



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

NATÁSSIA ALBUQUERQUE RIBEIRO

**POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS: FORMULAÇÃO DE
GÉIS E ANÁLISE DOS SEUS EFEITOS NA CICATRIZAÇÃO EM EXPERIMENTOS
IN VIVO E *IN VITRO*.**

FORTALEZA

2016

NATÁSSIA ALBUQUERQUE RIBEIRO

POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS: FORMULAÇÃO DE
GÉIS E ANÁLISE DOS SEUS EFEITOS NA CICATRIZAÇÃO EM EXPERIMENTOS *IN*
VIVO E *IN VITRO*.

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

Orientadora: Prof^a Dra. Norma Maria
Barros Benevides.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R37p

Ribeiro, Natássia Albuquerque.

Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas: formulação de géis e análise dos seus efeitos na cicatrização em experimentos in vivo e in vitro. / Natássia Albuquerque Ribeiro. – 2016.
133 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides.

1. Polissacarídeos sulfatados. 2. Cicatrização de feridas in vivo. 3. Queratinócitos e fibroblastos in vitro. I. Título.

CDD 572

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários á obtenção do grau de doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se á disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.


NATÁSSIA ALBUQUERQUE RIBEIRO

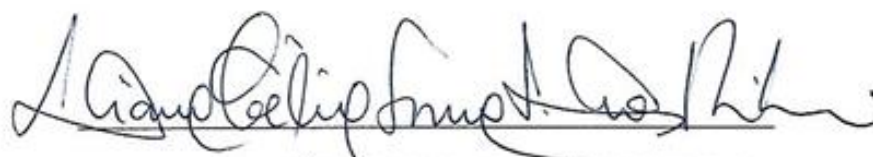
TESE APROVADA EM 29.01.2016



Dra. NORMA MARIA BARROS BENEVIDES

Depto. Bioquímica e Biologia Molecular-UFC

(Orientadora)



Dra. DIANA CÉLIA SOUSA NUNES-PINHEIRO

Prog. de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – UECE



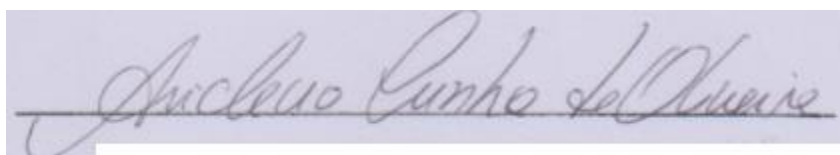
Dra. OSCARINA VIANA DE SOUSA

Instituto de Ciências do Mar- LABOMAR – UFC



Dra. HELLÍADA VASCONCELOS CHAVES

Faculdade de Odontologia – Campus Sobral – UFC



Dr. ARICLÉCIO CUNHA DE OLIVEIRA

Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – UECE

À minha família

AGRADECIMENTOS

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

Aos Professores Dr. Tony Parker e Dra. Jacqui McGovern da Universidade Tecnológica de Queensland – QUT, Brisbane/Austrália, por toda a incrível hospitalidade que recebi em um país diferente e o imensurável aprendizado que tive durante o ano de 2015.

Às Professoras Dra. Mirna Marques Bezerra, da Faculdade de Medicina da UFC – Campus e Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves, da Faculdade de Odontologia da UFC – Campus Sobral, por terem me recebido em seus laboratórios de braços abertos e por todo apoio imprescindível prestado na realização dos ensaios biológicos.

À Professora Dra. Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro, da Universidade Estadual do Ceará, por suas preciosas contribuições e ao me ensinar os experimentos de cicatrização.

À Professora Dra. Oscarina Viana de Sousa, por ter me recebido em seu laboratório e me ajudado com os experimentos de atividade antibacteriana.

À Professora Dra. Karuza Maria Alves Pereira, por ter me ajudado com as análises histológicas e suas valiosas contribuições.

Ao Professor Dr. Ariclécio Cunha de Oliveira da Universidade Estadual do Ceará, por gentilmente integrar a banca examinadora deste trabalho.

Á todos que fizeram ou fazem parte do Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CARBOLEC) com quem tive ou tenho o prazer de conviver diariamente: Renata Rivanor, Ticiane Abreu, Ticiane Lima, Renato Andrade, Ismael Nilo, Neto Silva, Ana Luiza Quinderé, Marjory Holanda, Annita Frota, George Meredite, Acrísio Uchôa, Edna Silva, Roberta Cristiane, Raquel Dantas, Chistiane Coura, Ricardo Bastos, Willame Alves, José Gerardo, Valdécio Silvano, Felipe Barros, Andressa Alexandre, Andrei Santos Vitoria Virginia, Cirlânio Albuquerque e Pedro Nonato. Todos vocês foram essenciais nessa minha caminhada e contribuíram de alguma forma para a elaboração desta tese, vocês me ajudaram a vencer uma etapa muito importante!

Em especial agradeço a Géssica Hellen, Pátricio Servente, Clara Maia e Tayna Fiúza que fizeram parte da minha caminhada como meus alunos de Iniciação Científica, estando presentes no meu dia-a-dia, me ajudando nos experimentos, o meu obrigada por tudo.

Á todos do Instituto de Saúde e Inovação Biomédica (IHBI) e do Programa de Regeneração e Reparo de Tecidos (TRR) pertencentes a QUT, pela acolhida e sincera solicitude, bem como, pelo muito que me ensinaram na área de cultura de tecidos.

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

Em especial dedico:

Aos meus pais Francisco Edson de Alcântara Ribeiro e Elisa Albuquerque Ribeiro, por todo o amor e apoio que sempre recebi e infundiram-me a confiança necessária para realizar os meus sonhos.

Ás minhas irmãs Andressa A. Ribeiro e Kátiusca A. Ribeiro, por sempre estarem ao meu lado e me ajudarem em tudo.

Ás minhas amigas para vida toda, Thais Fontenelle, Juliana Pereira, Deborah Moura, Marina Xavier, Luciana Vasconcelos, Ana Elisa Garcia, Jordana Soares, Isabela Pimenta, Larice Maia, Virginia Cerqueira, Bia Albuquerque e Rebeca Rabelo, que até hoje me ensinam sobre a amizade e fazem os meus dias mais alegres e coloridos.

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

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

QUT – Universidade Tecnológica de Queensland, através do Instituto de Saúde e Inovação Biomédica (IHBI)

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

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

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

RESUMO

A utilização de algas marinhas como ferramentas potenciais para a obtenção de produtos farmacêuticos tem se mostrado uma tendência mundial e cresceu substancialmente nas duas últimas décadas. Moléculas bioativas obtidas a partir de algas marinhas tais como proteínas, carboidratos, compostos fenólicos, ácidos graxos poliinsaturados, terpenóides etc. possuem inúmeras atividades biológicas. Dentre essas moléculas, destacam-se os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas. Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia do potencial cicatrizante de géis desenvolvidos à base de polissacarídeos sulfatados das algas marinhas: *Caulerpa racemosa* (CrII), *Cryptonemia crenulata* (CcII) e *Gracilaria birdiae* (GbI), nativas do litoral cearense em modelos de cicatrização *in vivo* e *in vitro*. Os polissacarídeos sulfatados foram obtidos por procedimento cromatográfico de troca iônica. As macromoléculas obtidas foram avaliadas em ensaio toxicológico e analisadas quanto ao seu potencial de interferir no sistema nervoso central (SNC). Posteriormente foram utilizadas em experimentos de atividades pró-coagulante *in vitro/ex vivo* e antibacteriana. Em seguida os polissacarídeos sulfatados foram utilizados na formulação de géis que foram avaliados quanto à sua irritabilidade dermal durante 7 dias, onde foi analisado as reações dermatológicas macroscópicas, espessura da pele e o valor de exsudato presente no tecido. Os géis foram aplicados em feridas induzidas em camundongos sadios por trauma mecânico e avaliados quanto ao seu potencial cicatrizante durante 15 dias. Uma avaliação histopatológica foi realizada para comprovação da eficiência dos géis no tratamento das lesões. CcII foi utilizado em experimentos *in vitro* onde foi observado o seu potencial de aderência, proliferação e citotoxicidade utilizando células HaCaT. E por fim, CcII foi avaliado em um modelo 3D de equivalentes de pele humana (3D EPHs) durante 7 dias, onde foi analisado parâmetros como área de re-epitelização e migração lateral dos queratinócitos. Os resultados observados demonstraram que CrII, CcII e GbI apresentaram rendimentos de 20,5%; 21,3% e 23,6%, respectivamente, e mostraram-se atóxicos e sem efeitos sobre o SNC. No ensaio de atividade pró-coagulante CrII demonstrou ser pró-coagulante e CcII apresentou atividade anticoagulante no ensaio do APTT *in vitro*. Entretanto, estas atividades não foram confirmadas no ensaio *ex vivo*. O polissacarídeo de GbI não apresentou atividades anticoagulante e pró-coagulante em nenhum dos ensaios testados. CrII, CcII e GbI não apresentaram atividade antibacteriana frente às bactérias gram-negativa e gram-positiva. Os géis formulados com CrII, CcII e GbI não se mostraram irritantes em um modelo de irritação

cutânea em camundongos. E quando testados em feridas, apenas o gel formulado com CcII apresentou efeito cicatrizante. Diante deste fato, CcII foi avaliada em experimentos *in vitro*, em que, não foi capaz de provocar a aderência, proliferação e citotoxicidade em células HaCaT. CcII quando analisada no modelo 3D EPHs apresentou um efeito cicatrizante, acelerando o processo de re-epitelização e migração dos queratinócitos. Tendo em vista os resultados obtidos, CcII apresenta um potencial para formulação de um bioproduto promissor com uma função de cicatrização.

Palavras-chave: Polissacarídeos sulfatados, cicatrização de feridas *in vivo*, queratinócitos e fibroblastos *in vitro*.

ABSTRACT

The use of marine algae as potential tools for obtaining pharmaceuticals has shown a worldwide trend and has grown substantially over the last two decades. Bioactive Molecules obtained from seaweeds such as proteins, carbohydrates, phenolics, polyunsaturated fatty acids, terpenoids, etc. they showed numerous biological activities. Among these molecules, it highlights the sulfated polysaccharides from seaweed. This work aimed to evaluate the effect of the healing potential gels developed from sulfated polysaccharide of seaweed: *Caulerpa racemosa* (CrII), *Cryptonemia crenulata* (CcII) e *Gracilaria birdiae* (GbI), native of Ceará in healing *in vivo* and *in vitro* models. The sulfated polysaccharides were obtained by chromatographic procedure of ion exchange. The macromolecules obtained were evaluated in toxicological testing and analyzed for their potential to interfere in the central nervous system (CNS). Later, it was used in procoagulant *in vitro/ex vivo* and antibacterial activity experiments. Then the sulfated polysaccharides were used in the formulation of gels that were evaluated for their dermal irritant for 7 days, which was analyzed macroscopic skin reactions, skin thickness and the amount of exudate present in the tissue. The gels were applied to wounds in healthy mice induced by mechanical trauma and evaluated for their potential healing for 15 days. A histopathological evaluation was performed to prove the efficiency of the gels in the treatment of injuries. CcII was used in *in vitro* experiments where it was observed its potential adhesion, proliferation and cytotoxicity using HaCaT cells. Finally, CcII was evaluated in a 3D model of human skin equivalent (3D EPHS) for 7 days, which was analyzed parameters such as re-epithelialization area and lateral migration of keratinocytes. The results obtained showed that CrII, CcII and GbI present income 20.5%; 21.3% and 23.6%, respectively, and shown to be non-toxic and without CNS effects. In the coagulant test, CrII shown to be pro-coagulant and CcII showed anticoagulant activity in APTT assay *in vitro*. However, these activities have not been confirmed in the *ex vivo* assay. The GbI polysaccharide showed no anticoagulant and procoagulant activities in any of the assays tested. CrII, CcII and GbI showed no antibacterial activity against gram-negative and gram-positive bacteria. The gels formulated with CrII, CcII and GbI were not irritating in a skin irritation model in mice. And, when tested in wounds, only the gel formulated with CcII presented healing effect. Considering this fact, CcII was evaluated in experiments *in vitro* where it was not able to cause adherence, proliferation and cytotoxicity in HaCaT cells. CcII when analysed in the 3D EPHs model has a healing effect, accelerating the process of re-

epithelization, and keratinocytes migrating. In view of the results obtained, CcII has a promising potential for formulating bioproduct with a healing activity.

Keywords: Sulfated Polysaccharide, *in vivo* wound healing, *in vitro* keratinocytes and fibroblasts.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Diagrama esquemático da estrutura da pele humana.....	30
FIGURA 2	Epitélio estratificado pavimentoso queratinizado que reveste a pele	31
FIGURA 3	Imagem da histologia da pele com a derme e algumas estruturas identificadas	32
FIGURA 4	Fluxograma da cicatrização de uma ferida com as suas fases	33
TABELA 1	Principais tipos celulares e mediadores envolvidos na cicatrização	34
FIGURA 5	Fluxograma da cascata de coagulação	35
FIGURA 6	Espécimes das algas e sua classificação taxonômica.....	48
FIGURA 7	Micrografias de contraste de fase de células HaCaT cultivadas em frascos de cultura 2D convencionais	50
FIGURA 8	Micrografias de contraste de fase de fibroblastos cultivados em frascos de cultura 2D convencionais	51
FIGURA 9	Fluxograma de extração dos polissacarídeos sulfatados totais	53
FIGURA 10	Teste do campo aberto.	54
FIGURA 11	Teste da placa perfurada	57
FIGURA 12	Teste de suspensão de cauda.....	58
FIGURA 13	Labirinto em Cruz Elevado, um modelo animal de ansiedade	59
FIGURA 14	Teste do nado forçado, um modelo animal de depressão	60
FIGURA 15	Grupos de animais utilizados no experimento de escarificação	63
FIGURA 16	Modelo 3D de equivalentes de pele humana (3D EPHs).....	69
FIGURA 17	Preparando os EPHs com MTT para os cortes histológicos	71

FIGURA 18	Avaliação da massa corporal dos grupos testados em animais machos e fêmeas	73
TABELA 2	Análises bioquímicas e do peso corporal dos órgãos de camundongos submetidos ao ensaio de toxicidade por dose repetida	76
FIGURA 19	Fotomicrografias de luz de 4 µm de espessura dos órgãos.	78
TABELA 3	Efeito dos polissacarídeos sulfatados sobre a atividade locomotora (ALE), grooming e rearing no teste de campo aberto em camundongos	80
FIGURA 20	Efeito dos polissacarídeos sulfatados sobre o número de mergulhos (head dips) e tempo de permanência no buraco no teste da placa perfurada	82
FIGURA 21	Efeito dos polissacarídeos sulfatados sobre o tempo de imobilidade no teste de suspensão de cauda em camundongos	83
TABELA 4	Efeito dos polissacarídeos sulfatados CrII, CcII e GbI no teste da cruz elevada em camundongos.....	85
FIGURA 22	Efeito dos polissacarídeos sulfatados e imipramina sobre o tempo de imobilidade no teste de nado forçado em camundongos.....	87
FIGURA 23	Avaliação do efeito coagulante no teste do APTT “in vitro”	89
FIGURA 24	Avaliação do efeito coagulante no teste do TP “in vitro”.....	91
FIGURA 25	(A) Avaliação do efeito coagulante no teste do APTT “in vivo”. (B) Avaliação do efeito coagulante no teste do TP “in vivo”	92
FIGURA 26	Avaliação do efeito antibacteriano analisando-se a formação de halos de inibição ao redor dos poços das amostras	95
FIGURA 27	Avaliação do potencial irritante dos polissacarídeos sulfatados CrII, CcII e GbI quanto a espessura da pele dos animais	98
FIGURA 28	Avaliação do potencial irritante dos polissacarídeos sulfatados CrII, CcII e GbI quanto a presença de infiltrados nos tecidos dermais	99
TABELA 5	Avaliação macroscópica durante os dias de tratamento.....	101

FIGURA 29	Imagens das lesões macroscópicas	102
TABELA 6	Análise histológica d do tecido das feridas nos dias 3 (A), 7 (B), 10 (C) e 15 (D) do experimento	106
FIGURA 30	Avaliação do potencial de aderência das células HaCat aos frascos de cultura quando submetidas ao tratamento com o polissacarídeo da alga <i>C. crenulata</i> (CcII)	108
FIGURA 31	Ensaio de proliferação celular CyQUANT® 24 h	109
FIGURA 32	Ensaio de proliferação celular CyQUANT® 48 h	110
FIGURA 33	Ensaio de proliferação celular CyQUANT® 72 h	111
FIGURA 34	Fotomicrografia das células HaCat do ensaio de proliferação celular nos tempos de 24, 48 e 72 h	112
FIGURA 35	Ensaio de citotoxicidade (MTT) 24 h. Análise da viabilidade celular.....	114
FIGURA 36	Avaliação da citotoxicidade no ensaio do MTT.	115
FIGURA 37	Análises histológica: medida da área de re-epitelização e migração lateral dos queratinócitos.	117
FIGURA 38	Avaliação do percentual de migração lateral dos queratinócitos.....	119

LISTA DE ABREVIACÕES

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
A.L.E.	Atividade locomotora
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Aminotransferase de alanine
AMP	Aminometilpropanol
ANOVA	Análise de Variância
AST	Aminotransferase de aspartate
CA	Teste do campo aberto
CcII	Fração polissacarídica sulfata eluída com 0,75 M de NaCl da alga <i>C. crenulata</i>
Cc-PST	Polissacarídeos sulfatados totais da <i>C. crenulata</i>
Ce	Ceará
CEPA	Comissão de tica em Pesquisa Animal
cm	Centímetro
CO ₂	Gás carbnico
CPC	Cloreto de cetilpiridínio
CrII	Fração polissacarídica sulfata eluída com 0,75 M de NaCl da alga <i>C. racemosa</i>
Cr-PST	Polissacarídeos sulfatados totais da <i>C. racemosa</i>
DEAE	Dietilaminoetil-celulose
DEAE	Grupo funcional dietilaminoetilo

DMEM	Meio de cultura <i>Eagle</i> modificado por <i>Dulbecco</i>
D-PBS	Solução de Dulbecco's Salina Tamponada Fosfatada
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPHs	Modelo 3D de equivalentes de pele humana
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
g	Gramas
GbI	Fração polissacarídica sulfata eluída com 0,5 M de NaCl da alga <i>G. birdiae</i>
Gb-PST	Polissacarídeos sulfatados totais da <i>G. birdiae</i>
H ₂ O ₂	Água oxigenada
i.p.	Intra-peritonal
i.v.	Intra-venosa
II	Infiltrado inflamatório
kDa	Kilodaltons
kg	Kilo
LABOMAR	Instituto de Ciências do Mar
LCE	Teste da cruz elevada
M	Molar
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMPs	Metaloproteinases de matriz

MPB	Proteína Básica Principal
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NCCLS	National Committe for Clinical Laboratory Standards
NEBA	Número de entradas no braço aberto
nm	Nanômetro
O	Oxigênio
PAF	Fator de ativação plaquetária
PC	Presença de colágeno
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PE	Presença de epitelização
PEBA	Porcentagem de entrada nos braços abertos
PF	Presença de fibroblastos
pH	Potencial Hidrogeniônico
PN	Presença de neovasos
PO	Pós-operatório
PP	Teste da placa perfurada
PST	Polissacarídeos sulfatados totais
PTBA	Porcentagem de tempo nos braços abertos
PVC	Policloreto de polivinila
q.s.p.	Quantidade suficiente para
QUT	Universidade Tecnológica de Queensland
rpm	Rotações por minuto

SC	Teste de suspensão de cauda
SFM	Meios de cultura isento de soro bovino fetal
TF	Fator tecidual
TG	Tecido de granulação
TGF	Fator de crescimento transformante
TGF	Fator de crescimento transformante
TNF	Fator de necrose tumoral
TP	Tempo de protrombina
TPBA	Tempo de permanência no braço aberto
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada
UFC	Universidade Federal do Ceará
UI	Unidade internacional
UV	Radiação ultravioleta
v/v	Volume/volume
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
W	Watts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	Algas marinhas	25
1.2	Polissacarídeos de algas marinhas	26
1.3	Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados de algas	28
1.4	Pele - Estrutura e função	29
<i>1.4.1</i>	<i>Epiderme</i>	<i>30</i>
<i>1.4.2</i>	<i>Derme</i>	<i>31</i>
1.5	Mecanismos envolvidos na cicatrização	33
<i>1.5.1</i>	<i>Fase de Coagulação</i>	<i>34</i>
<i>1.5.2</i>	<i>Fase Inflamatória</i>	<i>36</i>
<i>1.5.3</i>	<i>Fase de Proliferação</i>	<i>37</i>
<i>1.5.4</i>	<i>Fase de Remodelamento</i>	<i>39</i>
1.6	Toxicidade	41
1.7	Pesquisa de novos produtos na cicatrização utilizando polissacarídeos	42
2	HIPÓTESE	45
3	OBJETIVOS	46
3.1.	Geral	46
3.2.	Específicos	46
4	MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1	Materiais	48
<i>4.1.1</i>	<i>Aquisição das algas marinhas</i>	<i>48</i>
<i>4.1.2</i>	<i>Bactérias</i>	<i>49</i>
<i>4.1.3</i>	<i>Isolamento e cultura das células</i>	<i>49</i>
<i>4.1.4</i>	<i>Animais</i>	<i>51</i>
4.2	Métodos	52
<i>4.2.1</i>	<i>Extração dos polissacarídeos sulfatados totais</i>	<i>52</i>

4.2.2	<i>Fracionamento e purificação dos polissacarídeos sulfatados</i>	53
4.2.3	<i>Toxicidade</i>	54
4.2.3.1	<i>Avaliação da toxicidade por dose repetida</i>	54
4.2.3.2	<i>Avaliação da ação ansiolítica e antidepressiva em modelos clássicos neurocomportamentais de ansiedade e depressão em camundongos.</i>	54
4.2.3.2.1	<i>Protocolo experimental</i>	54
4.2.3.2.2	<i>Teste do campo aberto (CA)</i>	55
4.2.3.2.3	<i>Teste da placa perfurada (PP)</i>	56
4.2.3.2.4	<i>Teste de suspensão de cauda (SP)</i>	57
4.2.3.2.5	<i>Teste da cruz elevada (LCE)</i>	58
4.2.3.2.6	<i>Teste do nado forçado (TNF)</i>	59
4.2.4	<i>Avaliação do potencial pró-coagulante dos polissacarídeos sulfatados “in vitro” e “in vivo”</i>	60
4.2.4.1	<i>Ensaio da atividade pró-coagulante “in vitro”</i>	60
4.2.4.2	<i>Ensaio da atividade pró-coagulante “ex vivo”</i>	61
4.2.5	<i>Avaliação da atividade antibacteriana, in vitro, dos polissacarídeos</i>	61
4.2.5.1	<i>Preparação do Ágar nutritivo</i>	61
4.2.5.2	<i>Manutenção das culturas</i>	61
4.2.5.3	<i>Atividade antibacteriana dos polissacarídeos por difusão em placa</i>	62
4.2.6	<i>Preparação dos géis</i>	62
4.2.7	<i>Avaliações da irritabilidade dermal dos géis</i>	63
4.2.8	<i>Avaliação da atividade cicatrizante “in vivo”</i>	64
4.2.8.1	<i>Aplicações dos géis em feridas limpas induzidas em animais sadios através de trauma mecânico</i>	64
4.2.8.2	<i>Planimetria</i>	64
4.2.8.3	<i>Análise histopatológica das feridas</i>	65
4.2.9	<i>Avaliação da atividade cicatrizante in vitro</i>	65
4.2.9.1	<i>Ensaio de adesão celular</i>	66

4.2.9.2	<i>Ensaio de proliferação celular (CyQUANT®)</i>	66
4.2.9.3	<i>Teste de citotoxicidade (MTT)</i>	67
4.2.9.4	<i>Modelo 3D de equivalentes de pele humana “in vitro”</i>	68
4.2.9.5	<i>Avaliação da re-epitelização no ensaio do MTT</i>	70
4.2.9.6	<i>Análises histológica: medida da área de re-epitelização e migração lateral dos queratinócitos</i>	71
4.2.11	<i>Análises estatísticas</i>	72
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	73
5.1	Rendimento dos polissacarídeos sulfatados totais e das frações obtidas por cromatografia de troca iônica	74
5.2	Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose	74
5.3	Toxicidade	74
5.3.1	<i>Avaliação da toxicidade por dose repetida</i>	74
5.3.2	<i>Avaliação da ação ansiolítica e antidepressiva em modelos clássicos neurocomportamentais de ansiedade e depressão em camundongos</i>	79
5.3.2.1	<i>Teste do campo aberto (CA)</i>	80
5.3.2.2	<i>Teste da placa perfurada (PP)</i>	81
5.3.2.3	<i>Teste de suspensão de cauda (PP)</i>	82
5.3.2.4	<i>Teste da cruz elevada (LCE)</i>	84
5.3.2.5	<i>Teste do nado forçado (TNF)</i>	85
5.4	Avaliação do potencial pró-coagulante dos polissacarídeos sulfatados <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i>	88
5.4.1	<i>Ensaio da atividade pró-coagulante “in vitro”</i>	88
5.4.2	<i>Ensaio da atividade pró-coagulante “ex vivo”</i>	92
5.5	Avaliação da atividade antibacteriana, <i>in vitro</i>, dos polissacarídeos	94
5.6	Avaliações da irritabilidade dermal dos géis	96
5.7	Avaliação da atividade cicatrizante <i>in vivo</i>	99
5.7.1	<i>Análise histológica das feridas</i>	105

5.8	Avaliação da atividade cicatrizante <i>in vitro</i>	107
5.8.1	<i>Ensaio de adesão celular</i>	108
5.8.2	<i>Ensaio de proliferação celular (CyQUANT®)</i>	108
5.8.3	<i>Teste de citotoxicidade (MTT)</i>	113
5.8.4	<i>Modelo 3D de equivalentes de pele humana “in vitro”</i>	114
5.8.4.1	<i>Avaliação da re-epitelização no ensaio do MTT</i>	115
5.8.4.2	<i>Análises histológica: medida da área de re-epitelização e migração lateral dos queratinócitos</i>	116
6	CONCLUSÃO	121
	REFERÊNCIAS	122

1 INTRODUCAO

1.1 Algas marinhas

As macroalgas marinhas atualmente são consideradas organismos fotossintéticos aquáticos, que apesar de não formarem uma categoria taxonômica monofilética (não apresentam um ancestral comum) são agrupadas segundo uma característica única: a ausência de tecido constituído por células estéreis que envolvam os órgãos de reprodução. As principais divisões de algas, unicelular ou multicelulares compreendem as algas vermelhas (divisão Rhodophyta); pardas (divisão Phaeophyta) e verdes (divisão Chlorophyta) (O'SULLIVAN *et al.*, 2010)

As algas verdes podem ser unicelulares ou pluricelulares, ocorrendo vastamente em água doce e do mar, mas também podem ser encontradas em uma ampla variedade de habitats, como a superfície da neve, troncos de árvores, solo e em simbiose com fungos (constituindo os líquens), protozoários e celenterados. Apresentam o amido como polissacarídeo de reserva e sua parede celular é constituída de celulose. Estas algas são consideradas o grupo a partir do qual as plantas evoluíram. As algas pardas são pluricelulares e predominantemente marinhas. Compreendem as algas mais conspícuas das águas temperadas, boreais e polares, mas também são encontradas em regiões tropicais. Existem somente cerca de 1.500 espécies, que variam de formas microscópicas até as maiores macroalgas, que podem chegar a 60 metros de comprimento e pesar mais de 300 quilogramas. Apresentam a laminarina como polissacarídeo de reserva e sua parede celular é constituída de celulose e algina. As algas vermelhas são pluricelulares, particularmente abundantes em águas tropicais quentes. Porém, o número de espécies marinhas excede a soma de espécies pertencentes às divisões Phaeophyta e Chlorophyta. As algas vermelhas possuem de 4.000 a 6.000 espécies distribuídas em aproximadamente 680 gêneros, dentre os quais poucos são unicelulares (RAVEN *et al.*, 2007).

As algas representam a base da cadeia alimentar nos oceanos e sustentam mais de dois terços da biomassa mundial e são ainda responsáveis por aproximadamente metade da atividade fotossintética global (DAY *et al.*, 1999) Além de sua importância ecológica, as algas são consideradas excelentes fontes de proteínas, carboidratos, vitaminas, minerais,

possuindo baixos teores de lipídios e alto valor nutritivo (MABEAU *et al.*, 1992; MACARTAIN *et al.*, 2007; ORTIZ *et al.*, 2009) e ainda produzem outros metabólitos com potencial econômico, inclusive farmacológico, como proteínas (lectinas), aminoácidos tipo-micosporinas, compostos halogenados e principalmente polissacarídeos sulfatados, que fazem destes organismos foco das mais diversas pesquisas biomédicas (O'SULLIVAN *et al.*, 2010; MAYER *et al.*, 2013).

1.2 Polissacarídeos de algas marinhas

Os polissacarídeos sulfatados estão presentes nas algas verdes, na forma predominante de arabino-galactanas (PERCIVAL e McDOWELL, 1967), nas algas pardas na forma de fucoidanas (BERTEAU e MULLOY, 2003) e nas algas vermelhas na forma de galactanas, classificando-se em agaranas e carragenanas (PAINTER, 1983).

Estes polímeros aniônicos não são encontrados somente em algas marinhas, mas também ocorrem em animais como mamíferos e invertebrados (MOURÃO; PEREIRA, 1999; MOURÃO, 2007), fungos (CARDOZO *et al.*, 2011) e plantas (DANTAS-SANTOS *et al.*, 2012). Entretanto, as algas marinhas são a fonte mais importante de polissacarídeos sulfatados de origem não-animal e suas estruturas químicas variam de acordo com as diferentes espécies de algas (COSTA *et al.*, 2010).

Polissacarídeos de algas verdes representam, talvez, o grupo mais diversificado dessas moléculas. São heteropolissacarídeos aniônicos não repetitivos, apresentando-se, geralmente, bastante ramificados, complexos e constituídos de unidades de monossacarídeos ou dissacarídeos que são constituídas de unidades de galactose e arabinose (PERCIVAL; McDOWELL, 1967). Ulvana é um dos principais polissacarídeos solúveis em água encontrados nas algas verdes da ordem Ulvales que têm sulfato, ramnose, xilose, ácidos idurônico e glicurônico como principais constituintes. Entretanto, uma variedade de polissacarídeos é sintetizada pelas algas verdes (JIAO *et al.*, 2011).

As fucoidanas, que representam os polissacarídeos sulfatados de algas pardas são principalmente constituídas de α -L-fucopirranose, são facilmente extraídas da parede celular das algas marrons com água quente ou solução ácida e podem ser responsáveis por mais de

40% do peso seco das células isoladas (BERTEAU; MULLOY, 2003). Essas fucoidanas podem diferir em estrutura entre as espécies de algas e podem variar até mesmo dentro da mesma espécie. Devido a essa heterogeneidade de estruturas, diferentes condições de extração utilizadas por pesquisadores podem dar origem ao isolamento de formas distintas de fucoidanas. Esses polissacarídeos sulfatados contêm pequenas quantidades de outros monossacarídeos, incluindo glicose, galactose, manose, xilose, ácidos urônicos e também grupos acetil (JIAO *et al.*, 2011).

Galactanas de algas vermelhas são de grande importância comercial sendo amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos devido às suas propriedades reológicas como gelificantes e espessantes. Essencialmente, elas consistem de uma cadeia linear composta por unidades dissacarídicas repetitivas de β -D-galactose ligada através do C-1 e C-3 (unidade A) e α -galactose através do C-1 e C-4 (unidade B), sendo que algumas unidades de α -galactose podem também ser encontradas na forma de 3,6-anidrogactose. Assim, as galactanas formam um arranjo alternado entre as unidades A e B, ou seja, (AB)_n (PAINTER, 1983). Estes polissacarídeos sulfatados são principalmente classificados com base na sua estereoquímica em dois grupos, carragenanas e agaranas. A diferença observada entre estes dois tipos de galactanas está na configuração enantiomérica da α -galactose da unidade B, que é considerada como sendo da série L para agaranas e D em carragenanas. A unidade A (β -D-galactose) sempre pertence à série D (USOV, 1984). Esta cadeia principal apresenta uma grande diversidade em relação aos seus grupos substituintes, como grupos O-sulfatados, O-metilados, O-glicosilados, na forma de 4,6-acetal de ácido pirúvico e algumas vezes também são substituídos por monossacarídeos adicionais (USOV, 1998).

A classificação das galactanas sulfatadas do tipo carragenana é definida de acordo com a presença de 3,6-anidrogactose no resíduo de galactose 4-O-ligado (unidade B) e a posição e número de grupos sulfato na unidade α -D galactose. Desta forma, são normalmente classificadas de acordo com suas características estruturais. (VAN DE VELDE *et al.*, 2002). Há pelo menos 15 diferentes estruturas de carragena (JIAO *et al.*, 2011). Dentre as carragenanas existentes, as mais comuns comercialmente são: κ (Kappa), ι (Iota) e λ (lambda), onde elas apresentam teores de sulfatação variando entre 22 e 38% (p/p) e massa molecular entre 400 e 600 kDa (VAN DE VELDE *et al.*, 2002).

As agaranas pertencem a um grupo de galactanas que apresentam uma cadeia principal formada por unidades de (1 \rightarrow 3)- β -D-galactopirranose e (1 \rightarrow 4)- α -L-galactopirranose.

(KNUTSEN *et al.*, 1994). As agaranas não possuem um sistema de classificação baseado em letras gregas como as carragenanas. A presença de substituintes O-metil e 4,6-O-(1'-carboxietilideno) é mais frequente e grupos sulfatos podem estar presentes tanto na unidade A como B (STORTZ e CERESO, 2000). Embora haja uma grande variedade de grupos substituintes nas agaranas, existem duas estruturas extremas que são consideradas os exemplos mais simples de galactanas do tipo agarana. Uma dessas estruturas é a agarose, a qual é constituída por unidades dissacarídicas repetitivas de (1→3)-β-D-galactopiranosose (unidade A) e (1→4)-3,6-anidro-α-L-galactopiranosose (unidade B). A agarose é a galactana com maior propriedade gelificante dentro do grupo das agaranas. Uma das agaranas mais estudada é a porfirina, obtida de espécies de algas vermelhas do gênero *Porphyra* incluindo *Porphyra capensis* e *P. Haitanensis* (JIAO *et al.*, 2011).

Além de carragenanas e agaranas as algas vermelhas possuem outros polissacarídeos sulfatados que são chamados de DL-híbridos e outros contendo várias substituições que envolvem grupos sulfatos, ácido pirúvico e grupos metoxila (JIAO *et al.*, 2011).

1.3 Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados de algas

Muitas espécies de algas marinhas são utilizadas como alimento e na medicina tradicional devido aos seus benefícios à saúde (VO; KIM 2013). As algas são ricas fontes de polissacarídeos sulfatados, incluindo alguns que se tornaram valiosos aditivos na indústria de alimentos devido às suas propriedades reológicas como gelificação e como agente espessante (carragenana) (CHAN *et al.*, 2013). As algas também desempenham um papel essencial no atual panorama de produção de biocombustíveis (GHADIRYANFAR *et al.*, 2016). Além de usos industriais, os polissacarídeos derivados de algas marinhas têm surgido nos últimos anos como uma fonte rica e importante de compostos naturais bioativos e por esta razão, a produção e as aplicações desses polissacarídeos como agentes terapêuticos têm sido tema de intensas pesquisas (NA *et al.*, 2010).

