J.C.T. Atividade antiinflamatória do granulado de *Calendula officinalis* L. e *Matricaria recutita* L. **Rev. Bras. Farmacogn**. v. 13, p. 17-19, 2003.
- SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, p. 821-832, 2010.
- SERHAN, C. N. Resolution Phase of Inflammation: Novel Endogenous Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators and Pathways. **Annu. Rev. Immunol**, v. 25, p. 101–37, 2007.
- SHIELDS, S. D.; CAVANAUGH, D. J.; LEE, H.; ANDERSON, D. J.; BASBAUM, A. I. Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. **Pain**, v. 151, p. 422-429, 2010.
- SILVA, N. S. F.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M. Effects of different spinal morphine doses in rats. **Rev. Bras. Anesthesiol**, v. 54, p. 60-67, 2004.
- SILVA, R. R. et al. Efeito de Flavonóides no Metabolismo do Ácido Aracdnônico. **Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da FMRP - Universidade de São Paulo**, v. 35, n. 2, p. 127-133, 2002.
- SIQUEIRA, R. C.; SILVA, M. S.; ALENCAR, D. B.; PIRES, A. F.; ALENCAR, N. M.; PEREIRA, M. G.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R.; ASSREUY, A. M. In vivo anti-inflammatory effect of a sulfated polysaccharide isolated from the marine brown algae *Lobophora variegata*. **Pharm Biol**, v. 49, p. 167-174, 2011.
- SNYDER F. Metabolic processing of PAF. **Clin Rev Allergy**, v. 12, p. 309-327, Review, 1994.
- SOMMER, C.; WHITE, F. Cytokines, Chemokines, and Pain, em: BEAULIEU, P.; LUSSIER, D.; PORRECA, F. **Pharmacology of Pain**. 1ª Ed, Seattle, IASP Press, p. 279-302, 2010.
- SOUZA, E. T.; QUEIROZ, A. C.; MIRANDA, G. E. C.; LORENZO, V. P.; SILVA, E. F.; FREIRE-DIAS, T. L. M.; CUPERTINO-SILVA, Y. K.; MELO, G. M. A.; SANTOS, B. V. O.; Estudo preliminar da atividade antiinflamatória de *Bryophillum calycinum* Salisb. **Rev. bras. farmacogn**, v. 15, n.1, p. 60-64, 2005.
- SOUZA, G. E. P., FERREIRA, S. H. Blockade antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Ag. Actions**, v. 17, p. 97-103, 1985.

- SPINOSA, H. S., GÓRNIAC, S. L., BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada a Medicina veterinária**. 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 239-272.
- STEEDS, C. E. The anatomy and physiology of pain. **Basic science**, v. 27, p. 507-511, 2009.
- STITES, D. P., TERR, A. J. **Imunologia Básica**. Tradução José Mauro Peralta, Lúcia Martins Teixeira, Alexandre Januário da Silva. Rio de Janeiro: Editora Prentice-Hall do Brasil LTDA, p. 102-117, 1992.
- STORTZ, C. A.; CERESO, A. S. Novel findings in carragenans, agaroids and “hybrid” red seaweed galactans. **Curr Top Phytochem**, v. 4, p. 121-134, 2000.
- TALARICO, L. B. et al. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, p. 63-71, 2004.
- TALARICO, L. B.; PUJOL, C. A.; ZIBETTI, R. G.M.; FARIA, P. C. S.; NOSEDA, M. D.; DUARTE, M. E. R. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus sero type and host cell. **Antiviral Res**, v. 66, p. 103-110, 2005.
- TARANTINO, M. Tesouros das águas – a ciência amplia a busca de substâncias extraídas de organismos de mares e rios benéficos à saúde humana. **Isto É**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 1869, p. 76-78, 2005.
- TASAKA, A. C. Antiinflamatórios não esteroidais. In: SPINOSA, H. S., GÓRNIAC, S. L., BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**, 3<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 21, p. 225-250, 2002.
- TERRY, M. J.; LINLEY, P. J.; KOHCHI, T. Making light of it: the role of plant heme oxygenase in phytochrome chromophore synthesis. **Biochem Soc Trans**, v. 30, p. 604-609, 2002.
- TITHERADGE, M.A. Nitric oxide in septic shock. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1411, p. 437-455, 1999.
- TURK, S. S.; SCHNEIDER, R. Printing properties of a high substituted guar gum and its mixture with alginate. **Dye Pigment**, v. 47, p. 269-275, 2000.
- USOV, A. I.; BILAN, M. I. Fucoidans-sulfated polysaccharides of brown algae. **Russian Chemical Reviews** v. 78 n. 8 p. 785-799, 2009.
- USOV, A. I. Polysaccharides of the red algae. **Adv Carbohydr Chem Biochem**. v. 65, p. 115-217, 2011.
- VALKO, M.; et al. Review: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **IJBCB**, v. 39, p. 44-84, 2007.
- VAN DE VELDE, F.; KHUTSEN, S.H.; USOVI, A. I.; ROLLEMA, H. S.; CERESO, A. S. H.; High resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Food Science & Technology**, v. 13, pp. 73-92, 2002.
- VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G.; JANHS, H. M. Algae, an introduction to phycology. **Cambridge: University Press**, p. 627, 1989.
- VANDERLEI, E. S. O.; ARAUJO, I. W. F.; QUINDERE, 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*. **Inflamm. Res**, v. 60, p. 1121-1130, 2011.
- VANE, J.R. The endothelium: maestro of the blood circulation. **Croonian Lecture. Phil Trans. R. Soc. Lon. B**, v. 348, p. 225-246, 1994.



- VENGE, P. Monitoring the allergic inflammation. **Allergy**, v. 59, p. 26-32, 2004.
- VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. Algas: da economia dos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Quim Nov**, v.27, n.1, p139-145, 2004.
- VILLANUEVA, R. D.; ROMERO, J. B.; RAGASA, A. L. R.; MONTANO, M. N. E. Agar from the red seaweed, *Laurencia flexillis* (Ceramiales, Rhodophyta) from northern Philippines. **Phycol Res**, v. 58, p. 151-156, 2010.
- WANG, L.; DUDEK, S. M. Regulation of vascular permeability by sphingosine 1-phosphate. **Microvascular Research**, v. 77, p. 39-45, 2009.
- WIJESSEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIMA, S.K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, pp. 14-21, 2011.
- WIJESINGHE, W. A. J. P.; ATHUKORALA, Y.; JEON, Y. Effect of anticoagulative sulfated polysaccharide purified from enzyme-assistant extract of a brown seaweed *Ecklonia cava* on Wistar rats. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 917-921, 2011.
- WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin induced edema in hind paw of rats as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 111, p. 544-547, 1962.
- YALCIN, I.; CHARLET, A.; FREUND-MERCIER, M. J.; BARROT, M.; POISBEAU, P. Differentiating thermal allodynia and hyperalgesia using dynamic hot and cold plate in rodents. **J Pain**, v. 10, n. 7, p. 767,773, 2009.
- YASUHARA-BELL, J.; LU, Y. Marine compounds and their antiviral activities. **Antivir Res**, v. 86, p. 231-240, 2010.
- YE, H.; WANG, K.; ZHOU, C.; LIU, J.; ZENG, X. Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. **Food Chem**, v. 111, p. 428-432, 2008.
- ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **Int Anesthesiol Clin**, v. 45, p. 27-37, 2007.
- ZHOU, G.; YUEPING SUN, Y.; XIN, H.; ZHANG, Y.; LI, Z.; XU, Z. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. **Pharmacological Research**, v. 50, p. 47-53, 2004.