



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

LUÍS EDUARDO CASTANHEIRA COSTA

FRAÇÃO POLISSACARÍDICA EXTRAÍDA DA ALGA VERMELHA *Gracilaria intermedia*: ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA

FORTALEZA-CE

2014

LUÍS EDUARDO CASTANHEIRA COSTA

FRAÇÃO POLISSACARÍDICA EXTRAÍDA DA ALGA VERMELHA *Gracilaria intermedia*: ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Ponte Freitas

FORTALEZA-CE

2014

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

-
- C873f Costa, Luís Eduardo Castanheira.
Fração polissacarídica extraída da alga vermelha *Gracilaria intermedia*: atividade anti-inflamatória e antinociceptiva / Luís Eduardo Castanheira Costa. – 2014.
79 f. : il. color., ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2014.
Orientação: Profª. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas.
1. *Gracilariaceae*. 2. Espectroscopia. 3. Carboidratos. I. Título.

CDD 574.192

LUÍS EDUARDO CASTANHEIRA COSTA

Fração polissacarídica extraída da alga vermelha *Gracilaria intermedia*: atividade anti-inflamatória e antinociceptiva.

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

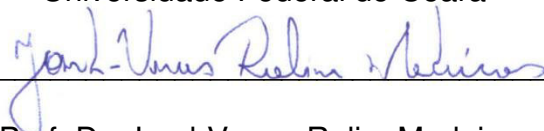
Aprovada em 10 / 11 / 2014

BANCA EXAMINADORA:



Prof.^a. Dr.^a. Ana Lúcia Ponte Freitas (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará



Prof. Dr. Jand-Venes Rolim Medeiros

Universidade Federal do Piauí



Prof. Dr. Luciano de Sousa Chaves

Instituto Federal do Pará

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Ana Lúcia Ponte Freitas por ter me acolhido em seu laboratório, ter confiado em mim e por ter proporcionado um bom ambiente de trabalho, respeito e gentileza ao longo dos dois anos nos quais convivemos.

Ao Prof. André Luiz dos Reis Barbosa pela sua co-orientação, receptividade e pelo apoio no meu mestrado.

Aos professores Norma Maria Barros Benevides, Jand-Venes Rolim Medeiros e Luciano de Sousa Chaves por gentilmente aceitar integrar a banca examinadora deste trabalho.

Aos companheiros de laboratório: Jaci Ximenes, Luciano Chaves, Victor Hugo, Maísa Pinheiro, Eliane Silva, Willer Malta, Clark Barros, Carla Benevides, Poliana Cavalcante e Renan Oliveira.

À minha família por todo o apoio ao longo desses dois anos de mestrado.

Ao Laboratório de Polímeros da UFC pela disponibilização de equipamentos para as análises de infravermelho e GPC.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e à FUNCAP pelo auxílio financeiro.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.” (Theodore Roosevelt)

RESUMO

As algas marinhas do gênero *Gracilaria* são importantes fontes de ágar e polissacarídeos sulfatados e são comumente utilizadas nas indústrias alimentícia, farmacêutica e biotecnológica. O objetivo deste trabalho foi extrair, caracterizar estruturalmente e avaliar o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo de uma fração polissacarídica extraída da alga *Gracilaria intermedia*. Uma fração de polissacarídeos sulfatados foi obtida a partir da alga vermelha *Gracilaria intermedia* através de extração enzimática com papaína. O teor de açúcar e contaminação por proteínas foram avaliados através de testes colorimétricos. O material apresentou alto rendimento após a extração e alta pureza, sem contaminação por proteínas. Os polissacarídeos foram submetidos a testes de caracterização estrutural através da análise por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e a massa molar média da fração polissacarídica foi determinada através de Cromatografia por Permeação em Gel (GPC). O polissacarídeo foi identificado como uma agarana, com um peso molecular de 410 kDa. Foram realizados testes de atividade anti-inflamatória em modelos de edema de pata induzido por carragenana, dextrana, composto 48/80, serotonina e histamina. Também foi avaliado o efeito anti-inflamatório do polissacarídeo em modelo de peritonite induzida por carragenana, com posterior contagem de leucócitos e neutrófilos, assim como medição dos níveis de TNF- α e interleucina-1 β . Os resultados indicam que o polissacarídeo extraído apresenta alta atividade anti-inflamatória e esta atividade está relacionada à inibição de mediadores inflamatórios. A atividade antinociceptiva foi avaliada através de modelos de contorção abdominal induzida por ácido acético, teste da formalina e placa quente. Os demonstraram que o polissacarídeo extraído apresentou atividade analgésica nos testes de contorção abdominal induzida por ácido acético e no teste da formalina mas não apresentou redução significativa no teste de placa quente, sugerindo um mecanismo de ação a nível de sistema periférico. Os polissacarídeos sulfatados obtidos a partir da alga marinha *Gracilaria intermedia* mostram potencial para serem utilizados futuramente como princípio ativo para um composto anti-inflamatório.

Palavras-chave: gracilariaceae, espectroscopia, atividade biológica, carboidratos,

ABSTRACT

Seaweeds from the *Gracilaria* genus are an important source of agar and sulfated polysaccharides and are commonly used in food, pharmaceutical and biotechnology industries. The objective of this study was to extract, structurally characterize and evaluate the anti-inflammatory and antinociceptive effects of a sulfated polysaccharide extracted from the red alga *Gracilaria intermedia*. A sulfated polysaccharide fraction was extracted from the red alga *Gracilaria intermedia* by enzymatic digestion with papain. The sugar content and protein contamination were evaluated through colorimetric tests. The material presented high yield and purity, without any protein contamination. The sulfated polysaccharides extracted were subjected to structural characterization analysis by Fourier transform infrared spectroscopy and the average molecular weight of the polysaccharide fraction was determined by Gel Permeation Chromatography (GPC). The polysaccharide fraction was identified as an agaran with a molecular weight of 410 kDa. Anti-inflammatory activity tests were conducted in models of paw edema induced by carrageenan, dextran, compound 48/80, serotonin, and histamine. The anti-inflammatory effect of the polysaccharide on carrageenan-induced peritonitis was also evaluated, with subsequent counting of leukocytes and neutrophils, as well as measurement of TNF- α and interleukin-1 β levels. The results of the anti-inflammatory activity tests indicate that the extracted polysaccharide exhibits high anti-inflammatory activity and this activity is related to inhibition of inflammatory mediators. The antinociceptive activity was evaluated using models of writhing induced by acetic acid, formalin test and hot plate. The antinociceptive tests showed that the extracted polysaccharide had analgesic activity in the writhing test induced by acetic acid and in the formalin test but showed no significant reduction in the hot plate test, suggesting an action mechanism in the peripheral system. The sulfated polysaccharides derived from seaweed *Gracilaria intermedia* show potential for future use as an anti-inflammatory compound.

Keywords: Gracilariaceae, spectroscopy, carbohydrates, biological activity

Lista de ilustrações

Figura 1. Estrutura química básica de galactanas tipo agarana.	22
Figura 2. Aspecto macroscópico da alga vermelha <i>Gracilaria intermedia</i> e sua classificação taxonômica.....	30
Figura 3. Esquema de extração enzimática de polissacarídeos da alga vermelha <i>Gracilaria intermedia</i>	33
Figura 4. Espectros FT-IV em pastilhas de KBr dos Polissacarídeos de <i>Gracilaria intermedia</i>	43
Figura 5. Perfil cromatográfico de PLS em cromatografia de permeação em gel. ...	45
Figura 6. Efeito de PLS no edema de pata induzido por dextrana em camundongos.	49
Figura 7. Efeito de PLS no edema de pata induzido por composto 48/80 em camundongos.	50
Figura 8. Efeito de PLS no edema de pata induzido por histamina em camundongos.	50
Figura 9. Efeito de PLS no edema de pata induzido por serotonina em camundongos.	51
Figura 10. Atividade da mieloperoxidase (MPO) no sobrenadante do homogenato das secções de pata de camundongos.	53
Figura 11. Efeito de PLS na migração de leucócitos em peritonite induzida por carragenana em camundongos.	55

Figura 12. Efeito de PLS na migração de neutrófilos em peritonite induzida por carragenana.	56
Figura 13. Efeito de PLS nos níveis de TNF- α em peritonite induzida por carragenana.	58
Figura 14. Efeito de PLS nos níveis de IL-1 β em peritonite induzida por carragenana.	59
Figura 15. Efeito de PLS no número de contorções abdominais em teste de contorção induzida por ácido acético.	61
Figura 16. Efeito de PLS nos tempos de reação no teste da placa quente.	62
Figura 17. Efeito de PLS nos tempos de lambertura da pata no teste de formalina.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento de polissacarídeos obtidos de algas vermelhas do gênero *Gracilaria*.....40

Tabela 2. Atribuições aos sinais obtidos em espectroscopia na região do infravermelho.43

Tabela 3. Efeito de PLS no modelo de edema de pata induzido por Carragenana (Cg).47

SUMÁRIO

Resumo	7
Abstract	8
Lista de figuras	9
Lista de tabelas	11
1. INTRODUÇÃO.	15
1.1 Algas	15
1.2 Importância ecológica das algas	16
1.3 Importância econômica das algas.....	18
1.4 Algas vermelhas	20
1.5 Polissacarídeos de algas vermelhas	21
1.6 Propriedades farmacológicas de polissacarídeos	23
1.7 Inflamação	24
1.8 Nocicepção	27
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3. MATERIAIS	30
3.1 Coleta e identificação da alga marinha	30
3.2 Animais	31
4. MÉTODOS	32
4.1 Extração de polissacarídeos por digestão por papaína	32
4.2 Rendimento	33
4.3 Determinação de proteínas	34

4.4	Determinação de carboidratos totais	34
4.5	Espectroscopia na região do Infravermelho	35
4.6	Cromatografia de Permeação em Gel	35
4.7	Edema de pata induzido por carragenana	35
4.8	Edema de pata induzido por diferentes agentes inflamatórios	36
4.9	Determinação da atividade da Mieloperoxidase	37
4.10	Modelo de peritonite	37
4.11	Medição de TNF- α e IL-1 β	37
4.12	Teste de contorção abdominal induzida por ácido acético	38
4.13	Teste da formalina	38
4.14	Teste da placa quente	38
4.15	Análise estatística	39
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	Extração e rendimento	40
5.2	Análise química	41
5.3	Espectroscopia de infravermelho	41
5.4	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	44
5.5	Atividade anti-inflamatória de PLS em edema de pata induzido por carragenana	45
5.6	Efeito de PLS sobre o edema da pata induzido por diferentes agentes inflamatórios	48
5.7	Efeito de PLS na atividade da mieloperoxidase induzida por carragenana no tecido da pata de camundongos	51
5.8	Efeito anti-inflamatório de PLS em peritonite induzida por carragenana em camundongos	54

5.9 Efeito da fração PLS sobre a produção de citocinas induzida por carragenana em exsudato peritoneal	57
5.10 Efeito antinociceptivo de PLS na contorção induzida por ácido acético	60
5.11. Efeito antinociceptivo do PLS no teste da placa quente	61
5.12 Efeito de PLS no teste de formalina	63
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS	66

1. INTRODUÇÃO

1.1 Algas

O termo alga não apresenta nenhum significado taxonômico formal, entretanto, é rotineiramente utilizado para indicar um conjunto de organismos eucariontes do reino Protista. Atualmente sabe-se que as algas formam um grupo polifilético, onde os organismos não compartilham um ancestral em comum, mas são agrupados devido a semelhanças decorrentes de uma convergência evolutiva de organismos provenientes de linhas evolucionárias diferentes (BARSANTI; GUALTIERI, 2014).

As algas, com exceção das cianófitas, apresentam organelas envolvidas por membranas e todas as algas autotróficas possuem clorofila *a* e o pigmento acessório β -caroteno. Independentemente do tamanho, todas apresentam tecidos condutores rudimentares e estrutura reprodutiva unicelular ou, quando multicelular, com todas as células férteis, sem formar embrião envolvido por células estéreis (PEREIRA; NETO, 2014).

Apesar de apresentarem algumas semelhanças morfológicas, as algas formam um grupo bastante heterogêneo. Já existem mais de 30000 espécies descritas no banco de dados AlgaeBase com grande diversidade de formas e tamanhos, desde algas unicelulares (microalgas) como o picoplancton, medindo entre 0.2-2.0 μm de diâmetro, a organismos multicelulares de grande tamanho (macroalgas), com algumas espécies atingindo mais de 60 m de comprimento (GUIRY, 2012). A sua estrutura celular, o arranjo celular para formar corpos multicelulares e os seus pigmentos fotossintéticos variam significativamente de uma espécie para outra (PLAZA; CIFUENTES; IBÁÑEZ 2008; PEREIRA; NETO, 2014).

Tradicionalmente, esta diversidade de composição morfológica, substâncias de reserva, ciclo reprodutivo e tipo de pigmentos predominantes permite classificar as algas em três grandes grupos dentro do reino Protista: Rhodophyta (algas vermelhas), Phaeophyta (algas castanhas) e Chlorophyta (algas verdes) (RAVEN; EVERT; EICHORN, 2001). Nos últimos tempos, com o advento de técnicas mais modernas nas áreas de genômica e filogenia molecular, a história evolutiva de genes e taxonomia das algas vem sofrendo algumas alterações. Com base em tais análises, particularmente na interpretação da sequência de base de DNA do

cloroplasto e de sequências de RNA ribossômico, as algas são classificadas atualmente nas linhagens a seguir: Cyanophyta, Glaucophyta, Rhodophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Haptophyta, Euglenophyta, Chlorophyta e Charophyta (PEREIRA; NETO, 2014).

O grupo das cianófitas engloba as algas procariontes. Estas algas estão relacionadas com as bactérias gram negativas devido à estrutura da sua parede celular, mas compartilham algumas características com as algas eucariontes, como a presença de clorofila. As algas dos grupos restantes fazem parte do táxon Eukarya, são encontradas em maior quantidade e geralmente possuem células recobertas por uma parede fibrosa produzida pelo aparelho de Golgi. Esta parede apresenta celulose e muitas vezes contém polissacarídeos (SAMBAMURTY, 2006; PEREIRA; NETO, 2014).

1.2 Importância Ecológica das Algas

As algas são organismos capazes de colonizar qualquer meio que lhes ofereçam luz e umidade suficientes, temporárias ou permanentes; assim, são encontradas em águas doces, na água do mar, sobre os solos úmidos ou mesmo sobre a neve. Quer sejam uni- ou pluricelulares, as algas retiram todos os nutrientes necessários do meio onde estão – solução ou umidade – por isso, são organismos primariamente aquáticos, sendo principalmente encontradas nos oceanos. (BHATTACHARYA; MEDLIN, 1998)

Os oceanos oferecem ambientes e ecossistemas únicos para o crescimento da vida, dando aos organismos marinhos características únicas e mecanismos de adaptação que geralmente não estão presentes nos organismos terrestres (DEMUNSHI; CHUGH, 2009). Os organismos marinhos necessitam adaptar-se a diversas condições ambientais, tais como baixas concentrações de nutrientes, pressões altas, concentrações elevadas de sal, baixo conteúdo de oxigênio e pouca luz solar. Para minimizar estas condições, os organismos marinhos possuem características únicas que os diferenciam dos organismos terrestres em muitos aspectos como comportamento, metabolismo e estratégia de adaptação. Além das pressões físicas acima referidas, os organismos marinhos também estão sujeitos a

pressões ecológicas como a competição pelo espaço e a predação, levando-os a desenvolver estratégias que permitam a sua sobrevivência, tais como processos físicos ou químicos (HU *et al.*,2011).

A ocorrência de alterações na distribuição e abundância de diferentes tipos de algas ocorre devido a flutuações na topografia, natureza física do substrato, salinidade e correntes, ação das marés do ambiente marinho e da costa litorânea. O substrato marinho ou algal é utilizado como superfície de ancoragem com papel chave no crescimento para muitas espécies de algas e este crescimento é altamente dependente da disponibilidade de substratos nas áreas litorais e sublitorais da linha costeira (RAO, 1970).

Nos sistemas aquáticos as algas incorporam energia solar em biomassa, produzem o oxigênio que é dissolvido na água e utilizado pelos demais organismos aquáticos, atuam na mineralização e no ciclo dos elementos químicos e servem como alimento para seres vivos herbívoros e onívoros. Ao finalizar seu ciclo de vida, seus constituintes químicos sofrem transformações nos sedimentos, são solubilizados e reciclados na água. Estas diferentes funções desempenhadas pelas algas nos sistemas aquáticos dependem de diversos fatores, como temperatura, intensidade da radiação solar, concentração de nutrientes na água e tipo de alimentação dos animais presentes no sistema (BLANCK; WALLIN; WANGBERG, 1984).

Alterações naturais ou antropogênicas no sistema aquático podem alterar o balanço destes fatores controladores, e causar mudanças na composição da comunidade de algas, nas taxas de produtividade, na biomassa e na química da água. É importante notar que, tanto a inibição como a estimulação do crescimento dos organismos, são igualmente indesejáveis, pois qualquer alteração na produtividade das algas ou na composição da comunidade, em relação ao usual para aquele sistema em particular, pode ameaçar todo o equilíbrio do ecossistema (BLANCK; WALLIN; WANGBERG, 1984).

No seu ambiente natural, as algas geralmente são espécies representativas do nível trófico básico. Essa posição é bastante importante ecológicamente, pois as algas servem como a fonte de alimento principal para os invertebrados aquáticos e ocupam, assim, uma posição única entre os produtores primários: são um elo

importante na cadeia alimentar e essenciais à economia energética dos ambientes aquáticos como alimento (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

Algumas espécies de algas podem ser utilizadas como bioindicadores para detecção de nutrientes e substâncias tóxicas presentes em ambientes aquáticos. Existem índices de poluição baseados nos gêneros de algas presentes no ambiente. Em geral, quanto menos diversificada a população algal, maior a poluição do sistema (TRAINOR, 1983).

Um outro aspecto ecológico importante das algas está relacionado à sua capacidade em retirar elementos químicos do meio aquoso. Diversos estudos de cultivo de algas são realizados em áreas poluídas para avaliar o seu potencial no tratamento de águas residuais de processos industriais, detoxificação biológica e remoção de metais pesados, sugerindo a utilização de algumas espécies de algas na recuperação de sistemas aquáticos, em especial quanto à presença de íons metálicos e compostos orgânicos (PIMENTA, 2011). Nas últimas décadas, também tem sido avaliado o uso das algas como reagentes químicos em processos de pré-concentração na química analítica (MAHAN; HOLCOMBE, 1992).

1.3 Importância econômica das algas

Nos últimos anos, a crescente procura por novos produtos naturais em diversas áreas, como por exemplo, a alimentar, a cosmética e a farmacêutica, acarretou em um interesse cada vez maior pelos organismos de origem marinha (DUAN *et al.*, 2006; SHANMUGHAPRIYA *et al.*, 2008). Dentre os organismos marinhos, as algas constituem uma fonte promissora de novas substâncias. A alta competitividade dos ambientes aquáticos leva as algas a desenvolverem variadas estratégias de defesa, culminando com a produção de diversos compostos a partir de diferentes vias metabólicas (MARINHO-SORIANO, 2011).

Cada vez mais as indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia focam seus esforços na descoberta de novas substâncias naturais que sejam mais eficientes e menos nocivas. Na indústria alimentícia as algas representam um alimento natural que fornece um elevado valor nutritivo e com baixo teor de calorias. As algas também possuem minerais, proteínas, apresentam todos os aminoácidos essenciais, várias vitaminas, incluindo a vitamina B12 (ausente nos vegetais superiores), fibras e

baixo conteúdo em gorduras. Em muitos países do leste asiático o consumo de macroalgas marinhas como alimento é comum e seu uso como alimento ou em aditivos alimentares no mundo cresceu exponencialmente na última década. (SEKMOKIENE; LIUTKEVICIUS; MALAKAUSKAS, 2007; DHARGALKAR; VERLEKAR, 2009). Apenas o comércio de “nori” (gênero *Porphyra*), uma alga bastante utilizada no ramo alimentício na preparação de sushis, foi responsável pela movimentação 1,8 bilhões de dólares (OLIVEIRA, 2002).

De igual modo, as algas também têm ganhado cada vez mais importância econômica nas indústrias farmacêutica e cosmética, onde os produtos oriundos de algas têm lugar proeminente (DENNY; GAINES, 2007; YASUHARA-BELL; LU, 2010). Há séculos as algas são utilizadas como fonte de compostos bioativos de uma forma empírica, no entanto apenas mais recentemente, com o advento de tecnologias de análise mais precisas, foi possível identificar com mais precisão as substâncias benéficas presentes (BARSANTI; GUALTIERI 2014). Estas substâncias produzidas pelas algas constituem uma vasta gama de moléculas, tornando as algas um atrativo alvo de pesquisas buscando moléculas com potencial de uso para as áreas biomédica, cosmética, indústria alimentar e farmacêutica (BARSANTI; GUALTIERI, 2014).

Em relação ao potencial farmacológico no que concerne a bioprodutos, tendências recentes na pesquisa de drogas a partir de fontes naturais sugerem que as algas são um grupo promissor no fornecimento de novas substâncias bioativas (IOANNOU; ROUSSIS, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Já foram isolados, a partir de algas, agentes terapêuticos naturais que incluem classes de compostos como terpenóides, ácido ribonucleico, proteínas, hidratos de carbono, lipídeos, entre outros (FUSETANI, 2000). Estes compostos apresentam diversas atividades biológicas, tais como antibacteriana, antioxidante, antifúngica, antimalárica, antitumoral, anti-inflamatória, entre outras (MAYER *et al.*, 2013).