Assim, os polissacarídeos sulfatados são reconhecidos por possuírem uma série de atividades biológicas, incluindo anticoagulante, antitrombótica, antiviral, anticâncer, antioxidante, imuno-inflamatória, dentre outras (WIJESEKARA *et al.*, 2011; DORE *et al.*, 2013; BARAHONA *et al.*, 2014; USTYUZHANINA *et al.*, 2016).

Porém, o papel biológico e farmacológico dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas fazem parte de uma área de estudos ainda considerada pouco explorada quando comparada aos estudos realizados com plantas superiores. Portanto, pesquisas adicionais tornam-se necessárias para investigação de suas diversas atividades biológicas.

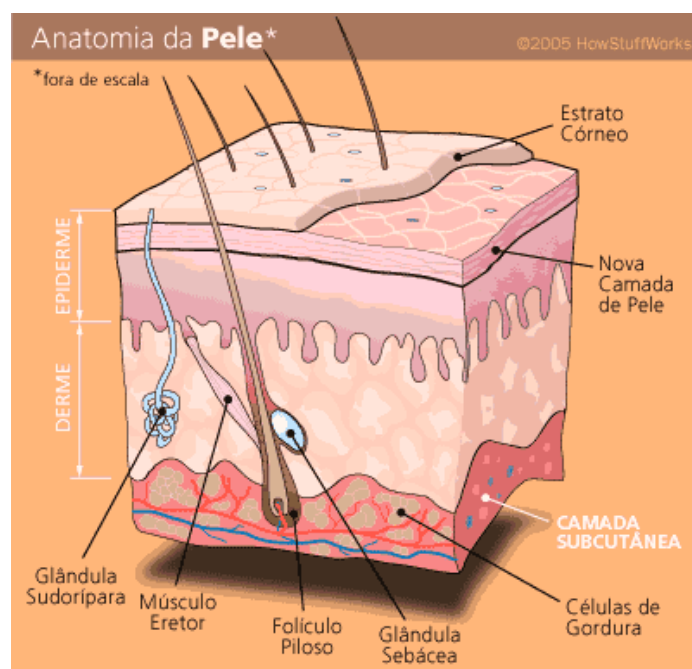
1.4 Pele - Estrutura e função

A pele é o maior órgão do corpo humano, representando 15% do peso total de um adulto e com uma área de 1,5 a 2 m². A sua espessura pode variar entre 0,5 mm (nas pálpebras) e 6 mm (entre as omoplatas), no entanto a espessura da pele na maior parte do corpo é de 1 a 2 mm (YANNAS, 2001). É considerada a principal barreira de proteção do organismo e apesar de ser esta a sua função principal ela desempenha outras funções adicionais essenciais, como: impedir a perda excessiva de líquidos, proteger da ação de agentes externos, sintetizar vitamina D com a exposição dos raios solares, agir como órgão do sentido e participar da termoregulação corpórea (SMELTZER; BARE, 2005).

A pele apresenta uma variedade de habitats, incluindo regiões com uma ampla faixa de pH, temperatura, umidade e conteúdo seboso. Além disso, estruturas da pele como os folículos capilares, sebáceos, glândulas écrinas e apócrinas compreendem sub-habitats que podem estar associados com sua microbiota residente (Grice *et al.*, 2008)

A pele possui duas camadas principais: a epiderme, a camada mais externa, e a derme, a estrutura mais interna da pele (Fig. 1). Entre estas duas camadas encontra-se a membrana basal e sob a derme o tecido subcutâneo (ou hipoderme). A espessura da pele varia de acordo com a zona do corpo onde se encontra, devendo-se as variações de espessura principalmente a variações da espessura da derme. A pele está ligada ao resto do organismo por 3 sistemas: sistema linfático, sistema circulatório e sistema nervoso. Estes sistemas são responsáveis pelo fornecimento de nutrientes e oxigénio, pela remoção de substâncias tóxicas, pelo equilíbrio de fluidos, sensibilidade e pela resposta imunitária da pele (ATALA; LANZA, 2002).

Figura 1 – Diagrama esquemático da estrutura da pele humana.



Fonte: BEAR *et al.*, 2008.

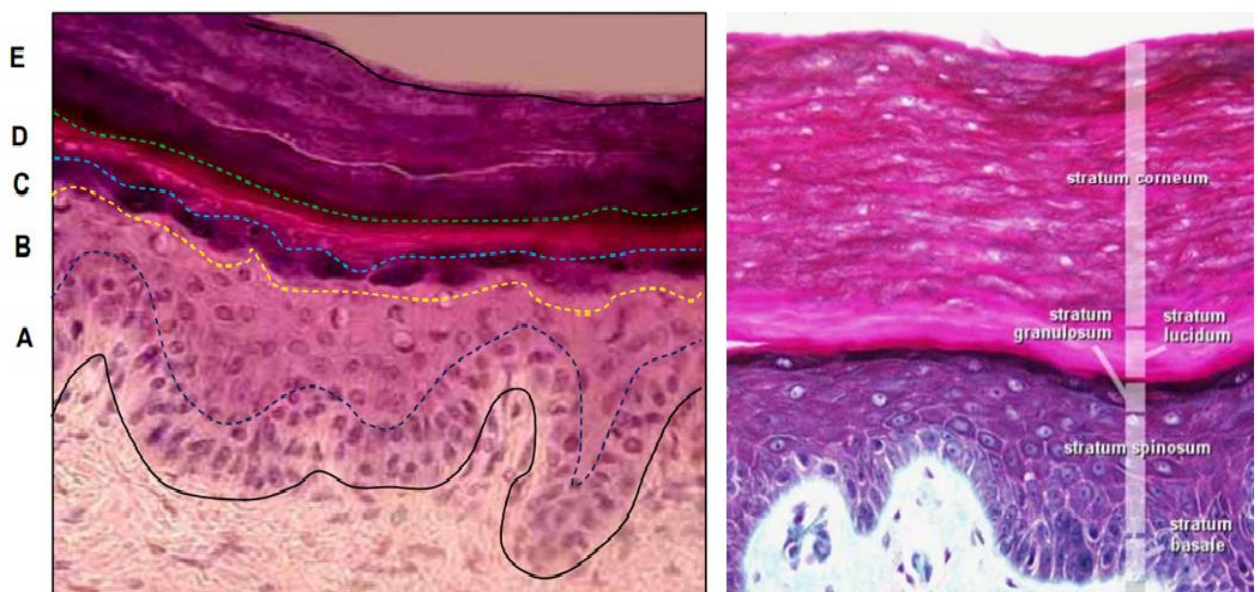
1.4.1 Epiderme

É uma estrutura celular avascularizada de várias camadas de células epiteliais. A epiderme é bastante fina, com uma espessura de cerca de 0,1-0,2 mm apresentando um mínimo de 0,05 mm nas pálpebras, até 1,5 mm na planta dos pés (YANNAS, 2001). A estratificação é mantida graças à presença de tonofilamentos e desmossomas que unem os citoplasmas dessas células (QUERLEUX *et al.*, 2009). É composta majoritariamente por queratinócitos (90 a 95%), com uma população menor de melanócitos responsáveis pela produção de melanina, células de Langerhans (células do sistema imunitário) e células de Merkel (5 a 10%) com função neuroendócrina (KANITAKIS *et al.*, 2002).

As células epidérmicas estão dispostas em camadas contínuas, compreendendo: a camada basal (única camada), as células espinhosas ou camada espinhosa (5 a 15 camadas), a camada granular (1 a 3 camadas), a camada lúcida (única camada) e a camada córnea ou corneificada (5 a 10 camadas), subdivididas em uma camada profunda (compacta) e uma superficial, que faz parte da camada mais externa de células descamativas queratinizadas do estrato córneo. Em algumas áreas do corpo, como a região palmo-plantar uma camada adicional, o estrato lúcido, pode ser visto entre as camadas granular e córnea (Fig. 2). A

epiderme também contém dois tipos distintos de unidades estruturais, isto é, a parte superficial das glândulas sudoríparas écrinas e folículos pilosos. Estes também são feitos de células epiteliais, mas têm suas próprias propriedades biológicas (matéria de renovação, diferenciação e resposta aos estímulos externos), refletidas por um aspecto histológico particular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008; QUERLEUX *et al.*, 2009)

Figura 2 - Epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, que reveste a pele. Onde temos representado pelas linhas coloridas: A Camada Basal (entre a linha contínua preta e a linha tracejada azul escura); B Camada Espinhosa (entre a linha tracejada azul escura e a linha tracejada amarela); C Camada Granular (entre a linha tracejada amarela e a linha tracejada azul clara); D Camada Lúcida (entre a linha tracejada azul clara e a linha tracejada verde); E Camada Córnea (entre a linha tracejada verde e a linha contínua preta). Técnica HE.



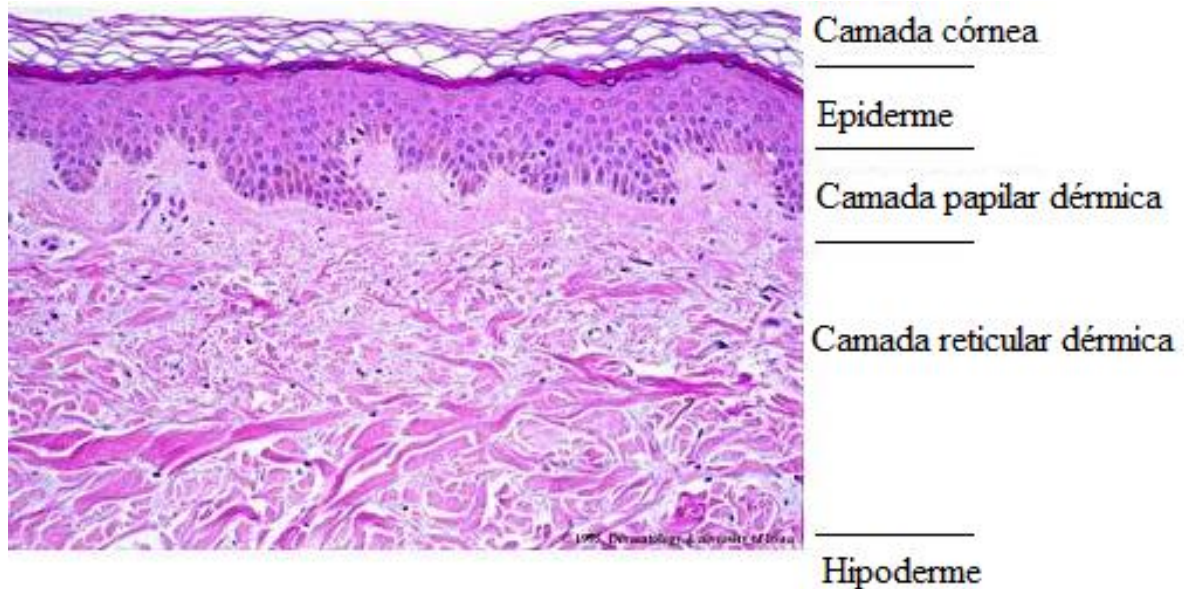
Fonte: Adaptado de Gunin (2010).

1.4.2 Derme

A derme é uma espessa camada de tecido conjuntivo que se estende da epiderme até o tecido subcutâneo, sua espessura é 10 vezes superior à da epiderme, variando entre 0,2 mm (nas pálpebras) até cerca de 4 mm (na planta dos pés) e é essencialmente esta camada que dita a espessura total da pele. A derme está em contato direto com a membrana basal e, juntamente com esta, desempenha a função de suporte mecânico à epiderme, acompanhando a topologia ondulada da fronteira da epiderme com a membrana basal com invaginações de uma estrutura na outra, o que impede que estas duas se separem ou deslizem uma sobre a outra. É composta principalmente por uma matriz extracelular rica em fibras colágenas, apresentando-se bastante

vascularizada e inervada, podendo, também, conter glândula sebáceas e sudoríparas e folículos pilosos. Pode ser dividida em camada papilar, mais externa, e camada reticular, mais interna (Fig. 3) (BANKS, 1992; BLANES, 2004).

Figura 3 - Imagem da histologia da pele com a derme e algumas estruturas identificadas.



Fonte: Disponível em: <http://www.dermatofuncional.pt/derme>

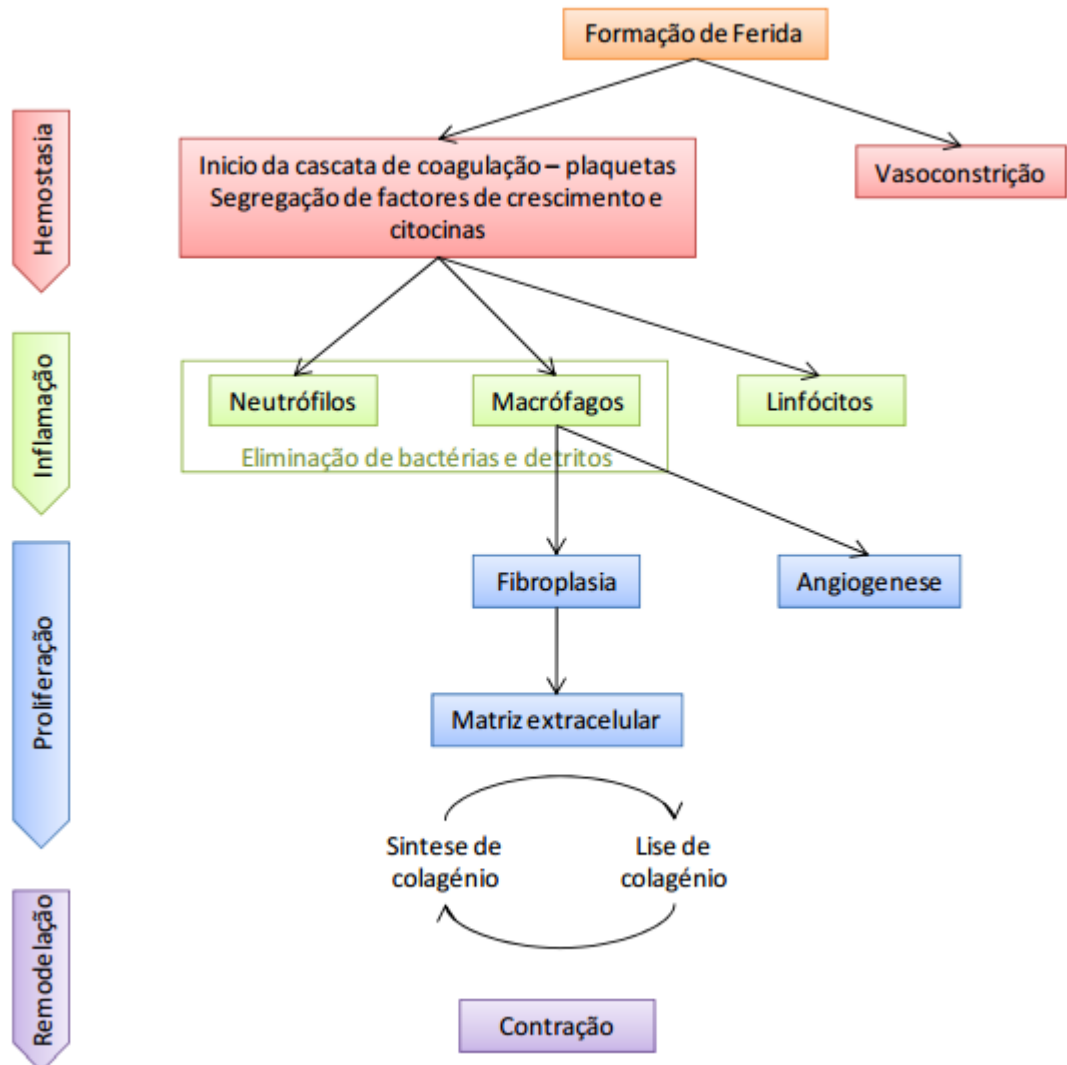
A camada papilar é delgada, constituída por tecido conjuntivo frouxo (projeções cônicas voltadas para cima) formando as papilas dérmicas, alternando com cristas epiteliais epidérmicas, aumentando a superfície de contato entre a derme e epiderme e permitindo uma melhor aderência entre essas camadas. Contém várias células (fibroblastos, dendrócitos dérmicos, mastócitos), vasos e terminações nervosas. Constituído de fibras colágenas dispostas em feixes frouxos e de finas fibras elásticas alongadas perpendicularmente à junção dermo-epidérmica (KANITAKIS *et al.*, 2002; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Ao nível das extremidades (ou seja, os dedos), a papila dérmica contém corpúsculos tácteis, terminações nervosas especializadas atuando como mecano-receptores (KANITAKIS *et al.*, 2002).

A camada reticular é mais espessa, constituída por tecido conjuntivo denso, composta de feixes grossos de colágeno. A rede elástica também é mais grossa. Esta camada contém a parte profunda dos anexos cutâneos, vascular e plexos nervosos (KANITAKIS *et al.*, 2002; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

1.5 Mecanismos envolvidos na cicatrização

A cicatrização de ferimentos começa imediatamente após uma lesão ou incisão e corresponde a uma combinação de eventos físicos, químicos e celulares que restauram um tecido ferido (HEDLUND, 2005). Em organismos superiores o reparo de tecidos pode ocorrer de duas formas: regeneração do tecido com a reposição da atividade funcional ou cicatrização do tecido com restabelecimento da homeostasia com perda da atividade funcional pela formação de cicatriz fibrótica (BALBINO *et al.*, 2005). A Figura 4 esquematiza, de uma forma sucinta, o processo típico de cicatrização de uma ferida.

Figura 4 - Fluxograma da cicatrização de uma ferida com as suas fases.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

No momento da injúria, múltiplos caminhos celulares e extracelulares são ativados, combinação dessa complexa rede de eventos, incluindo quimiotaxia, divisão celular, sínteses de neovascularização, novas matrizes extracelular e intracelular e formação e remodelação do tecido da cicatriz são regulados por vários mediadores, incluindo plaquetas, células da inflamação, citocinas, fatores de crescimento, metaloproteinasas e seus inibidores. Os principais tipos celulares e mediadores envolvidos no processo cicatricial estão indicados na Tabela 1. Nas feridas esses processos (que são desencadeados por lesão tecidual) envolvem quatro fases que se sobrepõem (apesar disso, são bem definidas): coagulação, inflamação, proliferação e remodelação do tecido, que é o estágio final do processo de cicatrização (SCHULTZ *et al.* 2003).

Tabela 1 - Principais tipos celulares e mediadores envolvidos na cicatrização.

Tipos celulares presentes no ferimento	Principais mediadores liberados	Principais efeitos desencadeados
Plaquetas	TGF- β , PDGF (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD), PAF, fibrinogênio, fibronectina, tromboplastina	Formação de trombo plaquetário que tampona a lesão e recrutamento de neutrófilos/monócitos
Neutrófilos	IL-6, IL-8, IL-1, TNF- α , TGF- β , HGF, MIP, HLE	Recrutamento de monócitos/macrófagos
Monócitos/ Macrófagos	TGF- α , TGF- β , VEGF-A, IL-6, IL-8, IL-1, TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, HB-EGF, HGF, MIP	Quimiotaxia de monócitos e fibroblastos, proliferação de fibroblastos, angiogênese e síntese de colágeno
Células residentes (a) Fibroblastos (b) Queratinócitos (c) Células endoteliais	(a) FGF1, FGF2, FGF4, FGF7, FGF-10, IP-10, IL-8, eotaxina, TGF- β (b) MCP-1, FGF1, FGF2, TGF- β , MIP-2; (c) MCP-1	Maturação e remodelamento da matriz extracelular e angiogênese

Fontes: Werner e Grose (2003), Hatanaka e Curi (2007) e Behm *et al.* (2012).

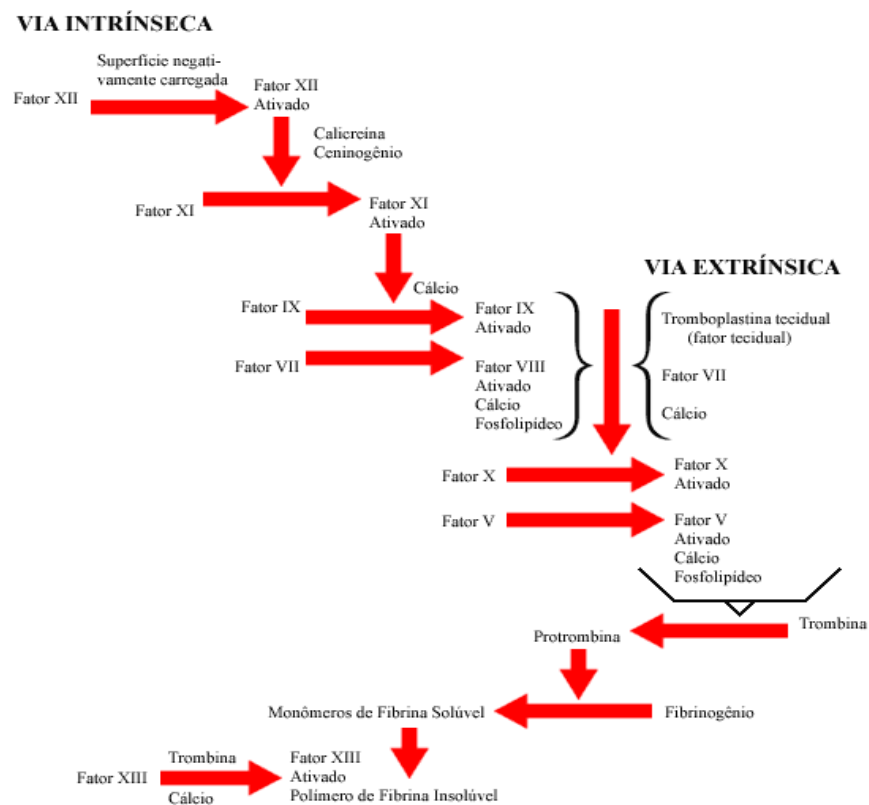
1.5.1 Fase de Coagulação

A hemostasia é o controle da perda sanguínea a partir de um vaso lesado. Ela se inicia com as plaquetas aderindo a macromoléculas nas regiões subendoteliais do vaso sanguíneo lesado. As plaquetas estimulam a ativação local dos fatores plasmáticos de coagulação, e isso conduz à geração de um coágulo de fibrina que reforça o agregado plaquetário. Mais tarde, à medida que ocorre a cicatrização da lesão, o agregado plaquetário e o coágulo de fibrina são degradados (MANN, 2006).

A coagulação sanguínea envolve uma série de reações de ativação de proteínas precursoras (zimogênios). A protease final gerada é a trombina (fator IIa) (MAJERUS *et al.*, 1978).

Quando a camada subendotelial é exposta, por exemplo, por uma injúria, uma glicoproteína ligada às células não-endoteliais, chamada fator tecidual (TF) entra em contato com o sangue. O TF se liga ao fator VII ativado (VIIa) e o complexo Colágeno AB resultante ativa os fatores IX e X. Uma vez ativado, o fator X converte protrombina em trombina (fator IIa), numa reação acelerada pelo fator Va. Na etapa final do sistema de coagulação, a trombina cliva fibrinogênio em monômeros de fibrina, que se polimerizam para formar um coágulo quimicamente estável (Figura 5) (ROSENBERG *et al.*, 1999).

Figura 5 - Fluxograma da cascata de coagulação.



Fonte: Disponível em: <http://docslide.com.br/documents/cascata-de-coagulacao-55c99842a1d0a.html>

Nos últimos 20 anos, uma grande reavaliação do papel da cascata de coagulação após a lesão do tecido tem sido explorada e agora já existem provas crescentes de que a coagulação é crítica para influenciar respostas inflamatórias e fibro-proliferativa durante as subseqüentes fases da cicatrização, em uma variedade de contextos patológicos em todos os principais sistemas de órgãos (MERCER; CHAMBERS 2013).

A cicatrização inicia-se com a hemostasia, que se prolonga por até 15 minutos (BAUM; ARPEY, 2005). As plaquetas são os componentes mais importantes na coagulação do sangue. Além disso, plaquetas liberam algumas citocinas e fatores de crescimento que aumentam o processo de cicatrização durante a coagulação do sangue (OKAMOTOA *et al.*, 2003). Um destes é o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), uma proteína que pode ser isolado a partir de plaquetas através de técnicas cromatográficas. Outros fatores, produzidos pelas plaquetas e outras células, incluem os fatores de: crescimento transformante (TGF), crescimento de fibroblastos (FGF) e crescimento endotelial vascular (VEGF) (SHAH *et al.*, 2012). Os mediadores liberados pelas plaquetas ativadas se difundem pela matriz provisória formando um gradiente quimiotático que orienta o recrutamento e a migração das células envolvidas com a instalação da resposta inflamatória (BALBINO *et al.*, 2005).

Os principais efeitos desencadeados são a formação de trombo plaquetário que tampona a lesão e o recrutamento de neutrófilos/monócitos para o local da lesão (HATANAKA; CURI, 2007).

1.5.2 Fase Inflamatória

A fase inflamatória é fundamental. Através das células e citocinas produzidas nesta fase ocorre a modulação das próximas fases da cicatrização. A inflamação protege a ferida contra organismos invasores patogênicos e limpa (fagocitose) as células danificadas após a lesão para evitar mais danos ao tecido (WAGENER *et al.*, 2013).

Células inflamatórias secretam enzimas e vários mediadores que resultam nas características clássicas da inflamação: dor, vermelhidão, calor e inchaço. Enquanto várias outras células envolvidas no processo, em termos de curar os principais intervenientes são os neutrófilos, os macrófagos e os linfócitos-T (SHAH *et al.*, 2012).

Os neutrófilos provenientes da circulação são as primeiras células a atingirem a região inflamada, sendo predominantes entre o primeiro e segundo dias. Sua função principal é fagocitar micro-organismos. A atividade microbicida destas células é dependente da ativação do sistema NADPH oxidase, ou seja, da geração de espécies reativas de oxigênio (*burst*

respiratório) e mobilização de cátions nos fagossomos, bem como da liberação de enzimas lisossomais, que auxiliam no combate à infecção (HATANAKA; CURI, 2007).

Além de sua função fagocitária, os neutrófilos possuem ação pró-inflamatória exercida através da liberação de citocinas que ativam fibroblastos e queratinócitos. Caso a ferida não esteja severamente infectada, em poucos dias o número de neutrófilos diminui devido à fagocitose por macrófagos (WERNER e GROSE, 2003; MARTIN, 2005). As citocinas liberadas por essas células durante o processo de apoptose são importantes componentes no recrutamento de monócitos. Os monócitos circulantes penetram então na ferida e se transformam em macrófagos. Essas células são conhecidas por secretarem fatores de crescimento e mediadores inflamatórios essenciais que coordenam processos importantes, como deposição de colágeno, contração da ferida e angiogênese (WRIGHT *et al.*, 2010; MURPHY *et al.*, 2011). Os fatores mitogênicos e citocinas sintetizadas e liberadas pelos macrófagos são: Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), FGF, VEGF, TGF- α e β e o fator-1 de crescimento *insulina-like* que são necessários para estimular a formação do tecido de granulação e, podem influenciar as fases tardias da cicatrização, como: neovascularização, granulação, fibroplasia e epitelização (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

Os monócitos/macrófagos são as células intermediadoras entre a fase inflamatória e a fase proliferativa da cicatrização. À medida que estas células diminuem no infiltrado inflamatório, dão espaço para a proliferação celular e preenchimento de matriz extracelular. Além disso, o marco do fim da fase inflamatória e início da fase proliferativa se dá com a presença de linfócitos T no infiltrado inflamatório (MIRZA & KOH, 2011; WILLENBORG *et al.*, 2012; PERDIGUERO *et al.*, 2011).

A participação de eosinófilos no processo cicatricial está, aparentemente, associada à produção da Proteína Básica Principal (MBP) que age na degradação do tecido. A fase inflamatória tem duração de 48 a 72 horas (HATANAKA; CURI, 2007).

1.5.3 Fase de Proliferação

Dividida em três subfases, a fase proliferativa caracteriza-se pelos processos de fibroplasia, angiogênese, deposição de matriz extracelular e re-epitelização. Nesta fase, ocorrem intensa migração e proliferação celular, principalmente de fibroblastos e queratinócitos (SEPHÉL; WOODWARD, 2006), sendo responsável pelo “fechamento” da lesão propriamente dita.

Os fibroblastos são os principais componentes do tecido de granulação e após a influência dos fatores de crescimento e demais mediadores, derivados principalmente (mas não exclusivamente) dos macrófagos, são ativados e migram das margens da ferida para o seu centro. Isto se dá pela matriz provisória formada e seguindo a orientação do gradiente químico de substâncias quimioatraentes. Com o aumento do número de fibroblastos ativados para a produção de colágeno no local, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico. Este processo é denominado de fibroplasia e para a sua eficiência é necessária a ocorrência, em paralelo, da formação de novos vasos sanguíneos, ou seja, é necessária a neovascularização da região (BALBINO *et al.*, 2005).

O processo de formação de novos vasos sanguíneos inicia-se com a ativação das células endoteliais as quais se separam de suas células vizinhas, devido à ruptura de junções de caderinas do endotélio vascular, resultando no aumento da permeabilidade vascular. A membrana basal é degradada por enzimas proteolíticas tais como metaloproteinases de matriz (MMPs), liberando fatores angiogênicos que, por sua vez, estimulam a proliferação e migração de células endoteliais. Formação do tubo capilar, deposição de uma nova membrana basal e anastomose levam ao fluxo sanguíneo. Fatores produzidos por células endoteliais tais como PDGF, atraem células de suporte como os pericitos, enquanto o VEGF e angiopoietinas garantem a estabilidade do vaso (BONNET; WALSH, 2005; ARROYO; IRUELA-ARISPÉM, 2010). A angiogênese permite o suprimento de oxigênio, nutrientes e células inflamatórias necessárias para o processo de cicatrização que ocorre dentro do tecido (BRADSHAW *et al.*, 2001; RODERO; KHOSROTEHRANI, 2010).

Por volta do quarto dia, com a fibroplasia e a angiogênese, inicia-se a formação do tecido de granulação, o qual é constituído por macrófagos, fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares, os quais são sustentados por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico, glicosaminoglicanos e colágenos tipos I e II. Esse tecido é edematoso e caracteriza-se pela presença de muitos espaços vazios, devido à imaturidade dos vasos, os

quais são exsudativos e sangram com facilidade (BAUM; ARPEY, 2005; HATANAKA; CURI, 2007).

Com a evolução do processo, a matriz extracelular, que inicialmente era composta principalmente por proteínas derivadas de plaquetas e do plasma, passa por modificações em sua composição. Na fase inicial do reparo, os fibroblastos passam a depositar grandes quantidades de fibronectina e ácido hialurônico. Posteriormente, há aumento na produção de glicosaminoglicanos, que serão, em parte, substituídos por proteínas como colágeno, elastina, laminina e proteases responsáveis pelo remodelamento fisiológico (BALBINO *et al.*, 2005). Durante o amadurecimento fenotípico dos fibroblastos em células produtoras de colágeno, o processo de contração da ferida alcança sua eficiência máxima. Isto ocorre devido à diferenciação de alguns fibroblastos das margens das feridas para miofibroblastos, células com características funcionais semelhante às células do músculo liso (THEORET, 2005; SEPHEL; WOODWARD, 2006).

A formação do epitélio é outro fenômeno que ocorre na fase de proliferação, na qual a epitelização faz-se pelo aumento de tamanho, da divisão e da migração das células da camada basal da epiderme por sobre a área de reparação do tecido conjuntivo subjacente (CARVALHO, 2002). Nessa fase, os fibroblastos migram sobre a estrutura de fibrina substituindo-a por uma rede de colágeno, através da excreção de colágeno e fibronectina, restaurando assim a matriz extracelular (MEC) na ferida. O colágeno é o principal componente que fortalece e suporta o tecido extracelular (NAYAK *et al.*, 2009; MURPHY *et al.*, 2011).

Ao final desta etapa, o leito da ferida está totalmente preenchido pelo tecido de granulação, a circulação é restabelecida pela neovascularização e a rede linfática está passando por regeneração. Lentamente o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras colágenas o que começa a dar à região lesada a aparência de cicatriz devido ao acúmulo de massa fibrosa (BALBINO *et al.*, 2005).

1.5.4 Fase de Remodelamento

Por volta do décimo dia, o leito da ferida está totalmente preenchido pelo tecido de granulação. Nesta etapa, surgem as primeiras fibras de colágeno tipo I, ocorre um aumento da resistência, sem aumento na quantidade de colágeno. A remodelação do colágeno inicia-se na formação do tecido de granulação e mantém-se por meses após a re-epitelização (BALBINO *et al.*, 2005).

A resistência de uma cicatriz é dada pela quantidade de colágeno depositada e pela forma com que as fibras estão organizadas. O remodelamento envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. Inicialmente, a deposição de colágeno é feita de maneira aleatória, tendo como orientação a organização da fibronectina e dependente da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Subsequentemente, essas fibras são digeridas, ressintetizadas, rearranjadas conforme organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente e lateralmente ligadas por ligações covalentes. Nessa fase ocorre uma tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal e alterações dos elementos da matriz extracelular (TOSCANO *et al.*, 2004; BALBINO *et al.*, 2005).

Os eosinófilos aparecem nas últimas fases da reparação e presume-se que podem estar relacionados à produção de fatores de crescimento. Quando a ferida completou o seu fechamento e os microrganismos foram eliminados, os linfócitos constituem o subsistema leucocitário mais abundante em feridas humanas. De forma notável, nesta etapa, eles são atraídos para a região da ferida em igual número que os monócitos e, a partir do décimo quarto dia, são os leucócitos que predominam na região (BALBINO *et al.*, 2005).

A ativação de receptores de integrinas pelos queratinócitos permite a interação com uma variedade de proteínas da matriz extracelular na margem e no leito da ferida. Por outro lado, a expressão e ativação, de metaloproteases promovem a degradação e modificação das proteínas da matriz extracelular no sítio da ferida, facilitando a migração celular. A própria atividade proteolítica dessas enzimas pode liberar fatores de crescimento ligados a matriz extracelular, de forma a manter constante o estímulo, a proliferação e migração dos queratinócitos, acelerando o processo de re-epitelização (SANTORO *et al.*, 2005). Esta fase de maturação perdura por toda a vida da ferida, embora o aumento da força tênsil se estabilize, após um ano, em 70 a 80% da pele intacta (TAZIMA *et al.*, 2008).

Com a evolução do processo, acentua-se a deposição de colágeno e a maioria das células desaparecem (observa-se a apoptose de fibroblastos e células endoteliais) formando finalmente a cicatriz. Ao final desta etapa, os anexos da pele, como folículos pilosos e

glândulas sofrem regeneração limitada e a coloração da cicatriz permanece pálida, pois a regeneração dos melanócitos é deficiente e as cicatrizes são hipo-vascularizadas devido ao desaparecimento dos neocapilares (BALBINO *et al.*, 2005).

Em contraste, algumas feridas não cicatrizam em uma maneira oportuna e ordenada, resultando em feridas crônicas e sem cicatrização. A desregulação em certos estágios da cicatrização pode resultar em deposição excessiva de colágeno e formação de cicatriz anormal, como visto em cicatrizes hipertróficas e quelóides (ENOCH e LEAPER, 2007). Portanto, muitos fatores podem interferir com este processo, resultando em retardo da cicatrização e um aumento na morbidade do paciente e mortalidade (YOUNG e MCNAUGHT, 2011)

1.6 Toxicidade

Durante o desenvolvimento de novos fármacos, a avaliação toxicológica *in vivo* de drogas constitui uma etapa importante para que estas possam ser testadas e utilizadas em seres humanos. Têm como objetivo a determinação do modo e local de ação farmacológica das drogas em potencial. Nessa fase, podem ser realizados estudos farmacológicos comparativos com fármacos da mesma classe terapêutica já descritos. Há várias etapas distintas para se obter todas as características da substância candidata a um novo fármaco (HAYES, 2001). Sendo assim, os testes toxicológicos normalmente requeridos com propósito regulatório incluem: toxicidade aguda, toxicidade sub-crônica, toxicidade crônica, mutagênese, carcinogênese, reprodução e teratogênese, toxicocinética, efeitos locais sobre a pele e olhos, sensibilização cutânea e ecotoxicidade (SPIELMANN, 2002; BARROS & DAVINO, 2003).

Os ensaios de toxicidade aguda avaliam os efeitos adversos que ocorrem em um curto período de tempo, após administração única ou múltipla dentro de horas, de elevadas doses da substância avaliada. O início da realização deste teste, segundo Valadares (2006), ocorreu na década de 20 para avaliar substâncias que seriam utilizadas em seres humanos, porém na década de 1970 passou a ser amplamente utilizadas para a comparação e classificação da toxicidade de substâncias e após este período, gradativamente, tornou-se pré-requisito para as agências reguladoras responsáveis pela aprovação de novos fármacos, aditivos alimentares, ingredientes cosméticos, produtos domésticos, químicos industriais e pesticidas.

Inúmeros trabalhos envolvendo estudos pré-clínicos *in vivo* de produtos naturais, utilizam parâmetros bioquímicos, hematológicos e anatomopatológicos para avaliar possíveis sinais de toxicidade. Em estudos farmacológicos/toxicológicos, após exposição às drogas, são analisados parâmetros que avaliam possíveis alterações na função hepática, função renal, bem como nos parâmetros hematológicos. Ainda, exames anatomopatológicos (macro e microscópicos) são de extrema importância, pois analisam estrutura e função, em nível celular. Portanto, é evidente a importância da avaliação desses parâmetros para detectar possível toxicidade de qualquer composto analisado (PITA, 2011) .

1.7 Pesquisa de novos produtos na cicatrização utilizando polissacarídeos

O objetivo principal do tratamento de feridas é curar a lesão no menor tempo possível com o mínimo de dor e desconforto para o paciente. No local da ferida, deseja-se uma cicatriz fina e flexível com máxima resistência à tração (PATHER *et al.*, 2011).

Apesar dos grandes avanços verificados nas últimas décadas acerca dos diversos fatores e fenômenos envolvidos com o processo de reparação tissular, a crescente pesquisa e a descoberta de novos recursos e tecnologias, muito há que ser descoberto, em especial nos países subdesenvolvidos. Assim, dentre os principais recursos disponíveis no Brasil utilizados na formulação de novos fármacos, destacam-se: ácidos graxos essenciais, alginato de cálcio, carvão ativado, colágeno de origem bovina, hidrocolóides, sulfadiazina de prata, dentre outros. Onde estes compostos podem atuar de três diferentes formas: curativos, moduladores do processo de cicatrização e na engenharia de tecidos onde podem auxiliar na substituição ou facilitar a reconstrução do tecido perdido ou danificado (BURD, A.; HUANG, L.2008).

Além dos recursos tradicionais, novas tecnologias têm auxiliado na descoberta de novos produtos tanto a base do látex da seringueira como de secreção de caramujo (MANDELBAUM *et al.*, 2003). Entretanto, diversos estudos têm se realizado com alguns polissacarídeos, como a quitina e os alginatos, aonde estes vêm sendo utilizados com fins terapêuticos, pois atuam como agentes cicatrizante, antimicrobiano e hemostático, além de possuírem efeito analgésico (SENEL; McCLURE, 2004; CHANDIKA *et al.*, 2015).

Diallo *et al* (2001) estudaram os polissacarídeos extraídos das raízes de *Entada africana* e observaram que estes interferiam com o sistema do complemento em testes realizados *in vitro*, podendo ser parcialmente responsáveis pela cicatrização de feridas, efeito este observado quando os curandeiros em Mali aplicavam unguentos com preparações extraídas das raízes de *E. africana* em diferentes tipos de feridas.

O polissacarídeo de *Angelica sinensis* apresentou efeito cicatrizante em úlceras gástricas experimentais em ratos Sprague-Dawley, além de mostrar efeito estimulante *in vitro* da proliferação de células epiteliais gástricas (YE, *et al.*, 2003). Foi relatado também que o polissacarídeo da planta *Anacardium occidentale L.* favoreceu a resolução do período inflamatório da cicatrização, onde os resultados demonstraram que os animais apresentaram sinais flogísticos menos intensos e o aumento da presença do tecido de granulação fibrovascular e fibras colágenas nas feridas (SCHIRATO *et al.*, 2006).

Pesquisas *in vitro* utilizando heparina (um tipo de polissacarídeo não ramificado) demonstraram o seu efeito cicatrizante. Os resultados comprovaram que em 90% das feridas experimentais tratadas com o gel heparina-quitosana cicatrizaram mais rápido quando comparados com o gel de quitosana sozinho (30%) e heparina sozinha (0%) (BURD, A.; HUANG, L. 2008). A aplicação tópica dos extratos de flores *Opuntia ficus-indica* acelerou o processo de re-epitelização e a contração de feridas cutâneas induzidas experimentalmente em ratos (AMMAR, *et al.*, 2015).

O ácido hialurônico (polissacarídeo não sulfatado) tem sido utilizado em diversas aplicações médicas e tem contribuído para diversas funções biológicas tais como: adesão celular, migração, diferenciação e proliferação de células teciduais. Além de promover uma estrutura temporária nas fases iniciais da cicatrização facilitando a difusão de nutrientes e removendo resíduos metabólicos celulares (CHANDIKA *et al.*, 2015).

O potencial de cicatrização de hidrogéis (polissacarídeos) em queimadura foi avaliada em ratos submetidos a uma queimadura de segundo grau profunda. Verificou-se que o grupo tratado com o hidrogel de CMC/Odex mostrou o fechamento da ferida quase completa aos 21 dias após o tratamento quando comparado a ferida do grupo não tratado com o hidrogel. Além disso, a análise histológica indicou claramente a regeneração dos anexos da pele, incluindo folículos pilosos, glândulas sebáceas e papilares dérmicas, sugerindo que o tratamento com o hidrogel promoveu a cicatrização de feridas e a regeneração da pele (LI *et al.*, 2015).

Xing e colaboradores (2015) investigaram o papel do acemanano, um mucopolissacarídeo extraído das folhas de *Aloe vera*, no reparo tecidual em feridas induzidas em ratos e demonstraram que este promoveu a cicatrização, em parte, através da ativação de mecanismo de tradução de proteínas mediadas por mTOR/AKT, podendo representar uma abordagem alternativa para a terapia de feridas cutâneas.

Entretanto, a literatura não faz referência a produtos cicatrizantes locais oriundos basicamente de algas marinhas.

Diante do exposto acima, foi reconhecido que não só pode ser atribuído aos polissacarídeos, características físicas necessárias de um curativo, mas também, como participantes ativos no processo de cicatrização de feridas (BURD; HUANG, 2008). Neste contexto, por serem biomoléculas, os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas têm sido uma escolha para investigação como potenciais auxiliares na cicatrização de ferida.

2 HIPÓTESE

Baseado em estudos anteriores em que polissacarídeos de algas marinhas mostraram-se atóxicos e detentores das mais diversas atividades biológicas, e que polissacarídeos extraídos de plantas superiores apresentaram um efeito cicatrizante, a hipótese da presente tese é que polissacarídeos extraídos e purificados de algas marinhas do litoral cearense apresentam efeito cicatrizante em modelos *in vitro* e *in vivo* através da aceleração do processo de re-epitelização e migração lateral de queratinocitos.

3 OBJETIVOS

3.1. Geral

Isolar polissacarídeos sulfatados de algas marinhas, analisar sua toxicidade e possíveis danos ao SNC, avaliar suas atividades antibacteriana e pró-coagulante e seus efeitos cicatrizante em modelos de cicatrização *in vivo* e *in vitro*.

3.2. Específicos

- ✓ Extrair os polissacarídeos sulfatados totais das algas marinhas e fracioná-los;
- ✓ Avaliar o efeito sistêmico das frações obtidas na toxicidade aguda em camundongos e possíveis alterações nas funções hepáticas e renais, como também, avaliar a ação ansiolítica e antidepressiva das frações obtidas em modelos clássicos neurocomportamentais de ansiedade e depressão em camundongos.
- ✓ Avaliar o potencial coagulante dos polissacarídeos sulfatados em testes de coagulação *in vitro* e *ex vivo*;
- ✓ Avaliar a ação dos polissacarídeos sulfatados frente à bactérias gram-positiva e gram-negativa;
- ✓ Formular os géis com os polissacarídeos sulfatados, utilizando como veículo o Carbopol 940 (C);
- ✓ Avaliar a irritabilidade dermal dos géis;

- ✓ Verificar o potencial de cicatrização dos géis a base de polissacarídeos em um modelo de feridas induzidas por trauma mecânico em camundongos (*in vivo*) e análise histológica dos tecidos dos animais submetidos ao tratamento preventivo;
- ✓ Avaliar o potencial cicatrizante dos polissacarídeos sulfatados em testes *in vitro* utilizando cultura de células humanas e modelos equivalentes de pele humana.

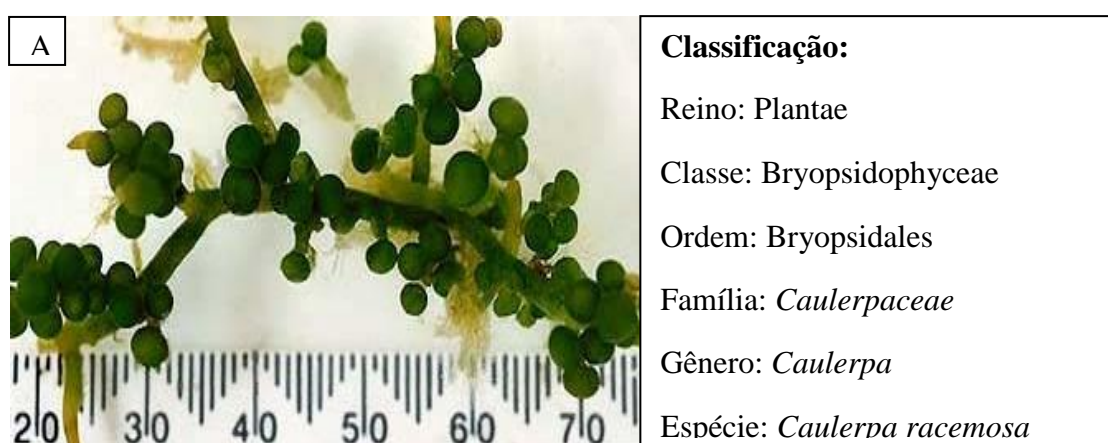
4 MATERIAIS E MÉTODOS



4.1 Materiais

4.1.1 Aquisição das algas marinhas

As algas marinhas *Caulerpa racemosa*, *Cryptonemia crenulata* e *Gracilaria birdiae*, foram coletadas de bancos naturais cearenses localizados na Praia da Pedra Rachada no município de Paracuru-Ce em maré de sizígia (Figura 6). A seleção das espécies seguiu critérios quanto à abundância, facilidade de obtenção, importância comercial e/ou sem registro de estudo. Após a coleta as algas foram acondicionadas em sacos plásticos sendo transportadas para o laboratório de algas marinhas da Universidade Federal do Ceará (UFC) onde foram lavadas, para a remoção de areia e epífitas, secas à temperatura ambiente (25 °C) e posteriormente maceradas com nitrogênio líquido, sendo acondicionadas em potes de vidro à temperatura ambiente. Coletas foram realizadas de 6 em 6 meses.

Figura 6 - Espécimes das algas e sua classificação taxonômica: *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J. Agardh (A) *Cryptonemia crenulata* (J.Agardh) J.Agardh (B), *Gracilaria birdiae* E.M.Plastino & E.C.Oliveira (C).



<p>B</p> 	<p>Classificação: Reino: Plantae Classe: Florideophyceae Ordem: Halymeniales Família: <i>Halymeniaceae</i> Gênero: <i>Cryptonemia</i> Espécie: <i>Cryptonemia crenulata</i></p>
<p>C</p> 	<p>Classificação: Reino: Plantae Classe: <i>Florideophyceae</i> Ordem: <i>Gracilariales</i> Família: <i>Gracilariaceae</i> Gênero: <i>Gracilaria</i> Espécie: <i>Gracilaria birdiae</i></p>

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.2 Bactérias

As cepas padrão (ATCC) de eubactérias que foram utilizadas neste trabalho foram provenientes da bacteriotéca do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado do Instituto de Ciências do Mar (Labomar) da Universidade Federal do Ceará. Foram utilizadas espécies de bactérias Gram-negativa e Gram-positiva. A espécie Gram-negativa foi: *Escherichia coli* e a espécie Gram-positiva foi *Staphylococcus aureus*.

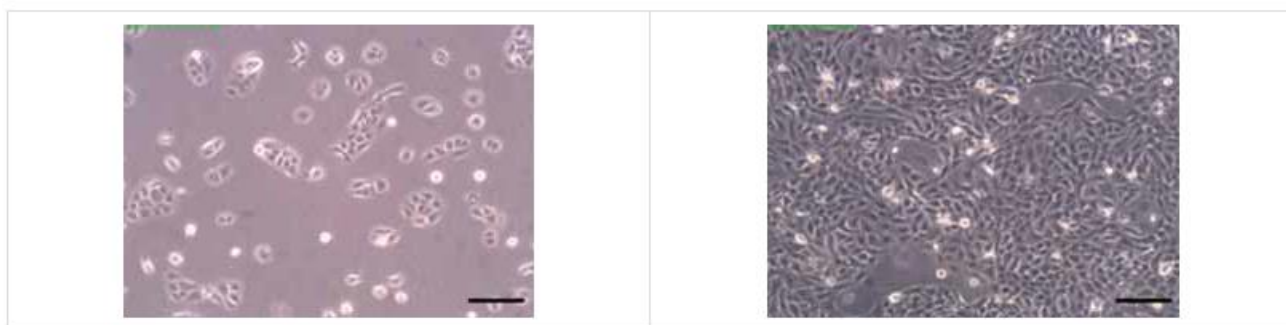
4.1.3 Isolamento e cultura das células

As amostras de peles foram coletadas com o consentimento de pacientes que passaram por cirurgias de redução de seios e abdome, realizadas no Hospital St. Andrews e Wesley

(Brisbane, QLD, Austrália). A aprovação do comitê de ética para o uso de materiais humanos foi obtida em conjunto com a Universidade Tecnológica de Queensland (QUT) e o Hospital St. Andrews e Wesley. Em adição, todos os experimentos foram conduzidos de acordo com a declaração de Helsinki, 2004.

Células HaCaT (linhagem de queratinócitos humanos) foram cedidos pelo Professor Norbert E. Fusening (DKFZ, Heidelberg, Germany) e foram cultivados de acordo como descrito previamente por Hyde, *et al.*, (2004) (Figura 7). O meio de cultura utilizado foi o *Eagle* modificado por *Dulbecco* (DMEM; Invitrogen), 10% soro bovino fetal, 2 mM L-Glutamina e 1% solução de antibióticos (100 UI/ml de penicilina/estreptomicina 100 µg/mL). O meio de cultura foi trocado a cada dois dias, enquanto as células eram mantidas em incubadora com atmosfera de 5% CO₂ a 37 °C.

Figura 7 - Micrografias de contraste de fase de células HaCaT cultivadas em frascos de cultura 2D convencionais. Imagens mostram células em baixa (à esquerda) e alta (direita) confluência. Barras de escala: 200 µM.



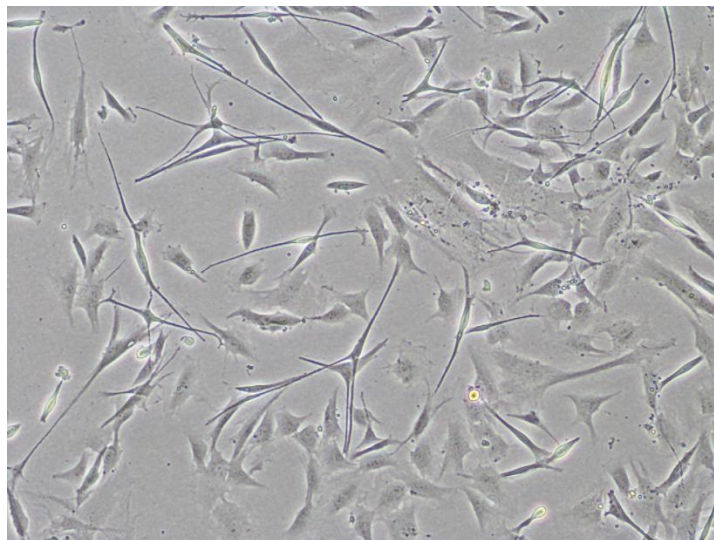
Fonte: Elaborada pelo autor.

Queratinócitos humanos, de diferentes doadores, foram isolados de amostras de pele e cultivados *in vitro* utilizando o meio de cultura *Full Green's* (Rheinwald and Green, 1975) de acordo com os protocolos previamente descritos por Dawson *et al.*, (2006). O meio de cultura foi trocado a cada três dias, enquanto as células eram mantidas em incubadora com atmosfera de 5% CO₂ a 37 °C.

Para o isolamento de fibroblastos (Figura 8), pedaços de pele foram finamente triturada (0,2x0,2 cm) e imersas no meio de cultura DMEM com adição de 0,05% de colagenase A (tipo I; Invitrogen, Mulgrave, Austrália) a 37 °C, 5% de CO₂ durante 18 h. A solução de enzima foi então centrifugada a 2000 rpm durante 10 min. As células foram semeadas em frascos T80 e cultivadas utilizando o meio DMEM (10% soro bovino fetal). O

meio de cultura foi trocado a cada três dias, enquanto as células eram mantidas em incubadora com atmosfera de 5% CO₂ a 37 °C.

Figura 8 - Micrografias de contraste de fase de fibroblastos cultivados em frascos de cultura 2D convencionais.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Depois de atingir aspecto de subconfluência celular, todas as culturas foram amplificadas repetidamente, até que o número desejado de células fosse obtido. As culturas foram descartadas após a 20ª passagem, para que dessa forma, o fenótipo da população celular seja preservado.

4.1.4 Animais

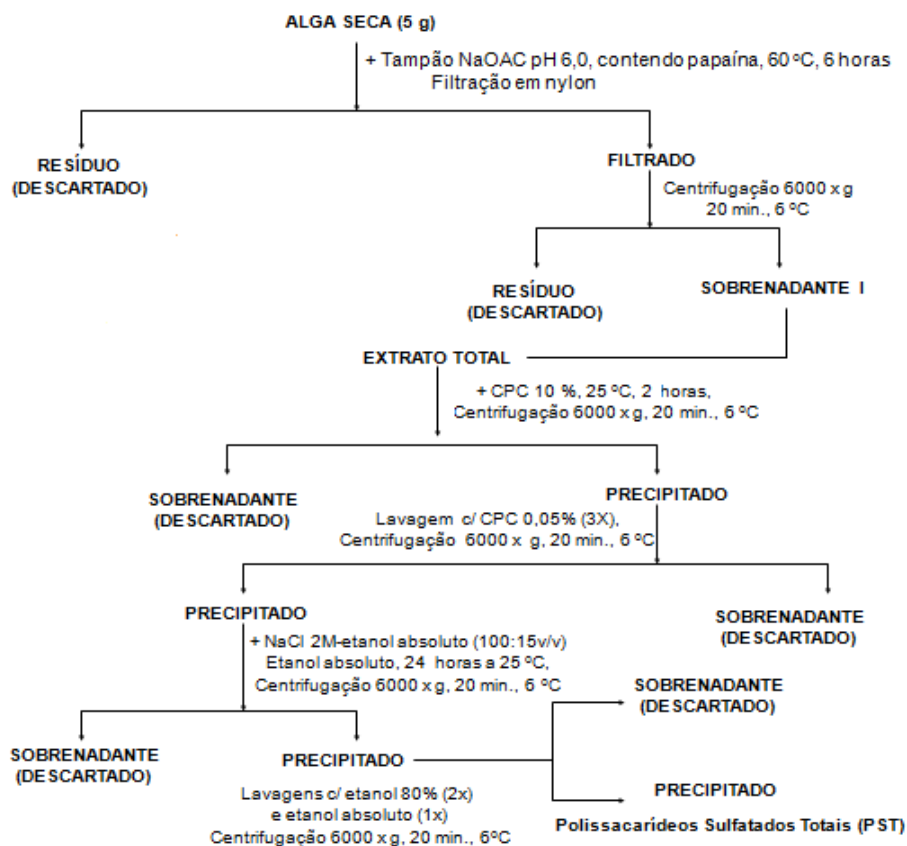
Foram utilizados camundongos *Swiss* machos e fêmeas, pesando entre 25 a 35 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e mantidos em salas com temperatura ambiente controlada e livre acesso à ração e à água no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Os ensaios com os animais seguiram os padrões exigidos de ética e biossegurança, e somente foram iniciados após aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) desta instituição.

4.2 Métodos

4.2.1 Extração dos polissacarídeos sulfatados totais

Para extração dos polissacarídeos sulfatados totais (PST), 5 g de cada alga foram hidratadas em 250 mL de tampão acetato de sódio (Vetec, Brasil) 0,05 M, pH 6,0 com 1020 mg de papaína (Vetec), 5 mM de cisteína e 5 mM de EDTA (Vetec), mantendo-se em banho a 60 °C por 6 horas e posteriormente filtrado. O resíduo obtido foi lavado com água destilada, submetido à outra filtragem e o filtrado obtido reunido ao da primeira filtragem. Os polissacarídeos sulfatados foram precipitados com 16 mL de uma solução a 10% de cloreto de cetilpiridínio (CPC) (Sigma, EUA), por 2 horas à temperatura ambiente e centrifugado (2.560 x g; 20 min, 5 °C). O precipitado foi lavado com 610 mL de uma solução 0,05% de CPC, centrifugado e dissolvido em 172 mL de uma solução de NaCl (Vetec) 2 M: etanol (100:15,v/v). Os PST foram precipitados com 305 mL de etanol absoluto (24 hs a 4 °C). O precipitado obtido após centrifugação foi lavado duas vezes com 305 mL de etanol 80% e uma vez com etanol absoluto, sempre seguidos de centrifugações (Figura 9). O material obtido foi então dialisado contra água destilada, liofilizado sendo armazenados à temperatura ambiente.

Figura 9 – Fluxograma de extração dos polissacarídeos sulfatados totais.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.2 Fracionamento e purificação dos polissacarídeos sulfatados

Os polissacarídeos sulfatos (30 mg) separadamente foram dissolvidos em 5 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0, e posteriormente foram aplicados em cromatografia de troca iônica utilizando uma coluna de DEAE-celulose equilibrada com o mesmo tampão. A coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio e as frações de polissacarídeos sulfatados foram eluídas por “step wise” com NaCl nas concentrações de 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,5; M adicionado ao tampão de equilíbrio. As frações foram monitoradas através da propriedade metacromática usando o azul de 1,9-dimetilmetileno (Aldrich, EUA) e as leituras realizadas em espectrofotômetro a 525 nm (FARNDALE *et al.*, 1986). As frações sulfatadas majoritárias

foram dialisadas contra água destilada, liofilizadas e estocadas à temperatura ambiente para uso posterior e denominadas CrII, CcII e GbI, respectivamente para cada espécie de alga *Caulerpa racemosa*, *Cryptonemia crenulata* e *Gracilaria birdiae*.

4.2.3 Toxicidade

4.2.3.1 Avaliação da toxicidade por dose repetida

Camundongos machos e fêmeas foram tratados com doses repetidas de 10 mg/Kg; i.v. com a fração polissacarídica de CcII ou solução salina (0,15 M) estéril durante 7 dias consecutivos em grupos de seis animais, cada, rigorosamente pesados. Animais sem tratamento também foram analisados, sendo estes o grupo padrão. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica com livre acesso à água e ração. No 8º dia, os animais foram anestesiados por hidrato cloral e as amostras de sangue do plexo retro-orbitário foram coletadas e centrifugadas para a obtenção do soro para posteriores dosagens das enzimas transaminases Glutâmico Oxalacética e Pirúvica (AST e ALT), relacionadas a função hepática, Uréia que está relacionada a função renal e fosfatase alcalina (ALP) que é usada no diagnóstico e no acompanhamento de distúrbios hepáticos e ósseos (Kits comerciais - LABTEST Diagnóstica S/A, Minas Gerais, Brasil). Em seguida, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical, seguido de retirada dos órgãos (fígado, rim direito, coração, baço, timo e linfonodo) e pesagens dos mesmos. O peso úmido de cada órgão foi expresso em porcentagem com relação à massa corporal e comparado ao grupo salina.

4.2.3.2 Avaliação da ação ansiolítica e antidepressiva em modelos clássicos neurocomportamentais de ansiedade e depressão em camundongos.

4.2.3.2.1 Protocolo experimental

Os animais foram tratados com diferentes doses das frações polissacarídicas de CcII e CrII (1, 5 ou 10 mg/Kg; i.v.). Os animais foram submetidos aos testes comportamentais 30 min após a última administração das frações polissacarídicas. Por outro lado, para a avaliação da atividade antidepressiva, foi utilizado imipramina (Novartis, Brasil), 10 e 30 mg/Kg (i.p.), nos testes de nado forçado e suspensão de cauda, respectivamente, como controle positivo. Como referência ansiolítica foi utilizado diazepam (Roche, Brasil) na dose de 1 mg/Kg (i.p.) nos testes de labirinto em cruz elevada e placa perfurada e 2 mg/Kg no ensaio de campo aberto como padrão para atividade relaxante muscular.

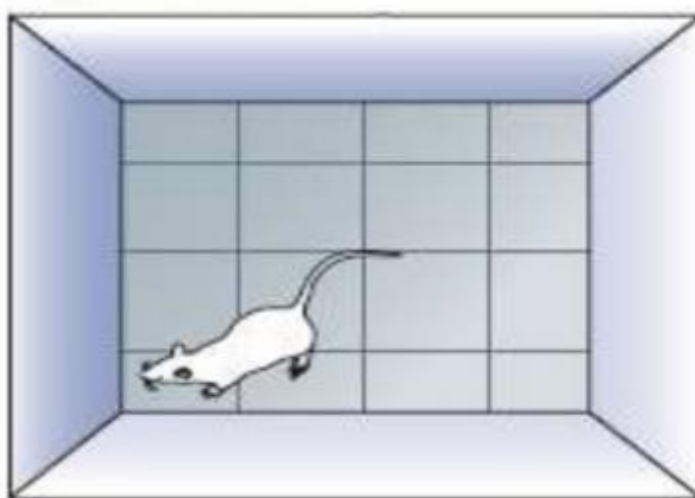
Antes dos experimentos os animais foram colocados em ambiente fechado desprovido de barulho externo, com a temperatura constante (24 ± 1 °C) e iluminação de baixa intensidade (lâmpada vermelha de 15 W), de modo que se adaptem com o ambiente do experimento. Os testes do campo aberto, placa perfurada e suspensão de cauda foram realizados com os mesmos grupos de animais da maneira descrita a seguir: primeiramente os animais foram colocados no campo aberto onde foram avaliados durante 5 min e, em seguida, transferidos para a placa perfurada onde foram observados por 5 min e finalmente suspensos pela cauda e analisados durante 6 min. O ensaio da cruz elevada e do nado forçado foram realizados com os mesmos grupos de animais da maneira descrita a seguir: os animais foram observados na cruz elevada por 5 min e depois submetidos ao ensaio de nado forçado onde foram observados por 5 min. Em todos os testes, com exceção apenas do nado forçado e suspensão de cauda, após cada observação animal, foi utilizado álcool 70% para remoção de resíduos e odor do animal.

4.2.3.2.2 *Teste do campo aberto (CA)*

Este teste foi realizado seguindo o modelo proposto inicialmente por Archer, 1973. O teste consiste em um protocolo, cuja avaliação dos seus componentes tem sido amplamente utilizada para mensuração de emocionalidade, atividade exploratória (MATTO & ALLIKMETS, 1999), atividade geral ou locomotora, medo e ansiedade (COURVOISIER *et al.*, 1996). Os animais foram divididos em 5 grupos, onde receberam tratamento: salina (NaCl 0,9%; i.v.); CrII, CcII e GbI nas doses de 1, 5 ou 10 mg/Kg, i.v.; diazepam 2 mg/Kg. Os camundongos foram individualmente inseridos em uma caixa de acrílico branca (60 x 60 x

60 cm) dividida igualmente em 16 quadrantes (Figura 10). Cada animal foi colocado no centro do arranjo experimental imediatamente antes do teste e foram observados por 5 min. Os parâmetros para observação foram: número de cruzamentos com as quatro patas (movimentação espontânea), número de comportamentos de auto-limpeza (*grooming*) e o número de levantamentos em duas patas (*rearing*), registrados durante um tempo de 5 minutos.

Figura 10 - Teste do campo aberto. O aparato é constituído de em uma caixa de acrílico branca (60 x 60 x 60 cm) dividida igualmente em 16 quadrantes.



Fonte: Disponível em: <http://www.slideshare.net/AdvaitaMv/screening-of-anxiolytics-44529278>

4.2.3.2.3 Teste da placa perfurada (PP)

Introduzido inicialmente por Clark *et al.*, (1971), o teste da placa perfurada é constituído de uma placa (60 cm x 30 cm) com 16 orifícios (2,3 cm de diâmetro) espaçados uniformemente, feita de acrílico preto, sendo esta suspensa a 10 cm da bancada (Figura 11). O parâmetro analisado foi o número de *Head dips* (número de vezes que o animal coloca a cabeça nos orifícios) durante 5 min. Os animais, um por vez, foram colocados na plataforma 30 min após o tratamento com salina (NaCl 0,9%; i.v.); CrII, CcII e GbI nas doses de 1, 5 ou 10 mg/Kg, i.v.; diazepam 1 mg/Kg.

Figura 11 - Teste da placa perfurada. O aparato é constituído de uma placa (60 cm x 30 cm) com 16 orifícios (2,3 cm de diâmetro) espaçados uniformemente, feito de acrílico preto, sendo está suspensa a 10 cm da bancada.



Fonte: Disponível em: <http://access.stoeltingco.com/stoelting/3220/2614/1500/ANYmaze/Hole-Board-Test-NEW>

4.2.3.2.4 Teste de suspensão de cauda (SC)

Originalmente proposto por Stéru e colaboradores em 1985, o teste de suspensão da cauda promove ao animal uma situação aversiva de inescapabilidade, dessa forma, alternando períodos de agitação e de imobilidade (Chermat *et al.*, 1986). Os animais, um por vez, foram suspensos 30 min após o tratamento com salina (NaCl 0,9%; i.v.); CrII, CcII e GbI nas doses de 1, 5 ou 10 mg/Kg, i.v.; imipramina (30 mg/Kg, i.p), presos por uma fita adesiva a cerca de 1 cm da ponta da cauda, numa plataforma de 58 cm acima da bancada, e observados durante 5 min. O parâmetro analisado foi o tempo de imobilidade do animal em segundos (Figura 12).

Figura 12 - Teste de suspensão de cauda. O aparato é constituído de uma plataforma de 58 cm acima da bancada onde o camundongo é preso pela cauda com uma fita adesiva.



Fonte: Disponível em: <http://access.stoeltingco.com/stoelting/2592/2614/1500/ANYmaze/Tail-Suspension-Test>

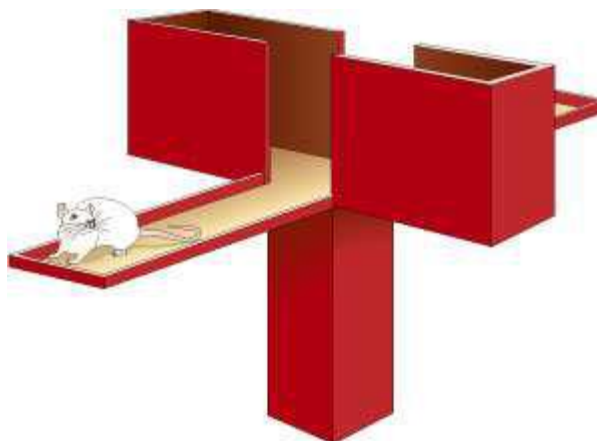
4.2.3.2.5 Teste da cruz elevada (LCE)

O teste da LCE apresenta dois braços abertos e dois braços fechados dispostos perpendicularmente (LISTER, 1987) (Figura 13). Trinta minutos após o tratamento com salina (NaCl 0,9%; i.v.); CrII, CcII e GbI nas doses de 1, 5 ou 10 mg/Kg, i.v.; diazepam 1 mg/Kg (i.p.), os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento foi observado por 5 min. As medidas comportamentais registradas no LCE são: número de entradas e o tempo despendido nos braços abertos e nos fechados.

A frequência total de entradas é obtida pela soma simples das frequências de entradas nos braços abertos e fechados. Para análise estatística dos dados e confecção dos gráficos, a porcentagem de entradas nos braços abertos é calculada dividindo-se a frequência de entradas nos braços aberto pela frequência total de entrada, e esse índice multiplicado por 100, de maneira semelhante e calculada a porcentagem de tempo em que os animais permanecem nos braços fechados. Dessa forma, os parâmetros utilizados para análise estatística foram: número de entradas no braço aberto (NEBA), tempo de permanência no braço aberto (TPBA), porcentagem de entrada nos braços abertos (PEBA) e porcentagem de tempo nos braços

abertos (PTBA). Para análise estatística, todos os grupos foram comparados aos grupos controles.

Figura 13 - Labirinto em Cruz Elevado, um modelo animal de ansiedade. O aparato é constituído de duas passarelas em forma de cruz, com dois braços opostos fechados por paredes laterais, e outros dois braços opostos abertos.



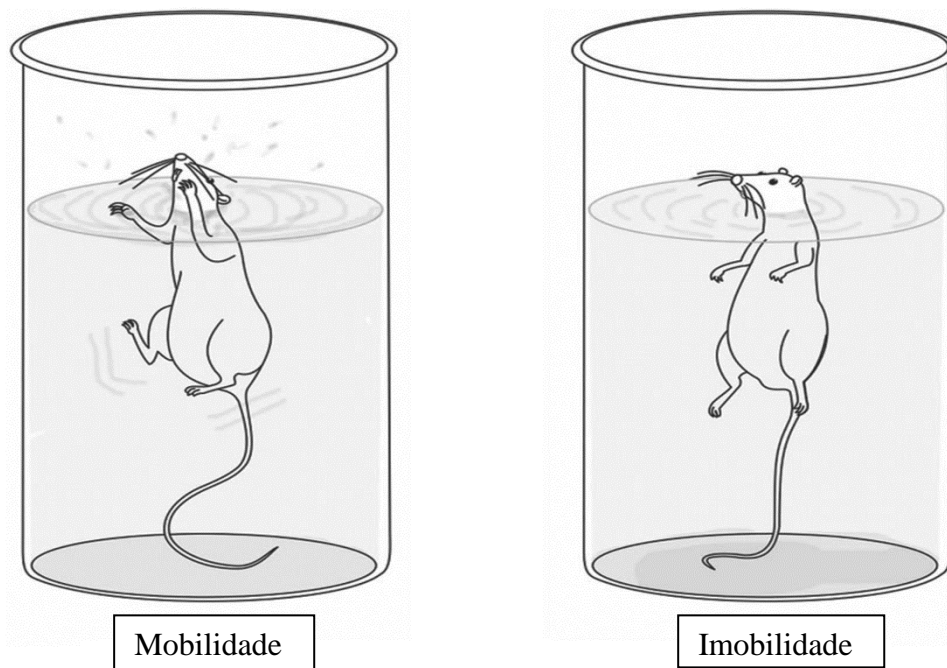
Fonte: Disponível em: <http://slideplayer.com.br/slide/1241779/>

4.2.3.2.6 Teste do nado forçado (TNF)

O teste de nado forçado introduzido por Porsolt em 1977 e aplicado em roedores se baseia na atividade motora seguida de imobilidade em uma situação onde não é possível uma fuga. No teste, após um período inicial de luta, o animal adota uma postura típica realizando apenas os movimentos necessários para manter sua cabeça fora da água. O tempo total em que o animal mostra este comportamento é então medido (Hédou *et al.*, 2001).