No em no litoral da região Nordeste do Brasil, as algas são encontradas em abundância e facilmente coletadas, e apresentam utilidade como biomassa para o tratamento de efluentes industriais nas praias (OLIVEIRA *et al.*, 2009). No tocante à exploração de espécies com fins comerciais, a atividade de maior porte no Brasil corresponde à colheita de algas vermelhas, principalmente dos gêneros *Gracilaria* e

Hypnea, no litoral do nordeste, especialmente na costa entre os estados do Ceará e da Paraíba (VIDOTTI ; ROLLEMBERG, 2004).

1.4 Algas vermelhas

As algas vermelhas são organismos que formam o grupo Rhodophyta, na sua maioria são pluricelulares e vivem em substratos particularmente abundantes em águas tropicais quentes. Existem aproximadamente entre 4.000 e 8.000 espécies de algas vermelhas, distribuídas em 700 gêneros. Estas são encontradas na região entremarés e no infralitoral até profundidades de até 40 ou, ocasionalmente, a 250m. Dentre essas espécies, as espécies marinhas são as mais abundantes, enquanto observa-se um número muito reduzido de espécies de água doce, constituindo apenas 20 gêneros (GAMAL, 2010; REVIERS, 2010 VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

As algas do grupo Rhodophyta apresentam uma coloração avermelhada característica, decorrente da presença do pigmento ficoeritrina em suas células, que se sobrepõe à cor verde da clorofila *a*. Estes organismos possuem clorofila *a* e *d*, carotenoides, e armazenam grãos citoplasmáticos de um composto similar ao amido como principal composto de reserva. Outra característica morfológica comum entre as algas vermelhas é a sinapse, uma estrutura que proporciona contato entre o citoplasma de duas células adjacentes (REVIERS, 2010; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

Algumas algas vermelhas são consumidas diretamente pelo homem como as algas do gênero *Porphyra* e da espécie *Palmaria palmata*, bastante utilizadas para a preparação de sushis. As rodófitas calcificadas exercem um papel de sedimentação indispensável à constituição e à sobrevivência dos recifes de corais e podem ser utilizadas como adubo calcário. Compostos extraídos de algas vermelhas, como ágares e carragenanas são amplamente utilizados como gelificantes ou espessantes (REVIERS, 2010).

Dentro do grupo das rodófitas, o gênero *Gracilaria* tem sido alvo da atenção de inúmeras pesquisas, especialmente devido a seu conteúdo de ágar, sendo este gênero responsável por mais de 60% da produção mundial de ágar. Além disso, suas altas taxas de crescimento e reprodução favorecem o seu cultivo (TSENG, 2001; KAIN; DESTOMBE 1995). No Brasil o cultivo de algas gracilarióides vem aumentando nas últimas décadas, uma avaliação realizada no ano de 2000 revelou que 600 toneladas de *Gracilaria spp.* foram extraídas das populações naturais do

litoral do nordeste para a extração de ágar. *Gracilaria intermedia* é uma alga vermelha pluricelular pertencente à família gracilariaceae e encontrada no litoral do Nordeste brasileiro. Atualmente existem poucos artigos científicos publicados com estudos envolvendo *G. intermedia*, limitando-se a levantamentos ecológicos e biogeográficos (LYRA, 2005;).

1.5 Polissacarídeos de algas vermelhas

Um componente importante da matriz extracelular das algas marinhas são os polissacarídeos. Estes compostos apresentam estruturas heterogêneas e complexas, recobrando a parede celular de celulose (POMIN, MOURÃO, 2008). Estes compostos formam mucilagens e parecem apresentar capacidade protetora contra a desidratação em períodos de maré baixa. Ainda, fornecem flexibilidade à estrutura da alga, facilitando o processo de captura de luz e nutrientes por estes organismos (PERCIVAL, MCDOWELL, 1967).

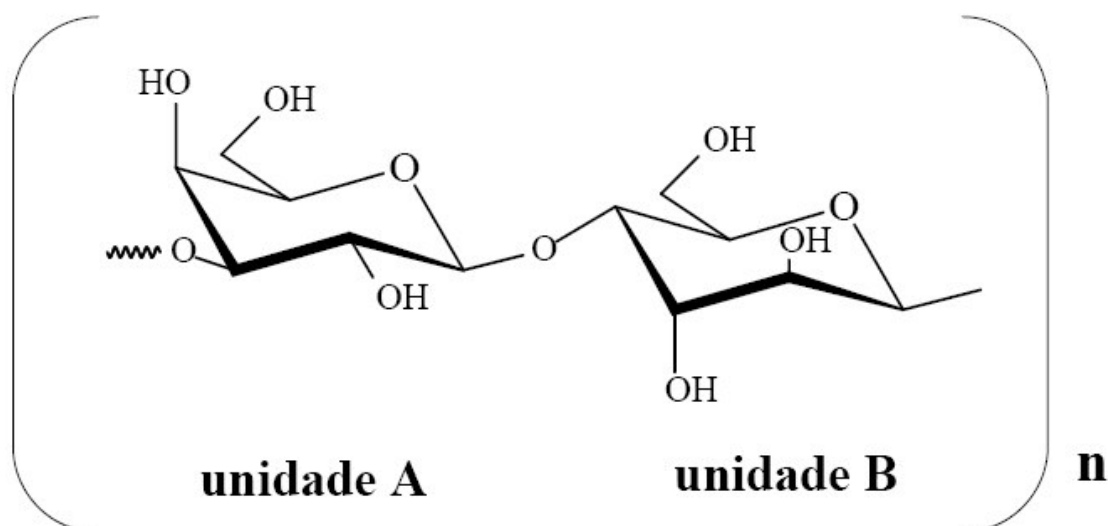
O grupo de alga pode influenciar na composição estrutural dos polissacarídeos encontrados. Segundo Percival e McDowell, (1967) os polissacarídeos encontrados nas algas vermelhas podem estar na forma de galactanas sulfatadas: polissacarídeos sulfatados constituídos principalmente por repetições do monossacarídeo galactose. Estes polissacarídeos geralmente apresentam alta massa molecular (≥ 100 KDa) e possuem alta eletronegatividade, devido aos ésteres sulfatados em sua estrutura, o que os torna bastante aniônicos, possibilitando interação eletrostática com proteínas específicas, podendo ser um ponto chave para as suas ações biológicas (POMIN, 2010).

A estrutura das galactanas sulfatadas sofre variações entre diferentes espécies de algas vermelhas, entre diferentes ambientes ou até mesmo em diferentes estações do ano (PEREIRA *et al.*, 2005). As galactanas sulfatadas estão presentes principalmente na forma de carragenanas e agaranas e apresentam estrutura linear alternante de resíduos de β -D-galactopiranosose 3-ligadas e α -galactopiranosose 4-ligadas, os quais estão na configuração D em carragenanas e na configuração L em agaranas (Figura 1), alguns também podem apresentar simultaneamente dissacarídicas de carragenanas e agaranas, formando um terceiro grupo de polissacarídeos onde as unidades de α -galacose podem estar tanto na configuração

D- quanto L-: as galactanas DL-híbridas,. Alguns resíduos podem estar na forma de anidrogalactose (KNUTSEN *et al.*, 1994). Várias algas vermelhas são agarófitas e as espécies do gênero *Gracilaria* são as principais produtoras de ágar encontradas na natureza (KUMAR; FOTEDAR, 2009; BORAL; BOHIDAR, 2009).

Em meados da década de 50, estudos de fracionamento levaram a acreditar que o ágar é composto por unidades de agarose e unidades de agarpectina. A agarose é um polissacarídeo neutro, caracterizado por uma estrutura linear de unidades repetidas do dissacarídeo agarobiose (1→3)-β-D-galactose e (1→4)-3,6-anidro-α-L-galactose. Já a agarpectina caracteriza-se como um polissacarídeo ácido contendo sulfato, metil, ácido pirúvico e ácido D-glucurônico adicionado à agarobiose. Porém, na década de 70, com auxílio de técnicas de análise mais precisas, as características dos ágares puderam ser descritas de maneira mais eficaz, levando à descoberta de galactanas que apresentam continuidade de regiões neutras e altamente carregadas na mesma molécula (DUCKWORTH; YAPHE, 1971; BOURRET, 2005).

Figura 1. Estrutura química básica de galactanas tipo agarana.



A estrutura química das agaranas pode apresentar diferentes graus de substituição, especialmente por ésteres de sulfato. As interações entre as agaranas e outras moléculas estão provavelmente relacionadas com as características

estruturais dos glicanos como a configuração anomérica, padrão de sulfatação, posição da ligação glicosídica e sua conformação (POMIN, 2009).

1.6 Propriedades farmacológicas de polissacarídeos

Historicamente, os produtos naturais têm desempenhado um papel extremamente importante na medicina e a química de produtos naturais contribui de forma notável para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. Produtos naturais ou seus derivados podem servir como protótipos moleculares para a síntese de fármacos. Este fato é evidente pelo elevado número de produtos de origem natural atualmente utilizados na terapêutica de diferentes patologias. Estima-se que aproximadamente mais de 50% dos produtos químicos lançadas no mercado nas duas últimas décadas derivem de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007; AMADOR *et al.*, 2003).

Ao longo das últimas décadas tem ocorrido um elevado crescimento do número de moléculas naturais isoladas a partir de organismos marinhos. Diversos trabalhos recentes demonstram a importância desses organismos na descoberta de compostos de diferentes classes e com diversas atividades biológicas, reforçando a importância de novas pesquisas (COSTA *et al.*, 2010; BLUNT *et al.*, 2013; MAYER *et al.*, 2013; JIAO *et al.*, 2011). Este aumento da exploração de organismos marinhos para a obtenção de novos produtos tem sido coincidente com o desenvolvimento de novas tecnologias de análise estrutural, especialmente o espectrômetro de ressonância magnética nuclear de alta resolução, que veio desempenhar um papel chave na elucidação da estrutura dos produtos naturais marinhos (HU *et al.*, 2011). Desde o início da década de 1970, mais de 15.000 estruturas de novos produtos naturais foram descobertos a partir de microrganismos, algas e invertebrados marinhos, incluindo proteínas, lipídeos e polissacarídeos, exibindo uma grande variedade de atividades biológicas (COSTA-LOTUFO, 2009).

Já foram relatados na literatura polissacarídeos sulfatados obtidos de algas com diversas importantes atividades biológicas, como anticoagulante, antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória e antiviral (JIAO *et al.*, 2011). Dessa forma, é importante o isolamento de novos polissacarídeos para encontrar moléculas com potencial terapêutico, pois cada uma destas substâncias possui estrutura única,

podendo atuar em diferentes alvos moleculares (COSTA et al., 2010). Atualmente, a relação entre estrutura e atividades biológicas de galactanas sulfatadas ainda é pouco conhecida. Porém, pode-se afirmar que apenas a densidade de carga não é suficiente para explicar a ampla gama de atividades biológicas apresentada por essas moléculas, devendo-se considerar também o padrão de substituição e a natureza da cadeia principal do polissacarídeo (POMIN, 2010).

Diversos estudos descrevem a atividade anti-inflamatória de polissacarídeos derivados de algas vermelhas. Um dos mecanismos avaliados na atividade anti-inflamatória de polissacarídeos é a inibição da migração celular. Diferentes polissacarídeos sulfatados mostraram atividade anti-inflamatória relacionada à redução do extravasamento de leucócitos polimorfonucleares (CUMASHI *et al.*, 2007). Esses polissacarídeos parecem exercer o efeito devido à inibição do rolamento de leucócitos mediado por selectinas (BERTEAU & MULLOY, 2003; CUMASHI *et al.*, 2007; MATSUI *et al.*, 2003).

Também foi demonstrada a atividade antinociceptiva de diversos polissacarídeos sulfatados. Através da administração oral de polissacarídeos totais extraídos da alga vermelha *Bryothamnion seaforthii* em camundongos, observou-se inibição do número de contorções abdominais, induzidas por ácido acético, bem como a primeira e segunda fase no modelo de formalina, e aumento do tempo de reação ao estímulo térmico em modelo de placa quente (VIEIRA *et al.* 2004). Polissacarídeos sulfatados extraídos da alga vermelha *Gracilaria caudata*, também apresentaram efeitos anti-inflamatório e antinociceptivos em testes realizados com camundongos (CHAVES *et al.*, 2013).

1.7 Inflamação

Abbas, Lichman e Pillai (2008) definem a inflamação como sendo uma complexa reação localizada no tecido conjuntivo vascularizado cuja função é destruir, bloquear ou diluir um agente agressor (bactérias, fungos, vírus, queimaduras, traumas físicos, dentre outros). Suas principais características são dor, rubor, calor, edema e perda de função. Assim, embora a reação de inflamação seja uma medida de proteção do organismo, pode causar sérios danos teciduais e patologias, pois estes sintomas podem ocorrer de forma exarcebada, causando danos teciduais na região inflamada.

A reação de inflamação envolve mecanismos a nível vascular e a nível celular. Dentre os eventos inflamatórios celulares, pode-se citar a migração de células leucocitárias para o foco de inflamação e processos de coagulação. Os eventos vasculares, que permitem a ocorrência dos eventos celulares, são vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, maior permeabilidade vascular, e extravasamento de líquidos e proteínas para o meio extracelular. A inflamação pode ser classificada como aguda ou crônica. A inflamação aguda é uma ação imediata e inespecífica do corpo em virtude de um agente agressor e é de curta duração. A inflamação crônica é de longa duração e caracteriza-se pela infiltração de células mononucleares, acarretando em destruição tecidual (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Várias células estão envolvidas na inflamação: células endoteliais vasculares, mastócitos, células mononucleares residentes e leucócitos. Os leucócitos podem ser divididos em células polimorfonucleares (neutrófilos eosinófilos, e basófilos) e células mononucleares (monócitos e linfócitos). O recrutamento de leucócitos desempenha um papel importante na resposta imune a agentes infecciosos e durante doenças inflamatórias e autoimunes. O processo de extravasamento de leucócitos do sangue para o tecido inflamado requer uma complexa cascata de eventos adesivos entre os leucócitos e o endotélio (CHAVAKIS et al., 2009; ZARBOCK et al., 2009)

Os neutrófilos constituem o tipo de célula leucocitária mais abundante no sangue; caracterizam-se por apresentar um núcleo lobular segmentado e também grânulos citoplasmáticos repletos de enzimas de degradação. Atuam nas fases iniciais da inflamação e são bastante sensíveis a agentes quimiotáticos. Os neutrófilos atuam nos locais de lesão tecidual através de endocitose de agentes não reconhecidos e secreção de enzimas intracelulares, como elastase, endopeptidases e mieloperoxidase (MPO), uma enzima derivada de leucócitos que catalisa a formação de espécies reativas oxidantes. Além de integrantes da resposta imune inata, estudos têm comprovado a contribuição desses oxidantes para o dano tecidual durante inflamação (NAGHAVI *et al.*, 2003).

Os eosinófilos são granulócitos oriundos da medula óssea, sendo bastante encontrados em infiltrados inflamatórios de reações de fase tardia da hipersensibilidade imediata, contribuindo em processos de asma e doenças

alérgicas; são também células muito importantes na ação antiparasitária extracelular, como a ação provocada por helmintos. Os basófilos estão presentes em pequenas quantidades no sangue periférico, mas podem ser recrutados para os sítios inflamatórios; eles atuam sobretudo nas reações de hipersensibilidade. (CRUVINEL, 2010).

Os monócitos são células que circulam no sangue; sendo recrutadas de forma ativa para os focos inflamatórios, local no qual os monócitos originam os macrófagos. Os macrófagos são células fagocitárias ativadas por produtos oriundos de microrganismos e por citocinas de linfócito T. Após sua ativação, os macrófagos fagocitam e eliminam os micro-organismos; secretam citocinas pró-inflamatórias e apresentam os antígenos aos linfócitos T auxiliares. Os macrófagos têm sua nomenclatura modificada de acordo com o tecido no qual se encontram; no sistema nervoso são chamados células microgliais; nos sinusóides vasculares do fígado são chamados células de Kupffer; nas vias aéreas pulmonares recebem o nome de macrófagos alveolares e nos ossos, osteoclastos (ABBAS; LICHMAN; PILLAI. 2008).

Os linfócitos e os produtos oriundos dele, anticorpos, são considerados os principais componentes da imunidade adquirida; sendo as células a função de reconhecer e responder de maneira específica aos antígenos. Os linfócitos são divididos em três classes: os linfócitos B; os linfócitos T, que são subdivididos em linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos e linfócitos T reguladores; e os *natural killer*. Os linfócitos B são as células produtoras de anticorpos; os linfócitos T agem destruindo os antígenos de microrganismos ou mesmo as células infectadas (ABBAS; LICHMAN; PILLAI. 2008).

Havendo inexistência de infecção, leucócitos e monócitos circulam livremente no sangue, no centro dos vasos, onde a resistência é menor e há uma maior velocidade do fluxo. Quando ocorre inflamação, inicia-se o processo de vasodilatação, diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo e as células circulantes passam a se aderir com as células endoteliais. Estas, por sua vez, estão repletas de quimiocinas, cuja expressão é induzida por citocinas produzidas em resposta a agentes microbianos. Os leucócitos expressam ligantes para selectinas e, por meio de tais ligantes ocorre interação entre leucócitos e células endoteliais. Essa interação é de baixa afinidade, o que ocasiona sequências de ligação e

desligamento, no sentido do fluxo sanguíneo; ocorrendo o fenômeno de rolamento de leucócitos ao longo do vaso (ABBAS; LICHMAN; PILLAI., 2008).

Dentre os mediadores do processo inflamatório, as citocinas representam um tipo especial de mediadores que podem ser produzidos pelas células do tecido afetado e por células circulantes, e atraem linfócitos e fagócitos (LUSTER, 1998). As citocinas são peptídeos produzidos por células do sistema imunológico como os macrófagos, linfócitos, células epiteliais e do tecido conjuntivo (SAMA *et al.*, 2004). São substâncias químicas circulantes no plasma e importantes mediadoras da resposta celular, desencadeadas pelo estímulo inflamatório agudo. Dentre elas destacam-se a interleucina (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF1 α) (CASSATELLA, 1995; SPRINGER, 1994). Outros mediadores inflamatórios são a histamina e serotonina e bradicinina, responsáveis pela resposta inflamatória rápida, acarretando em aumento da permeabilidade vascular e aumento do fluxo sanguíneo para o local da inflamação. Suas ações são vasodilatação e reações de fase aguda como alterações sistêmicas de inflamação como febre, sudorese, anorexia, perda de peso e leucocitose.

1.8 Nocicepção

A nocicepção pode ser definida como a detecção de estímulos nocivos e a subsequente transmissão de informações codificadas para o cérebro. Em contraste, a dor é essencialmente um processo perceptivo que surge em resposta a essa atividade (KIDD; URBAN, 2001). Nesse sentido, a dor aguda exerce um importante papel biológico, atuando como um mecanismo de defesa para manter a integridade do organismo. Do ponto de vista sensorial, estímulos nocivos de natureza mecânica, térmica ou química ativam os nociceptores (fibras do tipo C e A δ), responsáveis por conduzir a informação gerada na periferia para o sistema nervoso central (MILLAN, 1999)

Após uma lesão tecidual, ocorre a instalação do processo inflamatório devido à liberação de mediadores endógenos, os quais podem facilitar a transmissão nociceptiva e/ou sensibilizar os nociceptores (MILLAN, 1999). Além disso, sabe-se que a administração desses mediadores promovem comportamentos nociceptivos, caracterizados pelo ato dos animais de morder, lambem ou chacoalhar a área

injetada, indicando a ativação do nociceptor (DRAY, 1995; MILLAN, 1999). Porém, os mecanismos de ação envolvidos nas atividades anti-inflamatória e antinociceptiva dos polissacarídeos ainda são pouco compreendidos.

Existem vários modelos clássicos utilizados para avaliar o potencial antinociceptivo de moléculas. Geralmente, estes modelos são baseados na observação da resposta animal em relação à utilização de estímulos de diversos tipos e duração. Assim, os modelos experimentais utilizados no estudo da dor são divididos em categorias, classificados de acordo com os mecanismos de desencadeamento do efeito nociceptivo, que podem ser estímulos mecânicos, térmicos e químicos (ALMEIDA & OLIVEIRA, 2006; LE BARS *et al.*, 2001).

É possível avaliar o componente inflamatório em modelos de nocicepção química, como por exemplo, nos modelos de dor visceral induzida pela administração intraperitoneal de ácido acético ou através da injeção intraplantar de formalina. Vários estudos recentes realizados com polissacarídeos sulfatados de algas, demonstram uma variedade de atividades antinociceptivas em modelos de estudos clássicos de dor por indução química ou indução térmica, indicando que estes compostos têm bastante potencial para serem utilizados como precursores de bioprodutos analgésicos (CHAVES *et al.* 2013; COURA *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2012).

Baseando-se no fato de que polisacarídeos sulfatados de algas marinhas são compostos de alta atratividade para a produção de fármacos e com potencial para apresentar atividades biológicas, foi avaliado a composição químico-estrutural e as possíveis atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga *Gracilaria intermedia*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar aspectos químico-estruturais, atividade anti-inflamatória e anti-nociceptiva de um polissacarídeo obtido a partir da alga vermelha *Gracilaria intermedia*.

2.2 Objetivos Específicos


- Extrair uma fração polissacarídica sulfatada (PLS) da alga *Gracilaria intermedia* por digestão por papaína
- Calcular o rendimento de polissacarídeos obtidos.
- Determinar o teor de proteínas, e carboidratos no material obtido a partir do método de extração proposto.
- Caracterizar estruturalmente as frações polissacarídicas através de Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier e Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).
- Avaliar o efeito do PLS quanto a sua atividade anti-inflamatória *in vivo* com diferentes agentes pró-inflamatórios.
- Avaliar o efeito do PLS quanto a sua atividade antinociceptiva *in vivo*

3. MATERIAIS

3.1 Coleta e identificação da alga marinha

Exemplares de *Gracilaria intermedia* (registrada sob o número 2386 no herbário ficológico do Laboratório de Ciências do Mar – Labomar, Universidade Federal do Ceará) foram coletados na Praia do Pacheco, município de Caucaia, Ceará, Brasil, (coordenadas: 03° 43 '58' 'S, 38° 39' W 21 ") – em setembro/2013, durante maré baixa, armazenados em sacos plásticos a -20° C e conduzidos ao Laboratório de Algas Marinhas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC). No laboratório, as algas foram lavadas com água destilada para retirada de epífitas e demais organismos incrustantes, e secas a 25 °C. O aspecto macroscópico da alga e sua classificação taxonômica podem ser observados na Figura 2.

Figura 2. Aspecto macroscópico da alga marinha vermelha *Gracilaria intermedia* e sua classificação taxonômica.

	Filo	Rhodophyta
	Subfilo	Eurhodophytina
	Classe	Florideophyceae
	Subclasse	Rhodymeniophycidae
	Ordem	Gracilariales
	Família	Gracilariaceae
	Gênero	Gracilaria
	Nome Botânico	<i>Gracilaria</i> <i>intermedia</i> J.Agardh 1901

Fonte: Joana Castro/ Algaebase, 2013.

3.2. Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss, com massa corpórea entre 18-25 g, fornecidos pelo biotério central da UFC - Campus do Pici. Os animais

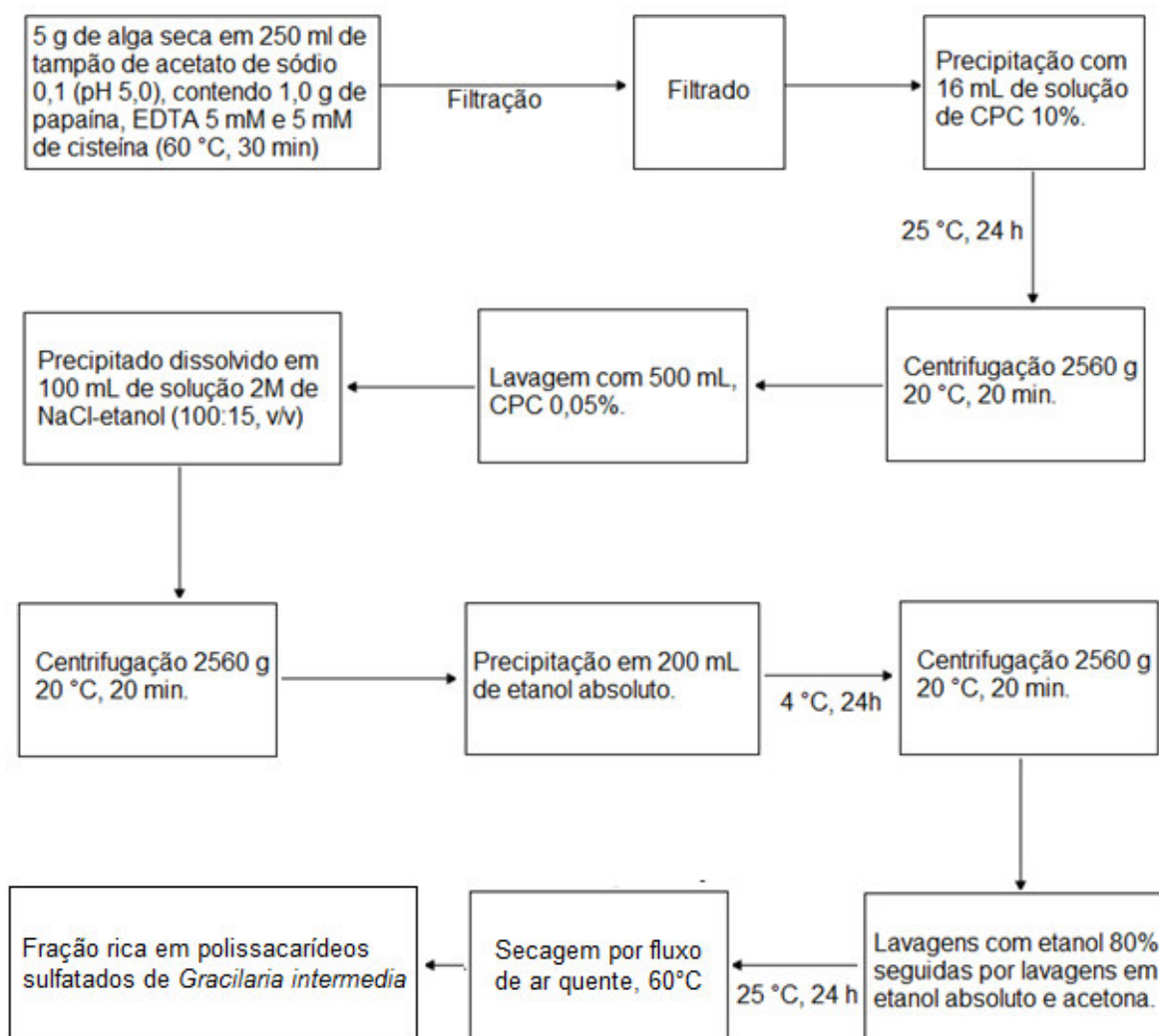
receberam água e alimentação *ad libitum*. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios de cuidado e uso atualmente estabelecidos pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). O protocolo experimental utilizado aprovado está registrado sob o número 017/13 do Comitê de Ética e Pesquisa da FACID – Faculdade Integral Diferencial do Piauí.

4. MÉTODOS

4.1 Extração de polissacarídeos por digestão com papaína

A extração dos polissacarídeos (PLS) ocorreu segundo a metodologia de Farias *et al.* (2000) com modificações (Figura 3). Alga seca (5 g) foi suspensa em 250 ml de tampão de acetato de sódio 0,1 (PH 5,0), contendo 1,0 g de papaína, EDTA 5 mM e 5 mM de cisteína e incubou-se a 60 °C durante 30 min. A mistura de incubação foi então filtrada por uma membrana de nylon, e o homogeneizado foi guardado. Os polissacarídeos sulfatados em solução foram precipitados com 16 ml de solução de cloreto de cetilpiridínio (CPC) 10%. Após 24 h à temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada a 2560 g durante 20 min a 20 °C. Os polissacarídeos sulfatados foram lavados com 500 mL de solução de 0,05% de CPC, dissolvido em 100 ml de uma solução 2 mol/L de NaCl-etanol (100 : 15, v/v). Os polissacarídeos em solução foram precipitados com 200 ml de etanol absoluto. Após 24 h, a 4°C, o precipitado foi recolhido por centrifugação (2560 g durante 20 min a 20°C) e lavado exaustivamente com etanol a 80%, etanol absoluto e acetona. Seguindo-se secagem por fluxo de ar quente (60 °C). O polissacarídeo obtido (PLS) foi guardado em local seco a temperatura ambiente.

Figura 3. Esquema de extração enzimática de polissacarídeos da alga vermelha *Gracilaria intermedia*.



4.2 Rendimento

Para cálculo do rendimento da fração obtida em relação ao peso de alga utilizado para a extração foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Teor de polissacarídeos \%} = \frac{\text{massa (g) do material seco obtido}}{\text{massa (g) de macroalga seca utilizada para o processo de extração}} \times 100$$

4.3 Determinação de Proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada segundo do método proposto por Bradford (1976).

O preparo da solução de Bradford ocorreu pelo seguinte procedimento: 50 mg de Comassie G-250 foram dissolvidos em 25 mL de álcool etílico e a solução obtida, agitada durante 1 h em erlenmeyer envolto com papel alumínio. Seguiu-se a adição de 50,0 mL de ácido fosfórico 85 %. O volume foi então aferido para 500 mL com o uso de água destilada. A solução resultante foi filtrada três vezes com papel de filtro e acondicionada em frasco âmbar à temperatura ambiente.

Procedeu-se a confecção da curva padrão com Albumina Sérica Bovina (BSA) pela mistura de 1,0 mL de solução de BSA em diferentes concentrações e 2,5 mL de solução de Bradford. Após 10 min, as soluções obtidas foram analisadas em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm. Todas as concentrações foram analisadas em triplicata.

Para que a quantidade de proteína das amostras fosse dosada, foram utilizadas solução de 1,0 mg./mL de polissacarídeos diluída nas seguintes proporções 1:10, 1:50 e 1:100. A estas soluções foi adicionado o reagente de Bradford e feitas leituras em espectrofotômetro a 595 nm. Para a estimativa das concentrações de proteína foi realizada correlação entre as leituras obtidas com as soluções contendo a amostra e as da curva padrão.

4.4 Determinação de Carboidratos totais

O teor de carboidratos totais foi determinado seguindo o método de Dubois *et al.* (1956). Para a confecção da curva de calibração, galactose foi usada como padrão.

Foi preparada uma solução de partida (0,0004 g/mL) com o padrão galactose e procedeu-se a confecção da curva de calibração. Cada um dos pontos da curva foi obtido pela leitura, em espectrofotômetro, 490 nm, de soluções preparadas com 500,0 µL de solução de galactose em diferentes concentrações; 0,5 mL de solução de Fenol (5 %) e 2,5 mL de solução concentrada de ácido sulfúrico (95,5 %).

Cada uma das amostras em estudo foi preparada na concentração de 0,5 mg.mL⁻¹. Estas soluções foram então diluídas na proporção volumétrica 1:9 e realizou-se a leitura em espectrofotômetro como citado anteriormente. A quantificação de galactose ocorreu por correlação com a curva de calibração. Cada um dos ensaios foi realizado em triplicata

4.5 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros das frações polissacarídicas foram obtidos através da dispersão das amostras em pastilhas de KBr e, para obtenção do espectro, foi utilizado um Espectrofotômetro de Infravermelho com transformada de Fourier da Shimadzu, modelo FTIR-8300, apresentando uma janela espectral de 400 a 4000 cm⁻¹.

4.6 Cromatografia de permeação em gel

O pico massas molares (MPK) foi realizada por cromatografia de permeação em gel (GPC) com equipamento Shimadzu à temperatura ambiente usando uma coluna Ultrahydrogel linear (7,8 x 300 mm) , fluxo 0,5 ml/min , 0,5 % de concentração de polissacarídeo e 0,1 M de NaNO₃ como solvente. Um refractômetro diferencial e um fotômetro de raios ultravioleta (a 280 nm) foi utilizado como detector eo volume de eluição corrigido para o marcador interno de etileno glicol a 11,25 ml . Amostras de pululano (Shodex Denko) Mw de 5,9 × 10³, 1,18 × 10⁴, 4,73 × 10⁴, 2,12 × 10⁵, 7,88 × e 10⁵ g/mol foram usadas para a confecção da curva padrão .

4.7 Edema de pata induzido por carragenana

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em seis grupos (n = 6). Camundongos do grupo I (controle negativo) foram pré-tratados por via intraperitoneal (i.p.) com salina estéril (NaCl a 0,9%). Os camundongos dos grupos II, III, IV e V foram pré-tratados por via intraperitoneal com 0,1, 0,3, 1 ou 3 mg/kg de PLS respectivamente. Após uma hora, carragenana dissolvida em salina estéril

(NaCl a 0,9%) foi administrada por injeção subplantar na pata direita (500 µg por pata, 50 µl), incluindo o grupo VI (apenas carragenana).

O volume da pata foi medido com um pletismômetro (Ugo-Basile, 7140) imediatamente antes de injeções (volume basal) e 1, 2, 3, e 4 horas após as injeções. Os resultados foram expressos como a alteração no volume da pata (ml), calculado subtraindo o volume basal a partir do volume medido nos tempos indicados. A percentagem de inibição de aumento de volume da pata de cada grupo foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição de edema} = \frac{(V_t - V_o) \text{ Controle} - (V_t - V_o) \text{ Tratado}}{(V_t - V_o) \text{ Controle}} \times 100$$

Onde V_o é o volume basal e V_t é o volume final, medido nos tempos indicados.

Ao término do ensaio, foi avaliada a atividade anti-inflamatória de cada concentração, e a concentração com melhor porcentagem de inibição de edema foi utilizada para os testes de dosagem de mieloperoxidase, testes inflamatórios com diferentes agentes flogísticos, modelo de peritonite e testes de atividade antinociceptiva.

4.8 Edema de pata induzido por diferentes agentes inflamatórios

Para avaliar o efeito anti-inflamatório do PLS em edema de pata induzido por diferentes agentes inflamatórios, foram administradas aos grupos de animais (n=6) injeções de 50 µl de dextrana (500 µg/pata), serotonina (1%, p/v), histamina (1%, p/v), ou composto 48/80 (12 µg/pata) na pata traseira direita. Um grupo recebeu 50 µl de 0,9% de solução salina estéril e serviu como um grupo de controle não tratado. PLS (1 mg/kg) foi injetado intraperitonealmente 30 min antes das injeções intraplantar de agentes flogísticos. O volume da pata foi medido imediatamente antes das injeções e nos intervalos de tempo de 30, 60, 90 e 120 minutos.

4.9 Determinação da atividade da mieloperoxidase

Para a determinação da atividade da MPO 50-100 mg de tecido da pata traseira de animais do grupo IV (PLS 1 mg/kg), do grupo I (salina) e do grupo VI (apenas carragenana) foram homogeneizados separadamente em 1 ml de tampão de potássio com 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 4500 rpm durante 15 minutos a 4 °C. A atividade da MPO no sedimento ressuspendido foi testada medindo a variação da absorbância a 450 nm usando dicloridrato de o-dianisidina e peróxido de hidrogênio a 1%. Os resultados são apresentados como unidades de MPO/mg de tecido. Uma unidade atividade de MPO (UMPO) foi definida como a conversão de peróxido de hidrogênio a 1 mmol de água ao longo de 1 min a 22 °C.

4.10 Modelo de peritonite

Para o ensaio de modelo de peritonite, os camundongos foram separados em três grupos (n=6) e pré-tratados por via oral com 250 mL de solução salina estéril, ou PLS 1 mg/kg. Uma hora mais tarde, os camundongos foram injetados com 250 µL de carragenana (500 µg/cavidade) na cavidade peritoneal. Camundongos injetados apenas com solução salina foram usados como controle negativo. Após 4 horas os camundongos foram sacrificados e a cavidade peritoneal foi lavada com 1,5 mL de salina tampão fosfato heparinizado (PBS) para colher as células contidas no fluido peritoneal. As contagens de células totais foram realizadas em câmara de Neubauer e contagem diferencial de células (100 células totais) foram realizadas utilizando lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Os resultados são apresentados como o número total de leucócitos ou neutrófilos por mililitro de exsudato peritoneal.

4.11 Medição de IL-1 β e TNF- α

Após o ensaio de peritonite, amostras de fluido peritoneal foram recolhidas e os níveis de IL-1 β e TNF- α foram avaliadas usando um ensaio imunoenzimático ligado à enzima sanduíche (ELISA), como descrito anteriormente (CUNHA *et al.*, 1993). Os

resultados foram expressos como pg/mL de cada citocina por cavidade peritoneal lavada

4.12 Teste de contorção abdominal induzida por ácido acético

O teste de contorção abdominal induzida por ácido acético foi utilizado para avaliar a atividade analgésica (COLLIER *et al.*, 1968) de PLS. Os camundongos (n = 6 por grupo) foram injetados (i.p.) com 0,6% de ácido acético (10 ml/kg de peso corporal), e a intensidade de nocicepção foi quantificada através da contagem do número total de contorções, durante um período de 20 min, incluindo contrações musculares abdominal e extensões da pata (KOSTER; ANDERSON; DE-BEER, 1959). Os animais receberam PLS (1 mg/kg, i.p.) ou solução salina estéril (grupo de controle, 0,9%, p /v) 30 min antes da injeção de ácido acético. Animais injetados com morfina (5 mg/kg, s.c.), administrada 30 minutos antes do ácido acético, foram utilizados como controle de referência.

4.13 Teste da formalina

Este teste, que resulta em uma lesão tecidual local para a pata, tem sido utilizado como um modelo para a dor tônica e dor inflamatória localizada (HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985). Os camundongos (n = 6 por grupo) foram, tratados com PLS (1 mg/kg, i.p.), solução salina estéril (0,9%) ou morfina (5 mg/kg, grupo controle) 30 minutos antes da injeção de formalina. Trinta minutos após o pré-tratamento, vinte microlitros de formalina a 2,5% foram administrados (s.c.) na pata traseira direita (20 µl/pata) dos animais. A quantidade de tempo de lambertura da pata foi registrada de 0 a 5 min (fase 1, neurogênica) e de 20 a 25 minutos (fase 2, inflamatória) após a injeção de formalina (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

4.14 Teste da placa quente

O teste de placa quente é um outro método habitualmente utilizado para medir a atividade analgésica (EDDY; LEINBACK, 1953). Cada camundongo foi colocado

duas vezes sobre uma placa aquecida (51 ± 1 °C), separados por um intervalo de 30 min. O primeiro ensaio tem como objetivo familiarizar os animais com o procedimento de teste, e o segundo ensaio serviu como controle para o tempo de reação (lamber a pata ou saltar). Os animais que apresentaram um tempo de reação maior do que 20 segundos foram excluídos. Após o segundo ensaio, os grupos de animais ($n = 6$) receberam solução salina estéril (0,9%, ip), PLS (1 mg/kg, i.p.), ou morfina (5 mg/kg, s.c.; controle de referência). Os tempos de reação dos animais sobre a placa quente foram medidos no tempo zero (0 hora) e aos 30, 60, 90, e 120 minutos após a administração dos compostos, com um tempo de corte de 45 segundos, para evitar lesões na pata.

4.15 Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média \pm E.P.M. Para todos os experimentos, foi realizada análise de variância seguida de testes de Newman-Keuls; $p < 0,05$ foi definido como estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração e rendimento

Neste estudo, foi realizada uma extração de polissacarídeos sulfatados através de digestão enzimática. Foi obtido 1,83 g de PLS a partir de 5 g de massa seca da alga *Gracilaria intermedia*, correspondendo a um rendimento de 36,7%. Este rendimento se assemelha a valores encontrados para outras algas do gênero *Gracilaria* com diferentes métodos de extração, cujo rendimento variou aproximadamente entre 10 e 40%, conforme aponta a Tabela 1.

Tabela 1. Rendimento de polissacarídeos obtidos de algas vermelhas do gênero *Gracilaria*.

Alga		Rendimento (%)
<i>Gracilaria birdiae</i>	(a)	6,50
<i>Gracilaria blodgettii</i>	(b)	26,20 - 37,00
<i>Gracilaria caudata</i>	(h)	32,80
<i>Gracilaria cervicornis</i>	(b)	39,30
<i>Gracilaria chilensis</i>	(j)	40,00
<i>Gracilaria córnea</i>	(c)	21,40
<i>Gracilaria corticata</i>	(d)	21,80
<i>Gracilaria corticata</i>	(e)	9,50 – 16,00
<i>Gracilaria crassa</i>	(e)	12,00 – 23,00
<i>Gracilaria crassissima</i>	(b)	13,10 – 30,00
<i>Gracilaria edulis</i>	(f)	10,90
<i>Gracilaria dura</i>	(g)	32,00-35,00
<i>Gracilaria debilis</i>	(i)	14,80
<i>Gracilaria fisheri</i>	(f)	13,30
<i>Gracilaria gracilis</i>	(k)	36,80

Fonte: (a) Maciel *et al.*, 2008; (b) Freile-Pelegrín, Murano, 2005; (c) Melo, *et al.*, 2002; (d) Adriamanantoanina, Chambat, Rinaudo, 2007; (e) Meena, *et al.*, 2008; (f) Praiboon *et al.*, 2006. (g) Marinho-Soriano, Bourret, 2005, (h) Barros *et al.*, 2013; (i) Mehta *et al.* 2010; (j) Tello-Ireland *et al.*, 2011; (k) Skriptsova, Nabivailo, 2009.

A espécie de alga, a metodologia empregada para a extração de seus polissacarídeos, fatores fisiológicos, estágio de vida, variações sazonais e mesmo o local de origem dos espécimes são fatores que podem afetar o rendimento e estrutura do polissacarídeo. (MARINHO-SORIANO; BOURRET 2003.; ROMERO; VILLANUEVA; MONTAÑO, 2008). Esses fatores, especialmente variação sazonal e metodologia de extração, podem explicar a diferença de rendimento obtido nesse estudo para a o rendimento de extração enzimática por papaína (18%) obtida por Castro (2014) para *G. intermedia* coletada no período de março/2013. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que *G. intermedia* é uma alga que apresenta alto rendimento na extração enzimática de polissacarídeos.