O experimento consiste numa exposição do animal a um tanque (22 cm de diâmetro e 40 cm de altura), contendo água limpa e fresca a 25 °C até cerca de 20 cm de altura do tanque, e posteriormente, o tempo de imobilidade do animal; é observado por um período de 5 min (Figura 14). Os camundongos foram divididos em grupos, onde foram tratados com salina (NaCl 0,9%; i.v.); CrII, CcII e GbI nas doses de 1, 5 ou 10 mg/Kg, i.v.; imipramina 10 mg/Kg (i.p.). O animal foi considerado imóvel quando permaneceu flutuando na água, fazendo apenas movimentos suaves necessários para manter a cabeça acima da água.

Figura 14 - Teste do nado forçado, um modelo animal de depressão. O experimento consiste numa exposição do animal a um tanque (22 cm de diâmetro e 40 cm de altura), contendo água limpa e fresca a 25 °C



Fonte: ABELAIRA *et al.*, 2013.

4.2.4 Avaliação do potencial pró-coagulante dos polissacarídeos sulfatados “*in vitro*” e “*ex vivo*”.

4.2.4.1 Ensaio da atividade pró-coagulante “*in vitro*”

Plasma humano foi coletado em uma solução de citrato de sódio 3,8% na proporção de 9:1 e analisado pelo Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA) (ANDERSON *et al.*, 1976). Resumidamente, 90 μL de um “pool” de plasma foram incubados por 1 min a 37 °C com 10 μL de soluções com diferentes concentrações (1, 5 ou 10 mg/ml) das frações polissacarídicas ou heparina. Logo após, 100 μL de Cefalina ativada (Reagent Celite, Biolab, Mérieux, Rio de Janeiro, Brasil) foram adicionadas à mistura, que foi incubada por mais 2 min. Em seguida, 100 μL de CaCl_2 0,25 M foram acrescentado, e o tempo de coagulação foi registrado em um coagulômetro (Sinnowa, Brasil). Para a determinação do tempo de protrombina (PT), 90 μL de “pool” de plasma humano citratado foram incubados a 37 °C com diferentes concentrações das frações polissacarídicas das três diferentes espécies de algas (1, 5

ou 10 mg/ml) ou heparina por 1 minuto, e 200 μ L de tromboplastina cálcica foram adicionadas e foi mensurado o tempo de coagulação.

4.2.4.2 Ensaio da atividade pró-coagulante ex vivo

Camundongos receberam injeção intravenosa com diferentes concentrações das frações polissacarídicas das três diferentes espécies de algas (1, 5 ou 10 mg/mL) durante cinco dias consecutivos e, no sexto dia os animais foram anestesiados, e o sangue coletado do plexo orbital para obtenção do plasma. Posteriormente, os plasmas foram então submetidos aos ensaios do TTPA e PT, como descritos anteriormente na sessão 4.2.4.1, omitindo-se a adição exógena dos polissacarídeos. O plasma coletado foi então submetido aos ensaios de coagulação.

4.2.5 Avaliação da atividade antibacteriana, “in vitro”, dos polissacarídeos

4.2.5.1 Preparação do Ágar nutritivo

O ágar nutritivo foi composto por extrato de carne (5 g), caseína hidrolisada (17,5 g), amido (1,5 g), ágar (15 g) e água destilada q.s.p.1000 mL os quais foram misturados, aquecidos até fervura e então dispostos em tubos de ensaio com 15 mL cada. Em seguida, os tubos foram submetidos a esterilização em autoclave (Phoenix Lufero, Brasil) a 121°C por 15 minutos. O meio esterilizado e resfriado a 50 °C foi distribuído em placas de Petri e, após completa solidificação, as placas foram envolvidas em filme de PVC e então acondicionadas a 4 °C até sua utilização.

4.2.5.2 Manutenção das culturas

As cepas das bactérias usadas neste trabalho foram preservadas em meio de ágar nutritivo em camada alta e inclinado, recoberto com uma camada de óleo mineral estéril, e estocadas a 4 °C.

4.2.5.3 Atividade antibacteriana dos polissacarídeos por difusão em placa

A pesquisa da atividade antibacteriana dos polissacarídeos das três diferentes espécies de algas foi realizada seguindo a metodologia de BAUER *et al.*, (1966) em meio de ágar nutritivo. As cepas padrão das bactérias gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e gram-negativa (*Escherichia coli*) foram cultivadas em ágar Triptona Soja (TSA) e incubadas durante 24 horas em 35°C. Após isso, inóculos das culturas crescidas foram diluídos em solução salina 0,85% até alcançar turbidez equivalente a 0,5 da Escala de McFarland que corresponde a uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. O inóculo também foi lido em espectrofotômetro com o comprimento de onda de 625 nm para confirmação da concentração de células bacteriana. Utilizando swab estéreis, o conteúdo bacteriano foi inoculado sobre a superfície das placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton (Difco) semeando em quatro direções e contornando as bordas da placa. Os discos embebidos com os polissacarídeos sulfatados (10 mg/ml) das espécies de algas padronizadas foram aplicados sobre a superfície do agar e em seguida as placas foram incubadas durante 24 horas a 35 °C. Como controle positivo foi utilizado o antibiótico de amplo espectro cloranfenicol (30 µg) e como controle negativo água destilada esterilizada. O procedimento foi feito em duplicata. A leitura do ensaio foi realizada analisando a formação de halos de inibição ao redor dos discos contendo as amostras de acordo com a Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI 2010).

4.2.6 Preparação dos géis

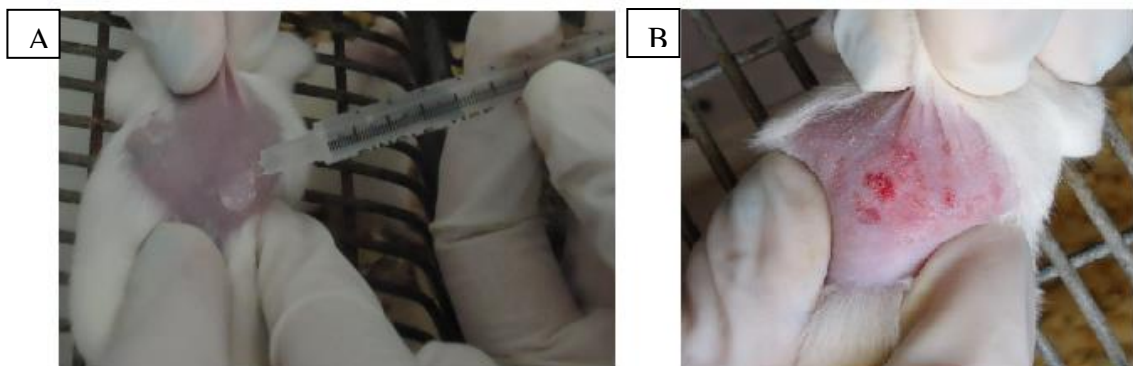
Para a preparação de 100 g do gel a (1,0%), foram adicionadas a cada fração polissacarídica nas concentrações aleatórias de 1, 5 e 10 mg/mL, Carbopol 940 1% (1,0 g), Silicone 1204 (0,5 g), Aminometilpropanol - AMP (0,3 g), Euxil K400 (0,1 g) e água desmineralizada q.s.p 100 mL. Para comprovação da atividade cicatrizante dos

polissacarídeos presentes nos géis descritos acima, foi também preparado um controle utilizando-se um gel na ausência das frações polissacarídicas.

4.2.7 Avaliações da irritabilidade dermal dos géis

Camundongos Swiss, machos, (25-35g; n=6), foram divididos em dois grupos: 1- animais com a pele íntegra, 2- animais com a pele escarificada (Figura 15) que receberam o gel das diferentes concentrações das frações polissacarídicas das três diferentes espécies de algas (1, 5 ou 10 mg/mL), gel sem polissacarídeo (veículo) e salina como controle. Os animais foram previamente depilados no dorso e a pele escarificada (até a presença de fluido tissular perceptível) foi delimitada em uma área de 1cm². Os géis e a salina (50 µL) foram aplicados topicamente em dose única diária e monitorados diariamente durante 7 dias consecutivos. A espessura da pele foi mensurada com auxílio de paquímetro digital diariamente e além disto, foram observadas as seguintes reações dermatológicas macroscópicas provenientes do tratamento: edema, eritema, exsudação, presença de crostas. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados e fragmentos da pele da área lesionada foram coletados (*punch* 5 mm) para pesagem em mg (P_{inicial}) permanecendo 1 h na estufa a 60 °C (P_{final}). O valor de exsudato presente no tecido foi calculado de acordo com a fórmula: $P_{\text{inicial}} - P_{\text{final}} = \text{exsudato}$.

Figura 15 - Grupos de animais utilizados no experimento de escarificação. Pele íntegra (A) e pele escarificada (B).



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.8 Avaliação da atividade cicatrizante “in vivo”.

4.2.8.1 Aplicações dos géis em feridas limpas induzidas em animais sadios através de trauma mecânico

Para avaliação cicatrizante dos géis constituídos das frações polissacarídicas, foi utilizado o modelo de indução de lesão tecidual segundo a metodologia descrita por Schirato *et al.*, (2006) com algumas modificações. Inicialmente, o procedimento cirúrgico consistiu em anestésiar camundongos *Swiss* machos, pesando entre 25 a 35 g (n=6) por via intramuscular com cloridrato de xilazina 2% (Kensol[®], Konig, S/A) e cloridrato de cetamina 10% (Syntec, Brasil), onde estes foram submetidos à tricotomia da região dorsal. Após 24 h os animais foram anestesiados novamente, nas mesmas condições acima, em seguida foi realizado a antisepsia utilizando-se álcool iodado 0,15%. As lesões foram produzidas por incisão da pele, divulsão da tela subcutânea e remoção das camadas de derme e epiderme com o mínimo de sangramento, com auxílio de um *punch* cirúrgico e pinça de dissecação. Após o procedimento cirúrgico os animais foram randomizados em grupos experimentais, de acordo com o tratamento tópico diário. Após três horas, grupos de animais receberam topicamente: géis de diferentes concentrações das frações polissacarídicas das três diferentes espécies de algas (1, 5 ou 10 mg/mL) e gel de carbapol 940 (1,0%). Como controle positivo, foi aplicado kollagenase[®] (Cristália, Brasil). Os tratamentos foram administrados diariamente ao longo de 15 dias de experimento.

4.2.8.2 Planimetria

As avaliações macroscópicas das lesões nos dorsos dos animais foram realizadas diariamente, iniciando após 24 horas da cirurgia e até o 15º dia do período pós-operatório (PO), onde logo após o tratamento tópico foram evidenciados os sinais flogísticos (edema, hiperemia, presença de crosta e exsudado) e os sinais de re-epitelização e desprendimento da crosta.

Após a eutanásia nos dias 3, 7, 10 e 15, as feridas de cada animal foram fotografadas pela câmera digital Sony WS-610, no modo básico, sem flash, sem zoom e na resolução de 3,0 MB. Para padronização da distância da câmera à ferida, a câmera foi fixada em um tripé de alumínio distando 30 cm e perpendicular a ferida. Uma régua disposta ao lado do animal e junto às feridas foi utilizada para padronização da unidade de área das lesões em mm² e também para servir como medida conhecida na calibração do software *ImageJ* ao calcular a área da ferida. As imagens das feridas foram transferidas para um computador e analisadas pelo software *ImageJ* onde foi calculado as áreas das feridas nos dias 3, 7, 10 e 15. O percentual da contração da área das feridas foi expresso, utilizando-se a equação: % de contração = 100. [(Wo - Wi)/Wo], onde Wo= área inicial da ferida e Wi= área final da ferida (RAMSEY *et al.*, 1995).

4.2.8.3 *Análise histopatológica das feridas*

A análise histopatológica foi realizada nos 3°, 7° 10° e 15° dias PO, em cada grupo de animais. Amostras de tecido lesionado foram coletadas de cada animal destinado à análise histopatológica. As amostras de fragmentos de pele foram fixadas em formaldeído 4% (v/v) em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,2, submetidas ao processamento histopatológico de rotina e incluídas em parafina. Após microtomia, os cortes foram corados pela Hematoxilina-Eosina e examinados por microscopia óptica, onde foram observados os parâmetros de: presença de epitelização (PE), infiltrado inflamatório (II), presença de fibroblastos (PF), presença de neovasos (PN), presença de colágeno (PC) e tecido de granulação (TG) sendo estas classificadas em escores: ausente (-), leve (+), moderado (++) e intenso (+++). Todos os animais submetidos a biópsia foram previamente anestesiados por via intramuscular. E em seguida, esses animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. A leitura das laminais foi realizada por um patologista, onde este, não sabia os grupos aos quais analisava sendo considerado um patologista cego.

4.2.9 *Avaliação da atividade cicatrizante “in vitro”.*

4.2.9.1 Ensaio de adesão celular

A adesão das células HaCaT foram mensuradas na cultura celular 1 h e 30 min depois de cada tratamento por espectrometria onde foi observado o produto da clivagem (Formazan) do sal de tetrazolio (4-[3-(4-Iodofenol)-2-(4nitrofenol)-2H-5-tetrazolio]1,3-benzenodisulfato) (WST-1). Quando as culturas de células HaCaT atingiram a sub-confluência desejada, foram lavadas e incubadas (5% CO₂ a 37 °C) três vezes com solução de Dulbecco's Salina Tamponada Fosfatada (D-PBS) durante 5 min. As células foram submetidas a um tratamento de 1 ml de tripsina para desaderirem dos frascos de cultivo. Posteriormente, foram ressuspendidas em meio DMEM (isento de soro bovino fetal) e semeadas em uma placa de 48 poços na concentração de $3,6 \cdot 10^3$ células/poço. As células receberam tratamento com a fração polissacarídica (CcII) diluída no meio de cultura nas concentrações de 5, 50, 500 ou 5000 µg/mL. Como controle positivo foi usado o meio contendo 10% de soro bovino fetal e como controle negativo apenas o meio DMEM (SFM). As placas foram incubadas com atmosfera de 5% CO₂ a 37 °C durante 1 h e 30 min e, após este período, o meio foi removido da placa e os poços lavados 2x com 500 µl de D-PBS. Seguidamente, foi adicionado 500 µl de paraformaldeído em cada poço e incubados à temperatura ambiente por 20 min. Posteriormente, o paraformaldeído foi removido e adicionado 500 µl de cristal violeta e incubados a temperatura ambiente por mais 20 min. Por fim, o cristal violeta foi removido e foi adicionado 500 µl de ácido acético a 10% em cada poço. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro (Beckman, Inc Fullerton, USA) a 595 nm. O experimento foi realizado com amostras em triplicada, e repetido 3 vezes.

4.2.9.2 Ensaio de proliferação celular (CyQUANT®)

A proliferação das células HaCat foi mensurada em cultura com duração de 24, 48 e 72 h por fluorescência onde foi detectado os ácidos nucleicos das células usando o Kit CyQUANT® GR com um corante específico para ácidos nucleicos. (Molecular Probes). Quando as culturas de células HaCaT atingiram a confluência desejada (80%) foram lavadas e incubadas (5% CO₂ a 37 °C) três vezes com D-PBS durante 5 min. As células foram submetidas a um tratamento de 1 mL de tripsina para desaderirem dos frascos de cultivo e

ressuspendidas em meio DMEM (10% soro bovino fetal; 500 µl), e semeadas em uma placa de 48 poços na concentração de 2.10^4 células/poço. Em três falcons foram armazenados, no freezer -80 °C, um *pellet* de 1.10^6 /mL células para serem usadas na curva padrão de cada tempo do experimento. As placas foram incubadas com atmosfera de 5% CO₂ a 37 °C durante 24 h para que as células pudessem se aderir a placa. Após 24 h, as células receberam tratamento com CcII diluída no meio de cultura (2% soro bovino fetal) nas concentrações de 5, 50, 500 ou 5000 µg/mL. Como controle positivo foi usado o meio contendo 10% de soro bovino fetal e como controle negativo apenas SFM. Os placas foram incubadas com atmosfera de 5% CO₂ a 37 °C durante 24, 48 e 72 h. Após o período determinado as placas de cultura foram fotografadas utilizando um microscópio eletrônico e, posteriormente, o meio foi descartado e as células lavadas com 500 µl de D-PBS e armazenadas *overnight* no freezer -80 °C. Durante a análise das amostras de cada tempo (24, 48 e 72 h) foi adicionado 100 µl de solução CyQUANT® GR por poço e a placa (coberta por papel alumínio) foi incubada a temperatura ambiente por 5 min. Uma curva padrão para a contagem do número de células foi preparada adicionando-se 1 mL de solução CyQUANT® GR no pellet de células presentes no falcon que estava armazenado no freezer -80 °C. As células sofreram lise e os seus ácidos nucleicos foram expostos. Dessa forma, as células ressuspendidas representam o total de ácidos nucleicos de 1.10^6 células. Para elaboração da curva padrão foram realizadas diluições seriadas das células lisadas até atingirem diferentes concentrações (50 a 50.000 células em 100 µl). As amostras da solução padrão também foram incubadas a temperatura ambiente por 5 min. Finalmente, recolheu-se uma alíquota de cada poço (80 µl) e transferidas para uma placa preta para serem lidas a 480 nm de excitação e 520 nm de emissão em um leitor de microplacas de fluorescência (POLARstar OPTIMA – BMG labtech, Offenburg, Germany). Este procedimento foi repetido nos 3 tempos de análise. Os dados brutos obtidos foram corrigidos com o valor do branco (apenas a solução CyQUANT® GR) e convertidos para o número de células com auxílio da curva padrão. O experimento foi realizado com amostras em triplicada, e repetido 3 vezes.

4.2.9.3 Teste de citotoxicidade (MTT)

Esse método avalia a viabilidade celular que se baseia na capacidade das células viáveis reduzirem metabolicamente o sal de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-

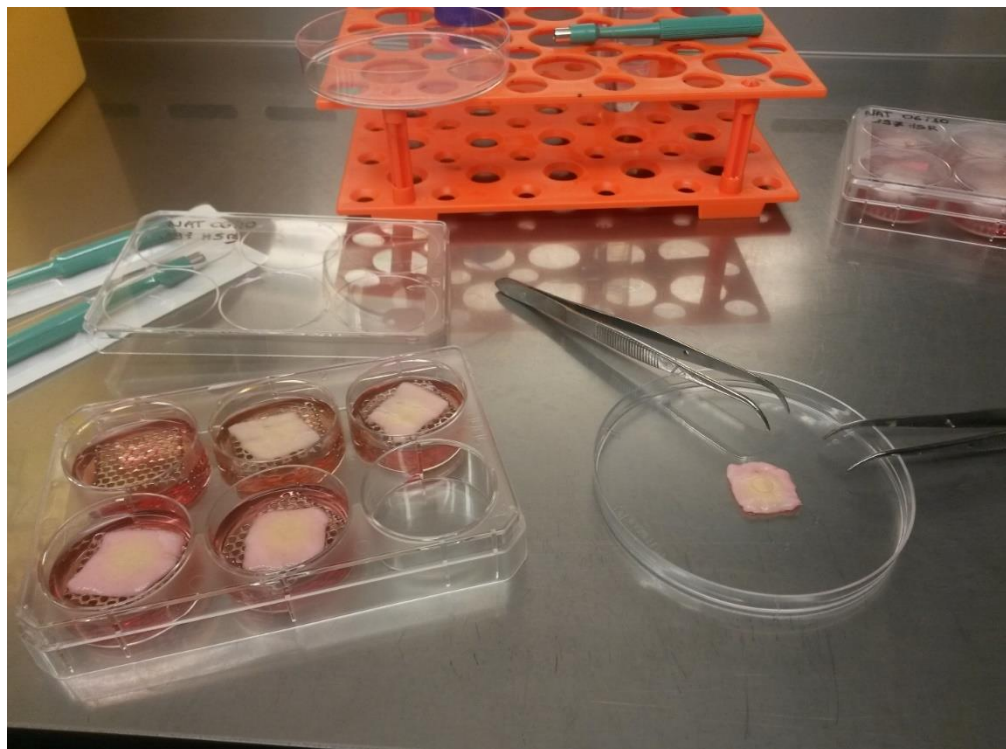
difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich). O sal de MTT é um composto hidrossolúvel, que em solução apresenta coloração amarelo-pálido, e é facilmente incorporado pelas células viáveis, que reduzem esse composto em suas mitocôndrias através da enzima desidrogenase succínica. As desidrogenases estão associadas ao NADPH e ao NADH. Ao ser reduzido o MTT é convertido em cristais de formazan, um composto de coloração azul-escuro, não solúvel em água e que fica armazenado no citoplasma celular, sendo dessa forma, analisados posteriormente por espectrofotometria UV/visível. Deste modo, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor o sinal espectrofotométrico. O teste do MTT foi realizado de acordo com os seguintes passos (MOSMANN, 1983). Quando as culturas de células HaCat atingiram a confluência desejada (80%) foram lavadas e incubadas (5% CO₂ a 37 °C) três vezes com D-PBS durante 5 min. As células foram submetidas a um tratamento com 1mL de tripsina para desaderirem dos frascos de cultivo e semeadas em placas (24 poços) na concentração de 1.10⁴ células/poço. Após 24 h as células receberam tratamento com CcII diluída no meio de cultura (2% soro bovino fetal; 1 mL) nas concentrações de 5, 50, 500 ou 5000 µg/mL. Como controle positivo foi usado o meio contendo 10% de soro bovino fetal e como controles negativos o meio contendo 2% de soro bovino fetal e apenas o meio DMEM (SFM). As placas foram incubadas com atmosfera de 5% CO₂ a 37 °C durante 24 h. Posteriormente as células foram lavadas 3x com D-PBS (1 mL) e seguidamente adicionado 1 mL do reagente MTT (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) na concentração de 5mg/mL em PBS, para uma concentração final de 0,5mg/mL e incubadas com atmosfera de 5% CO₂ a 37 °C durante 30 min (formação de cristais azuis). O sobrenadante foi removido e foi adicionado 1 mL de DMSO, para dissolução dos cristais e, incubados por 10 min a temperatura ambiente em uma placa de agitação. A leitura da absorbância foi realizada em um espectrofotômetro (Beckman, Inc Fullerton, USA) a 570 nm. O experimento foi realizado com amostras em triplicada, e repetido 3 vezes.

4.2.9.4 Modelo 3D de equivalentes de pele humana “in vitro”

O modelo 3D de equivalentes de pele humana (3D EPHs), baseia-se na descelularização e des-epidermização de amostras de peles que foram coletadas com o consentimento de pacientes seguindo o protocolo previamente descrito por Chakrabarty *et al.*, (1999). Sumariamente, as peles des-epidermizadas foram cortadas em pedaços de

aproximadamente 1,8 cm x 1,8 cm e colocadas com o lado papilar para cima em uma placa de cultura de células de 12 poços. Anéis de aço inoxidável estéreis (Aix Scientifics, Aachen, Alemanha) com um diâmetro interno de 9 milímetros foram colocados sobre a pele. Queratinócitos (primeira passagem; $3,6 \cdot 10^4$) e fibroblastos (segunda passagem; $1,8 \cdot 10^5$) suspensos em 500 μ l de meio de cultura contendo soro bovino fetal foram adicionados no centro de cada anel e incubados com atmosfera de 5% CO_2 a 37 °C durante 24 h. Em seguida, os anéis foram removidos e os EPHs (derme mais queratinócitos e fibroblastos) foram incubados, nas mesmas condições anteriores, por 3 dias. No quarto dia os EPHs foram transferidos para uma grade de aço inoxidável em uma placa de cultura de seis poços mantida em aproximadamente 7 mL de meio de cultura *Full Green's*, para que dessa forma, os EPHs ficassem na interfase do líquido/ar sendo então incubados com atmosfera de 5% CO_2 a 37 °C por 9 dias. O meio de cultura foi trocado a cada três dias. Após este período, uma ferida de espessura parcial foi feita com auxílio de um *punch* de 6 mm para biopsia (Stiefel, Castle Hill, Austrália). A epiderme foi então removida com o auxílio de uma pinça e descartada (Figura 16).

Figura 16 - Modelo 3D de equivalentes de pele humana (3D EPHs).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para avaliar o efeito do gel formulado com CcII sobre as feridas induzidas no EPHs estas, foram tratadas com a aplicação tópica de 50 µl de gel diariamente, durante 7 dias. Os grupos tratados foram: 1- gel na concentração de 500 µg/mL de CcII, 2- gel na concentração de 1000 µg/mL de CcII e 3- gel contendo apenas o veículo carbopol. Como controle positivo foi utilizado apenas o meio de cultura *Full Green's* e como controle negativo foi adicionado estreptomicina ao meio de cultura *Full Green's*. O experimento foi realizado com amostras em triplicada, e repetido 3 vezes.

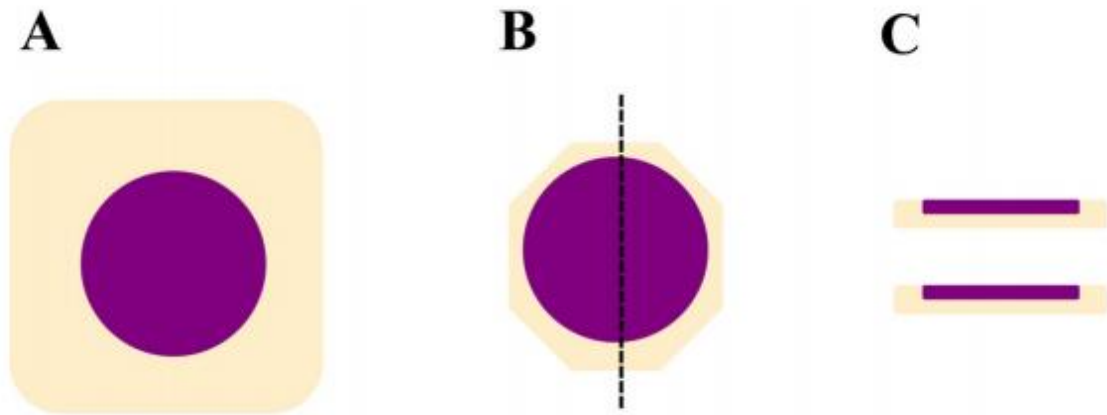
4.2.9.5 Avaliação da re-epitelização no ensaio do MTT

Após o 7 dia de tratamento, o meio foi descartado das placas de cultura contendo os EPHs e adicionou-se 2 mL de solução de MTT a 5 mg/mL em PBS, para uma concentração final de 0,5 mg/mL e as placas foram incubadas com atmosfera de 5% CO₂ a 37 °C durante 1 h e 30 min. Após este período os EPHs foram transferidos para placas de 12 poços com 3 mL de formalina e incubados a temperatura ambiente por 48 h. Posteriormente, a formalina foi descartada e fotos dos EPHs foram tiradas com auxílio de uma câmera Nikon (Coolpix 4500, Maxwell Optical, Lidcombe, NSW, Austrália). A avaliação da re-epitelização foi realizada analisando as imagens das feridas com o auxílio do software *ImageJ*.

4.2.9.6 Análises histológica: medida da área de re-epitelização e migração lateral dos queratinócitos.

Após as análises com MTT os EPHs foram aparados com auxílio de um bisturi (Figura 17), acondicionados em cassetes histológicos e colocados em álcool 80% *overnight* para remoção da coloração provocada pelo ensaio anterior. Posteriormente foram fixados em formalina a 10% e desidratados em diluições seriadas de etanol. As amostras foram embebidas em parafina e os blocos foram cortados, utilizando um micrótomo (Leica Microsystems, North Ryde, Austrália) para dar origem a cortes de 5 mm de espessura.

Figura 17 – Preparando os EPHs com MTT para os cortes histológicos. Visão esquemática que descreve: (A) o EPHs corado com MTT, com a área roxa representando a região onde as células são contadas. (B) o EPHs foi aparado para remover o excesso e cortado ao meio para criar dois pedaços equivalentes. (C) uma vista de lado do EPHs representando como este será embebido na parafina para as análises histológicas.



Fonte: McGovern J. A. (2012).

Os cortes foram desparafinizados para retirada da parafina dos cortes após a microtomia, utilizando xilol; a hidratação, que foi realizada por meio de sequências alcoólicas em concentrações decrescentes, ou seja, álcool 100%, 95%, 80%, 70%, até a água destilada; a coloração, realizada pela imersão dos cortes no corante hematoxilina e eosina (Sigma-Aldrich; Castle Hill, NSW, Austrália), favorecendo a combinação de suas estruturas com o corante para posterior visualização em microscópio de luz; a desidratação utilizando concentrações alcoólicas crescentes (álcool 70%, 80%, 95% e 100%); a clarificação, utilizando xilol como líquido intermediário entre o álcool e o meio de selagem e a selagem, ou montagem da lâmina propriamente dita, onde se cobriu o tecido com uma lamínula de vidro, usando uma substância para fixar a lâmina à lamínula (selagem). As lâminas foram armazenadas para posteriores análises histológicas.

4.2.10 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média) ou como mediana. Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos foi realizada Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni, Kruskal-Wallis ou Student-Newman-

Keuls como teste *post hoc*. Os escores histológicos foram expressos em mediana e avaliados através do teste de Kruskal-Wallis. Foi adotado nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$) em todos os testes realizados. Para a montagem dos diversos gráficos e tabelas foi utilizado o software *GraphPad Prism* 4.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

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

A partir da extração de 5 g das algas secas *C. racemosa*, *C. crenulata* e *G. Birdiae* obteve-se, 125 mg do polissacarídeo total (Cr-PST), 55 mg do polissacarídeo total (Cc-PST) e 210 mg do polissacarídeo total (Gb-PST), respectivamente, perfazendo um rendimento de 2,5% Cr-PST, 1,1% Cc-PST e 4,2% Gb-PST.

Estes resultados estão de acordo com Riberio *et al.*, (2014), Ribeiro (2009) e Vanderlei *et al.*, (2011) onde os polissacarídeos sulfatados totais das algas *C. racemosa*, *C. crenulata* e *G. birdiae* apresentaram um rendimento de 2,2%, 0,6% e 4,6%, respectivamente.

Várias metodologias podem ser empregadas para a extração de polissacarídeos de algas marinhas, tais como: aquosa a frio (MACIEL *et al.*, 2008) e a quente (SOUZA *et al.* 2012), enzimática (FARIAS *et al.*, 2000), por tratamento alcalino (STEPHANIE *et al.*, 2010), dentre outras. Dessa forma, é importante salientar que variações de rendimentos são encontradas na literatura podendo ser justificado por diferentes metodologias de extração empregadas e a variações sazonais das algas (Bird, 1988). A extração por digestão enzimática foi a utilizada neste trabalho devido a propriedade de eliminar contaminantes proteicos (PERCIVAL; McDOWELL, 1967).

Na literatura podemos fazer uma comparação entre rendimentos de extrações enzimáticas e a quente. Os PST da mesma espécie estudada em questão, *C. crenulata*, foram obtidos por Talarico *et al.*, (2004), utilizando o procedimento de extração prévia aquosa a frio (25 °C) por 5 horas, com a finalidade da remoção de amido das florídeas, seguido da extração e re-extração (do resíduo obtido) a quente (80 °C), em tampão fosfato (NaH₂PO₄, 0.025 M, pH 6.5) por 6 horas. Os extratos obtidos C1 (extração a frio), C2 (primeira extração a quente), C3 (segunda extração a quente), apresentaram rendimentos de 4,0%, 6,8% e 1,1%, respectivamente. Em relação a alga *G. birdiae* Souza *et al.* (2012), realizaram extração aquosa a quente e obtiveram um rendimento de 27,2 %.

Podemos perceber que a extração enzimática possui um menor rendimento, entretanto é preferível utilizar biocompostos mais puros quando se trabalha com atividades biológicas, do que utilizar protocolos de extração mais rápidos e com rendimentos melhores.

5.2 Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose.

No presente estudo, o fracionamento dos Cr-PST, Cc-PST e Gb-PST foram realizados, através de cromatografia de troca-iônica em coluna de DEAE-celulose.

Cr-PST resultou em três frações sulfatadas majoritárias denominadas de CrI, CrII e CrIII, eluídas respectivamente com 0,5; 0,75 e 1 M de NaCl, cujo rendimentos obtidos após diálise e liofilização foram de 10,5; 20,5 e 17,6%, respectivamente. Cc-PST resultou em três frações sulfatadas majoritárias denominadas de CcI, CcII e CcIII, eluídas respectivamente com 0,5; 0,75 e 1 M de NaCl, cujo rendimentos obtidos após diálise e liofilização foram de 6,3; 21,3 e 9,3%, respectivamente. Gb-PST apresentou duas frações polissacarídicas GbI e GbII, eluídas nas concentrações 0,5 e 0,75 M de NaCl, cujo rendimentos obtidos após diálise e liofilização foram de 23,6 % e 4,6 %, respectivamente.

As frações CrII, CcII e GbI foram escolhidas para serem utilizadas nos ensaios biológicos posteriores por terem apresentado melhores rendimentos, como também, já foram descritas na literatura por apresentarem atividades biológicas.

5.3 Toxicidade

5.3.1 Avaliação da toxicidade por dose repetida

Toxicidade é a propriedade potencial de uma determinada substância química de instalar um estado patológico em consequência de sua introdução ou interação com o organismo. Esta propriedade é verificada através da avaliação toxicológica onde se obtém

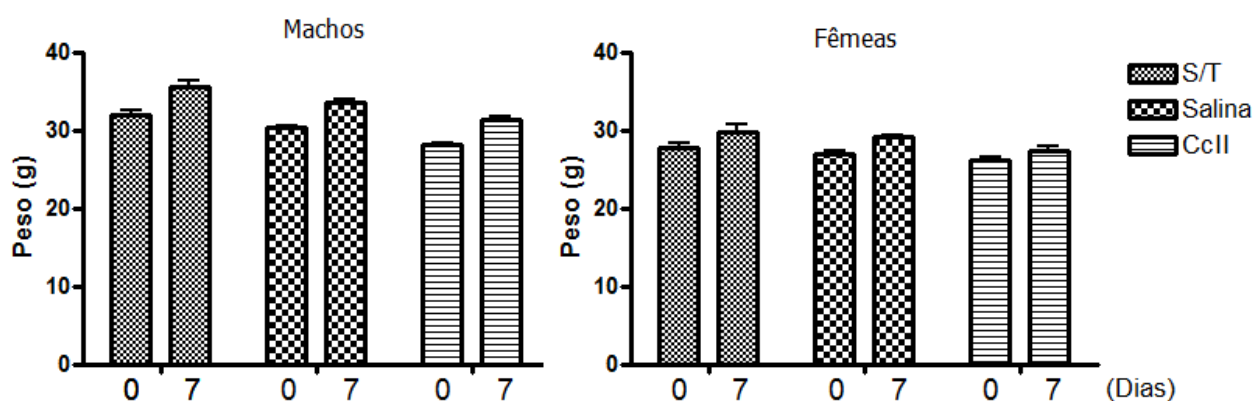
dados como dosagem, sinais, efeitos provocados que irão determinar o potencial de toxicidade. Uma das formas de proceder à avaliação toxicológica é através da administração de quantidade do composto em estudo ou doses do extrato total em animais podendo ser realizada a toxicidade aguda, subcrônica ou crônica (LIMA, 2009).