5.2 Análise química

O teor de galactose do PLS liofilizado de *G. intermedia* foi de 67,5%. Os teores de carboidratos encontrados são próximos aos percentuais de D-galactose encontrados em outras algas do gênero *Gracilaria*. Em frações polissacarídicas da alga *Gracilaria birdiae*, Brasil, foram encontrados teores de açúcares entre 30,8 e 68,2% (VANDERLEI *et al.*, 2011). Amorim *et al.* (2012) realizaram o teste fenol sulfúrico em diferentes frações de *Gracilaria ornata*, Brasil, e encontraram teores de açúcares variando entre 33,14 e 62,20%. A quantidade de galactose obtida foi maior que a obtida por Castro (2014) (56,64%) para polissacarídeos obtidos através de extração enzimática de espécimes de *G. intermedia* coletados na praia da Taíba, município de São Gonçalo, em abril/2013. Esta variação na quantidade de compostos entre uma mesma espécie pode ser decorrente de variações sazonais ou geográficas (PEREIRA *et al.*, 2005).

As leituras de absorvância de proteínas das soluções contendo PLS ficaram abaixo do poder de detecção do aparelho utilizado, demonstrando que o material obtido pela extração possui apenas traços de proteínas.

5.3 Espectroscopia de infravermelho

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho é uma técnica bastante útil para a elucidação de estruturas de compostos químicos e é uma das

técnicas mais úteis para a identificação de componentes estruturais em polissacarídeos (PEREIRA *et al.*, 2011). O espectro infravermelho de um composto químico é bastante característico para a molécula em questão e pode ser utilizado como assinatura química da mesma. Por isso, a espectroscopia na região do infravermelho possui extensa aplicação na identificação de compostos químicos (SOLOMONS, 2001). Também é bastante utilizada por ser uma técnica que necessita de pequenas quantidades de amostra (miligramas) e por ser um método não agressivo, com alta confiabilidade. Em polissacarídeos sulfatados de algas vermelhas, as bandas do espectro de FT-IR podem ser utilizadas para distinguir algas produtoras de carragenanas e agaranas (ORDOÑEZ; RUPEREZ, 2011).

A Figura 4 mostra os espectros na região do infravermelho de PLS expandidos na região de bandas entre 1400 e 700 cm^{-1} para melhor identificar os grupos sulfatados presentes. A Tabela 2 indica as atribuições dadas aos picos obtidos.

O espectro de infravermelho do PLS apresentou perfis de bandas semelhantes as que são relacionadas aos polissacarídeos de algas. A partir do espectro é possível deduzir que o polissacarídeo é um ágar, devido à presença da banda encontrada a 890 cm^{-1} , correspondente ao grupo dos ágares (MOLLET; RHAOUI; LEMOINE, 1998). As bandas encontradas em 1376 e 1258 cm^{-1} podem ser atribuídas a grupos éster de sulfato, a baixa intensidade dessas bandas sugere que PLS possui um baixo grau de sulfatação (PRADO-FERNANDEZ *et al.*, 2003; ROCHAS; LAHAYE; YAPHE, 1986).

A banda encontrada em 1071 cm^{-1} refere-se aos esqueletos de galactanas (MOLLET; RAHAOUI; LEMOINE, 1998. PRADO-FERNANDEZ *et al.*, 2003). A banda a 933 cm^{-1} refere-se ao grupo de COO presente na 3, 6-anidrogactose e as bandas encontradas em 819 e 869 cm^{-1} indica a presença de grupos sulfatados, galactose-6-sulfato e galactose-4-sulfato, respectivamente (CHOPIN; WHALEN, 1993). Estes resultados estão de acordo com estudos realizados com polissacarídeos extraídos de *G. intermedia* (CASTRO, 2014).

O polissacarídeo de *G. intermedia* não apresentou nenhum sinal resolvido em 845, 830 e 805 cm^{-1} indicando a ausência de sulfatação em C-4 e C-2 dos resíduos de D-galactose. Esse padrão de sulfatação já foi encontrado em outras espécies do gênero *Gracilaria* (MURANO, 1995; MONTANO; VILLANUEVA; ROMERO, 1999; MOLLET; RHOUI; LEMOINE, 1998).

Figura 4. Espectros FT-IV em pastilhas de KBr dos Polissacarídeos de *Gracilaria intermedia* na região e número de onda de 1400 – 700

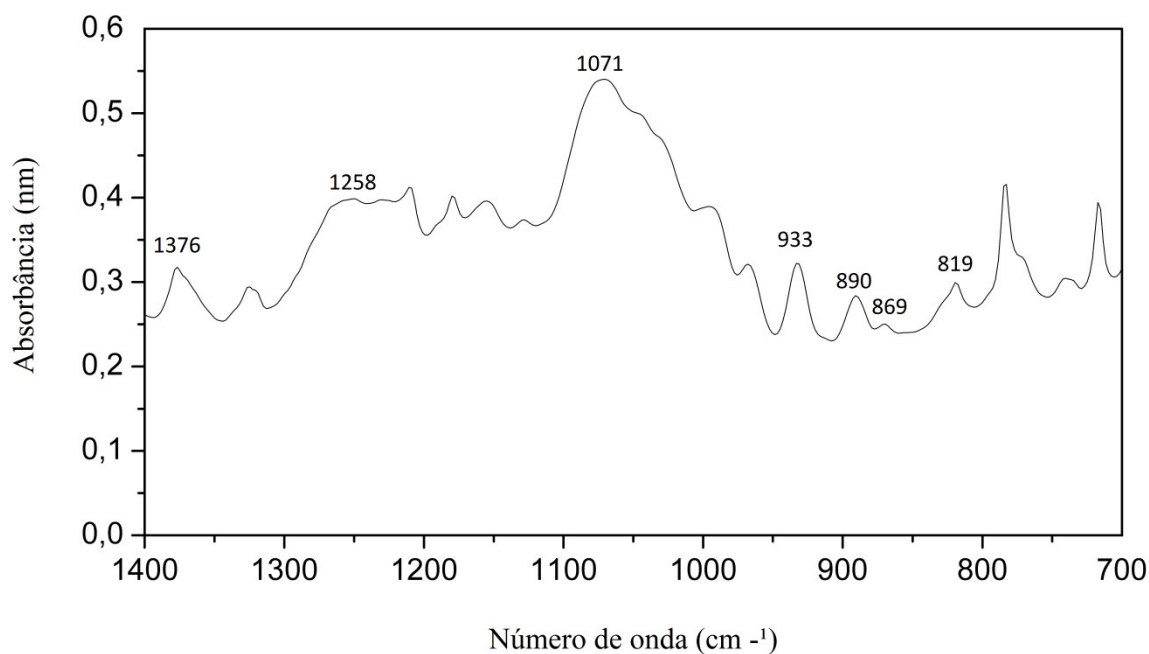


Tabela 2. Atribuições aos picos obtidos em experimentos de infravermelho.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuições	Referência
1376, 1258	Éster Sulfato	ab
1258	O = S = O (estiramento assimétrico)	abc
1071	Esqueleto de galactanas (C - O + C - OH)	ad
933	C - O - C de 3,6-anidrogactose	abc
890	Banda específica do ágar	d
869	Galactose-4-sulfato	e
819	Galactose-6-sulfato	abc

Fonte: (a) PRADO-FERNADÉS *et al.*,2003. (b) ROCHAS; LAHAYE; YAPHE, 1986. (c) CHOPIN; HALEN, 1993. (d) MOLLET; RAHAOUI, LEMOINE, 1998. (e) CHOPIN ; KERIN ; MEZEROLLE, 1999.

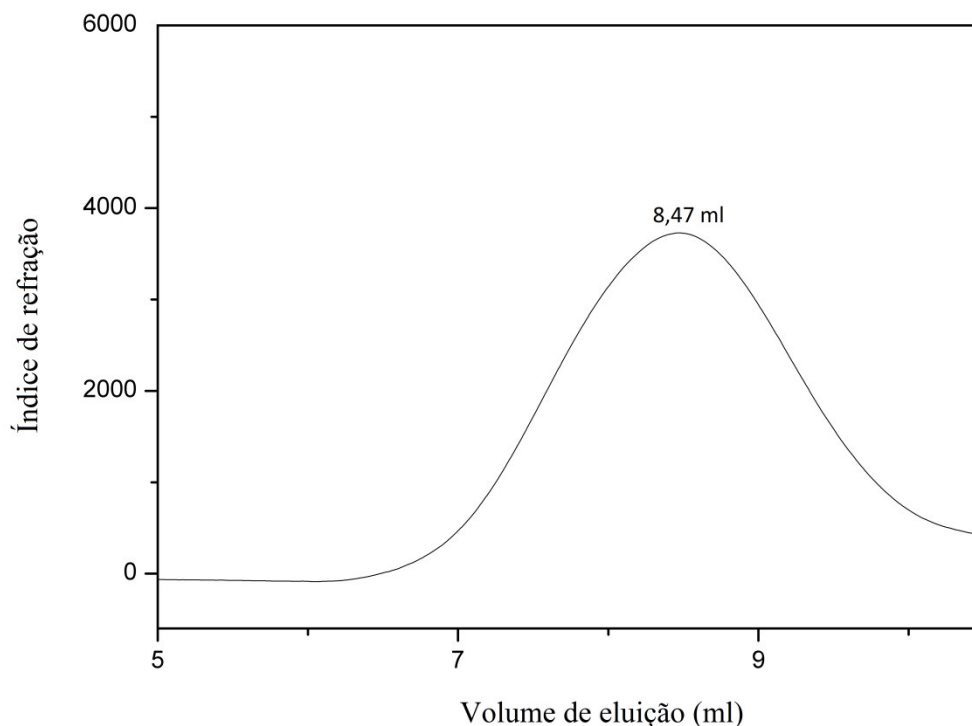
5.4 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Polissacarídeos naturais são polímeros que não apresentam massas molares precisamente definidas, e sim, massas molares médias. Isso se deve ao fato destes compostos geralmente serem polidispersos, apresentando uma distribuição de espécies moleculares quase idênticas em estrutura, com variação apenas no tamanho da cadeia.

A distribuição de massas molares dos polissacarídeos extraídos de *G. intermedia* foi estimada através de Cromatografia de Permeação em Gel (GPC). Para construção da curva de calibração foram utilizados polímeros lineares, homopolissacarídeos lineares isolados do fungo *Aureobasidium pullulans* (LEATHERS 2003) de diferentes massas molares, em intervalo de grandeza de 10^3 a 10^6 g/mol.

O perfil cromatográfico do PLS é apresentado na figura 5. PLS apresentou um perfil polidisperso, característico de polissacarídeos naturais. O cromatograma mostra um único pico, comportando-se como um sistema homogêneo, com volume de eluição de 8,47 mL no seu ápice. A massa molar do pico foi estimada em $4,1 \times 10^5$ g/mol ou 410 kDa. Valores elevados para peso molecular são comuns em polissacarídeos sulfatados de algas marinhas devido ao grupamento de cadeias polissacarídicas (POMIN, 2010). Souza *et al.* (2012) encontraram valores de 350 kDa para polissacarídeos sulfatados extraídos de *Gracilaria birdiae* e polissacarídeos de *Gracilaria lemaneiformis* foram caracterizados possuindo valores de peso molecular de 1370 kDa (FAN *et al.*, 2012)

Figura 5. Perfil cromatográfico do PLS extraído da alga *Gracilaria intermedia* em cromatografia de permeação em gel.



5.5 Atividade anti-inflamatória de PLS em edema de pata induzido por carragenana

As algas marinhas apresentam um grande potencial como fonte de compostos naturais para o desenvolvimento de novas drogas. Dos compostos derivados de algas marinhas, os polissacarídeos sulfatados, em especial, apresentam um enorme potencial como fonte de princípios ativos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de inflamação (CHEN *et al.*, 2007; GROTH *et al.*, 2009).

A formação do edema de pata no modelo inflamatório induzido pela injeção de carragenana, em camundongos, é bifásico. A primeira fase deste modelo ocorre aproximadamente uma hora após o estímulo inflamatório e consiste no aumento da permeabilidade vascular através da ação de mediadores inflamatórios como histamina e serotonina (NIAZI *et al.*, 2009). A segunda fase do edema ocorre aproximadamente 3 h após o tratamento e é caracterizada por uma infiltração de granulócitos no sítio de inflamação, induzindo a produção de vários mediadores pró-

inflamatórios, como citocinas (TNF- α , IL-1 β), óxido nítrico e prostaglandinas (HAJARE *et al.*, 2001; DÉCIGA-CAMPOS *et al.*, 2007; POSADAS *et al.*, 2004; GILLIGAN *et al.*, 1994). Portanto, foi avaliada a atividade anti-inflamatória de PLS nas duas fases do modelo experimental clássico de edema de pata induzido por carragenana, com medições entre 1, 2, 3 e 4 horas.

A tabela 3 resume os efeitos de PLS no edema de pata induzido por carragenana nos tempos medidos. A injeção de carragenana (500 μ g/pata) induziu um aumento significativo no volume da pata em todos dos intervalos de tempo especificados ($p < 0,05$) em comparação ao grupo tratado apenas com salina, comprovando a eficácia do agente inflamatório. Nos estágios iniciais de formação do edema (1 e 2 horas após a administração do estímulo inflamatório), apenas PLS 1mg/kg apresentou redução significativa do edema ($p < 0,05$). Nos tempos de 3 e 4 horas após a administração do estímulo inflamatório, uma redução significativa ($p < 0,05$) do edema foi observada em todos os grupos que receberam pré-tratamento com PLS antes da administração do estímulo inflamatório, esta redução do volume de edema ocorreu de modo dose-dependente nas concentrações de PLS 0,1, 0,3 e 1 mg/kg.

O efeito máximo induzido pela administração de PLS, em doses de 0,1, 0,3 e 3 mg/kg, foi observada na terceira hora, com taxas de inibição de 48,01%, 46,2% e 67,0%, respectivamente, em comparação aos animais que receberam apenas carragenana. O efeito anti-inflamatório máximo de PLS foi induzido pela administração de PLS a 1 mg/kg na segunda hora, com uma taxa de inibição de 82,35%. A dose mais eficaz em todos os tempos medidos foi de 1 mg/kg e esta dose foi, portanto, escolhida para posterior avaliação, incluindo o dos seus efeitos sobre o edema da pata induzido por diferentes agentes inflamatórios, dosagem de mieloperoxidase, peritonite induzida por carragenana, e atividade antinociceptiva.

Tabela 3. Efeito do PLS de *G. intermedia* no modelo de edema de pata induzido por Carragenana (Cg). Antes de receber a injeção de Cg (100 µL; 500 µg pata-1; s.c.), animais receberam PLS de *G. intermedia* (0,1 0,3, 1 e 3 mg/kg; s.c.). Os outro grupo receberam apenas salina estéril sem Cg ou apenas Cg. Os dados são expressos como média ± e.p.m. de 6 animais por cada grupo. *p<0,05 indica diferença significativa para o grupo salina e #p<0,05 indica diferença significativa para o grupo Cg.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Edema de pata (ml)			
		1h	2h	3h	4h
Salina		0.018±0.002	0.013±0.004	0.018±0.007	0.020±0.006
Controle (Cg)		0.048±0.009*	0.068±0.007	0.106±0.010	0.091±0.009
			*	*	*
PLS	0.1	0.032±0.007 (33.3%)	0.072±0.016 (-5.88%)	0.055±0.005# (48.1%)	0.050±0.011# (45.0%)
	0.3	0.032±0.002 (33.3%)	0.056±0.007 (17.6%)	0.057±0.002# (46.2%)	0.055±0.006# (39.5%)
	1	0.012±0.007# (75.0%)	0.012±0.009# (82.35%)	0.031±0.007# (70.7%)	0.030±0.007# (67.0%)
	3	0.028±0.008 (41.6%)	0.035±0.005# (48.52%)	0.035±0.005# (67.0%)	0.033±0.007# (63.7%)

Os dados obtidos estão de acordo com os de outros estudos em que foram relatados efeitos anti-inflamatórios de polissacarídeos extraídos de algas marinhas reduzindo inflamação induzida por carragenana (BRITO *et al.*, 2013 e DAMASCENO *et al.*, 2013). Siqueira *et al.* (2010), avaliando o efeito anti-inflamatório de um polissacarídeo da alga marinha parda *L. variegata*, verificaram que o pré-tratamento com esse polissacarídeo na dose de 1mg/kg inibiu em 47% (0.48 ± 0.04 mL) o edema de pata na segunda hora quando induzido por carragenana. O extrato polissacarídico total das algas marinhas vermelhas *Gracilaria cornea* e *Digenea simplex* também mostrou-se capaz de reduzir (p<0,05) o edema de pata de modo dose-dependente quando induzido por Cg (COURA *et al.* 2012; PEREIRA *et al.*, 2014).

Os resultados obtidos demonstram que PLS foi capaz de reduzir o edema de pata provocado por carragenana nas duas fases da inflamação (antes e após 3h), apresentando um alto efeito anti-inflamatório se comparado a outros polissacarídeos sulfatados de algas marinhas vermelhas. Portanto, é possível sugerir que o mecanismo de ação anti-inflamatória de PLS possa envolver a inibição de mediadores de inflamação e migração de neutrófilos. O mecanismo de inibição do edema nas duas fases foi posteriormente investigado através de testes com modelo de edema de pata induzido por diferentes agentes anti-inflamatórios e modelo de peritonite induzida por carragenana.

5.6. Efeito de PLS sobre o edema da pata induzido por diferentes agentes inflamatórios

O mecanismo de ação da carragenana no modelo de edema de pata é bem conhecido, e sabe-se que a fase inicial é principalmente mediada pela liberação de histamina e serotonina. Para avaliar melhor o mecanismo de ação de PLS em edema de pata, foram realizados testes com edema induzido por diferentes agentes inflamatórios.

O edema de pata induzido por dextrana ocorre principalmente devido à indução da desgranulação de mastócitos, acarretando na liberação de histamina e serotonina. Estes mediadores pró-inflamatórios são substâncias com alto poder de vasodilatação e podem provocar um aumento da permeabilidade vascular. Com isso, o fluido edematoso formado pela injeção de dextrana contém poucas proteínas e alguns neutrófilos, semelhante à fase inicial do edema de pata provocado por carragenana em camundongos (METCALFE, 2008; GUPTA *et al.*, 2003; CHEN *et al.* 1995 e VINEGAR *et al.*, 1987 LINARDI *et al.*, 2000; SKIDMORE; WHITEHOUSE, 1967).

A inflamação induzida por composto 48/80 também envolve desgranulação de mastócitos, liberação de histamina e serotonina e posterior aumento da permeabilidade vascular, formando um edema com características semelhantes ao induzido por dextrana (MALING, 1974). A inibição da desgranulação de mastócitos é um importante indicador para avaliar a eficácia de potenciais drogas anti-inflamatórias (MAZZARI *et al.* 1996; WEISCHER 1975). Portanto, a hipótese de que

parte da ação anti-inflamatória de PLS envolve a inibição de mediadores da inflamação foi avaliada medindo o seu efeito sobre edema de pata provocado por dextrana, composto 48/80, histamina e serotonina.

Em comparação aos animais tratados com a solução salina de controle, os animais tratados com os diferentes agentes inflamatórios apresentam um acentuado aumento no volume da superfície subplantar da pata posterior ($p < 0,05$) (Figuras. 6, 7, 8 e 9), o que indica a eficácia dos agentes pró-inflamatórios utilizados. A injeção de PLS (1 mg/kg) reduziu significativamente o edema induzido por agentes flogísticos durante todos os cursos de tempo testados. Aos 30 min, o ponto de tempo do efeito de pico em todos os agentes testados, PLS inibiu o volume do edema de pata de animais tratados com dextrana, composto 48/80, histamina e serotonina em 41,9%, 40,0%, 34,0% e 52,0% respectivamente.

Figura 6. Efeito do PLS de *G. intermedia* no edema de pata induzido por dextrana em ratos. Os dados estão expressos como média \pm s.e.m. de seis ratos para cada grupo. * $P < 0,05$ indica diferença significativa entre o grupo dextrana e # $P < 0,05$ indica diferença significativa entre o grupo salina.

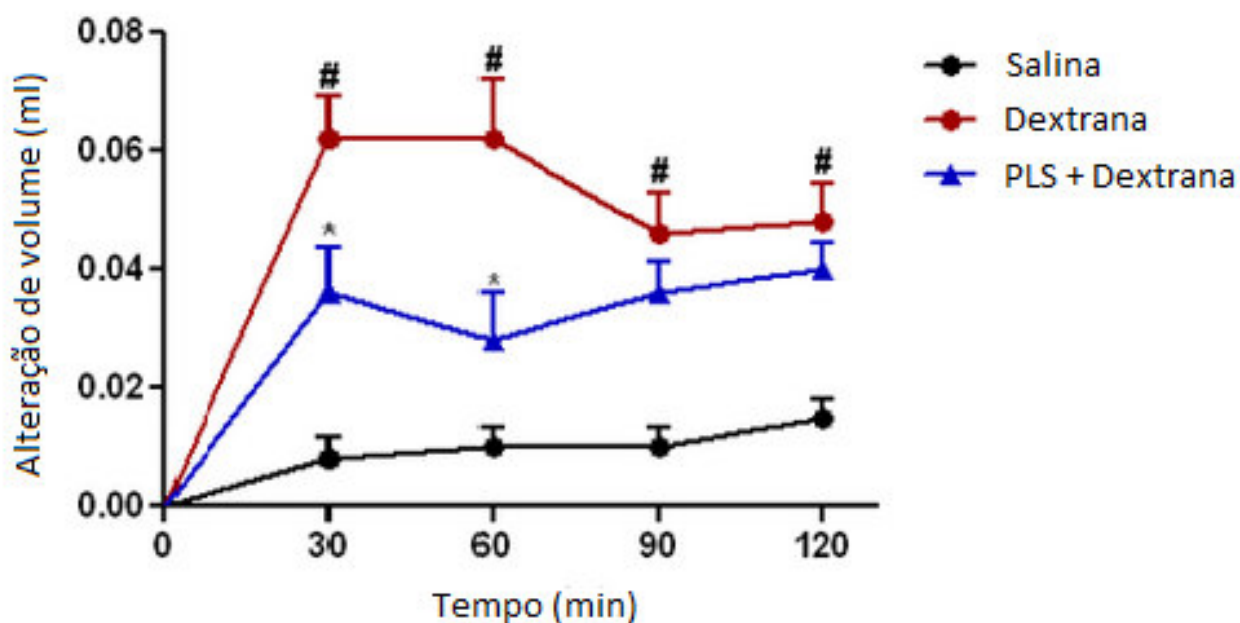


Figura 7. Efeito do PLS de *G. intermedia* no edema de pata induzido por 48/80 em ratos. Os dados estão expressos como média \pm s.e.m. de seis ratos para cada grupo. * P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo 48/80 e # P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo salina.

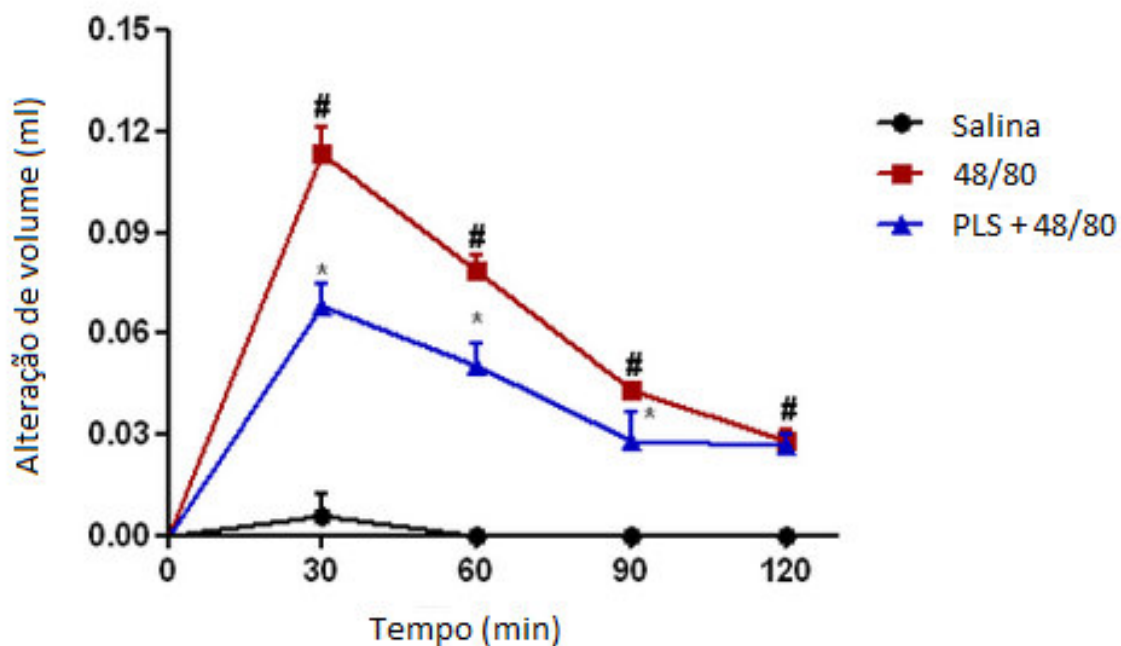


Figura 8. Efeito do PLS de *G. intermedia* no edema de pata induzido por histamina em ratos. Os dados estão expressos como média \pm s.e.m. de seis ratos para cada grupo. * P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo histamina e # P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo salina.

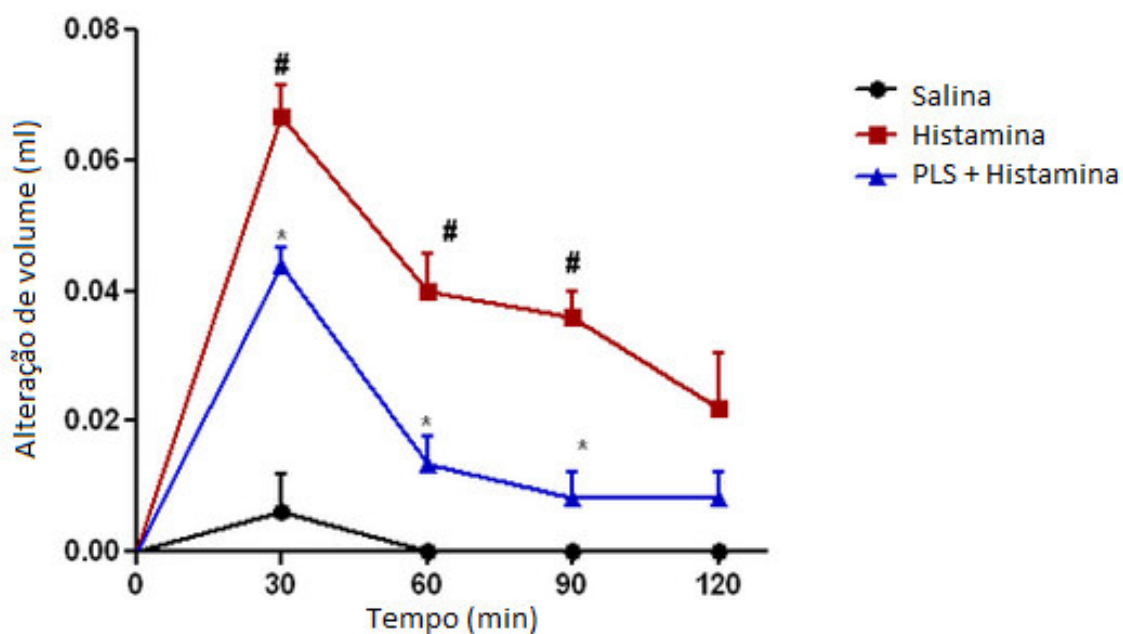
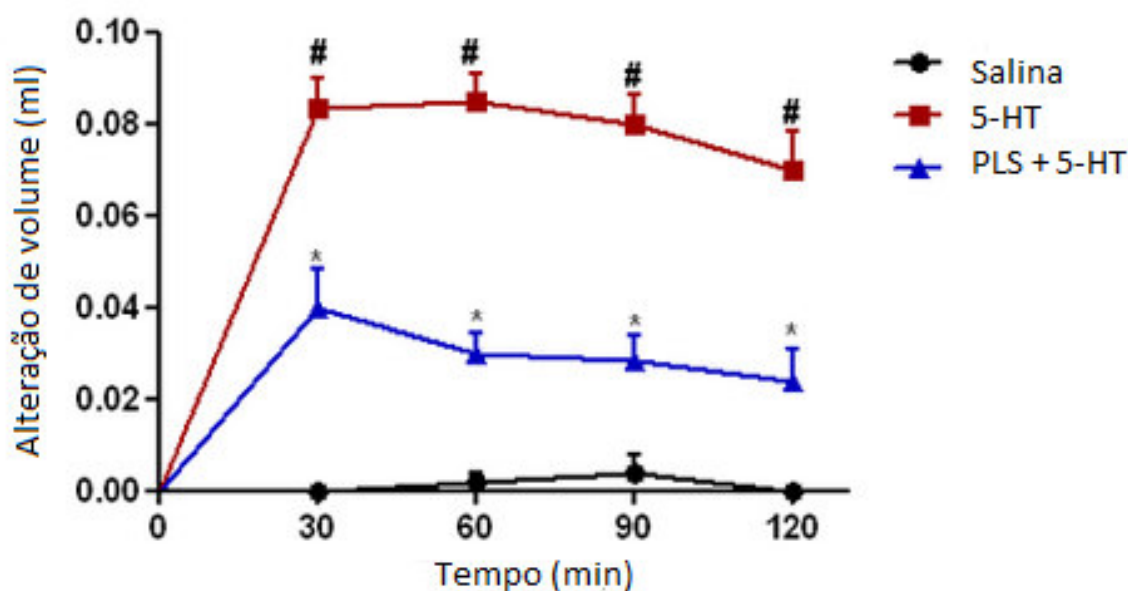


Figura 9. Efeito do PLS de *G. intermedia* no edema de pata induzido por serotonina (5-HT) em ratos. Os dados estão expressos como média \pm s.e.m. de seis ratos para cada grupo. * P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo 5-HT e # P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo salina.



Um estudo com polissacarídeos sulfatados isolados da alga vermelha *Solieria filiformis* mostra que o composto também foi capaz de reduzir o edema de pata induzido por dextrana na concentração de 1 mg/kg, com uma redução de 38,57% do edema (ARAÚJO et al., 2011). Pereira et al. (2014) encontrou valores similares de inibição de edema provocado por serotonina e histamina com polissacarídeos sulfatados extraídos a partir da alga vermelha *Digenea simplex*, em concentração de 60 mg/kg, sugerindo que a ação anti-inflamatória deste polissacarídeo pode atuar na inibição de mediadores inflamatórios específicos e modulação da migração de neutrófilos para o tecido inflamado.

Portanto, a partir dos resultados do efeito inibitório de PLS em edemas de pata provocados por dextrana, composto 48/80, serotonina e histamina, é possível sugerir que o mecanismo de ação anti-inflamatória deste composto atue através da alteração do componente vascular do edema, possivelmente agindo como uma barreira física, inibindo mediadores inflamatórios, interferindo assim no estabelecimento da fase inicial do processo inflamatório.

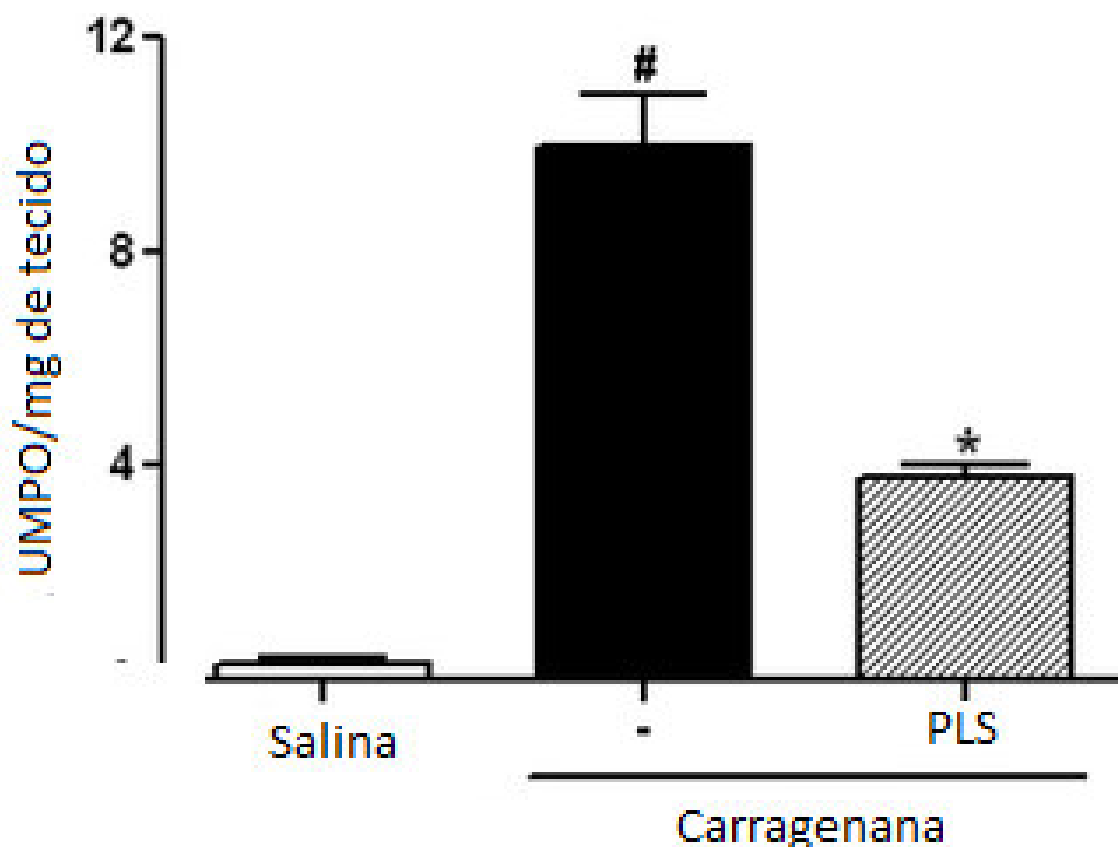
5.7 Efeito de PLS na atividade da mieloperoxidase induzida por carragenana no tecido da pata do rato

A segunda fase da resposta inflamatória induzida pela carragenana no tecido da pata é conhecida por ser acompanhada de alta produção de prostaglandina, com posterior liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β) e infiltração de neutrófilos no local da inflamação (POSADAS et al., 2004; DE SMET, 1997; SOUZA et al., 1988). A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, por isso, a medição do nível de atividade da mieloperoxidase é uma ferramenta bastante útil e comumente utilizada para medir o nível de infiltração de neutrófilos em tecidos que sofreram processos inflamatórios (LORIA, 2008; VLASOVA; SOKOLOV; ARNHOLD, 2012).

Também é demonstrado que a inibição de mieloperoxidase é um importante indicador de atividade anti-inflamatória (CHAVES et al., 2013). Portanto, a hipótese de que parte do mecanismo de ação anti-inflamatória de PLS envolve a redução da migração de neutrófilos da resposta inflamatória induzida por carragenana foi avaliada através da medição da atividade da mieloperoxidase.

Como mostrado na Figura 10, foi detectada atividade da mieloperoxidase no tecido. Após o tratamento com estímulos inflamatórios, houve um aumento significativo na atividade de MPO foi encontrado nos animais tratados apenas com carragenana, comparado com os animais tratados apenas com salina (9.97 ± 0.93 UMPO/mg contra 0.30 ± 0.11 UMPO/mg de tecido). Entretanto, o pré-tratamento com PLS (1 mg/kg) reduziu significativamente ($P < 0.05$) a atividade de MPO em tecido da pata (3.81 ± 0.22 UMPO/mg de tecido).

Figura 10 Atividade da mieloperoxidase (MPO) no sobrenadante do homogenato das seções da pata administrada com Carragenana (Cg), PLS de *G. intermedia* (1 mg/kg ou salina estéril (s.c.)), expressa em unidade de MPO/mg de tecido. Os dados estão expressos como média \pm s.e.m. de seis ratos para cada grupo. * P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo carragenana #P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo salina



Outros polissacarídeos de algas vermelhas também apresentam capacidade de reduzir os níveis de MPO em edema de pata induzido por carragenana. Pereira et al. (2014) observou redução do nível de MPO, com polissacarídeos sulfatados extraídos a partir da alga vermelha *Digenea simplex*, em concentração de 60 mg/kg e Coura et al. (2012) obteve resultados semelhantes com polissacarídeos em concentrações de 3, e 9 mg/kg.

Uma vez que os níveis de atividade de MPO em animais tratados com PLS foram menores do que os dos animais tratados com apenas carragenana, é plausível que a atividade anti-inflamatória de PLS envolva, em parte, a inibição da migração de neutrófilos para o local da inflamação.

5.8 Efeito anti-inflamatório de PLS em peritonite induzida por carragenana em ratos

A migração de leucócitos para o tecido lesado é um aspecto importante do processo inflamatório (PEREZ et al., 2013). O modelo de peritonite induzida por carragenana é uma ferramenta farmacológica bastante utilizada para a avaliação de migração de neutrófilos e teste de drogas anti-inflamatórias, pois permite a quantificação de células e é um modelo sensível à ação de drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (MONTANHER, et al. 2007; BROOKS; DAY, 1991). Portanto, a hipótese de que o efeito anti-inflamatório de PLS está relacionado com uma redução da infiltração de neutrófilos para o local da inflamação, foi averiguada em um modelo experimental de peritonite em camundongos.

Em relação aos animais tratados apenas com solução salina na cavidade peritoneal, os camundongos tratados com a administração intraperitoneal de carragenana apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) na contagem de leucócitos totais (10.41 ± 1.03 contra $3.01 \pm 0.40 \times 10^3$ cel/ml) e na contagem de neutrófilos totais (8.63 ± 0.69 contra $1.46 \pm 0.15 \times 10^3$ cel/ml) presentes no fluido peritoneal (Figuras 11 e 12), comprovando a eficácia do agente pró-inflamatório. O pré-tratamento dos animais com PLS a 1 mg/kg reduziu significativamente ($p < 0,05$) a migração de leucócitos totais ($4.02 \pm 0.38 \times 10^3$ cel/ml) e a migração de neutrófilos ($2.34 \pm 0.35 \times 10^3$ cel/ml) na cavidade peritoneal dos camundongos em relação ao grupo tratado apenas com carragenana, correspondendo a um potencial de inibição de leucócitos e neutrófilos de 61,3% e 72,88%, respectivamente (Figura 11).

Figura 11. Efeito de PLS na migração de leucócitos em peritonite induzida por carragenana. Os camundongos foram administrados com Carragenana (Cg), PLS 1 mg/kg ou salina estéril. Os dados estão expressos como média \pm s.e.m. de seis ratos para cada grupo.* P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo carragenana. #P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo salina.

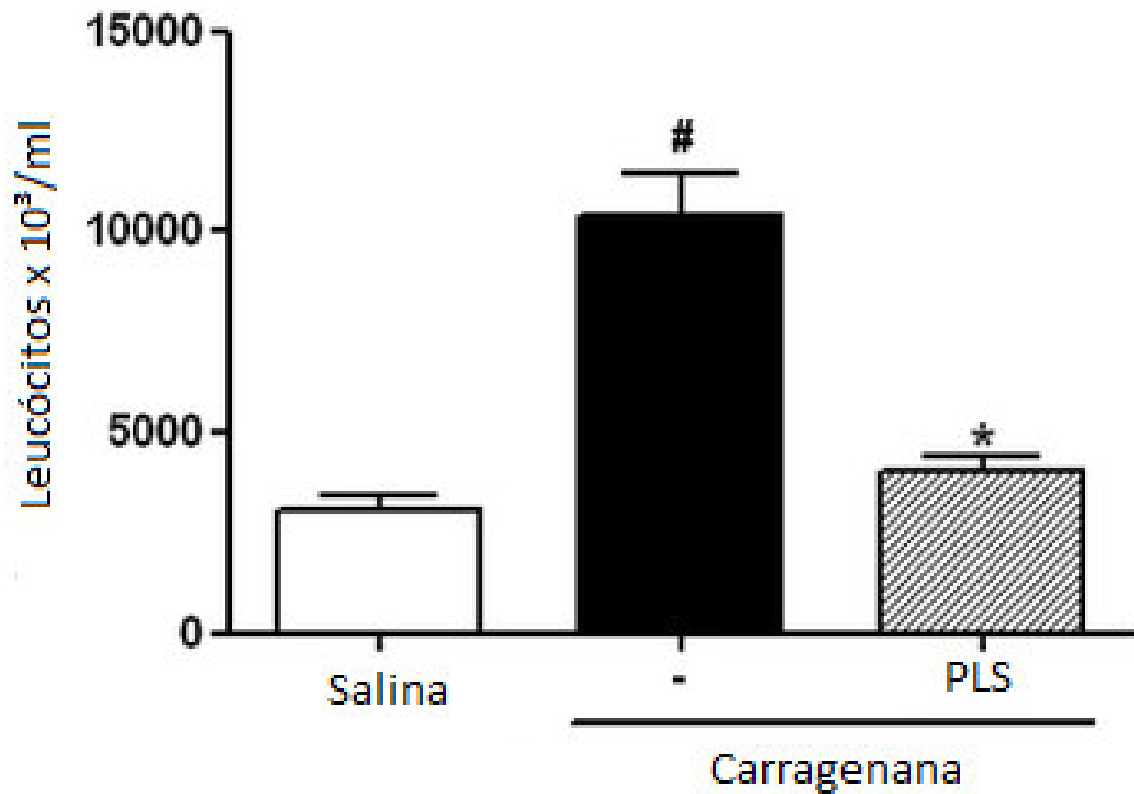
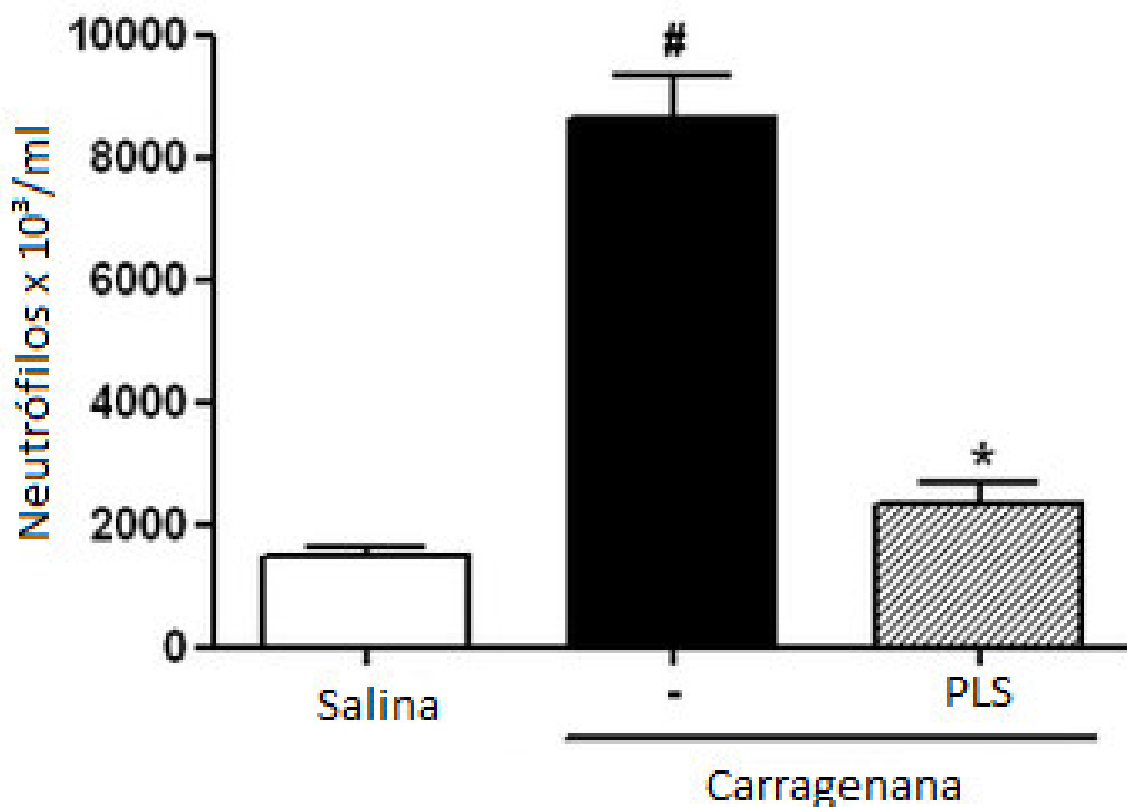


Figura 12. Efeito de PLS na migração de neutrófilos em peritonite induzida por carragenana. Os camundongos foram administrados com Carragenana (Cg), PLS 1 mg/kg ou salina estéril. Os dados estão expressos como média \pm s.e.m. de seis ratos para cada grupo.* P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo carragenana. #P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo salina.