A avaliação preliminar das propriedades tóxicas das espécies de algas *C. racemosa* e *G. birdiae* já foram realizadas segundo Ribeiro *et al.*, (2014) e Vanderlei *et al.*, (2011) respectivamente, sendo estas algas consideradas atóxicas. Dessa forma, apenas o polissacarídeo da alga *C. crenulata* foi avaliado quanto ao seu potencial toxicológico.

O polissacarídeo sulfatado da alga *C. crenulata* (CcII) foi avaliado no ensaio de toxicidade por dose repetida e de acordo com os resultados obtidos não houve mortalidade entre os animais e os mesmos não apresentaram alterações físicas (ereção de pelos, mucosa, olhos, etc.) ou comportamentais.

Além disso, ao longo de todo o experimento (7 dias), não foram observadas alterações significantes na massa corporal nos grupos que receberam CcII, quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 18).

Figura 18 – Avaliação da massa corporal dos grupos testados em animais machos e fêmeas. Análise realizada no primeiro (0) e no sétimo (7) dia de experimento.



Os valores representam a média \pm EPM do peso (g) dos animais. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste post hoc.

Antes do sacrifício, os animais tiveram seu sangue coletado para a verificação de alterações enzimáticas importantes presentes no plasma sanguíneo. Observou-se através das análises bioquímicas, que a CcII não alterou de forma significativa as concentrações de ureia, mostrando que ela não provocou possíveis alterações renais. Os resultados obtidos pelas dosagens das transaminases glutâmico oxalacética, glutâmico pirúvica, fosfatase alcalina e

ureia mostraram ausência de alterações hepáticas renais e ósseas, uma vez que não houve diferença estatística entre os grupos salina, sem tratamento e CcII (Tabela 2).

Tabela 2 – Análises bioquímicas e do peso corporal dos órgãos de camundongos submetidos ao ensaio de toxicidade por dose repetida. Os animais foram pesados e injetados com CcII (10 mg/Kg, i.v.) diariamente durante sete dias. Posteriormente, os animais foram anestesiados e amostras de sangue coletadas para dosagens bioquímicas (AST, ALT, ALP e ureia).

Paramêtros	Tratamento (10 mg/Kg; i.v.)			
	Machos	Sem tratamento	Salina	<i>C. crenulata</i>
Coração (g/ 100 g peso corporal)		0,218 ± 0,01	0,214 ± 0,01	0,217 ± 0,01
Fígado (g/ 100 g peso corporal)		2,25 ± 0,06	1,99 ± 0,04	1,69 ± 0,03 *
Baço (g/ 100 g peso corporal)		0,11 ± 0,008	0,13 ± 0,006	0,13 ± 0,008
Rim (g/ 100 g peso corporal)		0,32 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,29 ± 0,01
Timo (g/ 100 g peso corporal)		0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,004	0,09 ± 0,007
Linfonodo direito (g/ 100 g peso corporal)		0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,006	0,10 ± 0,007
Ureia (mg/dl)		51,08 ± 3,14	45,37 ± 3,23	39,19 ± 1,64
AST (UI/L)		99,48 ± 15,95	83,81 ± 12,70	62,38 ± 6,93
ALT (UI/L)		84,84 ± 19,83	107,01 ± 26,59	54,58 ± 5,10
ALP (UI/L)		106,3 ± 7,72	99,71 ± 5,77	92,79 ± 3,53

Paramêtros	Tratamento (10 mg/Kg; i.v.)			
	Fêmeas	Sem tratamento	Salina	<i>C. crenulata</i>
Coração (g/ 100 g peso corporal)		0,20 ± 0,01	0,22 ± 0,006	0,18 ± 0,006
Fígado (g/ 100 g peso corporal)		1,67 ± 0,06	1,66 ± 0,05	1,31 ± 0,01 *
Baço (g/ 100 g peso corporal)		0,10 ± 0,003	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,005 *
Rim (g/ 100 g peso corporal)		0,23 ± 0,007	0,24 ± 0,01	0,23 ± 0,004
Timo (g/ 100 g peso corporal)		0,09 ± 0,006	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,007 *
Linfonodo direito (g/ 100 g peso corporal)		0,09 ± 0,006	0,07 ± 0,007	0,08 ± 0,01
Ureia (mg/dl)		38,0 ± 2,59	35,95 ± 1,56	33,47 ± 1,69
AST (UI/L)		73,34 ± 17,97	71,83 ± 10,35	85,32 ± 8,84
ALT (UI/L)		57,11 ± 10,49	114,5 ± 8,95	63,26 ± 5,98
ALP (UI/L)		104,6 ± 4,44	107,5 ± 6,28	95,13 ± 9,55

Os dados foram expressos como média ± E. P. M. (n=6). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por teste de Bonferroni. * para valores significativos comparados ao controle salina (p>0,05).

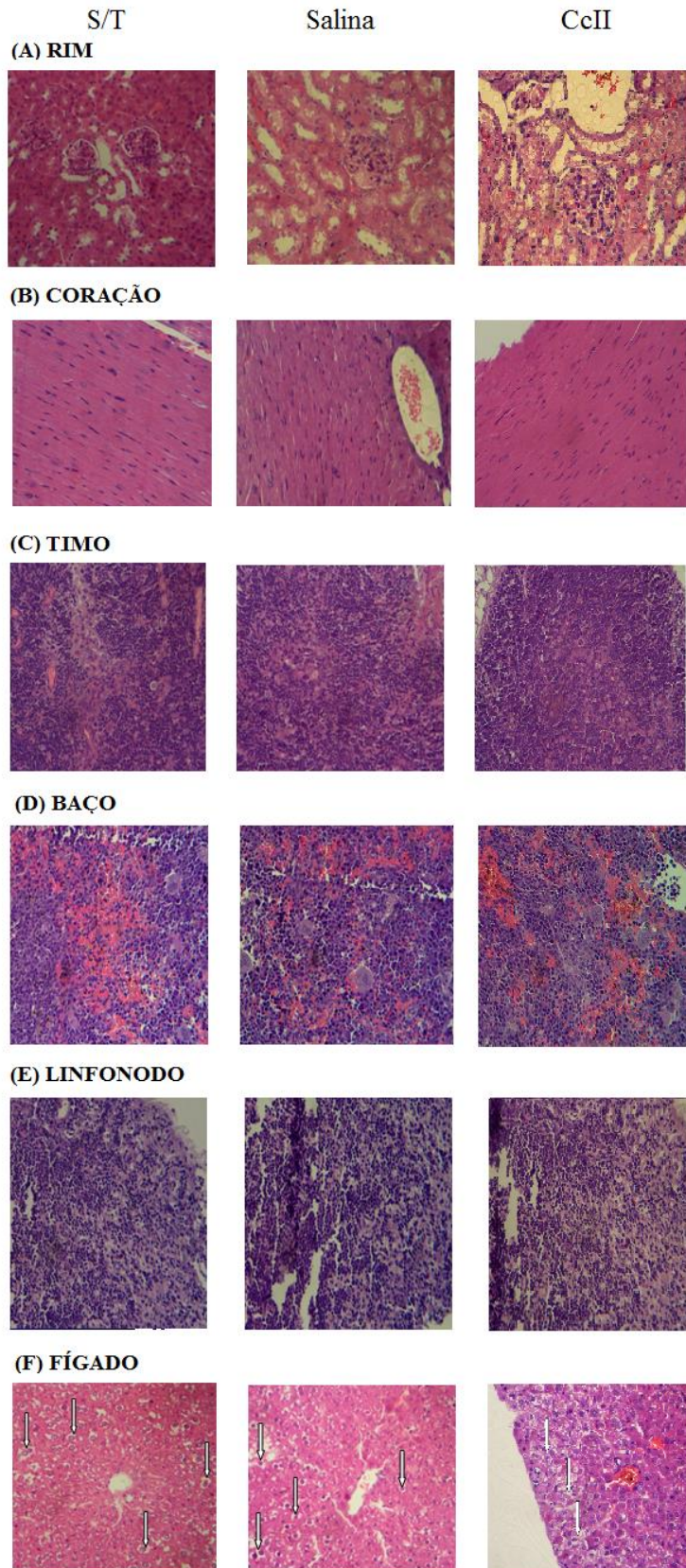
Como pode ser observado na tabela 2, os animais tratados com CcII não apresentaram alterações significativas em relação ao peso relativo dos órgãos coração, rim e linfonodo (machos e fêmeas) baço e timo (machos) em relação aos animais dos grupos controles, sem tratamento e salina. Contudo, houve diferença significativa (p < 0,05) do peso do fígado dos

camundongos tratados com CcII em relação aos animais que não receberam tratamento e a salina, para ambos os sexos. E as fêmeas tratados com CcII apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) do peso do baço e timo em relação aos animais que não receberam tratamento e a salina.

Adicionalmente, foram realizadas análises histológicas dos órgãos a fim de verificar a presença ou não de alguma anormalidade na morfologia das células e tecidos. Para tanto, os tecidos foram fixados, cortados, e corados com hematoxilina-eosina para observação de possíveis lesões em microscopia trilocular. Os resultados demonstraram que os órgãos: rim, timo, baço, linfonodo, coração e fígado não apresentaram alterações significativas em nenhum dos grupos avaliados (Figura 19).

Diante de todos os resultados (dados fisiológicos, bioquímicos e histológicos) podemos concluir que CcII não apresentou sinais de toxicidade.

Figura 19 - Fotomicrografias de luz de 4 μm de espessura dos $\text{6rg}\tilde{\text{a}}\text{o}$ s. Rim, cora 7 o, timo, ba 7 o, linfonodo e fgado (notar discreta vacuoliza 7 o citoplasmática indicado por setas brancas) de camundongo *Swiss* ap 6 s 7 dias de administra 7 o i.v. da CcII (10 mg/kg) e salina (NaCl; 0,15 M) como tamb e m do grupo dos animais que n $\tilde{\text{a}}$ o receberam nenhum tratamento. Aumento de 400X.



Tem sido demonstrado em estudos toxicológicos que os polissacarídeos sulfatados são bem tolerados em animais experimentais. Siqueira *et al.* (2011) utilizaram os polissacarídeos sulfatados isolados da alga marinha parda *Lobophora variegata* (1mg/ Kg; i.v.) em um tratamento de sete dias consecutivos e, este mostrou-se atóxico. Os PST da alga marinha vermelha *G. cornea* também foram injetados em ratos (9 mg/Kg, i.p.) por 14 dias consecutivos e estes não produziram sinais significativos de toxicidade (COURA *et al.*, 2011). Além destes, polissacarídeos sulfatados da *G. birdiae* (10 mg/Kg; i.p.), também apresentaram o mesmo padrão de ausência de toxicidade, com exceção de um aumento no peso do baço (VANDERLEI *et al.*, 2011).

5.3.2 Avaliação da ação ansiolítica e antidepressiva em modelos clássicos neurocomportamentais de ansiedade e depressão em camundongos.

Os conhecimentos empíricos acumulados no passado (tradição cultural) e os científicos desenvolvidos, ao longo do tempo, principalmente com a condução de ensaios clínicos randomizados, mostram que as plantas medicinais e os medicamentos fitoterápicos podem, também, provocar efeitos adversos, toxicidade e apresentar contraindicações de uso (ALEXANDRE *et al.*, 2005a, b).

Assim, para o sucesso do desenvolvimento de novos fármacos efetivos, é de extrema importância que estes sejam avaliados quanto aos seus potenciais efeitos indesejáveis. Segundo Haller & Mano (2011), aproximadamente 80% dos estudos que avaliam possíveis transtornos psiquiátricos utilizando modelos animais empregaram testes tradicionais considerados como “clássicos”. Exemplos destes testes são: campo aberto, placa perfurada, suspensão de cauda, cruz elevada e nado forçado.

Dessa forma, a fim de avaliar se os polissacarídeos sulfatados avaliados neste trabalho poderiam interferir no sistema nervoso central, causando perda da função motora, depressão ou ansiedade estes ensaios clássicos foram realizados. Como o polissacarídeo da alga marinha *G. birdiae* já foi avaliado quanto a estes parâmetros pelo Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CARBOLEC) e este não apresentou efeitos no sistema nervoso central, apenas os polissacarídeos das espécies de algas *C. racemosa* e *C. crenulata* foram avaliados quanto a estes parâmetros.

5.3.2.1 Teste do campo aberto (CA)

O teste do campo aberto é empregado para avaliar a atividade exploratória dos animais. A tendência natural do animal em um ambiente novo é de explorá-lo, apesar da tensão e conflito causado por este ambiente (MONTGOMERY, 1955). Dessa forma, a locomoção, o *rearing* e o *grooming* em roedores são os parâmetros comportamentais mais usados para descrever influências da vida ou da administração de drogas no SNC (ARAKAWA; IKEDA, 1991; REX, STEPHENS, FINK, 1996), possibilitando, também, discutir a especificidade do efeito de uma droga, caso ela seja estimulante, sedativa, ansiolítica ou ansiogênica (LISTER, 1987).

Os animais que receberam tratamento com os polissacarídeos CrII e CcII em todas as doses (1,0; 5,0 ou 10,0 mg/Kg; i.v.) não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao grupo salina em nenhum dos parâmetros observados (Atividade locomotora espontânea – A.L.E., *Grooming* e *Rearing*). Já o diazepam apresentou, como esperado, uma diminuição dessa atividade em todos os parâmetros (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito dos polissacarídeos sulfatados sobre a atividade locomotora (ALE), *grooming* e *rearing* no teste de campo aberto em camundongos. (A) Polissacarídeo da alga *C. racemosa*. (B) Polissacarídeo da alga *C. crenulata*.

A		Parâmetros		
Tratamento	A.L.E	<i>Grooming</i>	<i>Rearing</i>	
Controle	55,2 ± 2,8	2,6 ± 0,4	4,33 ± 1,3	
CrII 1 mg/Kg	66,8 ± 4,9	3,11 ± 0,3	5,0 ± 1,4	
CrII 5 mg/Kg	50,4 ± 3,6	2,0 ± 0,4	3,66 ± 1,5	
CrII 10 mg/Kg	66,4 ± 4,4	1,5 ± 0,3	3,55 ± 0,7	
DZP 2 mg/kg	29,3 ± 2,3*	0,6 ± 0,1*	0,7 ± 0,2*	

B		Parâmetros		
Tratamento	A.L.E	<i>Grooming</i>	<i>Rearing</i>	
Controle	55,2 ± 2,8	1,7 ± 0,2	3,37 ± 0,5	
CcII 1 mg/Kg	51,8 ± 2,1	1,37 ± 0,2	4,12 ± 0,7	
CcII 5 mg/Kg	51,3 ± 3,2	1,22 ± 0,1	4,0 ± 1,08	
CcII 10 mg/Kg	52,2 ± 3,6	1,12 ± 0,2	3,87 ± 0,8	
DZP 2 mg/kg	29,3 ± 2,3*	0,5 ± 0,1*	0,5 ± 0,2*	

Os valores representam a média ± EPM da atividade locomotora, *grooming* e *rearing*. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste post hoc. * para valores significativos comparados ao controle salina (p<0,01).

Desta forma, os polissacarídeos CrII e CcII em todas as doses não apresentaram alterações em sua atividade locomotora (A.L.E.), comportamento exploratório (*Rearing*) e não ficaram apreensivos (aumento do número de *Grooming*) (ARCHER, 1973).

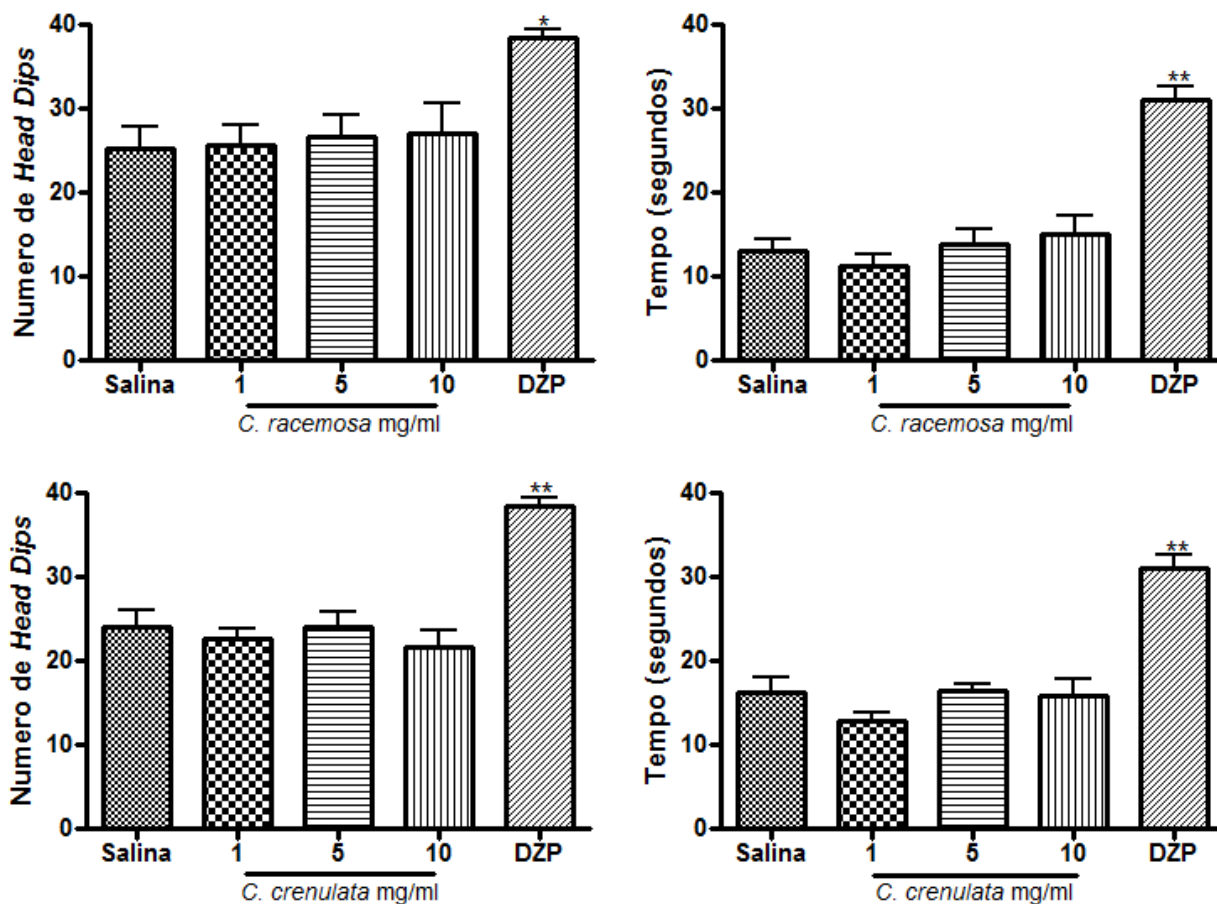
5.3.2.2 Teste da placa perfurada (PP)

O teste da placa perfurada é um método simples para se avaliar o comportamento de um animal quando submetido a um ambiente desconhecido. Nesse teste, a emocionalidade, a ansiedade e/ou a resposta ao estresse em animais, podem ser mensurados através da simples observação (RODRIGUIEZ; BROITMEAN; FOSCOLO, 1987). Fármacos ansiolíticos tendem a aumentar o número de explorações nos orifícios, onde podemos analisar o índice de atividade exploratória, enquanto fármacos ansiogênicos ou fármacos em doses sedativas tendem a reduzir esta exploração (FILE; PELLOW, 1985; TAKEDA *et al.*, 1998).

O número de vezes que o animal coloca a cabeça no orifício da placa perfurada (*head dips*), como também, sua permanência com a cabeça dentro do orifício, tem sido registrado como um parâmetro para avaliar as condições de ansiedade em animais. Neste modelo, doses não-sedativas de benzodiazepínicos e outras drogas ansiolíticas aumentaram o número de *head dips* e de permanência dentro do buraco pelos camundongos, enquanto seus antagonistas o reduzem (CRAWLEY, 1985; TAKEDA *et al.*, 1998).

Os resultados demonstraram que os polissacarídeos CrII ($25,56 \pm 2,40$; $26,56 \pm 2,59$; $27,00 \pm 3,54$) e CcII ($22,56 \pm 1,24$; $24,13 \pm 1,6$; $21,63 \pm 2,08$) nas doses de 1,0; 5,0 e 10,0 mg/Kg; i.v. respectivamente não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao grupo salina ($25,22 \pm 2,66$) em relação ao número de *Head Dips*, como também, não alteraram o tempo de permanência dentro do buraco CrII ($11,30 \pm 1,39$; $13,80 \pm 1,78$; $15,00 \pm 2,18$) e CcII ($22,75 \pm 1,13$; $16,40 \pm 0,85$; $15,75 \pm 2,05$) nas doses de 1,0; 5,0 e 10,0 mg/Kg; i.v., respectivamente, em relação ao seu controle ($13,00 \pm 1,42$). Enquanto o diazepam (1mg/Kg; s.c.) apresentou, como esperado, um aumento do número de *Head Dips* ($38,50 \pm 0,96$) e prolongou o tempo de permanência no buraco ($31,00 \pm 1,63$) (Figura 20).

Figura 20 – Efeito dos polissacarídeos sulfatados sobre o número de mergulhos (*head dips*) e tempo de permanência no buraco no teste da placa perfurada. (A) Polissacarídeo da alga *C. racemosa*. (B) Polissacarídeo da alga *C. crenulata*.



Os valores representam a média \pm EPM do número de *Head Dips* e do tempo de permanência no buraco. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Para valores significativos comparados ao controle salina * ($p < 0,01$) ** ($P < 0,001$).

De acordo com os resultados, os polissacarídeos sulfatados de CrII e CcII em todas as doses utilizadas demonstraram não ser detentores de atividade ansiolítica, sendo esta resposta confirmada no ensaio da cruz elevada.

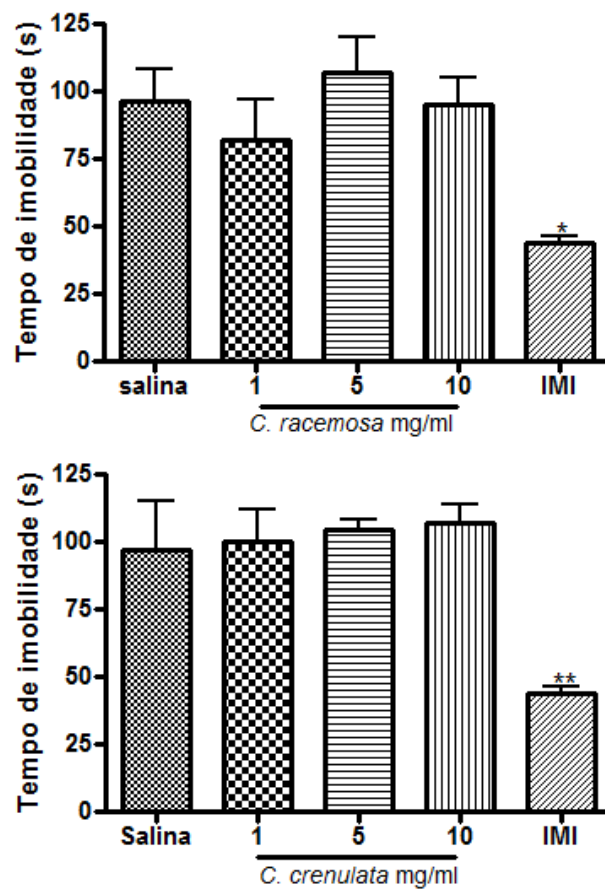
5.3.2.3 Teste de suspensão de cauda (PP)

O teste da suspensão da cauda é um modelo amplamente utilizado para analisar a atividade antidepressiva de compostos farmacológicos em camundongos. O teste é baseado no

fato de que animais que são submetidos a curtos períodos de estresse inescapável pela suspensão de sua cauda tendem a desenvolver uma postura imóvel (Steru *et al.*, 1985). Os antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade neste teste (PORSOLT; ANTON; JALFRE 1987; FERNADEZ-TERUEL *et al.*, 1992)

Os resultados decorrentes do tratamento agudo com os polissacarídeos CrII ($82, \pm 14,75$; $107,02 \pm 13,04$; $95,10 \pm 10,09$) e CcII ($100,0 \pm 11,81$; $104,5 \pm 3,58$; $107,0 \pm 7,02$) nas doses de 1,0; 5,0 e 10,0 mg/Kg; i.v., respectivamente, não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao grupo salina ($97,14 \pm 11,94$) em relação a imobilidade dos animais em nenhuma das doses utilizadas. A imipramina (30 mg/kg, i.p.), utilizada como controle positivo, reduziu ($44,10 \pm 2,44$) o tempo de imobilidade em relação ao controle salina (Figura 21).

Figura 21 - Efeito dos polissacarídeos sulfatados sobre o tempo de imobilidade no teste de suspensão de cauda em camundongos. Salina, CrII e CcII (1, 5 e 10 mg/Kg) e imipramina (30 mg/Kg) foram administrados 30 min antes do experimento.



Os valores representam a média \pm EPM sobre o tempo de imobilidade dos animais, durante 5 min. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Para valores significativos comparados ao controle salina * ($p < 0,01$) ** ($P < 0,001$).

Assim, os polissacarídeos sulfatados CrII e CcII em todas as doses utilizadas parecem não ser detentores de atividade antidepressiva, sendo esta resposta confirmada com o teste do nado forçado.

5.3.2.4 Teste da cruz elevada (LCE)

Montgomery (1955), realizando experimentos com intuito de avaliar a sensação de medo nos animais, observou que os ratos quando colocados em um suporte de cruz elevada (com dois braços fechados e dois abertos dispostos perpendicularmente) notoriamente tinham altos índices de exploração no braço fechado em oposição à exploração do braço aberto, ou seja, o braço aberto provocava uma forte reação de medo nos animais, fazendo com que eles o evitassem.

Posteriormente, Handley e Mithani (1984), utilizaram um labirinto em cruz elevada a aproximadamente 70 cm do chão, com dois braços fechados e dois abertos. Com esse modelo eles observaram que drogas ansiolíticas como o diazepam aumentavam o número de entradas nos braços abertos, enquanto que o ansiogênico picrotoxina, diminuía esse índice. Diante destes dados os autores concluíram que o labirinto em cruz elevada seria um modelo válido para o comportamento motivado pelo medo. No ano seguinte, Pellow e colaboradores (1985) realizaram também um estudo com o labirinto em cruz elevada, validando o teste não somente no âmbito da farmacologia, mas também do comportamento e da fisiologia.

Os animais que receberam tratamento com os polissacarídeos CrII e CcII em todas as doses (1,0; 5,0 e 10,0 mg/Kg) não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao grupo salina em nenhum dos parâmetros observados (número de entradas no braço aberto (NEBA), tempo de permanência no braço aberto (TPBA), percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA) e percentagem de tempo nos braços abertos (PTBA)). Enquanto que o diazepam apresentou, como esperado, um aumento dessa atividade em todos os parâmetros avaliados (Tabela 4).

Tabela 4 - Efeito dos polissacarídeos sulfatados CrII, CcII e GbI no teste da cruz elevada em camundongos. (A) Polissacarídeo da alga *C. racemosa*. (B) Polissacarídeo da alga *C. crenulata*.

A				
Parâmetros				
Tratamento	NEBA	TPBA	PEBA	PTBA
Controle	1,92 ± 0,46	17,36 ± 4,2	17,85 ± 3,7	9,05 ± 2,16
CrII 1 mg/Kg	4,12 ± 0,9	50,14 ± 11,68	31,20 ± 4,88	21,65 ± 5,35
CrII 5 mg/Kg	3,1 ± 0,6	31,70 ± 8,04	22,94 ± 3,6	14,64 ± 3,59
CrII 10 mg/Kg	5,0 ± 1,0	47,50 ± 11,17	29,32 ± 4,13	20,67 ± 4,66
DZP 1 mg/kg	10,75 ± 0,6*	158,6 ± 12,7*	63,26 ± 2,18*	52,13 ± 4,30*

B				
Parâmetros				
Tratamento	NEBA	TPBA	PEBA	PTBA
Controle	1,25 ± 0,5	12,75 ± 5,65	14,27 ± 5,14	6,43 ± 2,83
CcII 1 mg/Kg	1,8 ± 0,3	22,40 ± 7,09	22,59 ± 4,05	11,93 ± 3,50
CcII 5 mg/Kg	1,8 ± 0,2	23,80 ± 5,65	19,88 ± 3,79	11,98 ± 2,76
CcII 10 mg/Kg	3,0 ± 0,6	35,33 ± 7,25	24,39 ± 3,55	17,83 ± 3,81
DZP 1 mg/kg	10,75 ± 0,6*	148,6 ± 13,7*	63,26 ± 2,18*	54,12 ± 4,00*

Os valores representam a média ± EPM do número de entradas no braço aberto (NEBA), tempo de permanência no braço aberto (TPBA), percentagem de entrada nos braços abertos (PEBA) e percentagem de tempo nos braços abertos (PTBA). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. * para valores significativos comparados ao controle salina ($p < 0,001$).

O LCE é o modelo mais popular para pesquisas de novos agentes ansiolíticos com ação semelhante aos benzodiazepínicos (BARBOSA *et al.*, 2008). Desta forma, os polissacarídeos sulfatados CrII e CcII em todas as doses utilizadas não mostraram-se detentores de atividade ansiolítica.

5.3.2.5 Teste do nado forçado (TNF)

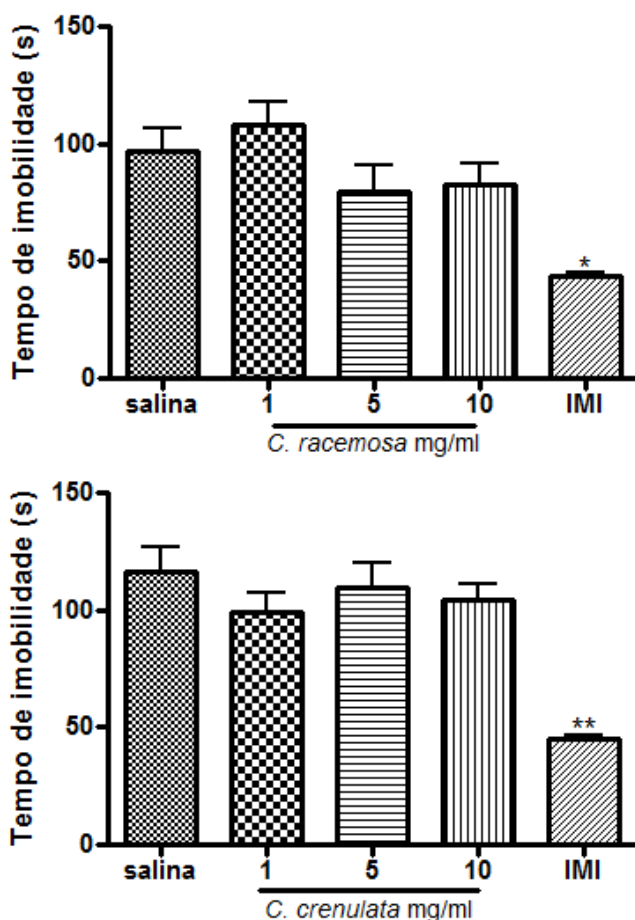
O teste do nado forçado é mais sensível que o teste da suspensão de cauda em detectar drogas com atividade antidepressiva, visto que, doses menores de drogas, como a imipramina, são suficientes para apresentar um efeito antidepressivo no nado forçado (PORSOLT; ANTON; JALFRE, 1987).

O fenômeno comportamental observado nesses testes se baseia no fato de que camundongos colocados num cilindro com água, após tentativas iniciais de fuga, rapidamente

mostram imobilidade, interpretada como prejuízo do comportamento esperado de tentar fugir, ou como, desenvolvimento de comportamento passivo capaz de afastar o animal de formas ativas de enfrentamento da situação estressora. Se um fármaco antidepressivo for administrado o animal apresentará comportamento mais ativo, persistindo na tentativa de escapar por tempo mais prolongado, quando comparado ao animal que recebeu solução inócua (PORSOLT *et al.*, 1978; CRYAN *et al.*, 2002).

Os resultados decorrentes do tratamento agudo com os polissacarídeos CrII ($107,8 \pm 10,41$; $79,50 \pm 11,18$; $82,88 \pm 8,71$) e CcII ($98,75 \pm 8,71$; $109,3 \pm 10,72$; $104,0 \pm 7,09$) nas doses de 1,0; 5,0 ou 10,0 mg/kg, respectivamente, não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao grupo salina ($97,14 \pm 11,94$), em relação a imobilidade dos animais. A imipramina (10 mg/Kg, i.p.), utilizada como controle positivo, reduziu ($44,88 \pm 1,96$) o tempo de imobilidade em relação ao controle salina (Figura 22).

Figura 22 – Efeito dos polissacarídeos sulfatados e imipramina sobre o tempo de imobilidade no teste de nado forçado em camundongos. Salina, CrII e CcII (1, 5 ou 10 mg/Kg) ou imipramina (10 mg/Kg) foram administrados 30 min antes do experimento.



Os valores representam a média \pm EPM sobre o tempo de imobilidade dos animais, durante 5 min. Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. Para valores significativos comparados ao controle salina * ($p < 0,01$) ** ($P < 0,001$).

Diante dos resultados, os polissacarídeos sulfatados CrII e CcII em todas as doses utilizadas não alteraram o tempo de imobilidade dos animais, tanto no teste de suspensão de cauda como no teste do nado forçado sendo desta forma, desprovidos de atividade antidepressiva.

A literatura tem demonstrado estudos relatando que vários tipos de polissacarídeos possuem efeitos a nível de sistema nervoso central, como neurotóxica (LUO *et al.*, 2009) neuroantioxidante (WIJESEKARA *et al.*, 2011), neuroprotetora (CHEN *et al.*, 2011), inibição da morte de células neurais (GAO *et al.*, 2012) Coura *et al.*, (2012) demonstraram que os polissacarídeos da alga *Gracilaria Cornea* apresentaram uma atividade antinociceptiva a nível de SNC, e mais recentemente, Monteiro *et al.*, (2015) demonstraram que os polissacarídeos

sulfatados da alga *G. Cornea* apresentaram um efeito ansiolítico no SNC através da ativação dos receptores $\alpha 2$ -GABA_A.

Assim, diante de todos os resultados que obtivemos nos ensaios neurocomportamentais, os polissacarídeos sulfatados CrII e CcII em todas as doses utilizadas não afetam o sistema nervoso central, sendo, desse modo, seguros para serem utilizados em outras atividades biológicas sem causar efeitos indesejados.

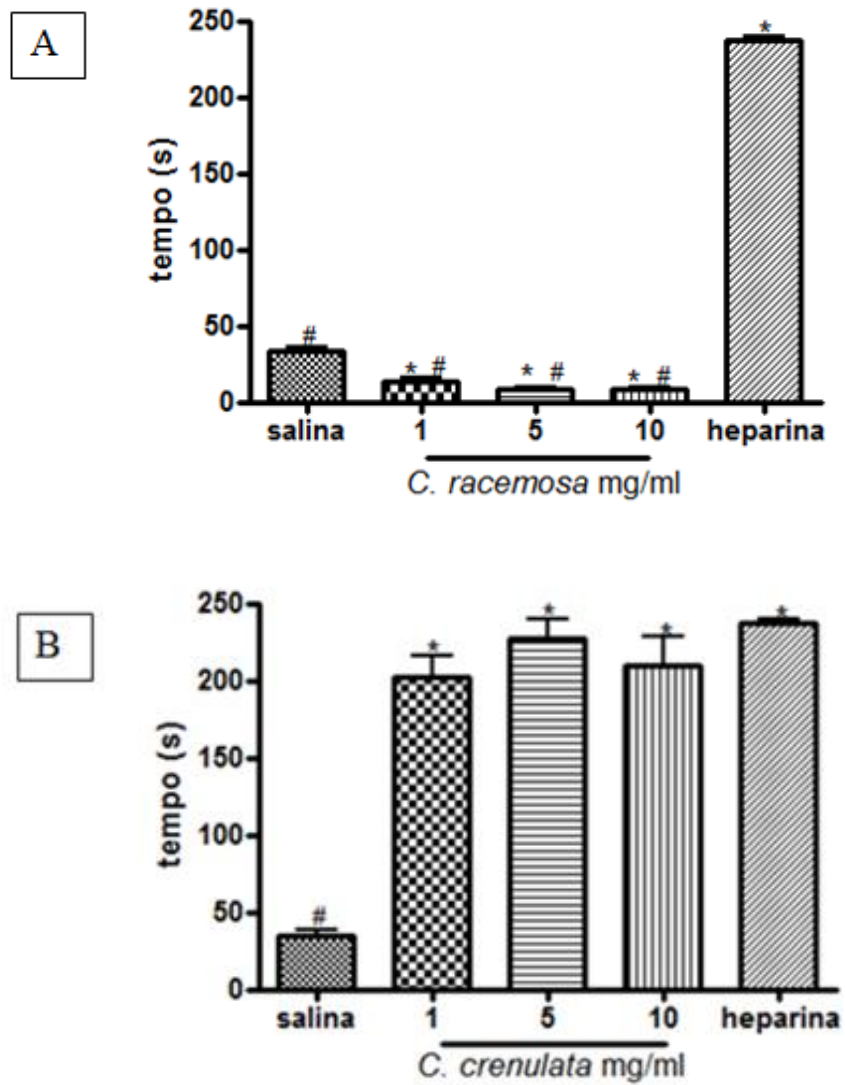
5.4 Avaliação do potencial pró-coagulante dos polissacarídeos sulfatados *in vitro* e *ex vivo*

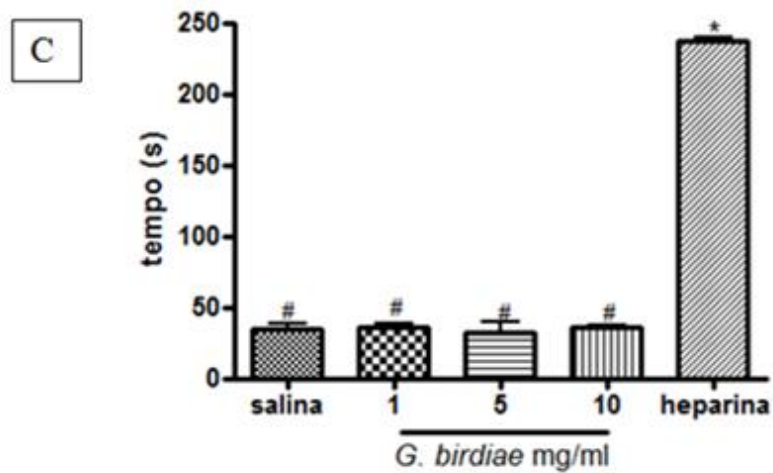
5.4.1 Ensaio da atividade pró-coagulante “*in vitro*”

A atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados é facilmente mensurada através de ensaios *in vitro*. Dentre os ensaios utilizados, o teste do Tempo de Ativação Parcial da Tromboplastina (APTT) avalia a eficiência da via intrínseca na medição da formação do coágulo de fibrina, o APTT normal é de cerca de 40 segundos em humanos.

O teste de APTT realizado com plasma humano segundo o método de Anderson *et al.* (1976), mostrou uma atividade pró-coagulante apenas para CrII em todas as doses utilizadas quando comparadas ao controle salina (Figura 23A), enquanto CcII apresentou uma forte atividade anticoagulante, em que todas as doses testadas não obtiveram diferenças estatísticas entre o grupo controle heparina (Figura 23B). O polissacarídeo da alga GbI não demonstrou ser nem anticoagulante e nem prócoagulante, não apresentando diferença estatística do grupo salina em nenhuma das doses utilizadas (Figura 23C).

Figura 23 – Avaliação do efeito coagulante no teste do APTT “*in vitro*”. (A) Polissacarídeo da alga *C. racemosa*. (B) Polissacarídeo da alga *C. crenulata*. (C) Polissacarídeo da alga *G. birdiae*.



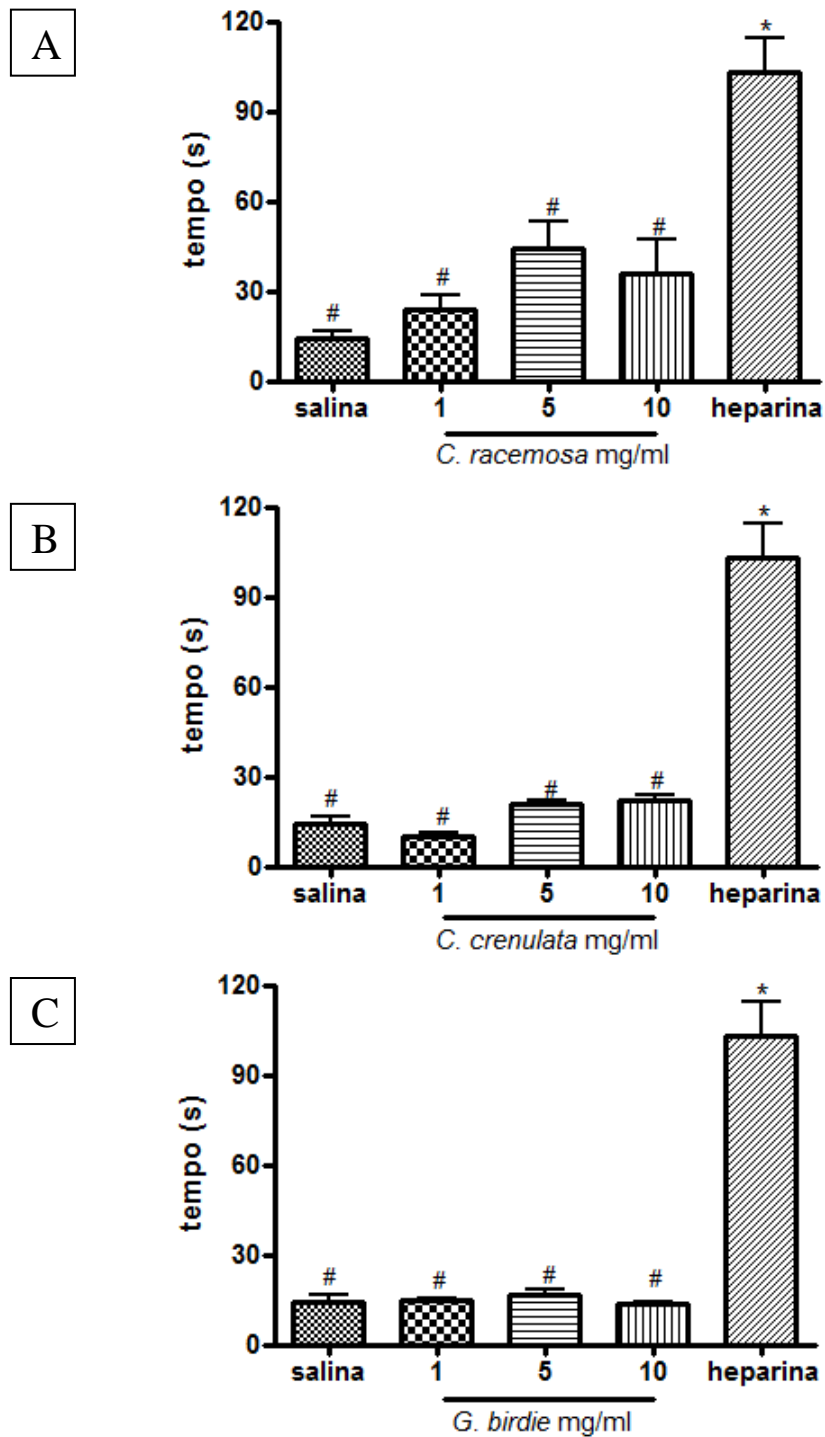


As barras representam a média \pm E.P.M. (n=6) do tempo (s). * indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) do controle salina, # indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) do controle heparina (ANOVA; Bonferroni).

O Tempo de Protrombina (TP) é uma medida laboratorial para avaliar a via extrínseca da coagulação. Em outras palavras, é um exame usado para determinar a tendência de coagulação do sangue. O TP normal é de cerca de 11 a 14,6 segundos em humanos. Quanto maior for o TP, menor será a concentração de protrombina no sangue.

O teste de TP realizado com plasma humano segundo o método de Anderson *et al.* (1976), mostrou que CrII, CcII e GbI em todas as doses utilizadas não apresentaram nenhum efeito coagulante (pro ou anti) quando comparados aos controles salina e heparina (Figura 24).

Figura 24 – Avaliação do efeito coagulante no teste do TP “*in vitro*”. (A) Polissacarídeo da alga *C. racemosa*. (B) Polissacarídeo da alga *C. crenulata*. (C) Polissacarídeo da alga *G. birdiae*.



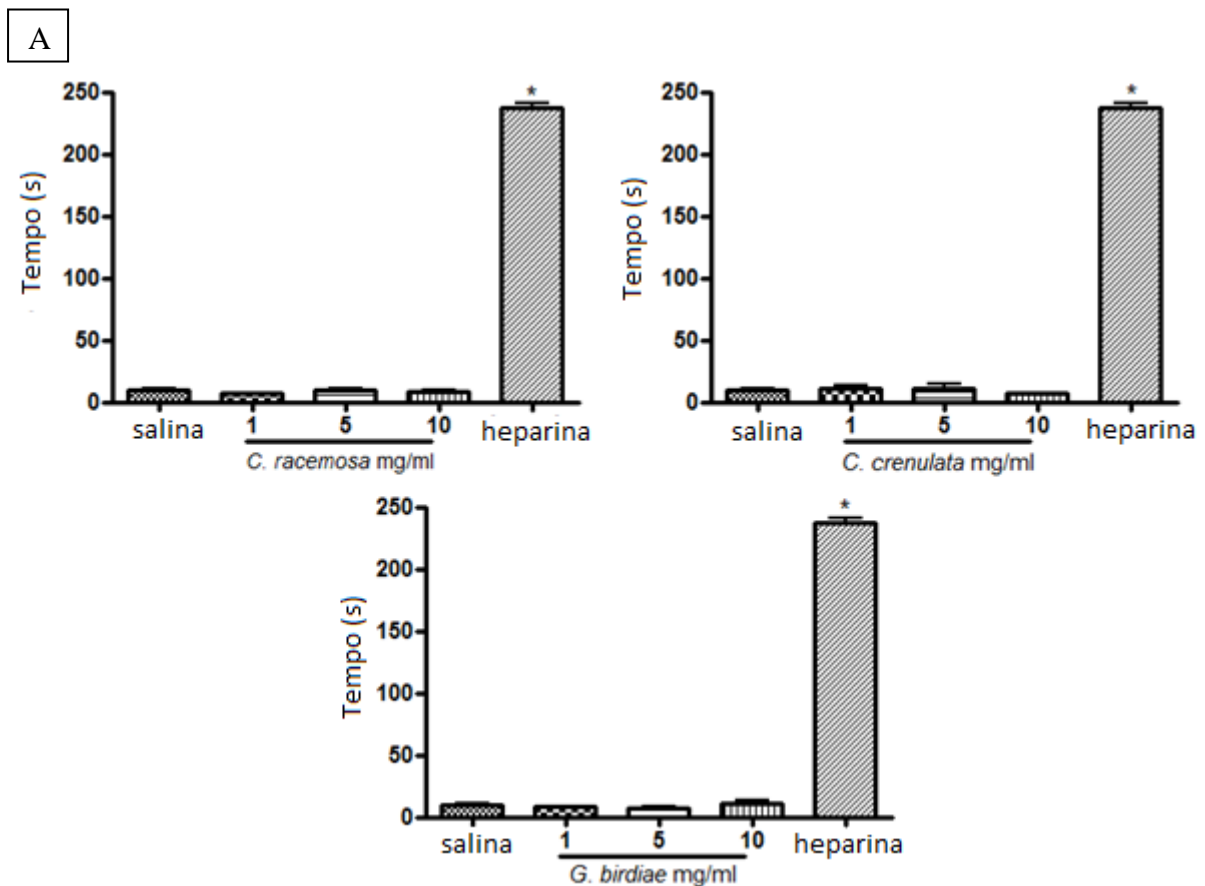
As barras representam a média \pm E.P.M. (n=6) do tempo (s). * indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) do controle salina, # indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) do controle heparina (ANOVA; Bonferroni).

5.4.2 Ensaio da atividade pró-coagulante “*ex vivo*”

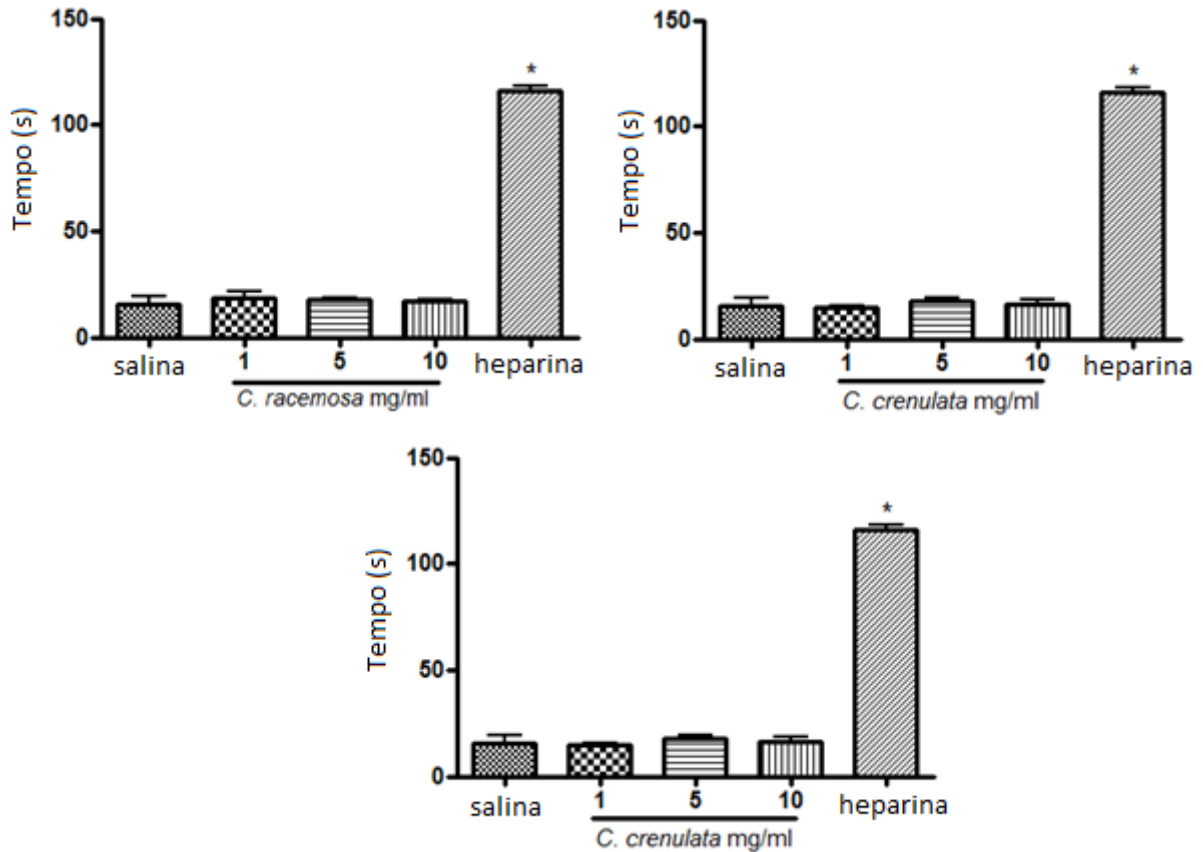
Para determinar a existência de uma correlação entre os efeitos *in vitro* e *ex vivo*, os polissacarídeos sulfatados e a heparin foram administrados por via intravenosa em camundongos por cinco dias e posteriormente foi realizado os ensaios de APTT e TP.

De acordo com a Figura 25 A e B os polissacarídeos CrII, CcII e GbI em todas as doses utilizadas não apresentaram nenhum efeito coagulante (anti ou pró) quando comparados aos controles salina e heparina em nenhum dos ensaios APTT e TP, respectivamente. Dessa forma não ocorreu correlação entre os resultados *in vitro* e *ex vivo*.

Figura 25 – (A) Avaliação do efeito coagulante no teste do APTT “*in vivo*”. (B) Avaliação do efeito coagulante no teste do TP “*in vivo*”.



B



As barras representam a média \pm E.P.M. (n=6) do tempo (s). * indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) do controle salina, (ANOVA; Bonferroni).

Em visto de que a primeira fase da cicatrização é a de coagulação (BAUM; ARPEY, 2005), procurou-se encontrar uma relação entre o potencial procoagulante destes polissacarídeos sulfatados e a sua capacidade de acelerar o processo de cicatrização. Além do que, a heparina é um polissacarídeo polianiónico sulfatado que interage com a antitrombina, formando um complexo ternário que inativa várias enzimas da coagulação sendo utilizada largamente em todo o mundo como um anticoagulante (MAJERUS; TOLLEFSEN 2007). Em relação aos polissacarídeos sulfatados oriundos de algas marinhas, estes já foram relatados na literatura por serem detentores desta atividade também (FONSECA *et al.*, 2008; GLAUSER *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2015; SUDHARSAN *et al.*, 2015; USTYUZHANINA *et al.*, 2016). Assim se estes polissacarídeos apresentassem um potente efeito anticoagulante, este poderia ser prejudicial, atrasando a primeira fase da cicatrização, fase esta, essencial para o desencadeamento do processo de cicatrização.

O polissacarídeo da alga CrII demonstrou-se ser pró-coagulante no ensaio do APTT *in vitro*, porém esta não foi confirmada no ensaio *ex vivo*. Da mesma maneira, o polissacarídeo

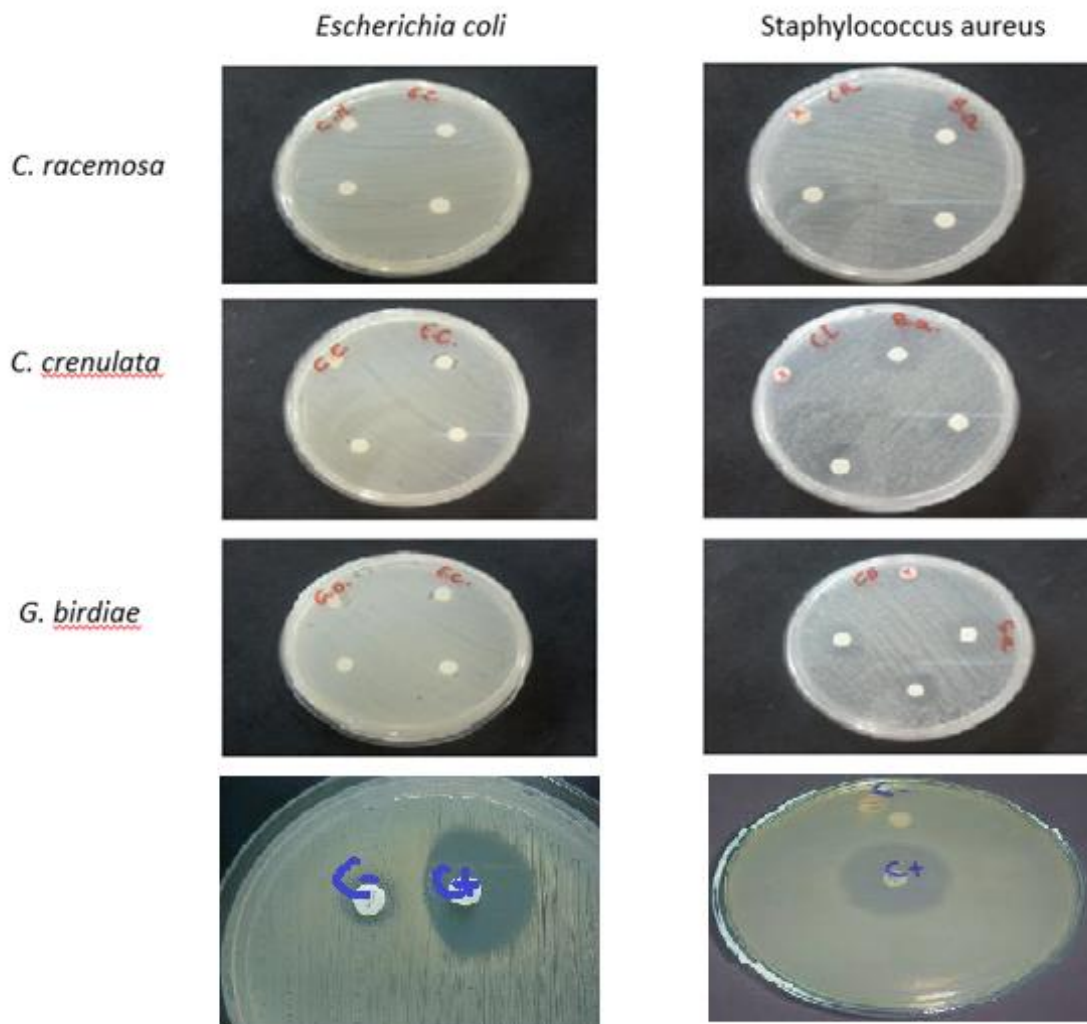
de CcII apresentou atividade anticoagulante no ensaio do APTT *in vitro*, porém, esta atividade não foi confirmada no ensaio *ex vivo*. O polissacarídeo de GbI não apresentou as atividades anticoagulante e pró-coagulante em nenhum dos ensaios testados. Assim, os polissacarídeos das algas testadas em modelos *ex vivo* não apresentaram efeito nem pró nem anti coagulante.

5.5 Avaliação da atividade antibacteriana, *in vitro*, dos polissacarídeos

Na busca de um gel cicatrizante ideal, este, além de possuir potencial cicatrizante, teria como efeito também a capacidade de impedir a proliferação de bactérias na ferida. Desta forma, os polissacarídeos sulfatados das algas marinhas *C. racemosa*, *C. crenulata* e *G. Birdiae* foram avaliados quanto ao seu potencial antibacteriano.

A leitura do ensaio antibacteriano foi realizada analisando-se a formação de halos de inibição ao redor dos poços das amostras. De acordo com as fotos (Figura 26) podemos perceber que CrII, CcII e GbII em todas as doses utilizadas não apresentaram um efeito antibacteriano frente às bactérias testadas, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Figura 26 – Avaliação do efeito antibacteriano analisando-se a formação de halos de inibição ao redor dos poços das amostras.



No mercado de medicamentos para cicatrização, temos exemplos em que foram adicionados antibacterianos para aumentar o potencial de cicatrização do produto. Um dos mais utilizados é o cloranfenicol, antibiótico primeiramente isolado a partir de culturas do *Streptomyces venezuelae* em 1947 e agora produzido sinteticamente. Possui uma estrutura relativamente simples e foi o primeiro antibiótico de amplo espectro a ser descoberto. Atua interferindo com a síntese proteica das bactérias e é principalmente bacteriostático (MAGOULASA *et al.*, 2015).

A pomada comercial KOLLAGENASE® é vendida de duas formas: Kollagenase e Kollagenase + Clorafenicol, sendo esta utilizada como agente desbridante em lesões superficiais, promovendo a limpeza enzimática das áreas lesadas e retirando ou dissolvendo, enzimaticamente, necroses e crostas (Cristalia Produtos Farmacêuticos Ltda). A pomada FIBRASE® (fibrinolisin, desoxirribonuclease e cloranfenicol) é indicada no tratamento de

lesões cutâneas infectadas (lesões na pele com infecção) tais como queimaduras, úlceras (lesões superficiais da pele) e feridas (Laboratórios Pfizer Ltda). EPITEZAN® é uma pomada para uso tópico oftálmico, indicada para acelerar a cicatrização e a epitelização dos tecidos oculares lesados e sua formulação contém: 10.000 UI de acetato de retinol, 25 mg de aminoácidos, 5 mg de metionina e 5 mg de cloranfenicol (Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda). A empresa Latinofarma Indústrias Farmacêuticas Ltda fabrica REGENCEL® um medicamento que é indicado para promover e proteger a epitelização (renovação da pele) e regeneração dos tecidos oculares lesados e possui em sua composição 5 mg de cloranfenicol.

Tendo em vista os resultados obtidos e um possível interesse da indústria farmacêutica em utilizar CrII, CcII e GbI na formulação de um produto cicatrizante, sugerimos que seja adicionado um agente antimicrobiano.

5.6 Avaliações da irritabilidade dermal dos géis

O potencial irritante de vários produtos e substâncias químicas, como cosméticos e medicamentos de uso tópico, é avaliado desde a década de 1940 por meio de experimentos com animais de laboratórios. Alguns dos ensaios adotados com o objetivo de avaliar o grau de irritabilidade, chamados de testes de irritação ocular ou cutânea, foram descritos inicialmente por John H. Draize e ainda hoje são adotados mundialmente por órgãos oficiais (OLIVEIRA, *et al.*, 2012)

De acordo com Chiari *et al.*, (2012), de uma maneira geral, podemos citar as reações que podem ser observadas ao se aplicar um medicamento de uso tópico:

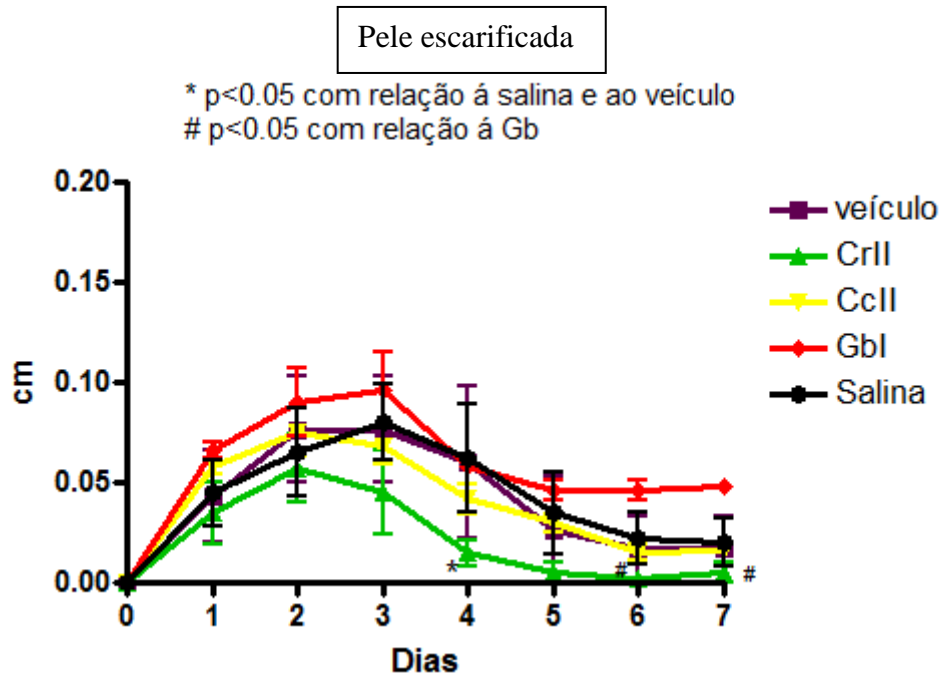
- irritação: reações de desconforto no local onde o produto foi aplicado, de intensidade variada, manifestadas como ardor ou prurido, eritema, edema, podendo causar destruição do tecido;
- sensibilização: reação alérgica, envolvendo mecanismos imunológicos. Pode ser de efeito imediato ou tardio e pode ocorrer em regiões diferentes da área de aplicação;
- efeito sistêmico: quando quaisquer componentes do produto atingem a corrente sanguínea, por via oral, inalatória, transcutânea ou transmucosa, metabolizados ou não.

Durante os sete dias de experimento foram analisadas reações dermatológicas macroscópicas, como: edema, eritema, exsudação, e presença de crosta. De acordo com as observações diárias os géis formulados com os polissacarídeos sulfatados CrII, CcII e GbI na sua maior dose (10 mg/Kg) não causaram nenhuma alteração dermatológica, em nenhum dos grupos experimentais (pele íntegra e pele escarificada). O Grupo de animais tratados com o veículo (Carbopol 940) também não apresentou nenhuma alteração sendo este veículo considerado inerte.

Para comprovar que os polissacarídeos sulfatados CrII, CcII e GbI não apresentam irritabilidade dermal, além da observação diária, foi feita uma avaliação da espessura da pele diariamente, como também, a mensuração do peso do exsudato presente na pele do animal no último dia do experimento.

Os animais de pele íntegra não tiveram alterações na espessura da pele em nenhum dos dias do experimento. Já os animais de pele escarificada apresentaram alterações na espessura da pele devido às escarificações e, como podemos observar através da Figura 27, os animais tratados com os géis formulados com os polissacarídeos CcII e GbI não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle salina, enquanto que os animais tratados com o gel formulado com o polissacarídeo CrII, no quarto dia de tratamento, tiveram uma redução da espessura da pele, sendo este resultado considerado promissor de uma possível atividade cicatrizante. O Grupo de animais tratados com o veículo não apresentou nenhuma diferença significativa em relação ao controle salina.

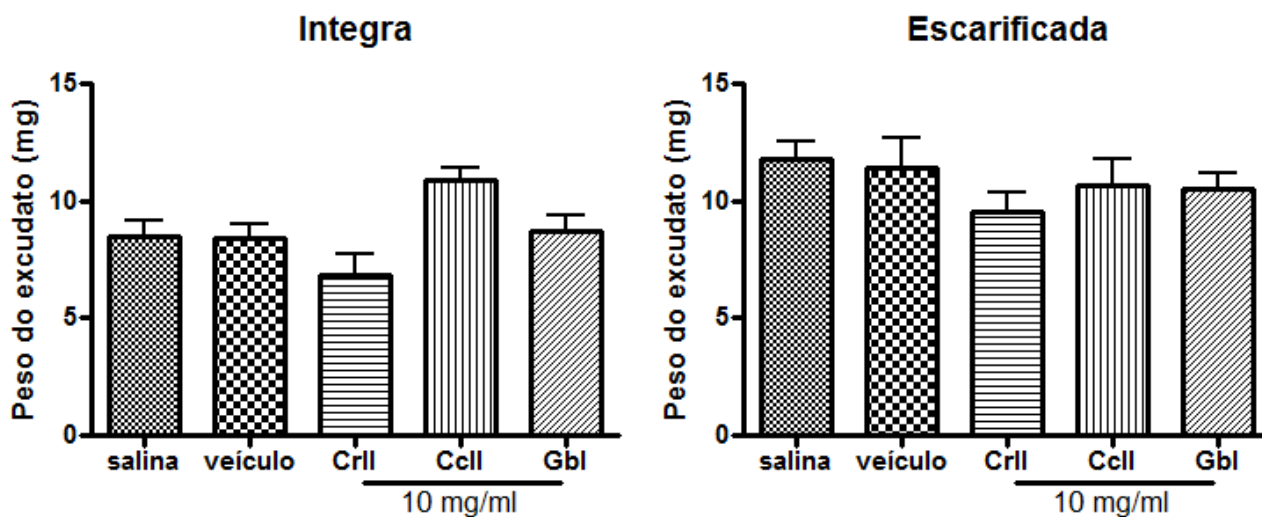
Figura 27: Avaliação do potencial irritante dos polissacarídeos sulfatados CrII, CcII e GbI quanto a espessura da pele dos animais no grupo de pele escarificada. Os animais receberam tratamento diário com os polissacarídeos CrII, CcII e GbI na dose de 10 mg/ml.



As barras representam a média \pm E.P.M. ($n=6$) da espessura da pele (cm). * indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) do controle salina, # indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) do grupo GbI (ANOVA; Bonferroni).

Os animais foram eutanasiados no último dia do experimento e foi removido um pedaço de pele com auxílio de um *punch* para pesagem e analisados quanto a presença de infiltrados nos tecidos dermais, característicos de edema (inflamação). De acordo com os resultados, os géis formulados com os polissacarídeos sulfatados CrII ($6,85 \pm 0,88 / 9,56 \pm 0,8$), CcII ($10,90 \pm 0,51 / 10,7 \pm 1,05$) e GbI ($8,7 \pm 0,65 / 10,54 \pm 0,61$), respectivamente, pele íntegra e pele escarificada, não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle salina ($8,5 \pm 0,69 / 11,83 \pm 0,69$). O Grupo de animais tratados com o veículo ($11,43 \pm 1,22 / 8,37 \pm 0,62$) não apresentou nenhuma diferença significativa em relação ao controle salina (Figura 28).

28 - Avaliação do potencial irritante dos polissacarídeos sulfatados CrII, CcII e GbI quanto a presença de infiltrados nos tecidos dermais. Os animais receberam tratamento diariamente com os géis formulados com os polissacarídeos CrII, CcII e GbI na dose de 10 mg/ml. No sétimo dia os animais foram eutanasiados e foi calculado o valor de exsudato presente no tecido de acordo com a fórmula: $P_{inicial} - P_{final} = \text{exsudato}$.



As barras representam a média \pm E.P.M. (n=6) do peso do exsudato (mg). * indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) do controle salina, (ANOVA; Bonferroni).

Diante dos resultados encontrados os géis formulados com os polissacarídeos sulfatados CrII, CcII e GbI na sua maior dose não se mostraram irritantes, sendo esses dados condizentes com a literatura em que, Burlando *et al.*, (2008) demonstraram que o polissacarídeo de *Boswellia serrata* não apresentava efeitos irritantes/citotóxicos quando aplicados topicamente. E, mais recentemente, Fernández-Ferreiro *et al.*, (2015), demonstraram que os polissacarídeos (Kappa-carragenana e alginatos) não apresentaram potencial irritante em um modelo de irritabilidade aguda na córnea.

5.7 Avaliação da atividade cicatrizante *in vivo*

A porcentagem de redução da lesão ou contração da lesão foi determinada a partir das fotografias obtidas em intervalos de tempo de 3 dias até total cicatrização da lesão inicial. O tempo de cicatrização dos animais do controle negativo estendeu-se por um período de 15 dias pós-operatório (p.o.). Portanto, esse foi o período de tempo máximo padronizado para determinar os parâmetros que caracterizam o potencial cicatrizante de um gel.