Outros estudos confirmam a capacidade de polissacarídeos de reduzir a migração de leucócitos. Cumashi et al. (2007), estudando polissacarídeos sulfatados de oito espécies de algas marinhas, obtiveram redução de níveis de leucócitos em peritonite causada por carragenana. Polissacarídeos da alga *Caulerpa racemosa* também reduziram os níveis leucocitários, em 56,69% em concentração de 0,1 mg/kg e em 33,96% em 1 mg/kg (RIBEIRO et al. 2014).

Os resultados obtidos indicam que o pré-tratamento com PLS resultou em uma pronunciada redução da quantidade de leucócitos totais e neutrófilos, sugerindo que parte do efeito anti-inflamatório de PLS ocorra através da inibição da migração de leucócitos e infiltração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, possivelmente através da formação de uma barreira física recobrendo o endotélio, interferindo no rolamento e adesão de leucócitos, necessário para o estabelecimento do processo inflamatório.

5.9 Efeito da fração PLS sobre a produção de citocinas induzida por carragenana em exsudato peritoneal

A carragenana induz a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal através de um mecanismo indireto que envolve a ativação de macrófagos, com a subsequente liberação de citocinas pro-inflamatórias, tais como IL-1 β e TNF- α (LORAM, 2007; SOUZA et al. 1888; LO et al., 1982). Este aumento nos níveis de citocinas pode resultar em extravasamento de proteínas do plasma e infiltração celular nos locais de inflamação (ROSENBAUM; BONEY, 1991; THORLACIUS; LINDBOM; RAUD, 1997). Vários estudos mostram os efeitos pró-inflamatórios das citocinas TNF- α e IL-1 β , incluindo a ativação de células inflamatórias, formação de edema e migração de neutrófilos (HADDAD, 2002; HOPKINS, 2003). Portanto, para averiguar o mecanismo de inibição da migração de leucócitos e neutrófilos por PLS, foi avaliado o seu efeito sobre a produção de citocinas induzidas por carragenana.

A resposta inflamatória induzida pela carragenana no modelo de peritonite foi associada com um aumento nos níveis de IL-1 e TNF- α (Figuras 13 e 14). Os níveis das citocinas IL-1 e TNF- α no fluido peritoneal dos camundongos do grupo controle, tratados apenas com solução salina, foram 65.60 ± 48.59 e 46.26 ± 1.56 pg/ml, respectivamente. Os níveis correspondentes de IL-1 e TNF- α foram significativamente ($p < 0,05$) mais elevados nos animais tratados com carragenana (1046 ± 34.53 pg/ml e 162.50 ± 24.09 pg/ml), comprovando a eficácia do agente pró-inflamatório. Os animais tratados com PLS exibiram uma redução significativa ($p < 0,05$) dos níveis de IL-1- β no exsudato peritoneal (653.10 ± 37.93 pg/ml) em relação ao grupo tratado apenas com carragenana, resultando em uma redução de 37,5%. Por outro lado, PLS não exerceu redução significativa nos níveis de TNF- α (164.80 ± 8.31 pg/ml).

Figura 13 Efeito de PLS nos níveis de TNF- α em peritonite induzida por carragenana. Os camundongos foram administrados com Carragenana (Cg), PLS 1 mg/kg ou salina estéril. Os dados estão expressos como média \pm s.e.m. de seis ratos para cada grupo.* P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo carragenana. #P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo salina.

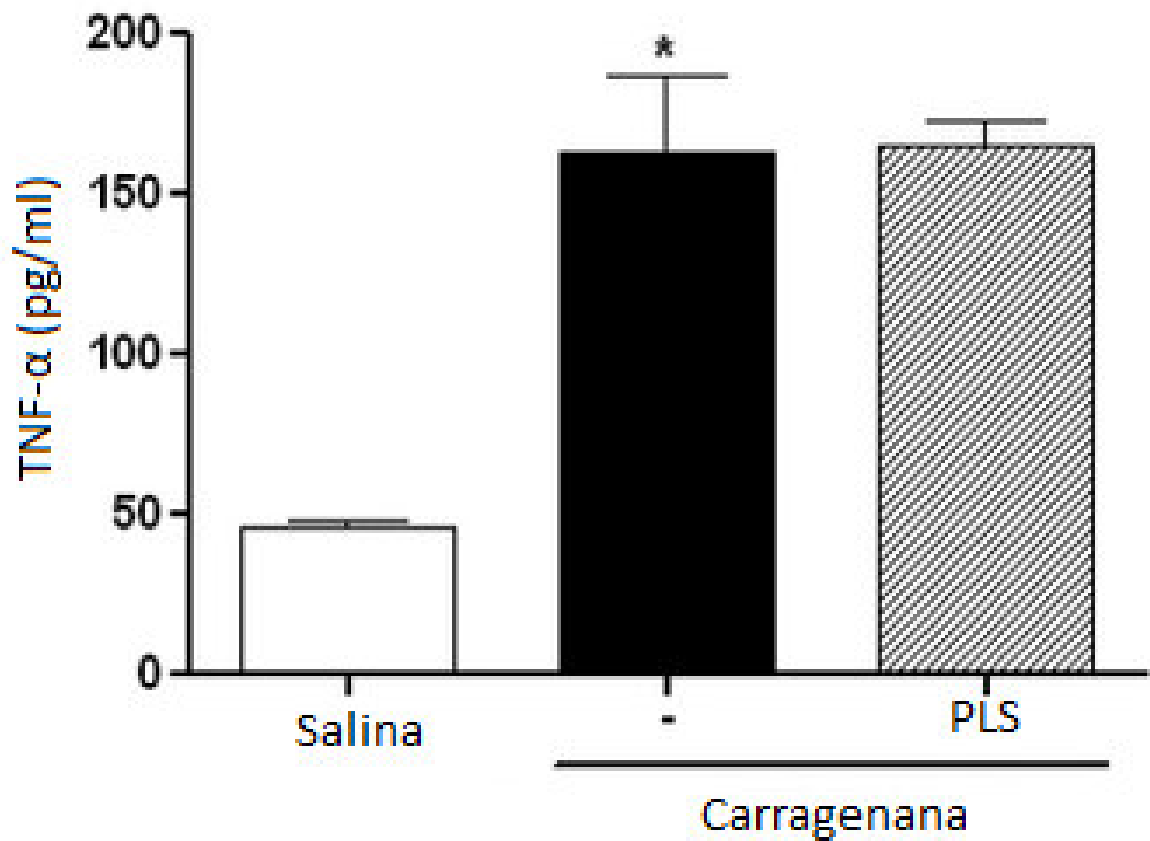
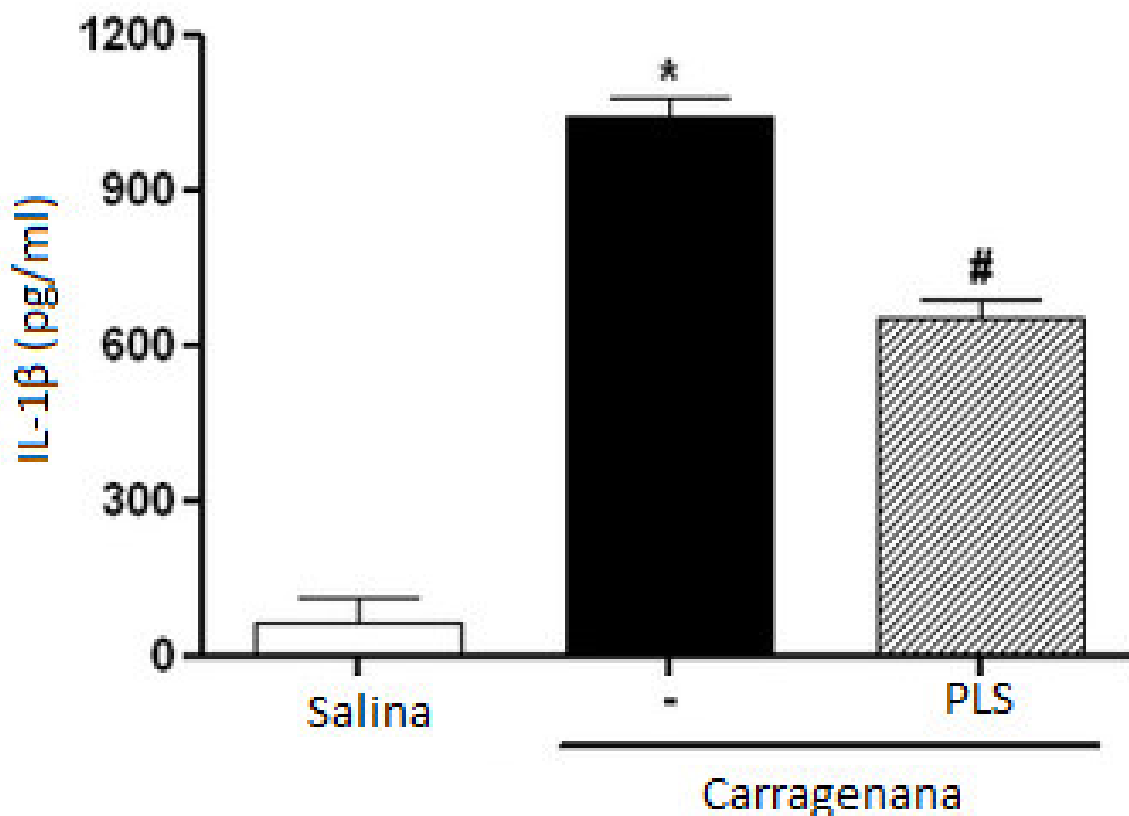


Figura 14 Efeito de PLS nos níveis de IL-1 β em peritonite induzida por carragenana. Os camundongos foram administrados com Carragenana (Cg), PLS 1 mg/kg ou salina estéril. Os dados estão expressos como média \pm s.e.m. de seis ratos para cada grupo.* P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo carragenana. #P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo salina.



Situações onde um composto reduz os níveis de IL-1 β , e não de TNF- α podem ocorrer. Damasceno et al (2014) estudando o composto acetato de carvacrol, um derivado do carvacrol, obtiveram uma redução nos níveis de IL-1 β em peritonite, mas não obtiveram redução dos níveis de TNF- α . Silva et al. (2014) também encontraram resultados similares para o composto myrtenol, em camundongos, sugerindo uma possível inibição da produção de IL-1 β nos sítios inflamatórios.

Com base nesta constatação, é possível sugerir que o mecanismo de redução da migração de neutrófilos para o local da inflamação após pré-tratamento com PLS se deve à diminuição da liberação de IL-1 β nos sítios inflamatórios, essa liberação acarreta em uma redução de extravasamento do plasma celular e de infiltração de células para o local da inflamação.

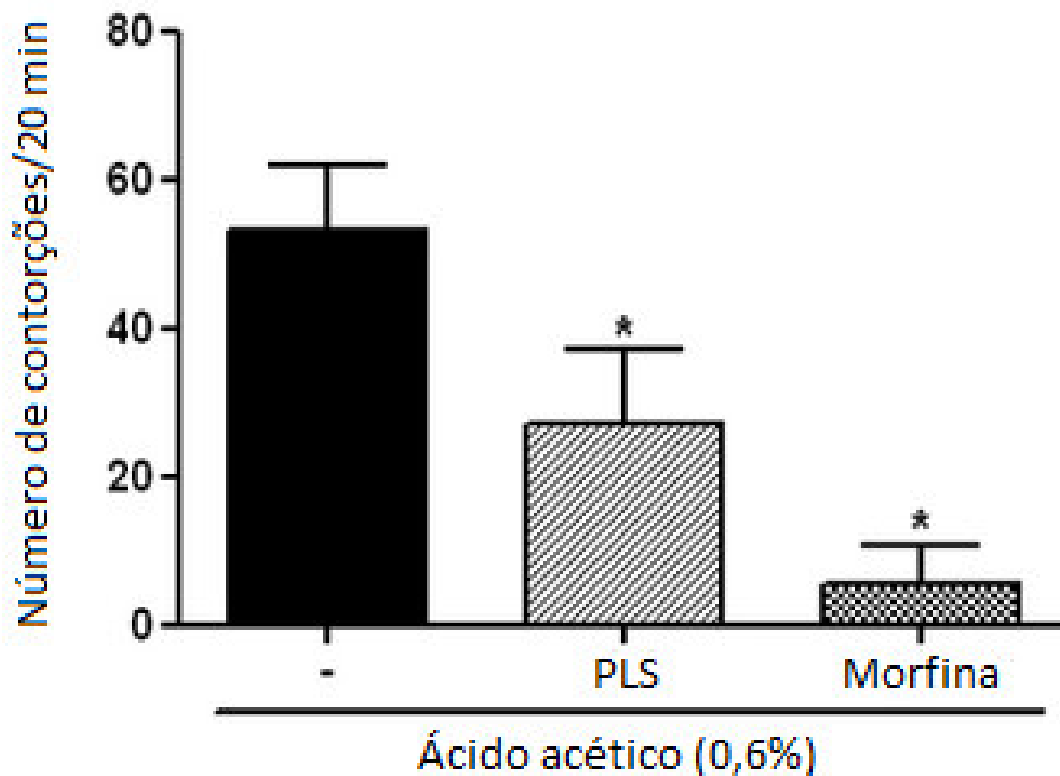
5.10 Efeito antinociceptivo de PLS na contorção induzida por ácido acético

Existe uma associação forte entre o processo de desenvolvimento da dor e o processo inflamatório, pois vários mediadores da inflamação participam da nocicepção, e o primeiro dos cinco sinais clássicos da inflamação é a dor (BITENCOURT et al., 2008). Estudos demonstram que a inibição da migração de neutrófilos e redução de níveis de mediadores pró-inflamatórios, reduzem a hipernocicepção induzida por diferentes estímulos inflamatórios (HOPKINS, 2003 e TJØLSEN; HOLE, 1997).

O teste de contorção é um modelo de dor visceral, comumente usado para a seleção de compostos analgésicos periféricamente ativos. Agentes algogênicos, como o ácido acético, provocam um comportamento de contorção típico em camundongos, caracterizado por contrações abdominais, movimentos do corpo como um todo, e torção dos músculos abdominais dorsais (BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). O ácido acético causa dor através de diferentes mecanismos nociceptivos, tais como liberação de histamina, serotonina, bradicinina, e prostaglandina e também através da liberação de citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β . Este modelo de teste é bastante utilizado devido a sua alta sensibilidade, mas é um modelo não-específico. (SANTOS, 2011; COLLIER et al. 1968; DUARTE; NAKAMURA; FERREIRA, 1988; MIRANDA et al., 2001). Vários estudos recentes têm demonstrado que polissacarídeos extraídos de algas marinhas se mostram como promissores agentes antinociceptivos (BRITO et al., 2013, CHAVES et al., 2013 e DAMASCENO et al., 2013). Assim, o potencial antinociceptivo de PLS foi avaliado usando o modelo de contorção induzida por ácido acético.

A Figura 15 mostra o efeito antinociceptivo de PLS nas contrações abdominais induzidas por ácido acético. A morfina apresentou uma resposta analgésica potente em comparação com a resposta observada em animais de controle, com diferença significativa ($p < 0,05$), comprovando a eficácia da droga. A administração de PLS (1 mg/kg) 30 minutos antes do estímulo doloroso reduziu significativamente a quantidade de contorções abdominais induzidas por ácido acético (48.8% de inibição) em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$).

Figura 15 Efeito de PLS no número de contorções abdominais em teste de contorção induzida por ácido acético. Os camundongos foram administrados com ácido acético, com pré-tratamentos de PLS 1 mg/kg ou morfina. Os dados estão expressos como média \pm s.e.m. de seis ratos para cada grupo.* P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo sem tratamento



Portanto, estes resultados associados com os resultados obtidos nos experimentos de inflamação, sugerem que PLS tem um efeito antinociceptivo, e o mecanismo de redução da contorção ocorre através da inibição do efeito de mediadores inflamatórios e migração de neutrófilos em resposta ao ácido acético. O modelo de contorção induzida por ácido acético é um modelo inespecífico, portanto, para avaliar melhor o mecanismo de ação de PLS na nocicepção a nível de sistema nervoso central e periférico, foram realizados testes de nocicepção em modelos de placa quente e formalina.

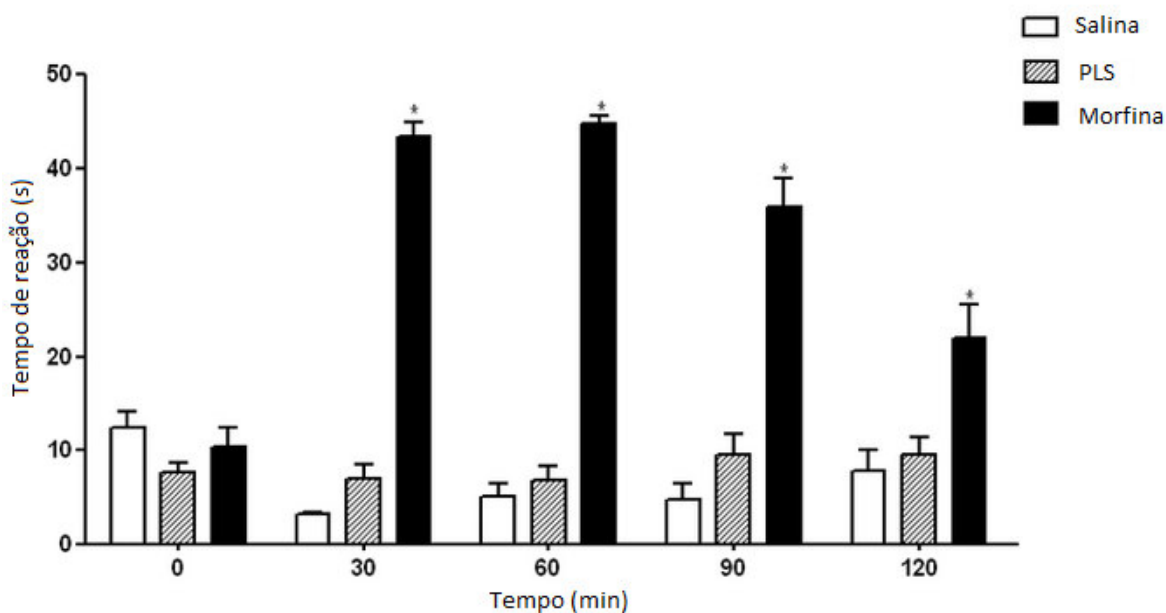
5.11. Efeito antinociceptivo do PLS no teste da placa quente

O teste de efeito antinociceptivo da placa quente é um teste bem conhecido e ajuda a avaliar especificamente a nocicepção central e medir as respostas complexas para inflamação e nocicepção promovidas por agentes opióides. É um teste que apresenta uma resposta rápida e aguda ao estímulo nocivo, através

principalmente da ativação das fibras A δ e C, agindo em nível de sistema nervoso central. (VILELA, 2009; BHANDARE, 2010; TJOLSEN; HOLE, 1997). O aumento do tempo de reação no teste de placa quente indica que o composto apresenta efeitos analgésicos via receptores supra-espinhal e espinhal (NEMIROVSKY, 2001). Fármacos analgésicos que atuam por vias periféricas possuem menos efeitos colaterais comparados a fármacos que atuam através de mecanismos centrais. Portanto, o efeito antinociceptivo de PLS a nível central foi avaliado através do teste de placa quente.