Todas as feridas cicatrizaram por segunda intenção, havendo a substituição do tecido injuriado por outro semelhante, porém não idêntico, caracterizada pela formação de tecido de granulação e contração da ferida (AL-Khamis *et al.*, 2011).

Em relação às análises macroscópicas realizadas diariamente, os animais de todos os grupos apresentaram edema, hiperemia e exsudato nos 4 primeiros dias de pós operatório. Do dia 5 ao dia 8 houve ausência de edema, exsudato e hiperemia em todos os grupos com exceção dos animais que receberam kolagenase, visto que este grupo apresentou exsudato, embora em menor quantidade, quando comparado com os dias anteriores. O aparecimento de uma crosta de aspecto granular espessa foi observado neste período em todos os grupos, com exceção novamente do grupo tratado com kolagenase, que não formou crosta grossa, e alguns animais já começaram a apresentar sinais de re-epitelização. O grupo tratado com CcII apresentou desprendimento da crosta precocemente neste período. Do dia 9 ao dia 12 houve desprendimento da crosta nos grupos que ainda possuíam crosta e estes apresentaram sinais de re-epitelização. Do dia 13 ao dia 15 todos os grupos já estavam com suas feridas fechadas e em processo de re-epitelização (Tabela 5).

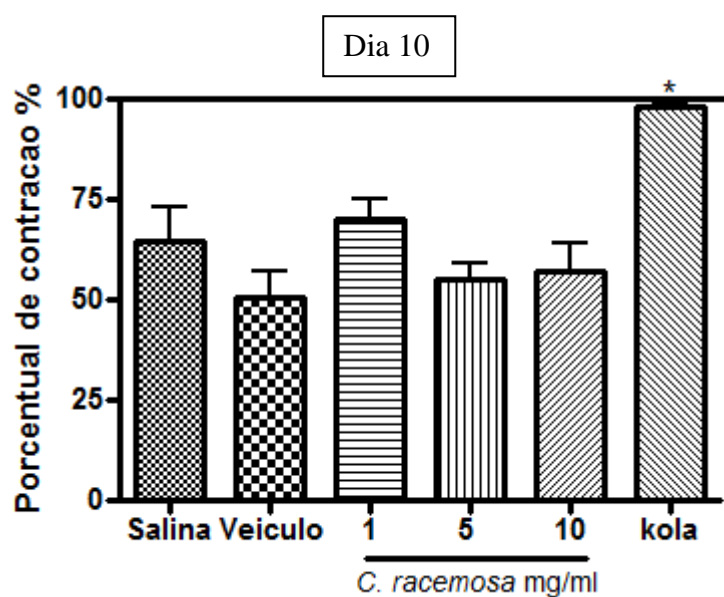
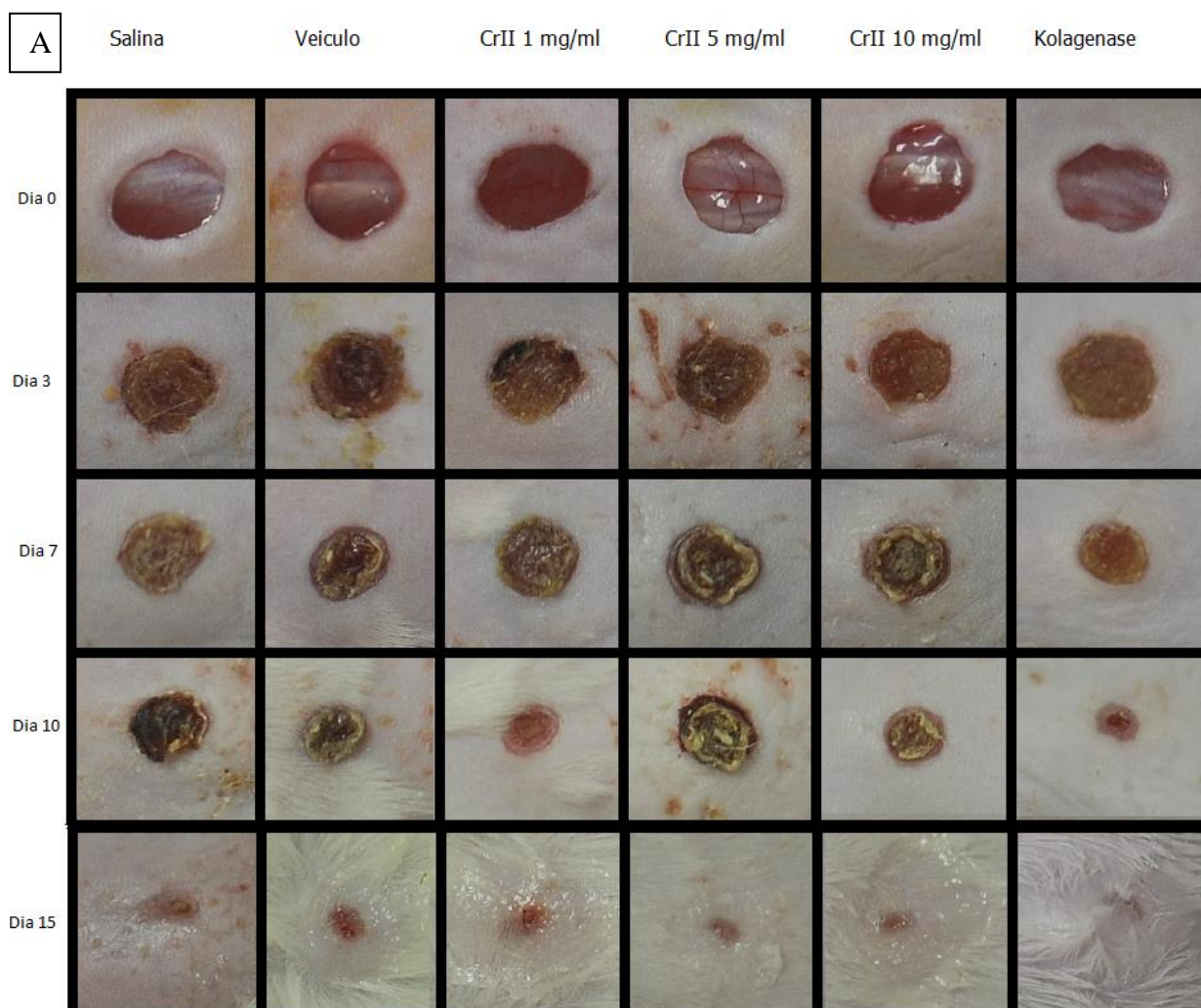
Tabela 5. Avaliação macroscópica durante os dias de tratamento

Tratamento	DIAS			
	0 - 4	5 - 8	9 - 12	13 - 15
Salina	Ed / Hip / Exs	Cr	De / Re	Re
Veiculo	Ed / Hip / Exs	Cr	De / Re	Re
CrII 1 mg/ml	Ed / Hip / Exs	Cr	De / Re	Re
CrII 5 mg/ml	Ed / Hip / Exs	Cr	De / Re	Re
CrII 10 mg/ml	Ed / Hip / Exs	Cr	De / Re	Re
CcII 1 mg/ml	Ed / Hip / Exs	Cr / De	De / Re	Re
CcII 5 mg/ml	Ed / Hip / Exs	Cr / De	Re	Re
CcII 10 mg/ml	Ed / Hip / Exs	Cr / De	Re	Re
Gbl 1 mg/ml	Ed / Hip / Exs	Cr	De / Re	Re
Gbl 5 mg/ml	Ed / Hip / Exs	Cr	De / Re	Re
Gbl 10 mg/ml	Ed / Hip / Exs	Cr	De / Re	Re
Kolagenase	Ed / Hip / Exs	Exs / Re	Re	Re

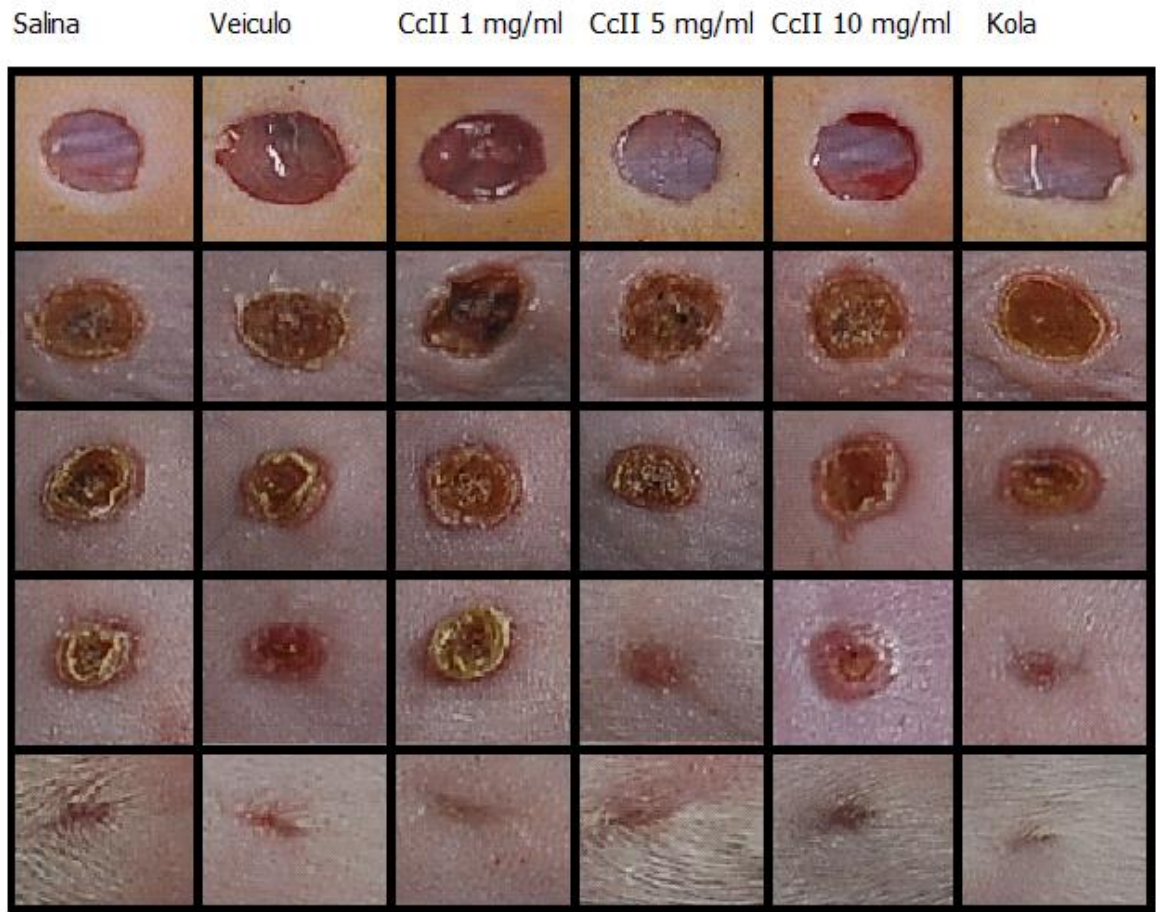
Ed = edema, Hip = hiperemia, Exs = exsudato, Cr = crosta, Re = re-epitelização, De = desprendimento da crosta

Após a eutanásia nos dias 3, 7, 10 e 15, as feridas de cada animal foram fotografadas e através do software *ImageJ* foi calculado a área da ferida. De acordo com a Figura 29 podemos observar que apenas os animais que receberam o gel na dose de 5mg/kg do polissacarídeo da alga *C. crenulata* apresentaram uma atividade cicatrizante estatisticamente significante quando comparada ao controle salina. Sendo esta atividade evidenciada no décimo dia do experimento, segue gráficos abaixo.

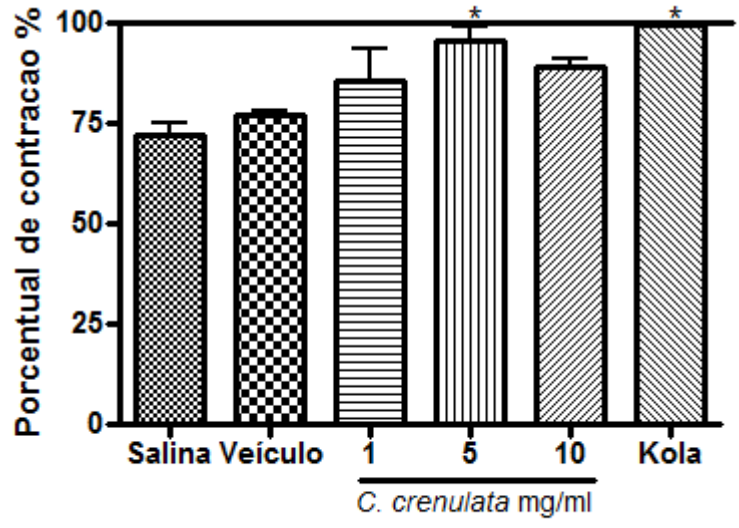
Figura 29 – Imagens das lesões macroscópicas. A figura mostra o processo de cicatrização dos grupos tratados com o gel formulado com: (A) Polissacarídeo da alga *C. racemosa*. (B) Polissacarídeo da alga *C. crenulata*. (C) Polissacarídeo da alga *G. birdiae*. Seguidas com o gráfico do seu Percentual de contração da ferida.

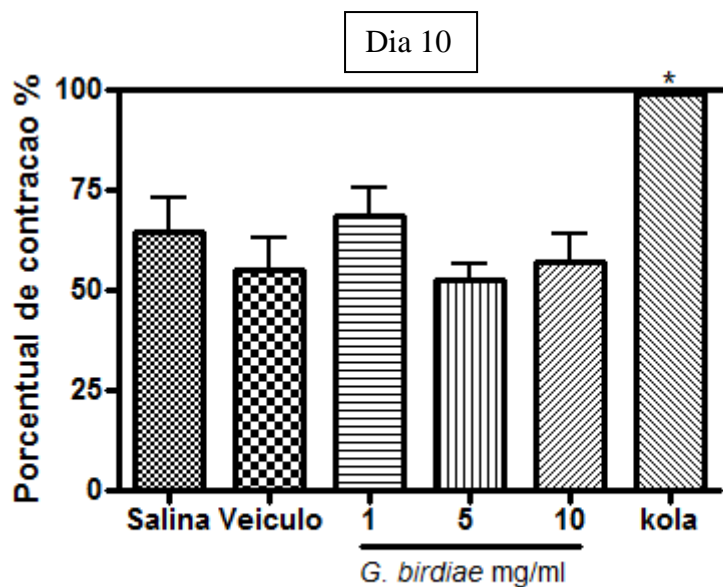


B



Dia 10





Os dados são expressos em média \pm s.e.m. de seis ratos para cada grupo. * $p < 0,05$ indica diferença significativa de cada grupo em relação ao dia 0. (ANOVA, teste de Bonferroni).

Como já foi explanado na sessão 1.6 diversos polissacarídeos já foram descritos na literatura por serem detentores de atividade cicatrizante (YE, *et al.*, 2003; SCHIRATO *et al.*, 2006; BURD, A.; HUANG, L. 2008; AMMAR, *et al.*, 2015; CHANDIKA *et al.*, 2015; LI *et*

al., 2015). Porém, este é o primeiro relato de um gel formulado com polissacarídeo sulfatado extraído de alga marinha possuir efeito cicatrizante em um modelo de feridas induzidas em camundongos.

5.7.1 Análise histológica das feridas

A fim de confirmar a atividade cicatrizante do gel formulado com CcII foram realizadas as análises histológicas do tecido das feridas nos dias 3, 7, 10 e 15 do experimento.

De acordo com a tabela 6 A, podemos observar que, durante a fase inflamatória da ferida, em que esta é caracterizada pela presença de infiltrado celular, e se traduz por migração celular intensificada de neutrófilos através das vênulas e extravasamento de moléculas séricas, anticorpos, complemento e proteínas pelos capilares (TAZIMA, *et al.*, 2008), o grupo da CcII leu-se um maior índice de infiltrado celular e também apresentou uma aceleração na formação do tecido de granulação, sendo este característico da fase proliferativa, a fase seguinte, quando comparados ao controle salina e ao veículo.

Com sete dias de experimento os cortes histológicos das feridas tratadas com o gel de CcII apresentaram-se sem infiltrado inflamatório caracterizando bem o fim da fase anterior (inflamatória). Além disso, leu-se também uma grande presença de fibroblastos, angiogênese, colágeno e tecido de granulação demonstrando que o processo de epitelização estava mais acelerado que os grupos controles, salina e veículo e muito semelhante ao controle positivo, a Kolagenase (Tabela 6 B).

No décimo dia de experimento é possível observar que os grupos tratados com CcII e Kolagenase, controle positivo, possuem uma maior presença de colágeno e re-epitelização e uma diminuição da formação de novos vasos sanguíneos quando comparados aos grupos controles negativos, salina e veículo (Tabela 6 C). Demonstrando mais uma vez que o processo de cicatrização está mais acelerado nos grupos tratados com CcII e Kolagenase, tendo em vista que já apresentam características da fase de remodelação (ocorre durante a fase final do processo proliferativo e pode continuar durante alguns meses, observando-se síntese, depósito, contração e remodelação da matriz extracelular (MEC) neoformada. Os fibroblastos continuam a ser as “células-chave” neste processo e por último há uma diminuição da vascularização (FINE; MUSTOE, 2001)).

De acordo com a tabela 6 D ao final no experimento as feridas dos animais já se encontravam na última fase do processo cicatricial e a salina era o único grupo que ainda continha tecido de granulação (característico da fase proliferativa).

Tabela 6. Análise histológica d do tecido das feridas nos dias 3 (A), 7 (B), 10 (C) e 15 (D) do experimento.

Dia 3				
A	SALINA	Ccll 5 mg/kg	Veículo	Kola
PE	-	-	-	-
II	++	+++	++	++
PF	-	-	-	-
PN	+	-	+	-
PC	-	-	-	-
TG	+	++	+	++

Dia 7				
B	SALINA	Ccll 5 mg/kg	Veículo	Kola
PE	++	+++	++	+++
II	+	-	+	++
PF	+++	+++	+++	+++
PN	+	+++	++	++
PC	++	+++	++	+++
TG	++	++	++	+

Dia 10				
C	SALINA	Ccll 5 mg/kg	Veículo	Kola
PE	++	+++	++	+++
II	+	-	+	+
PF	+++	+++	+++	+++
PN	++	+	++	+
PC	++	+++	++	+++
TG	+	+	+	+

Dia 15				
D	SALINA	Ccll 5 mg/kg	Veículo	Kola
PE	+++	+++	+++	+++
II	-	-	-	-
PF	+++	+++	+++	+++
PN	+	+	+	+
PC	+++	+++	+++	+++
TG	+	-	-	-

Presença de epitelização (PE)

Infiltrado inflamatório (II)

Presença de fibroblastos (PF)

Presença de neovasos (PN)

Presença de colágeno (PC)

Tecido de granulação (TG)

Escores: ausente (-), leve (+), moderado (++) e intenso (+++).

Diante dos resultados obtidos nas análises histológicas podemos confirmar o potencial cicatrizante que o gel formulado com CcII na dose de 5mg/ml apresentou no ensaio *in vivo*.

5.8 Avaliação da atividade cicatrizante *in vitro*.

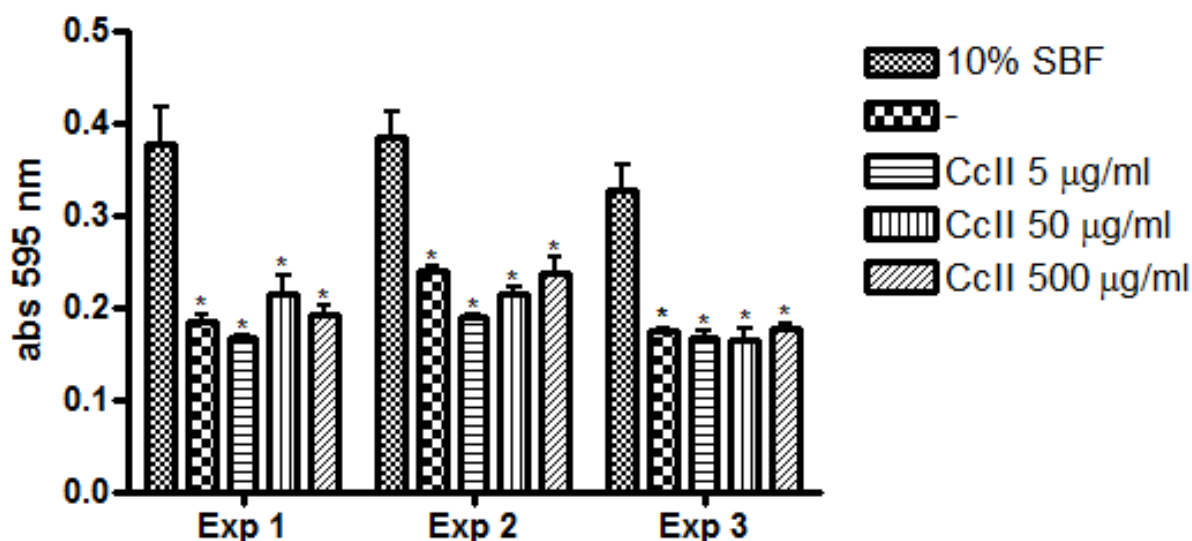
Diante dos resultados anteriores, apenas o gel formulado com o polissacarídeo sulfatado da alga marinha *C. crenulata* foi capaz de acelerar o processo cicatricial nas feridas induzidas em camundongos. Portanto, apenas o polissacarídeo e o gel de CcII foi utilizado nos ensaios para avaliar a atividade cicatrizante em modelos *in vitro*.

5.8.1 Ensaio de adesão celular

A maioria das células da pele, em cultura de tecido cresce sob a forma de monocamadas aderentes a um suporte sólido. Para as células começarem a proliferar normalmente se utiliza soro bovino fetal (SBF) ou albumina sérica bovina (BSA), para promover a adesão celular. Porém, sempre que possível, seria desejável que não se usasse soro nos meios de cultura, pois, problemas como inibição das barreiras sanitárias devido a essas duas substâncias serem produtos derivados sanguíneos, e ainda, por serem obtidos espécie bovina, representam altos riscos de contaminação e transmissão de doenças (TORNESI *et al.*, 1993; MILHAM *et al.*, 1994). Dessa forma, foi realizado o ensaio de adesão celular a fim de verificar se o polissacarídeo sulfatado era capaz de promover a adesão celular nos frascos de cultivo de células em substituição a proteínas de origem animal.

De acordo com a figura 30 podemos concluir que o polissacarídeo de CcII em todas as doses testadas 5 µg/ml ($0,173 \pm 0,02$), 50 µg/ml ($0,197 \pm 0,01$) e 500 µg/ml ($0,20 \pm 0,01$) diferiram estatisticamente do controle positivo (meio de cultura + 10% de SBF) ($0,362 \pm 0,01$) e apresentou resultado igual ao controle negativo (meio de cultura sem SBF) ($0,199 \pm 0,02$).

Figura 30 - Avaliação do potencial de aderência das células HaCaT aos frascos de cultura quando submetidas ao tratamento com o polissacarídeo da alga *C. crenulata* (CcII) utilizando o soro bovino fetal (SBF) a 10% como controle positivo.



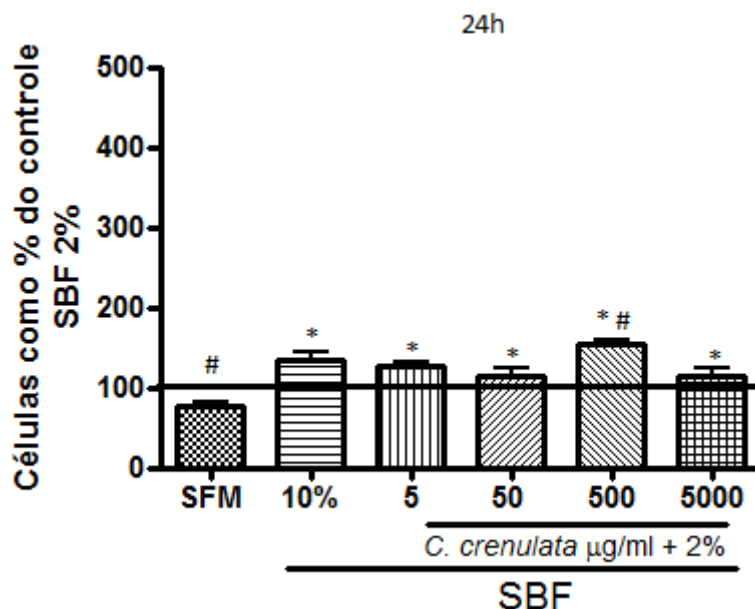
As barras representam a média \pm E.P.M. da abs 595 nm. * indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) do controle positivo meio de cultura + 10% de SBF (ANOVA; Bonferroni).

Dessa forma, nos próximos experimentos foi utilizado SBF para que assim as células pudessem se aderir aos frascos de cultura.

5.8.2 Ensaio de proliferação celular (CyQUANT®)

Todos os dados obtidos do ensaio de proliferação celular foram normalizados com o controle meio DMEM + SBF2%. Assim, observando a Figura 31, nota-se que nas primeiras 24 h há um aumento no número de células nos grupos 10%SBF – controle positivo ($133,8 \pm 9,59$); CcII 5 µg/ml + 2%SBF ($125,9 \pm 6,00$); CcII 50 µg/ml + 2%SBF ($114,1 \pm 10,3$); CcII 500 µg/ml + 2%SBF ($154,8 \pm 5,35$) e CcII 5000 µg/ml + 2%SBF ($115,2 \pm 8,85$) onde estes grupos diferiram significativamente do grupo negativo SFM ($76,92 \pm 5,32$). É importante salientar que o grupo CcII 500 µg/ml + 2%SBF teve uma maior proliferação celular do que o próprio grupo controle positivo.

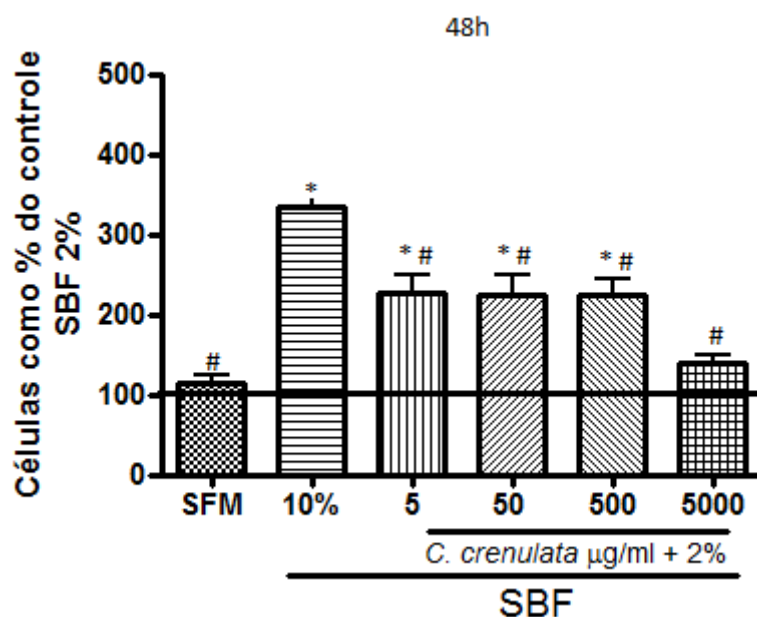
Figura 31 – Ensaio de proliferação celular CyQUANT® 24 h, foi utilizado soro livre de SBF (SFM) como controle negativo. Os dados obtidos foram normalizados com o controle meio DMEM + SBF2%.



As barras representam a média \pm E.P.M. das células como porcentagem do controle meio DMEM + SBF2%. * indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) do controle negativo meio de cultura SFM; # indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) do controle positivo meio de cultura DMEM + 10%SBF (ANOVA; Bonferroni).

Após 48 h de experimento é possível observar que o grupo controle positivo 10%SBF continuou apresentando um crescimento celular ($333,6 \pm 18,18$), como o esperado. Os grupos tratados com CcII + 2%SBF nas concentrações de 5 $\mu\text{g/ml}$ ($226,9 \pm 22,94$); 50 $\mu\text{g/ml}$ ($224,9 \pm 23,3$) e 500 $\mu\text{g/ml}$ ($223,6 \pm 21,05$) tiveram crescimento, mas estes foram significativamente inferior ao controle positivo. Porém o grupo tratado com CcII + 2%SBF na concentração de 5000 $\mu\text{g/ml}$ ($138,4 \pm 11,32$) quase não teve proliferação celular sendo o único grupo que recebeu tratamento que não teve diferença estatística do grupo negativo SFM ($115,2 \pm 8,23$) (Figura 32).

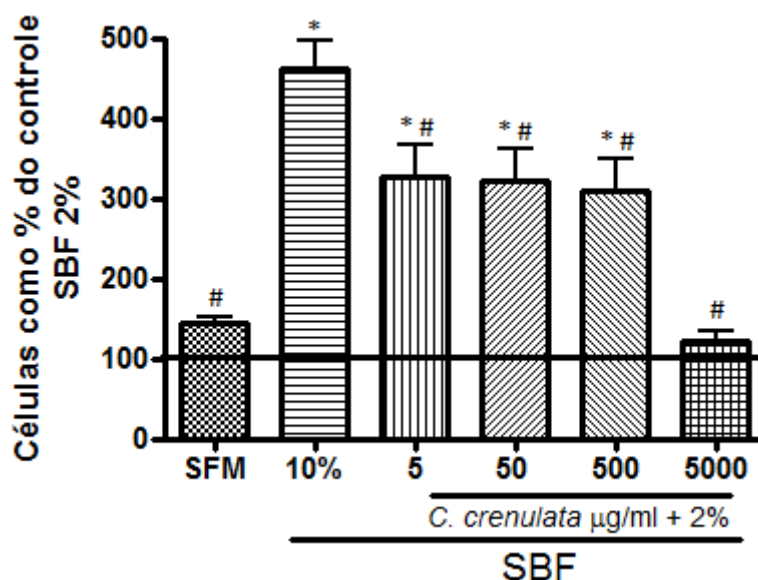
Figura 32 – Ensaio de proliferação celular CyQUANT® 48 h, foi utilizado soro livre de SBF (SFM) como controle negativo. Os dados obtidos foram normalizados com o controle meio DMEM + SBF2%.



As barras representam a média \pm E.P.M. das células como porcentagem do controle meio DMEM + SBF2%. * indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) do controle negativo meio de cultura SFM; # indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) do controle positivo meio de cultura DMEM + 10%SBF (ANOVA; Bonferroni).

Após 72 h de experimento podemos observar na Figura 33 que os grupos experimentais continuaram tendo o mesmo comportamento que apresentaram com 48 h. O grupo controle positivo 10%SBF obteve um crescimento celular ($461,8 \pm 36,21$), como o esperado. Os grupos tratados com CcII + 2%SBF nas concentrações de 5 $\mu\text{g/ml}$ ($327,7 \pm 39,14$); 50 $\mu\text{g/ml}$ ($320,5 \pm 42,28$) e 500 $\mu\text{g/ml}$ ($309,7 \pm 40,07$) tiveram crescimento, mas este foi significativamente inferior ao controle positivo. Porém o grupo tratado com CcII + 2%SBF na concentração de 5000 $\mu\text{g/ml}$ ($120,8 \pm 14,16$) apresentou uma redução na proliferação celular obtendo resultados inferiores ao grupo negativo SFM ($143,0 \pm 9,89$).

Figura 33 – Ensaio de proliferação celular CyQUANT® 72 h, foi utilizado soro livre de SBF (SFM) como controle negativo. Os dados obtidos foram normalizados com o controle meio DMEM + SBF2%.

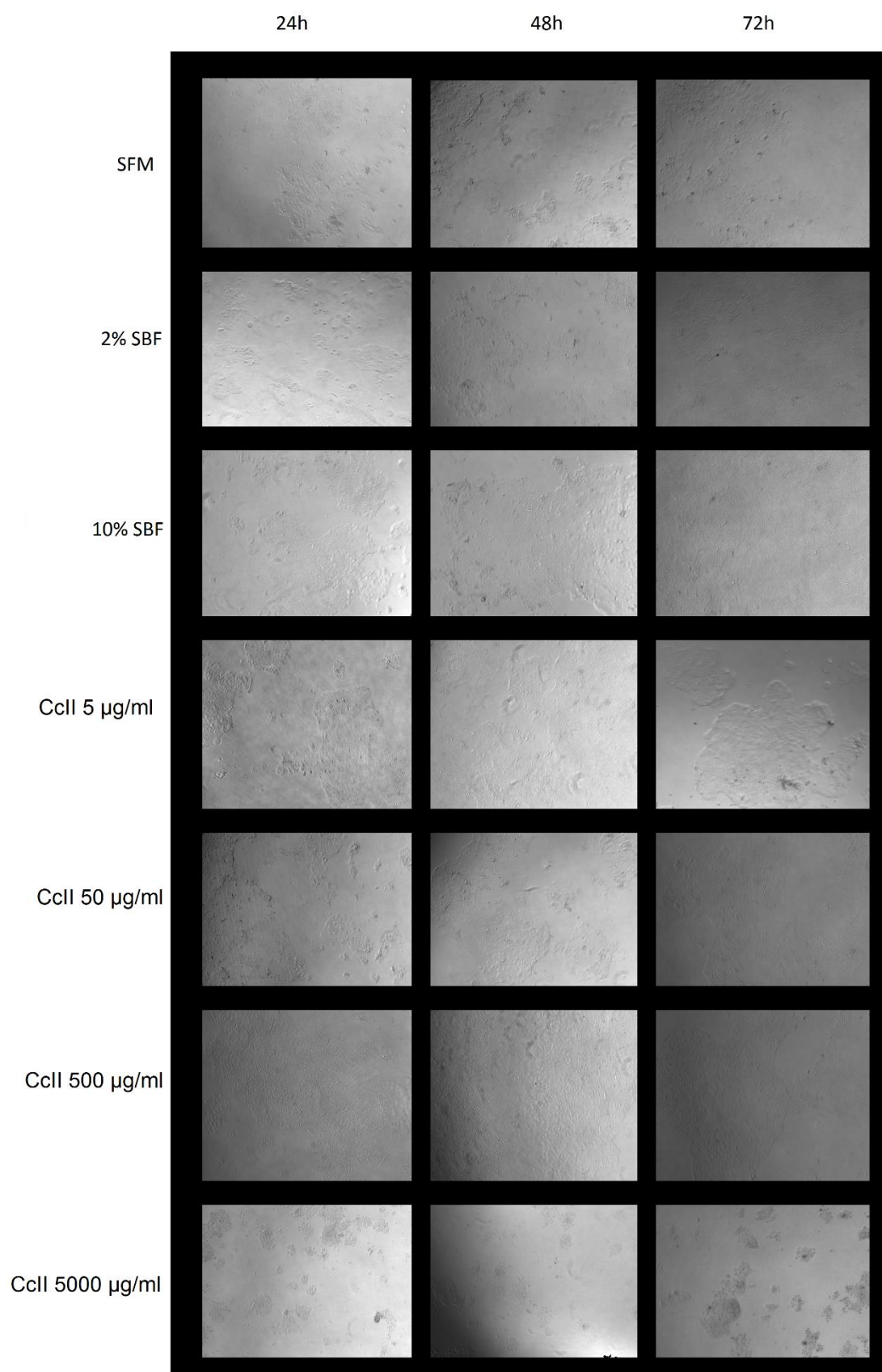


As barras representam a média \pm E.P.M. das células como porcentagem do controle meio DMEM + SBF2%. * indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) do controle negativo meio de cultura SFM; # indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) do controle positivo meio de cultura DMEM + 10%SBF (ANOVA; Bonferroni).