A Figura 16 mostra o efeito antinociceptivo de PLS em animais avaliados no teste da placa quente. A morfina, fármaco de referência e potente agonista de receptores opióides, prolongou significativamente ($p < 0,05$) o tempo de reação em comparação com a resposta observada nos animais do grupo controle, comprovando a eficácia da droga. O pré-tratamento com PLS (1 mg/kg) não foi capaz de prolongar significativamente o tempo de reação ao estímulo térmico em nenhum dos tempos observados (30, 60, 90 e 120 min).

Figura 16 Efeito de PLS nos tempos de reação no teste da placa quente. Os camundongos foram administrados com pré tratamentos com salina, PLS 1 mg/kg ou morfina. Os dados estão expressos como média \pm s.e.m. de seis ratos para cada grupo. * $P < 0,05$ indica diferença significativa entre o grupo carragenana.



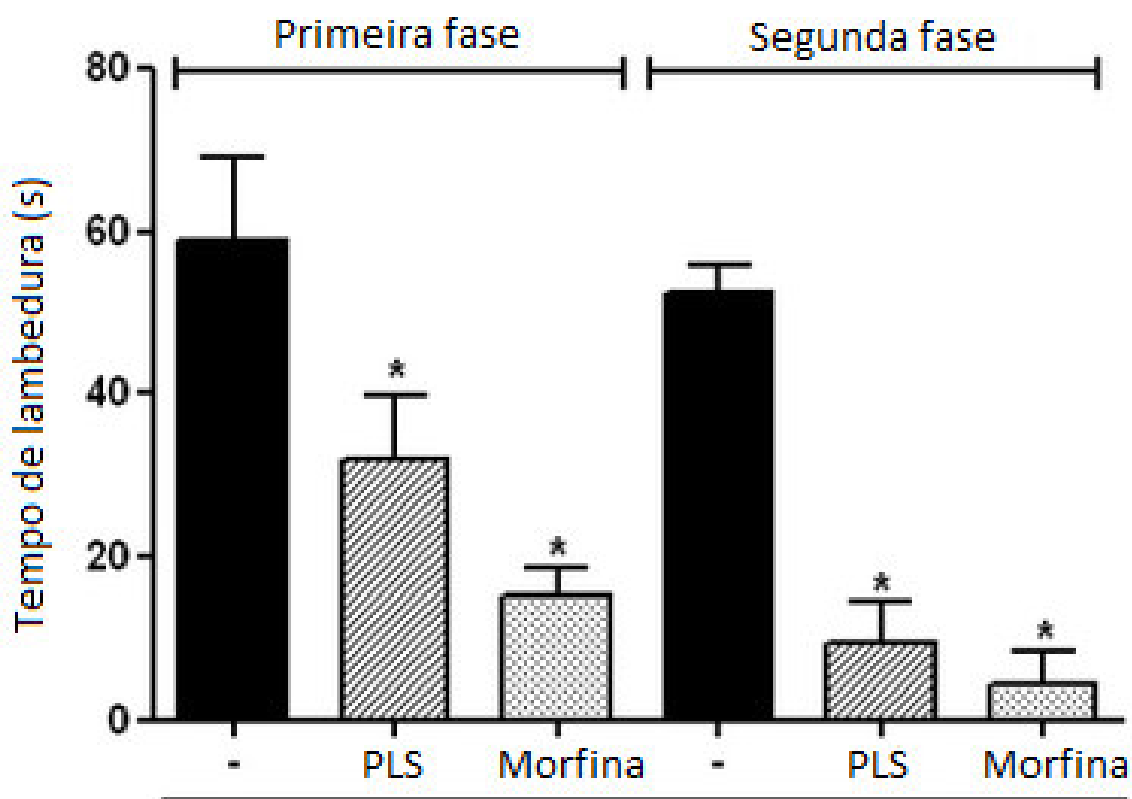
Em outro estudo, com um polissacarídeo sulfatado extraídos a partir da alga vermelha *Solieria filiformis*, o pré-tratamento com polissacarídeo foi capaz de reduzir a nocicepção no teste de ácido acético, mas não no teste de placa quente (ARAÚJO *et al.*, 2011). Batista *et al.* (2014) com polissacarídeos extraídos da alga *Agardhiella ramosissima* também obtiveram resultados semelhantes. Devido ao fato do pré-tratamento por administração de PLS não ter alterado o tempo de latência, é possível sugerir que o mecanismo da ação nociceptiva de PLS ocorra via mecanismos periféricos.

5.12 Efeito de PLS no teste de formalina

A dor persistente induzida pelo teste formalina em patas de camundongo envolve duas fases distintas. A primeira fase da dor é denominada neurogênica e é caracterizada pela estimulação química direta dos nociceptores, e a segunda fase é denominada inflamatória e é acompanhada pela libertação de mediadores inflamatórios, tais como neuropeptídios, prostaglandinas, serotonina, histamina e bradiquinina, ativando neurônios ventrais no nível da medula espinhal (RIDTITID *et al.*, 2008; HUNSKAAR *et al.* 1985; HUNSKAAR; HOLE, 1987 E MURRAY, PORRECA; COWAN, 1988). Substâncias que apresentem atividade antinociceptiva em ambas as fases provavelmente agem em nível de sistema nervoso central, e têm possível interação com receptores opióides enquanto as substâncias que agem principalmente na segunda fase agem a nível periférico (SHIBATA *et al.*, 1989).

A Figura 17 mostra que a injeção intraplantar de formalina aumentou significativamente o tempo total de lambertura nas primeira e segunda fases de tratamento ($59,02 \pm 10,04$ e $52,49 \pm 3,338$ segundos, respectivamente) em comparação com a morfina ($p > 0,05$), comprovando a eficácia da droga. Este evento foi inibido significativamente ($p > 0,050$) em ambas as fases com pré-tratamento com a fração de PLS 1 mg/kg ($32,09 \pm 7,729$ e $9,278 \pm 5,403$ segundos). Observou-se que o tempo de lambertura dos animais tratados com PLS foi inibida em 45,6% e 81,32% nas primeira e segunda fases, respectivamente, em comparação com os resultados observados no grupo de formalina.

Figura 17 Efeito de PLS nos tempos de lambertura da pata no teste de formalina. Os camundongos foram administrados com formalina, com pré tratamentos com PLS 1 mg/kg ou morfina. Os dados estão expressos como média \pm s.e.m. de seis ratos para cada grupo.* P <0,05 indica diferença significativa entre o grupo carragenana.



O efeito inibitório de PLS foi mais acentuado na segunda fase, o que está de acordo com os resultados encontrados nos testes anti-inflamatórios, onde PLS apresentou capacidade de inibição de mediadores inflamatórios. Portanto, é possível sugerir que o efeito antinociceptivo de PLS se deva principalmente à um mecanismo periférico.

6. CONCLUSÕES

A extração de polissacarrídeos realizada de maneira enzimática se mostrou eficaz em selecionar polissacarídeos sulfatados, o polissacarídeo foi identificado como uma agarana e apresentou alto rendimento de 36,7%. Este polissacarídeo apresentou peso molecular médio de 410 kDa.

O polissacarídeo sulfatado de *Gracilaria intermedia* apresentou efeitos anti-inflamatórios em camundongos em diversos modelos experimentais. É possível que seu mecanismo de atuação esteja relacionado com a inibição de mediadores inflamatórios.

O polissacarídeo sulfatado de *Gracilaria intermedia* apresentou efeitos antinociceptivos em camundongos, tendo ação principalmente através de mecanismos periféricos.

Estas características aliadas às favoráveis características produtivas das algas do gênero *Gracilaria* e à abundância da mesma em praias da costa cearense fazem da alga *Gracilaria intermedia* uma promissora fonte de extração de ágar.

Pesquisas posteriores devem ser realizadas no sentido de avaliar mais profundamente a ação anti-inflamatória de PLS, comparada a drogas comerciais e verificar a aplicação dos material obtido neste estudo em produtos específicos, visando sua aplicação industrial.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil, 2008.

ANDRIAMANANTOANINA, H., CHAMBAT, G., & RINAUDO, M. Fractionation of extracted Madagascar *Gracilaria corticata* polysaccharides: Structure and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 77-88, 2007.

AIRANTHI, M. W. A., SASAKI, N., IWASAKI, S., BABA, N., ABE, M., HOSOKAWA, M., & MIYASHITA, K. (2011). Effect of brown seaweed lipids on fatty acid composition and lipid hydroperoxide levels of mouse liver. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(8), 4156-4163.

AMADOR, M. L. et al. Progress in the development and acquisition of anticancer agents from marine sources. **Annals of Oncology**, v. 14, n. 11, p. 1607-1615, 2003.

AMORIM, R. N. S.; RODRIGUES, J. A. G.; HOLANDA, M. L.; QUINDERE, A. L. G.; PAULA, R. C. M.; MELO, V. M. M.; BENEVIDES, N. M. B. Antimicrobial Effect of a Crude Sulfated Polysaccharide from the Red Seaweed *Gracilaria ornata*. **Brazilian Archives of Biology and technology**, v.55, n.02, pp. 171-181, 2012.

ANANTHI, SUBASH et al. *In vitro* antioxidant and *in vivo* anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga). **Food and chemical toxicology**, v. 48, n. 1, p. 187-192, 2010.

ARAÚJO, IANNA WIVIANNE FERNANDES et al. Effects of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1207-1215, 2011.

ARMISEN, Rafael. World-wide use and importance of *Gracilaria*. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, n. 3, p. 231-243, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (1990). *Official methods of analysis of the association of official analytical chemistry*, (15 ed., 1115p.) Virginia: Arlington.

BARROS, FRANCISCO CN et al. Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (J Agardh). **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 1, p. 598-603, 2013.

BARS, DANIEL; GOZARIU, MANUELA; CADDEN, SAMUEL W. Animal models of nociception. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

BARSANTI, LAURA; GUALTIERI, PAOLO. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. CRC press, 2014.

BATISTA, JALLES A. et al. Polysaccharide isolated from *Agardhiella ramosissima*: Chemical structure and anti-inflammation activity. **Carbohydrate polymers**, v. 99, p. 59-67, 2014.

BELLORIN, A. M. (2002) . Filogenia Molecular de Algas Gracilarióides (Gracilariaceae, Rhodophyta). Tese de doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo

BHANDARE, AMOL M. et al. Potential analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of hydroalcoholic extract of *Areca catechu* L. nut. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 12, p. 3412-3417, 2010.

BHATTACHARYA, DEBASHISH; MEDLIN, LINDA. Algal phylogeny and the origin of land plants. **Plant Physiology**, v. 116, n. 1, p. 9-15, 1998.

BILAN, M.I., USOV A.I., Structural analysis of fucoidans Nat Prod Commun, 3 (2008), pp. 1639–1648.

BITENCOURT, FLÁVIO DA S. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 377, n. 2, p. 139-148, 2008.

BLANCK, HANS; WALLIN, GÖRAN; WÄNGBERG, Sten-Åke. Species-dependent variation in algal sensitivity to chemical compounds. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 8, n. 4, p. 339-351, 1984.

BLUNT, JOHN W. et al. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 30, n. 2, p. 237-323, 2013.

BORAL, S.; BOHIDAR, H.B. Hierarchical structures in ágar hydrogels. **Polymer**, v. 50, pp. 5585-5588, 2009.

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, n. 1-2, pp. 248-254, 1976.

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

BRITO, TARCISIO VIEIRA et al. Anti-inflammatory effect of a sulphated polysaccharide fraction extracted from the red algae *Hypnea musciformis* via the suppression of neutrophil migration by the nitric oxide signalling pathway. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 5, p. 724-733, 2013.

BROOKS, PETER M.; DAY, RICHARD O. Nonsteroidal antiinflammatory drugs—differences and similarities. **New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 24, p. 1716-1725, 1991.

BULLERI, F. (2010). The seaweed *Caulerpa racemosa* on Mediterranean rocky reefs: from passenger to driver of ecological change. **Ecology**, 91(8), 2205–2212.

BUSS, Antony D.; BUTLER, Mark S. (Ed.). **Natural product chemistry for drug discovery**. Royal Society of Chemistry, 2010.

CAMPO, V.F, KAWANO, D.F., SILVA, D.B., CARVALHO I. (2009) Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis—A review *Carbohydrate Polymers*, 77, 167–180.

CASSATELLA, MARCO A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunology today**, v. 16, n. 1, p. 21-26, 1995.

CASTRO, J.P. **Frações polissacarídicas obtidas a partir da alga vermelha *Gracilaria intermedia*: um estudo químico estrutural, avaliação de atividade antioxidante e caracterização reológica** 2014. Dissertação de Mestrado em Bioquímica. Instituto de bioquímica da Universidade federal do Ceará

CHAVAKIS, EMMANOUIL; CHOI, EUN YOUNG; CHAVAKIS, TRIANTAFYLLOS. Novel aspects in the regulation of the leukocyte adhesion cascade. **Thromb Haemost**, v. 102, n. 2, p. 191-197, 2009.

CHAVES, LUCIANO DE SOUSA ET al. Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 35, n. 1, p. 93-100, 2013.

CHEN, H., YAN, X., LIN, J., WANG, F., & XU, W. (2007). Depolymerized products of λ -carrageenan as a potent angiogenesis inhibitor. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(17), 6910-6917.

CHOPIN, T., & WHALEN, E. A new and rapid method for carrageenan identification by FT IR diffuse reflectance spectroscopy directly on dried, ground algal material. **Carbohydrate Research**, v. 246, pp. 51-59.1993.

COLLIER, H. O. J. et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 32, n. 2, p. 295-310, 1968.

COSTA, L. S., FIDELIS, G. P., CORDEIRO, S. L., OLIVEIRA, R. M., SABRY, D. A., CÂMARA, R. B. G. & ROCHA, H. A. O. (2010). Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64(1), 21-28.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.

COURA, CHISTIANE O. et al. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Sulphated Polysaccharides from the Red Seaweed *Gracilaria cornea*. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 110, n. 4, p. 335-341, 2012.

CRUVINEL, WILSON DE Melo et al. Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

CUMASHI, ALBANA et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology**, v. 17, n. 5, p. 541-552, 2007.

CUNHA, J. M. et al. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. **British journal of pharmacology**, v. 130, n. 6, p. 1418-1424, 2000.

DAMASCENO, SAMARA RB et al. Role of the NO/K ATP pathway in the protective effect of a sulfated-polysaccharide fraction from the algae *Hypnea musciformis* against ethanol-induced gastric damage in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 320-328, 2013.

DAWCZYNSKI, C., SCHÄFER, U., LEITERER, M., & JAHREIS, G. (2007). Nutritional and toxicological importance of macro, trace, and ultra-trace elements in algae food products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(25), 10470-10475.

DE SMET, PETER AGM. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs**, v. 54, n. 6, p. 801-840, 1997.

DÉCIGA-CAMPOS, MYRNA et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of compounds isolated from *Scaphyglottis livida* and *Maxillaria densa*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 114, n. 2, p. 161-168, 2007.

DEMUNSHI, YPSITA; CHUGH, ARCHANA. Patenting Trends in Marine Bioprospecting based Pharmaceutical Sector. **Journal of Intellectual Property Rights**, v. 14, p. 122-130, 2009.

DENIS, C., MORANÇAIS, M., LI, M., DENIAUD, E., GAUDIN, P., WIELGOSZ-COLLIN, G., FLEURENCE, J. (2010). Study of the chemical composition of edible red macroalgae *Grateloupia turuturu* from Brittany (France). **Food chemistry**, 119(3), 913-917.

DENNY, MARK W.; GAINES, Steven Dean (Ed.). **Encyclopedia of tidepools and rocky shores**. Univ of California Press, 2007.

DHARGALKAR, V. K.; VERLECAR, X. N. Southern Ocean seaweeds: A resource for exploration in food and drugs. **Aquaculture**, v. 287, n. 3, p. 229-242, 2009.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75, n. 2, p. 125-131, 1995.

DRECKMANN, K. M., & DE LARA-ISASSI, G. (2000). *Gracilaria caudata* J. Agardh (Gracilariaceae, Rhodophyta) en el Atlántico mexicano. **Hidrobiológica**, 10(2), 125-130.

DUAN, XIAO-JUAN et al. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. **Food chemistry**, v. 95, n. 1, p. 37-43, 2006.

DUARTE, M. E., CAUDURO, J. P., NOSEDA, D. G., NOSEDA, M. D., GONÇALVES, A. G., PUJOL, C. A. & CEREZO, A. S. (2004). The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. **Carbohydrate research**, 339(2), 335-347.

DUARTE, I. D.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica...[et al.]**, v. 21, n. 2, p. 341-343, 1987.

DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REBERS, P.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, pp. 350-356, 1956.

DUCKWORTH, M.; YAPHE, W. The structure of agar: Part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 16, n. 1, p. 189-197, 1971.

EDDY, NATHAN B.; LEIMBACH, DOROTHY. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl-and dithienylbutylamines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 107, n. 3, p. 385-393, 1953.

FAN, YANLI et al. Partial characterization and anti-tumor activity of an acidic polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 4, p. 1313-1318, 2012.

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 from invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, pp. 29299-29307, 2000.

FARROKHI, S., NABIPOUR, I., & ASSADI, M. (2012). Seaweeds: Some Pharmacological Effects. **Iran. J. Immunol**, 9(2), 145-148.

FREILE-PELEGRÍN, Y. & MURANO, E. Agars from three species of *Gracilaria* (Rhodophyta) from Yucatán Peninsula. **Bioresource Technology** v. 96, pp. 295-302, 2005.

FREILE-PELEGRÍN, ROBLEDO, D. Influence of alkali treatment on ágar from *Gracilaria cornea* Yucatán Mexico, **Journal of Applied Phycology**, v. 9, pp. 533-539, 1997.

FLEURENCE, J., MORANÇAIS, M., DUMAY, J., DECOTTIGNIES, P., TURPIN, V., MUNIER, M., ... & JAOUEN, P. (2012). What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture?. **Trends in Food Science & Technology**, 27(1), 57-61.

FUSETANI, NOBUHIRO (Ed.). **Drugs from the Sea**. Karger Medical and Scientific Publishers, 2000.

GAMAL, ALI A. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 18, n. 1, p. 1-25, 2010.

GILLIGAN, JAMES P. et al. Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P. **Inflammation**, v. 18, n. 3, p. 285-292, 1994.

GÓMEZ-ORDÓÑEZ, EVA; RUPÉREZ, PILAR. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1514-1520, 2011.

GUIRY, MICHAEL D. HOW many species of algae are there?. **Journal of Phycology**, v. 48, n. 5, p. 1057-1063, 2012.

GUPTA, R. et al. A Randomised Clinical Trial to Assess the Effect of Total Enteral and Total Parenteral Nutritional Support on Metabolic, Inflammatory and Oxidative Markers in Patients with Predicted Severe Acute Pancreatitis (APACHE II > 6) (R. Gupta et al., Southampton). **Pancreatology**, v. 3, n. 5, p. 406-413, 2003.

HADDAD, JOHN J. Cytokines and related receptor-mediated signaling pathways. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 297, n. 4, p. 700-713, 2002.

HAJARE, S. W. et al. Anti-inflammatory activity of *Dalbergia sissoo* leaves. **Fitoterapia**, v. 72, n. 2, p. 131-139, 2001.

- HOLDT, S. L., & KRAAN, S. (2011). Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of applied phycology*, 23(3), 543-597.
- HOPKINS, STEPHEN JOHN. The pathophysiological role of cytokines. *Legal Medicine*, v. 5, p. S45-S57, 2003.
- HU, GU-PING et al. Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. *Marine drugs*, v. 9, n. 4, p. 514-525, 2011.
- HUNSKAAR, STEINAR; HOLE, KJELL. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.
- HUNSKAAR, STEINAR; FASMER, OLE BERNT; HOLE, KJELL. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *Journal of neuroscience methods*, v. 14, n. 1, p. 69-76, 1985.
- IKEDA, YURI et al. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. *Life sciences*, v. 69, n. 24, p. 2911-2919, 2001.
- IOANNOU, EFSTATHIA; ROUSSIS, VASSILIOS. Natural products from seaweeds. In: **Plant-derived natural products**. Springer US, 2009. p. 51-81.
- JAULNEAU, V., LAFITTE, C., JACQUET, C., FOURNIER, S., SALAMAGNE, S., BRIAND, X., DUMAS, B. (2010). Ulvan, a sulfated polysaccharide from green algae, activates plant immunity through the jasmonic acid signaling pathway. *BioMed Research International*, 2010.
- JIAO, G., YU, G., ZHANG, J., & EWART, H. S. (2011). Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine drugs*, 9(2), 196-223.
- KAIN, JOANNA M.; DESTOMBE, CHRISTOPHE. A review of the life history, reproduction and phenology of Gracilaria. *Journal of Applied Phycology*, v. 7, n. 3, p. 269-281, 1995.
- KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. *British Journal of Anaesthesia*, v. 87, n. 1, p. 3-11, 2001.
- KNUTSEN, S. H. et al. A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Botanica marina*, v. 37, n. 2, p. 163-170, 1994.
- KONO, HAJIME; ROCK, KENNETH L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nature Reviews Immunology*, v. 8, n. 4, p. 279-289, 2008.
- KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DEBEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. In: **Federation proceedings**. 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814-3998: FEDERATION AMER SOC EXP BIOL, 1959. p. 412-412.
- KULKARNI, S. K.; MEHTA, A. K.; KUNCHANDY, J. Anti-inflammatory actions of clonidine, guanfacine and B-HT 920 against various inflammagen-induced acute paw oedema in rats. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie*, v. 279, n. 2, p. 324-334, 1986.
- KUMAR, VIVEK; FOTEDAR, RAVI. Agar extraction process for *Gracilaria cliftonii*. *Carbohydrate polymers*, v. 78, n. 4, p. 813-819, 2009.
- LAHAYE, A. ROBIC Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds *Biomacromolecules*, 8 (2007), pp. 1765–1774.
- LE BARS, DANIEL; GOZARIU, MANUELA; CADDEN, SAMUEL W. Animal models of nociception. *Pharmacological reviews*, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LEATHERS, TIMOTHY D. Biotechnological production and applications of pullulan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, n. 5-6, p. 468-473, 2003.

LI, B., LU, F., WEI, X., & ZHAO, R. (2008). Fucoidan: structure and bioactivity. **Molecules**, 13(8), 1671-1695.

LINARDI, ALESSANDRA et al. Involvement of kinins, mast cells and sensory neurons in the plasma exudation and paw oedema induced by staphylococcal enterotoxin B in the mouse. **European journal of pharmacology**, v. 399, n. 2, p. 235-242, 2000.

LORAM, L. C. et al. Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. **The Journal of Pain**, v. 8, n. 2, p. 127-136, 2007.
Cytokines and related-receptor mediated signalling pathways

LORIA, VALENTINA et al. Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. **Mediators of inflammation**, v. 2008, 2008.

LUSTER, ANDREW D. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 7, p. 436-445, 1998.

LYRA, G. M. **Distribuição, abundância e fenologia de sete espécies simpátricas de Gracilaria na praia de Stella Maris, Salvador, Bahia**. 2005. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado em Ecologia e Biomonitoramento. Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia. Salvador.[Links].

MACIEL, J.M., CHAVES, L.S., SOUZA, B.W.S., TEIXEIRA, D.I.A., FREITAS, A.L.P., FEITOSA, J.P.A., PAULA, R.C.M. Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 559-565, 2008.

MAHAN, CYNTHIA A.; HOLCOMBE, JAMES A. Immobilization of algae cells on silica gel and their characterization for trace metal preconcentration. **Analytical Chemistry**, v. 64, n. 17, p. 1933-1939, 1992.

MALING, HARRIET M. et al. Inflammation induced by histamine, serotonin, bradykinin and compound 48/80 in the rat: antagonists and mechanisms of action. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 191, n. 2, p. 300-310, 1974.

MARINHO-SORIANO, E.; FONSECA, P.C.; CARNEIRO, M.A.A.; MOREIRA, W.S.C. Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. **Bioresource Technology**, v. 97, pp. 2402-2406, 2006.

MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Bioresource Technology**, v. 90, n. 3, p. 329-333, 2003.

MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta) **Bioresource Technology**, v. 96, pp. 379-382, 2005.

MARINHO-SORIANO, E., BOURRET, E. . Effects of season on the yield and quality of ágar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Bioresource Technology**, v. 90, pp. 329-333, 2003

MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E; CASABIANCA, M.L.DE; MAURY, L. ÁGAR FROM THE REPRODUCTIVE AND VEGETATIVE STAGES OF *GRACILARIA BURSA-PASTORIS*. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*. N.1, 1999.

MARINHO-SORIANO, ELIANE et al. Frontiers on algae bioactive compounds. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, p. 2, 2011.

MARINHO-SORIANO, E., FONSECA, P.C., CARNEIRO, M.A.A., MOREIRA, W.S.C. (2006). Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresource Technology*, 97, 2402-2406.

MAYER, ALEJANDRO et al. Marine pharmacology in 2009–2011: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Marine drugs**, v. 11, n. 7, p. 2510-2573, 2013.

MAZUMDER, S., GHOSAL, P. K., PUJOL, C. A., CARLUCCI, M. J., DAMONTE, E. B., & RAY, B. (2002). Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *International journal of biological macromolecules*, 31(1), 87-95.

MAZZARI, SILVIO et al. N-(2-Hydroxyethyl) hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation. **European journal of pharmacology**, v. 300, n. 3, p. 227-236, 1996.

MEENA, R.; PRASSAD, K.; GANESAN, M.; SIDDHANTA, A. K. Superior quality ágar from *Gracilaria* species (Gracilariales, Rhodophyta) collected from the Gulf of Mannar, India. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, p. 397-402, 2008.

MEHTA, GAURAV K. et al. Preparation of galactans from *Gracilaria debilis* and *Gracilaria salicornia* (Gracilariales, Rhodophyta) of Indian waters. **Journal of applied phycology**, v. 22, n. 5, p. 623-627, 2010.

MELO, F. R.; PEREIRA, M. S.; FOGUEL, D.; MOURÃO, P. A. S. Antithrombin-mediated Anticoagulant Activity of Sulfated Polysaccharides. **Journal of Biologic Chemistry**, v. 279, p. 20824-20835, 2004.

MELO, M. R. S., FEITOSA, J. P. A., FREITAS, A. L. P., & DE PAULA, R. C. M., Isolation and Characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p. 491-498, 2002.

METCALFE, DEAN D. Mast cells and mastocytosis. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 946-956, 2008.

MILLAN, MARK J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.

MIRANDA, Fábio GG et al. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb. inner bark aqueous extract. **BMC pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 6, 2001.

MOLLET, JEAN-CLAUDE; RAHAOUI, ABDESLEM; LEMOINE, YVES. Yield, chemical composition and gel strength of agarocolloids of *Gracilaria gracilis*, *Gracilariopsis longissima* and the newly reported *Gracilaria* cf. *vermiculophylla* from Roscoff (Brittany, France). **Journal of Applied Phycology**, v. 10, n. 1, p. 59-66, 1998.

MONTANHER, Ana Beatriz et al. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 281-288, 2007.

MONTAÑO, Nemesio E.; VILLANUEVA, Ronald D.; ROMERO, Jumelita B. Chemical characteristics and gelling properties of agar from two Philippine *Gracilaria* spp. (Gracilariales, Rhodophyta). In: **Sixteenth International Seaweed Symposium**. Springer Netherlands, 1999. p. 541-548.

Mulloy, B. (2005). The specificity of interactions between proteins and sulfated polysaccharides. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77(4), 651-664.

MURANO, Erminio. Chemical structure and quality of agars from *Gracilaria*. **Journal of applied phycology**, v. 7, n. 3, p. 245-254, 1995.

MURRAY, Christopher W.; PORRECA, Frank; COWAN, Alan. Methodological refinements to the mouse paw formalin test: an animal model of tonic pain. **Journal of pharmacological methods**, v. 20, n. 2, p. 175-186, 1988

MURPHY, Des M. et al. The phosphodiesterase type IV inhibitor cilomilast decreases pro-inflammatory cytokine production from primary bronchial epithelial cells in lung transplantation patients. **The Journal of heart and lung transplantation**, v. 25, n. 12, p. 1436-1440, 2006.

NAGHAVI, Morteza et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient a call for new definitions and risk assessment strategies: part I. **Circulation**, v. 108, n. 14, p. 1664-1672, 2003.

NEMIROVSKY, Alexander et al. The antinociceptive effect of the combination of spinal morphine with systemic morphine or buprenorphine. **Anesthesia & Analgesia**, v. 93, n. 1, p. 197-203, 2001.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of natural products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NIAZI, Junaid et al. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of aqueous extract of fresh leaves of *Coccinia indica*. **Inflammopharmacology**, v. 17, n. 4, p. 239-244, 2009.

OLIVEIRA, Eurico C.; ALVEAL, Krisler; ANDERSON, Robert J. Mariculture of the agar-producing *Gracilarioid* red algae. **Reviews in Fisheries Science**, v. 8, n. 4, p. 345-377, 2000.

OLIVEIRA, Eurico Cabral et al. Algas e angiospermas marinhas bênticas do litoral brasileiro: diversidade, exploração e conservação. In: **Workshop sobre Avaliação e ações prioritárias para a conservação da Biodiversidade das zonas costeira e marinha. Relatório Técnico. Brasília, Ministério do Meio Ambiente**. 1999.

OLIVEIRA, L. S.; RUFINO, M. S. M.; MOURA, C. F. H.; CAVALCANTI, F. R.; ALVES, R. E.; MIRANDA, M. R. A. The influence of processing and long-term storage on the antioxidant metabolism of acerola (*Malpighia emarginata*) purée. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 23, n. 2, 2011.

OLIVEIRA, M. C. DE; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 53, n. 6, 2010.

PAREKH, R. G., DOSHI, Y. A., RAO, V. D., & CHAUHAN, V. D. Studies on a phycocolloid from red alga *Halymenia venusta* Boergesen. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 16, p. 274-276. 1987

Patwardhan, B., Warude, D., Pushpangadan, P., & Bhatt, N. (2005). Ayurveda and traditional Chinese medicine: a comparative overview. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(4), 465-473.

PEARSON, D., COX, H.E., **The chemical analysis of foods**. 7 ed. Edinburgh; New York: Churchill, Livingstone, 1976.

PERCIVAL, EI; MCDOWELL, Richard H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. 1967.

PEREIRA, Leonel; NETO, Joao Magalhaes (Ed.). **Marine Algae: Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assessment, and Biotechnology**. CRC Press, 2014.

PEREIRA, Leonel et al. VIBRATIONAL SPECTROSCOPY (FTIR-ATR AND FT-RAMAN)-A Rapid and Useful Tool for Phycocolloid Analysis. 2011.

PEREIRA, Maria 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, n. 12, p. 2015-2023, 2005.

Pereira, M. S., Mulloy, B., & Mourão, P. A. (1999). Structure and anticoagulant Activity of sulfated fucans comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae. *Journal of Biological Chemistry*, 274(12), 7656-7667.

PÉREZ GONZÁLEZ, Cuauhtemoc et al. Anti-inflammatory activity and composition of senecio salignus kunth. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

PIMENTA, Samuel. Comparação entre a biorremediação de água natural e água residual utilizando chlorella vulgaris. 2011.

PLAZA, Merichel; CIFUENTES, Alejandro; IBÁÑEZ, Elena. In the search of new functional food ingredients from algae. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n. 1, p. 31-39, 2008.

Polya, G. (2003). *Biochemical targets of plant bioactive compounds: a pharmacological reference guide to sites of action and biological effects*. CRC Press.

POMIN, Vitor H. Review: An overview about the structure–function relationship of marine sulfated homopolysaccharides with regular chemical structures. **Biopolymers**, v. 91, n. 8, p. 601-609, 2009.

POMIN, Vitor H.; MOURÃO, Paulo AS. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. **Glycobiology**, v. 18, n. 12, p. 1016-1027, 2008.

POSADAS, Inmaculada et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 331-338, 2004.

PRADO-FERNÁNDEZ, J. et al. Quantitation of κ -, ι - and λ -carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression. **Analytica Chimica Acta**, v. 480, n. 1, p. 23-37, 2003.

PRAIBOON, J., CHIRAPART, A., AKAKABE, Y., BHUMIBHAMOND, O., KAJIWARA, T., Physical and Chemical Characterization of ágar Polysaccharides Extracted from the Thai and Japanese Species of Gracilaria. **ScienceAsia**, v. 32, n. 1, pp. 11-17, 2006.

PRASAD, K.; SIDDHANTA, A. K.; GANESAN, M.; RAMAVAT, B. K.; JHA, B.; GHOSH, P. K. Agars of *Gelidiella acerosa* of west and southeast coasts of India. **Bioresource Technology**, v. 98, pp. 1907 – 1915, 2007.

RAMA RAO, K. Studies on Growth Cycle and Phycocolloid Content in *Hypnea musciformis* (WULF) LAMOUR. 1). **Botanica Marina**, v. 13, n. 2, p. 163-165, 1970.

Rates, S. M. K. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39(5), 603-613.

RAVEN, P. H.; EVERT, RF EICHHORN. SE Biologia vegetal. 7ª Edição. Rio de, 2001.

REVIERS, BRUNO. Natureza e posição das “algas” na árvore filogenética do mundo vivo. 2010.

RIDTITID, Wibool et al. Antinociceptive activity of the methanolic extract of *Kaempferia galanga* Linn. in experimental animals. **Journal of ethnopharmacology**, v. 118, n. 2, p. 225-230, 2008.

RIBEIRO, Natássia Albuquerque et al. Sulfated polysaccharides isolated from the green seaweed *Caulerpa racemosa* plays antinociceptive and anti-inflammatory activities in a way dependent on HO-1 pathway activation. **Inflammation Research**, p. 1-12, 2014.

RIBEIRO, Ronaldo A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, n. 1, p. 111-118, 2000.

ROCHAS, C.; LAHAYE, M.; YAPHE, W. Sulfate content of carrageenan and agar determined by infrared spectroscopy. **Botanica Marina**, v. 29, n. 4, p. 335-340, 1986.

RODRIGUES, José AG et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Caulerpa cupressoides*. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 2, p. 282-292, 2012.

ROMERO, Jumelita B.; VILLANUEVA, Ronald D.; MONTAÑO, Marco Nemesio E. Stability of agar in the seaweed *Gracilaria eucheumatoides* (Gracilariales, Rhodophyta) during postharvest storage. **Bioresource technology**, v. 99, n. 17, p. 8151-8155, 2008.

ROSENBAUM, J. T.; BONEY, R. S. Use of a soluble interleukin-1 receptor to inhibit ocular inflammation. **Current eye research**, v. 10, n. 12, p. 1137-1139, 1991.

SAMA, Andrew E. et al. Bench to bedside: HMGB1—a novel proinflammatory cytokine and potential therapeutic target for septic patients in the emergency department. **Academic Emergency Medicine**, v. 11, n. 8, p. 867-873, 2004.

SAMBAMURTY, A. V. S. S. **A textbook of algae**. IK International, 2006.

SANTOS, Edson N. et al. Anti-inflammatory, antinociceptive, and antipyretic effects of methanol extract of *Cariniana rubra* stem bark in animal models. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 2, p. 557-566, 2011.

SEKMOKIENĖ, Dalia; LIUTKEVIČIUS, Algirdas; MALAKAUSKAS, Mindaugas. Functional food and its ingredients. **Vet Zoot**, v. 37, p. 72-78, 2007.

SERHAN, Charles N.; CHIANG, Nan; VAN DYKE, Thomas E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 5, p. 349-361, 2008.

SHANMUGHAPRIYA, Santhanam et al. Antimicrobial activity of seaweeds extracts against multiresistant pathogens. **Annals of Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 535-541, 2008.

SHIBATA, Manabu et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, n. 3, p. 347-352, 1989.

SILVA, Renan O. et al. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of myrtenol, a plant-derived monoterpene alcohol, in mice. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 29, n. 3, p. 184-192, 2014.

Silva, I. B., Fujii, M. T., & Marinho-Soriano, E. (2012). Influence of tourist activity on the diversity of seaweed from reefs in Maracajaú, Atlantic Ocean, Northeast Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(4), 889-893.

SKIDMORE, I. F.; WHITEHOUSE, M. W. Biochemical properties of anti-inflammatory drugs—X: The inhibition of serotonin formation in vitro and inhibition of the esterase activity of α -chymotrypsin. **Biochemical pharmacology**, v. 16, n. 5, p. 737-751, 1967.

SKRIPTSOVA, Anna V.; NABIVAILO, Yulia V. Comparison of three gracilarioids: growth rate, agar content and quality. **Journal of applied phycology**, v. 21, n. 4, p. 443-450, 2009.

SOLOMONS, Thomas W.; FRYHLE, Craig B. **Química orgânica 1**. LTC, 2006.

SOUZA, Bartolomeu WS et al. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 287-292, 2012.

SOUZA, G. E. P. et al. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents and actions**, v. 24, n. 3-4, p. 377-380, 1988.

SOUZA, G. E. P. et al. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents and actions**, v. 24, n. 3-4, p. 377-380, 1988.

SOUZA, Éverton Tenório et al. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of caulerpin, a bisindole alkaloid isolated from seaweeds of the genus *Caulerpa*. **Marine drugs**, v. 7, n. 4, p. 689-704, 2009.

SPRINGER, Timothy A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, v. 76, n. 2, p. 301-314, 1994.

Tabarsa, M., Rezaei, M., Ramezanpour, Z., & Waaland, J. R. (2012). Chemical compositions of the marine algae *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta) as a potential food source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(12), 2500-2506.

TELLO-IRELAND, Cristian et al. Influence of hot-air temperature on drying kinetics, functional properties, colour, phycobiliproteins, antioxidant capacity, texture and agar yield of alga *Gracilaria chilensis*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2112-2118, 2011.

THORLACIUS, HENRIK; LINDBOM, LENNART; RAUD, JOHAN. Cytokine-induced leukocyte rolling in mouse cremaster muscle arterioles is P-selectin dependent. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 41, n. 4, p. H1725, 1997.

TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: **The pharmacology of pain**. Springer Berlin Heidelberg, 1997. p. 1-20.

TSENG, C. K. Algal biotechnology industries and research activities in China. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, n. 4, p. 375-380, 2001.

TRAINOR, F. R. Indicator algal assays: laboratory and field approaches. **Algae as Ecological Indicators**, Academic Press, New York 1984. p 3-14, 6 tab, 22 ref., 1984.

Usov, A. I., & Yarotsky, S. V. A, S. Shashkov, 1980. ¹³C-NMR Spectroscopy of Red Algal Galactans. *Biopolymers*, 19, 977-990.

Valiente, O., Fernandez, L. E., Perez, R. M., Marquina, G., & Velez, H. Agar polysaccharides from red seaweeds *Gracilaria domingensis* Sonder exKutzing and *Gracilaria mammillaris* (Montagne) Howe. *Botanica Marina*, v. 35, pp. 77–81, 1992.

VANDERLEI, E. S. O.; ARAÚJO, I. W. F. A.; QUINDERE, A. L. G.; FONTES, B. P.; ELOY, Y. R.G.; RODRIGUES, J. A. G. R.; SILVA, A. A. R. S.; CHAVES, H. V.; JORGE, R. J. B.; MENEZES, D. B.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; BEZERRA, M. M.; BENEVIDES, N. M. B. The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Inflammation Research**, v. 60, pp. 1121-1130, 2011.

VERMA, Prashant R. et al. Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R. Br. in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 102, n. 2, p. 298-301, 2005.

VIDOTTI, Eliane Cristina; ROLLEMBERG, MC do E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 139-145, 2004.

VILELA, Fabiana Cardoso et al. Evaluation of the antinociceptive activity of extracts of *Sonchus oleraceus* L. in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 124, n. 2, p. 306-310, 2009.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenin edema in rats. **Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 166, n. 1, p. 96-103, 1969.

VINEGAR, R. et al. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. In: **Federation proceedings**. 1987. p. 118-126.

VLASOVA, Irina I.; SOKOLOV, Alexey V.; ARNHOLD, Juergen. The free amino acid tyrosine enhances the chlorinating activity of human myeloperoxidase. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 76-83, 2012.

WEISCHER, C. H. [Experimental studies on the possibility of influencing mast cells in experimental carrageenin-induced rat paw edema. Histological study on the effects of some non-steroidal anti-inflammatory agents]. **Arzneimittel-Forschung**, v. 26, n. 10, p. 1867-1870, 1975.

Wijesekara, I., Pangestuti, R., & Kim, S. K. (2011). Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate polymers*, 84(1), 14-21.

XANTHOULEA, Sofia et al. Tumor necrosis factor (TNF) receptor shedding controls thresholds of innate immune activation that balance opposing TNF functions in infectious and inflammatory diseases. **The Journal of experimental medicine**, v. 200, n. 3, p. 367-376, 2004.

Ximenes, C. F., Carneiro, P. B. M., & de Sousa Barros, K. V. (2012, May). Estrutura da comunidade de macroalgas associadas a um banco de *H. wrightii* Ascherson do estado do Ceará, nordeste do Brasil. In *XIV Congresso Brasileiro de Ficologia*.

YASUHARA-BELL, Jarred; LU, Yuanan. Marine compounds and their antiviral activities. **Antiviral research**, v. 86, n. 3, p. 231-240, 2010.

ZARBOCK, Alexander; LEY, Klaus. Neutrophil adhesion and activation under flow. **Microcirculation**, v. 16, n. 1, p. 31-42, 2009.