Diante dos resultados encontrados, podemos perceber que os grupos tratados com CcII + 2%SBF nas concentrações de 5 e 50 $\mu\text{g/ml}$ não influenciaram na proliferação celular, apresentando um aumento no número de células esperado devido ao uso de 2% de soro bovino fetal diluído no meio de cultura. Porém o grupo tratado com CcII + 2%SBF na concentração de 500 $\mu\text{g/ml}$ acelerou o processo de proliferação celular nas primeiras 24 h, porém, com 48 e 72 h, CcII não apresentou este efeito. Já o grupo tratado com CcII + 2%SBF na concentração de 5000 $\mu\text{g/ml}$ obteve um declínio na proliferação celular sendo esta bastante evidenciada com 72 h de experimento.

A fim de verificar a morfologia das células, as placas de cultura foram fotografadas, e todas as células dos grupos experimentais testados com 24, 48 e 72 h apresentaram-se normais com exceção de CcII + 2%SBF na concentração de 5000 $\mu\text{g/ml}$ que mostrou diferenças morfológicas com 72 h de experimento (Figura 34).

Figura 34 – Fotomicrografia das células HaCat do ensaio de proliferação celular CyQUANT® nos tempos de 24, 48 e 72 h. As imagens foram obtidas no aumento de 40x em microscópio ótico.



Evidências na literatura comprovam que diversos polissacarídeos possam estimular a proliferação celular.

Jettanacheawchankit e colaboradores (2009) identificaram que uma solução contendo acemanana (polissacarídeo) estimulou a proliferação de fibroblastos de gengiva e a produção de algumas proteínas de matriz extracelular. Yao *et al.*, (2009) utilizaram uma solução com fração polissacarídica de *Aloe vera*, e os resultados obtidos demonstraram que essa solução promove a proliferação de fibroblastos humanos *in vitro*. Mais recentemente Wang *et al.*, (2014) demonstraram os efeitos de um polissacarídeo extraído de abalone (*Haliotis discus hannai Ino*) (AVAP I) sobre a proliferação celular HepG2, onde este, regulou a expressão gênica e acelerou o processo de ciclo celular.

Entretanto, existe relatos na literatura em que polissacarídeos podem não apresentar efeito na proliferação celular em modelos *in vitro*. Deters *et al.* (2001) demonstram que polissacarídeos extraídos da casca de *Hamamelis virginiana* não tiveram efeito na proliferação de queratinócitos humanos. Zippel *et al.*, (2010) comprovaram que arabinogalactanas extraídas de sementes de *Jatropha curcas L.* apesar de não estimularem a proliferação celular *in vitro* apresentaram-se como um potente indutor da diferenciação celular através da estimulação de hormônios de crescimento e sinalização celular induzida por TGF- β .

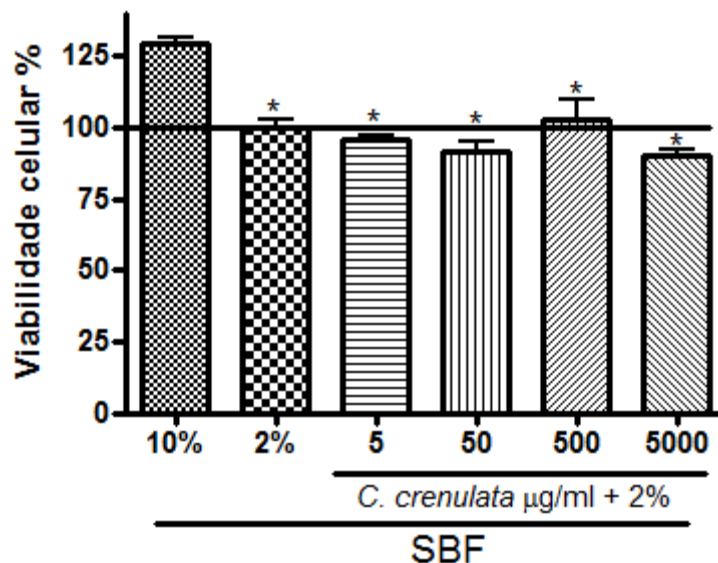
O fato de existir polissacarídeos que possam apresentar atividade de proliferação celular e outros não, é devido à especificidade celular que estes polissacarídeos apresentam, ou seja, um polissacarídeo pode apresentar um aumento na proliferação de queratinócitos entretanto não possuir efeito nenhum quando testados em fibroblastos. Deters *et al.* (2010) demonstraram que o polissacarídeo extraído das raízes de *Althea officinalis L.* estimulavam células epiteliais humanas (KB) e não tiveram efeito quando testadas em fibroblastos. Três tipos de polissacarídeos extraídos do fruto de *Typha latifolia L.* (TL1, TL2 e TL3) aumentaram significativamente a proliferação de queratinócitos (HaCaT) enquanto não apresentaram efeito nenhum quando testadas em fibroblastos (GESCHER *et al.*, 2011).

5.8.3 Teste de citotoxicidade (MTT)

A fim de verificar se o fato de o polissacarídeo ter apresentado um baixo efeito na proliferação celular estava relacionado a sua toxicidade e o mesmo estar causando a morte das células foi realizado o ensaio de citotoxicidade para analisar a viabilidade celular.

De acordo com a figura 35 podemos observar que o polissacarídeo de CcII em todas as doses testadas 5 µg/ml ($96,00 \pm 1,00$), 50 µg/ml ($91,50 \pm 3,5$), 500 µg/ml ($102,7 \pm 6,88$) e 5000 µg/ml ($90,33 \pm 1,85$) diferiram estatisticamente do controle positivo (meio de cultura + 10% de SBF) ($130,0 \pm 2,64$) e foi obtido resultado igual ao controle (meio de cultura + 2% de SBF) ($100,00 \pm 2,64$). Dessa forma o polissacarídeo de CcII em todas as doses testadas não são citotóxicos.

Figura 35 – Ensaio de citotoxicidade (MTT) 24 h. Análise da viabilidade celular.



As barras representam a média ± E.P.M. da viabilidade celular em %. * indica diferença estatística significante ($p < 0,05$) do controle positivo meio de cultura DMEM + 10% SBF (ANOVA; Bonferroni).

Estes dados corroboram com a literatura em que polissacarídeos quando testados em experimentos de citotoxicidade *in vitro* não apresentaram efeito tóxico (ZIPPEL *et al.*, 2010; GESCHER *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2014).

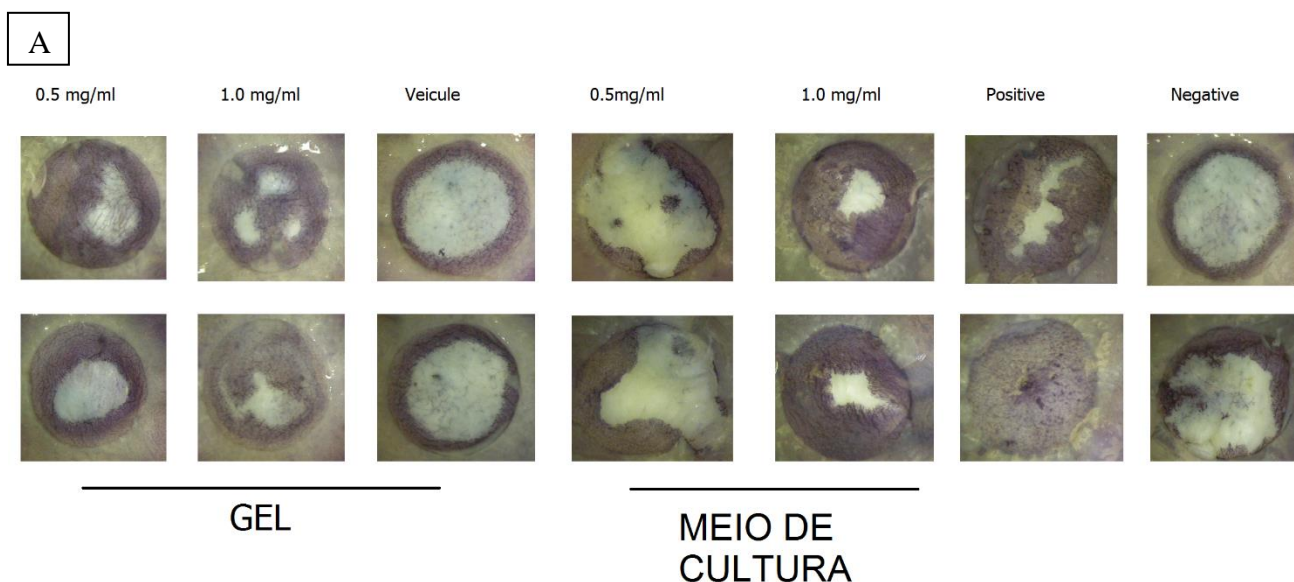
5.8.4 Modelo 3D de equivalentes de pele humana “*in vitro*”

Diante dos resultados obtidos com os géis formulados com o polissacarídeo de CcII, em que este apresentou uma atividade cicatrizante em modelos de feridas induzidas em camundongos, CcII foi avaliada quanto a seu potencial cicatrizante em um modelo 3D de equivalentes de pele humana *in vitro*.

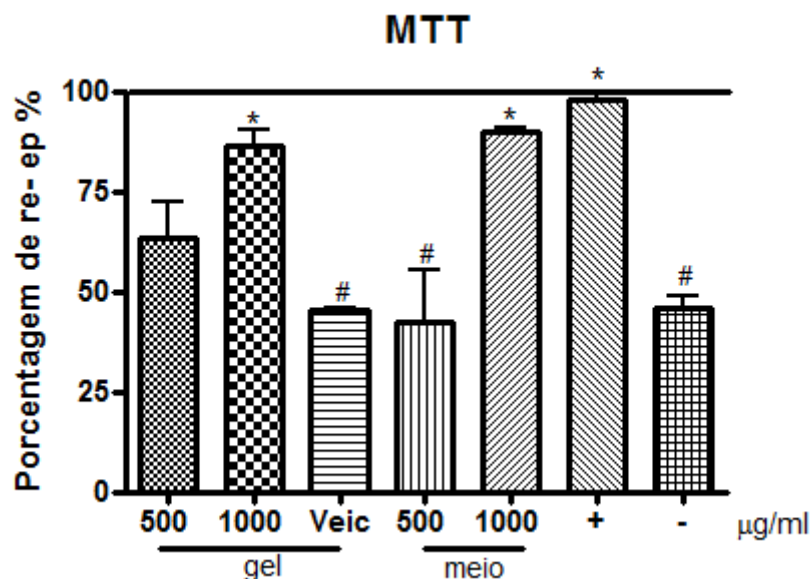
5.8.4.1 Avaliação da re-epitelização no ensaio do MTT

O polissacarídeo de CcII foi testado de duas formas neste experimento: em forma de gel e diluído no meio de cultura. Observando a Figura 36 A e B, o polissacarídeo de CcII na dose de 1000 $\mu\text{g/ml}$ tanto na forma de gel ($86,57 \pm 3,60$) como diluído no meio de cultura ($90,91 \pm 1,16$) não diferiram estatisticamente do controle positivo ($98,00 \pm 1,86$). O polissacarídeo de CcII na dose de 500 $\mu\text{g/ml}$ apresentou um resultado diferente para as duas formas utilizadas neste experimento e, quando este foi utilizado na forma de gel ($63,54 \pm 8,74$) não apresentou diferenças estatísticas em relação aos controles positivo ($98,00 \pm 1,86$) e negativo ($45,67 \pm 3,30$). Entretanto, quando foi utilizado diluído no meio de cultura ($42,15 \pm 13,08$) apresentou diferença estatística em relação ao controle positivo ($98,00 \pm 1,86$). O grupo experimental utilizando apenas o gel (Carbopol) sem CcII ($45,21 \pm 0,69$) não apresentou diferença estatística em relação ao controle negativo ($45,67 \pm 3,30$), como esperado.

Figura 36 – Avaliação da citotoxicidade no ensaio do MTT. (A) Imagem dos EPHs corados no ensaio do MTT, onde a área corada de cor roxa é utilizada para analisar a porcentagem de re-epitelização. (B) Gráfico com a porcentagem de re-epitelização (re-ep).



B



As barras representam a média \pm E.P.M. da porcentagem de re-epitelização %. * indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) do controle negativo. # indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) do controle positivo (ANOVA; Bonferroni).

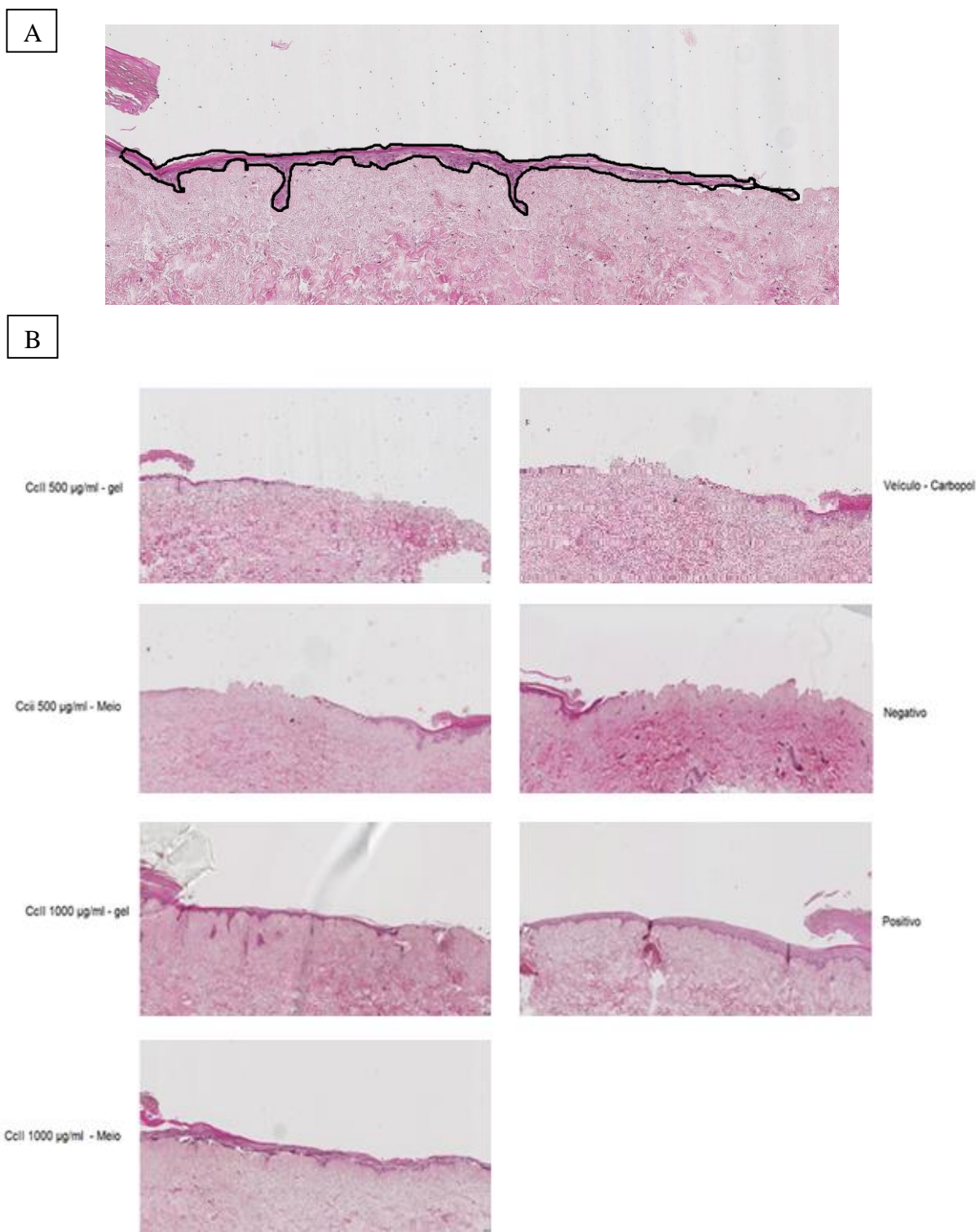
Dessa maneira o polissacarídeo de CcII na dose de 1000 $\mu\text{g/ml}$ tanto na forma de gel como diluído no meio de cultura acelerou o processo de re-epitelização não apresentando diferenças significativas em relação ao controle positivo. É importante salientar que este ensaio analisa também a viabilidade celular sendo esta igual ao percentual de re-epitelização.

5.8.4.2 Análises histológica: medida da área de re-epitelização e migração lateral dos queratinócitos

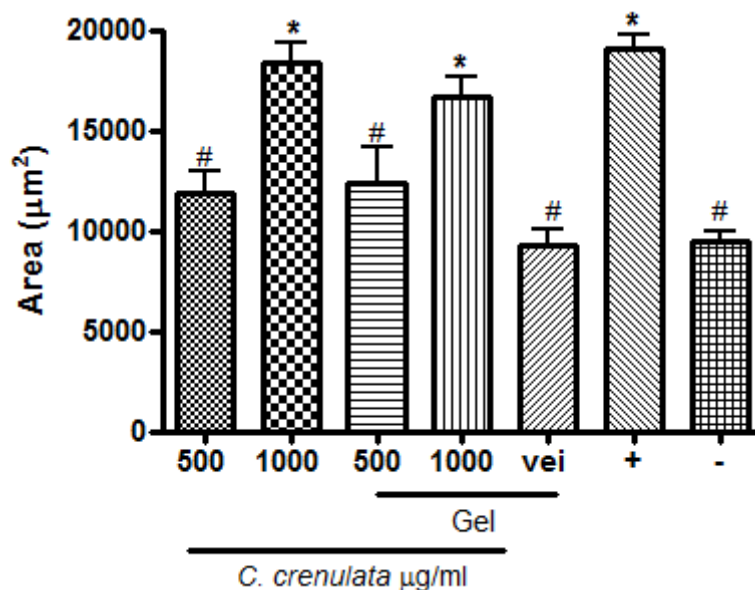
As análises histológicas foram realizadas para comprovar o efeito de CcII na re-epitelização dos EPHs. Na Figura 37 A podemos observar as fotomicrografias dos cortes histológicos, onde é possível identificar visualmente o potencial de re-epitelização de CcII na dose de 1000 $\mu\text{g/ml}$, tanto na forma de gel, como diluído no meio de cultura. Na Figura 37 B, temos a explanação da delimitação da área de re-epitelização, onde esta foi utilizada para calcular a área em μm^2 com auxílio do *Software ImageJ*. De acordo com a Figura 37 C, o polissacarídeo de CcII na dose de 1000 $\mu\text{g/ml}$ tanto na forma de gel (16.624 ± 1.084) como diluído no meio de cultura ($18.403 \pm 966,0$) não diferiram estatisticamente do controle positivo ($19.093 \pm 640,0$) mas diferiram do controle negativo ($7.616 \pm 494,1$). Enquanto que na dose de 500 $\mu\text{g/ml}$ o polissacarídeo de CcII tanto na forma de gel (12.342 ± 1.795) como diluído no meio de cultura (11.914 ± 1.083) não diferiram estatisticamente do controle negativo mas

diferiram do controle positivo. O grupo experimental utilizando apenas o gel (Carbopol) sem CcII ($9233 \pm 830,0$) não apresentou diferença estatística em relação ao controle negativo ($8,33 \pm 3,38$), como esperado.

Figura 37 - Análises histológica: medida da área de re-epitelização e migração lateral dos queratinócitos. (A) fotomicrografias dos cortes histológicos, escala de 100 μm . (B) delimitação da área de re-epitelização, escala de 100 μm . (C) Gráfico da porcentagem da área de re-epitelização (μm^2).



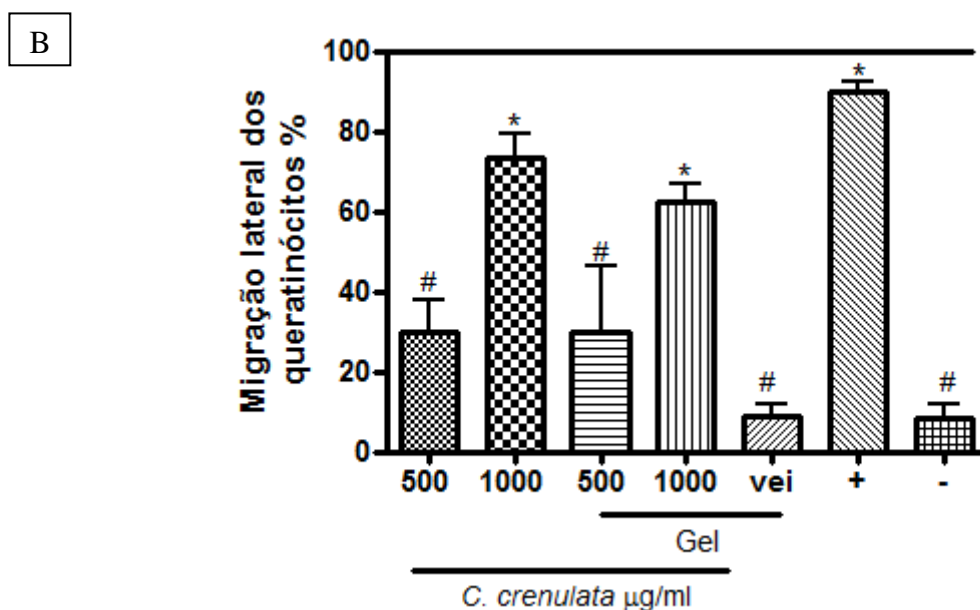
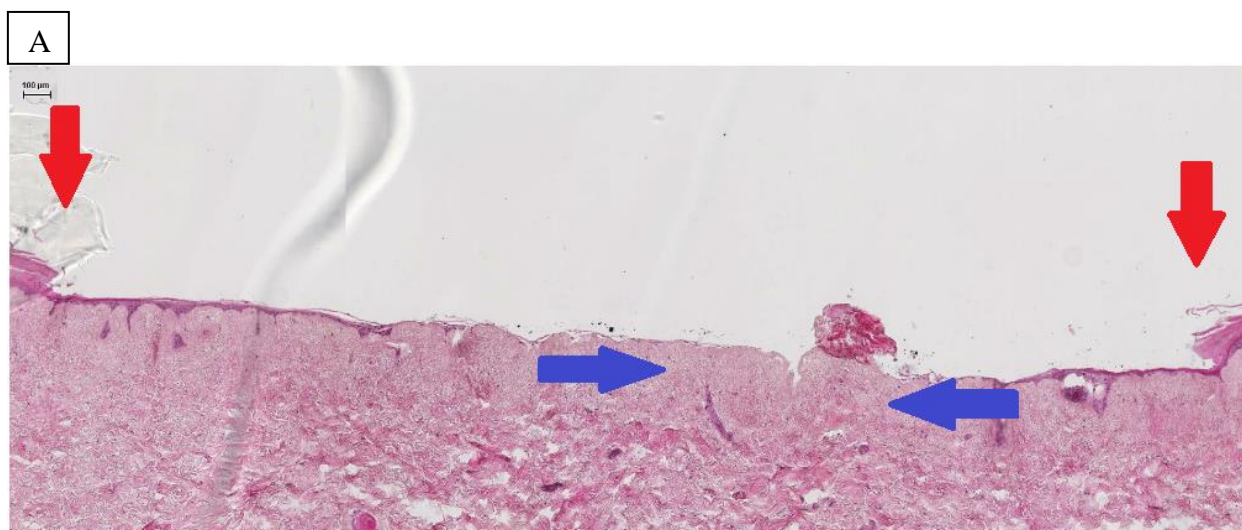
C



As barras representam a média \pm E.P.M. da porcentagem da área de re-epitelização (μm^2). * indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) do controle negativo. # indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) do controle positivo (ANOVA; Bonferroni).

O percentual de migração lateral das células foi avaliado de acordo com as análises histológicas onde através das imagens foi calculado a distância na qual os queratinócitos migraram lateralmente (Figura 37). O polissacarídeo de CcII na dose de 1000 $\mu\text{g/ml}$ tanto na forma de gel ($62,29 \pm 4,56$) como diluído no meio de cultura ($73,33 \pm 6,09$) não diferiram estatisticamente do controle positivo ($90,00 \pm 2,51$) mas diferiram do controle negativo ($8,33 \pm 3,38$). Enquanto que na dose de 500 $\mu\text{g/ml}$ o polissacarídeo de CcII tanto na forma de gel ($30,07 \pm 16,04$) como diluído no meio de cultura ($30,00 \pm 7,63$) não diferiram estatisticamente do controle negativo mas diferiram do controle positivo. O grupo experimental utilizando apenas o gel (Carbopol) sem CcII ($8,66 \pm 3,48$) não apresentou diferença estatística em relação ao controle negativo ($8,33 \pm 3,38$), como esperado (Figura 38).

Figura 38 – Avaliação do percentual de migração lateral dos queratinócitos. (A) fotomicrografia utilizada para o cálculo da porcentagem de migração lateral das células, as setas vermelhas representam as margens da ferida e as setas azuis representam a direção da migração dos queratinócitos. Escala de 100 μ m. (B) Gráfico com a porcentagem de migração lateral dos queratinócitos.



As barras representam a média \pm E.P.M. da porcentagem de migração lateral dos queratinócitos %. * indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) do controle negativo. # indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) do controle positivo (ANOVA; Bonferroni).

Assim, diante dos resultados obtidos no ensaio do MTT e das análises histológicas, podemos concluir que o polissacarídeo da CcII na dose de 1000 μ g/ml tanto na forma de gel, como diluído no meio de cultura apresentou um efeito cicatrizante no modelo 3D de equivalentes de pele humana *in vitro*, acelerando o processo de re-epitelização.

O modelo 3D de equivalentes de pele humana reproduz muitas características morfológicas da pele humana em condições definidas. Além disso o modelo 2D (cultura de

células) tem demonstrado ser pobre preditores de respostas *in vivo*. (SUN *et al.*, 2006). Dessa forma, podemos explicar, em partes, o fato de CcII não ter obtido resultado positivo no ensaio de proliferação de células em um modelo 2D de cultura celular.

Na literatura também não se tem relatos de polissacarídeos sulfatados, de algas ou não, apresentarem efeito cicatrizante em modelos 3D de equivalentes de pele humana, sendo este o primeiro relato.

6 CONCLUSÃO

Os polissacarídeos sulfatados das algas marinhas *Caulerpa racemosa*, *Cryptonemia crenulata* e *Gracilaria birdiae*, foram obtidos através de cromatografia de troca iônica em gel de DEAE-celulose mostraram-se atóxicos e sem efeitos ao SNC e não apresentaram potencial pro-coagulante e antibacteriano. Os géis formulados com CrII, CcII e GbI não foram irritantes, e apenas o gel de CcII apresentou efeito cicatrizante em um modelo de feridas induzidas em camundongos, sendo este confirmado através das análises histológicas. CcII, tanto na forma de gel como diluído no meio de cultura, também demonstrou potencial de cicatrização através da aceleração do processo de re-epitelização e migração lateral de queratinócitos, não apresentando citotoxicidade em modelos utilizando células humanas e pele equivalente de humanos *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ABELAIRA, H. M.; RÉUS, G. Z.; QUEVEDO, J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, vol.35 supl.2 São Paulo, 2013.
- ALEXANDRE, R. F. A.; GARCIA, F. N.; SIMÕES, C. M. O. Fitoterapia baseada em evidências. Parte 1. Medicamentos fitoterápicos elaborados com ginkgo, hipérico, kava e valeriana. **Acta Farma Bonaerense**, v. 24, p. 300-309, 2005a.
- ALEXANDRE, R. F. A.; GARCIA, F. N.; SIMÕES, C. M. O. Fitoterapia baseada em evidências. Parte 2. Medicamentos fitoterápicos elaborados com alcachofra, castanha-da-índia, ginseng e maracujá. **Acta Farma Bonaerense** v. 24, p. 300-309, 2005b.
- AL-KHAMIS, A.; MCCALLUM, I.; KING, P. M.; BRUCE, J. Healing by primary versus secondary intention after surgical treatment for pilonidal sinus (Review). **The Cochrane Collaboration**. Published by JohnWiley & Sons, Ltd. 2011.
- OLIVEIRA, A. G. L.; SILVA, R. S.; ALVES, E. N.; PRESGRAVE, R. F.; PRESGRAVE, O. A. F.; DELGADO, I. F. Chorioallantoic membrane assays (HET-CAM and CAM-TBS): alternative tests for performing toxicological evaluation of products with low potential for ocular irritation. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** (Impr.) vol.71 no.1 São Paulo 2012.
- AMMAR, I. BARDAA, S.; MZID, M.; SAHNOUN, Z.; REBAII, T.; ATTIA, H.; ENNOURI, M. Antioxidant, antibacterial and in vivo dermal wound healing effects of *Opuntia* flower extracts. **International Journal of Biological Macromolecules**. p. 483-490, 2015.
- ANDERSON, L. O.; BARROWCLIFFE, T. W.; HOLMER, E.; JOHNSON, E. A.; SIMS, G. F. C. Anticoagulant properties of heparin fractionated by affinity chromatography on matrix-bound antithrombin-3 and by gel-filtration. **Thromb. Res.**, v. 9, p. 575-580, 1976.
- FERNÁNDEZ-FERREIRO, A.; BARCIA, M. G.; GIL-MARTÍNEZ, M.; VIEITES-PRADO, A.; LEMAD, I.; ARGIBAY, B.; MÉNDEZ, J. B.; LAMAS, M. J.; OTERO-ESPINAR, F. J. In vitro and *in vivo* ocular safety and eye surface permanence determination by direct and Magnetic Resonance Imaging of ion-sensitive hydrogels based on gellan gum and kappa-carrageenan. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. Volume 94, Pages 342–351, 2015.
- ARAKAWA, O.; IKEDA, T. Apomorphine effect on single and paired rat open-field behavior. **Physiol. Behav.**, v. 50, p. 189-194, 1991.
- ARCHER, J. – Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behavior** v. 21, n.2, p. 205-35. 1973.
- ARROYO, A.G.; IRUELA-ARISPEM, A. Extracellular matrix, inflammation and the angiogenic response. **Cardiovascular Research**, v. 86(2), p. 226-235, 2010.
- ATALA, A.; LANZA, R. P. **Methods of Tissue Engineering**. Londres: Academic Press, Elsevier, 2002.

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

BANKS, W. **Histologia veterinária aplicada**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1992, 629p.

BARAHONA, T.; ENCINASA, M. V.; IMARAIB, M.; MANSILLAC, A.; MATSUHIROA, B.; TORRESA, R.; VALENZUELA, B. Bioactive polysaccharides from marine algae. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**. V. 4, Issue 2, P. 125–138, 2014.

BARBOSA, P.R.; VALVASSORI, S.S.; BORDIGNON JR, C. L.; KAPPEL, V. D.; MARTINS, M. R.; GAVIOLI, E. C.; QUEVEDO, J.; REGINATTO, F. H. The Aqueous extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* reduce anxiety-related behaviors without affecting memory process in rats. **J. Med. Food**, V. 11, n. 2, P. 282-288, 2008.

BARROS, S. B. M; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2.ed., p. 57-68, 2003

BARRY, A. L.; THORNSBERRY, C. SUSCEPTIBILITY TESTS: DIFFUSION TEST PROCEDURES. IN: BALOWS, A.; HAUSER, W. J.; HERMANN, K. L.; ISENBERG, H. D.; SHAMODY, H. J. 1991. **Manual of clinical microbiology**. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1117-1125, 1991.

BAUER, A. W., KIRBY, W. M. M., SHERRIS, J. C. & TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am J Clin Pathol**, v.45, 493-496, 1966.

BAUM, C.L.; ARPEY, C.J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatologic Surgery**, v.31, p.674-686, 2005.

BEAR, M.; CONNORS, B.; PARADISO, M. Neurociências: desvendando o Sistema nervoso. 3 ed. Porto Alegre: **Artmed**, 857 p. 2008.

BEHM, B.; BABILAS, P.; LANDTHALER, M.; SCHREML, S. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 26, p. 812-820, 2012.

BERTEAU, O.; MULLOY, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. **Glycobiology**, v. 13, n. 6, p. 29R-40R, 2003

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

BLANES, L. **Tratamento de feridas**. In: BAPTISTA-SILVA, J. C. C. (Ed.). Cirurgia vascular: guia ilustrado. São Paulo, 2004.

BONNET, C.S.; WALSH, D.A. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. **Rheumatology**, v. 44(1), p. 7-16, 2005.

BRADSHAW, A.D.; REED, M.J.; CARBON, J.G.; PINNEY, E.; BREKKEN, R.A.; SAGE, H. Increased fibrovascular invasion of subcutaneous polyvinyl alcohol sponges in SPARC-null mice. **Wound Repair and Regeneration**, v.9(6), p.522-530, 2001.

CHIARI, B. G.; MAGNANI, C.; SALGADO, H. R. N.; CORRÊA, M. A.; BORGES, V. L. Estudo da segurança de cosméticos: presente e futuro. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 33(3), p. 323-330, 2012.

BURLANDO, B.; PARODI, A.; VOLANTE, A.; BASSI, A. M. Comparison of the irritation potentials of *Boswellia serrata* gum resin and of acetyl-11-keto- β -boswellic acid by in vitro cytotoxicity tests on human skin-derived cell lines. **Toxicology Letters**, Volume 177, Issue 2, 15, p.144–149, 2008.

BURD, A. E HUANG, L. **Carbohydrate Chemistry, Biology and Medical Applications**. Elsevier Ltd., Chapter 11 - Carbohydrates and Cutaneous Wound Healing, p. 253-274, 2008.

CARDOZO, F. T.; CAMELINI, C. M.; MASCARELLO, A.; ROSSI, M. J.; NUNES, R. J.; BARARDI, C. R.; DE-MENDONÇA, M. M.; SIMÕES, C. M. Antiherpetic activity of a sulfated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* mycelia. **Antiviral Res.** V. 92(1) p. 108-14, 2011.

CARDOZO, K. H. M., GUARATINI, T., BARROS, M. P., FALCÃO, V. R., TONON, A.P., LOPES, N. P., CAMPOS, S., TORRES, M. A., SOUZA, A. O., COLEPICOLO., PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 146, p. 60-78, 2007.

CARVALHO, P. T. C. **Análise da Cicatrização de Lesões Cutâneas Através de Espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos**. São Carlos- SP, 2002.

CHAKRABARTY, K. H.; DAWSON, R. A.; HARRIS, P.; LAYTON, C.; BABU, M.; GOULD, L. Development of autologous human dermal-epidermal composites based on sterilized human allodermis for clinical use. **Br J Dermatol** 141: 811–23, 1999.

CHAN, S.W.; MIRHOSSEINI, K.; TAIP, F.S.; LING, T.C.; TAN, C.P. Comparative study on the physicochemical properties of κ -carrageenan extracted from *Kappaphycus alvarezii* (doty) doty ex Silva in Tawau, Sabah, Malaysia and commercial κ -carrageenans. **Food Hydrocolloids**. v. 30, p. 581–588, 2013.

CHANDIKA, P.; KO, S. C.; OH, G. W.; HEO, S. Y.; NGUYEN, V. T.; JEON, Y. J.; LEE, B.; JANG, C. H.; KIM, G.; PARK, W. S.; CHANG, W.; CHOI, I. W.; JUNG, W. K. Fish collagen/alginate/chitooligosaccharides integrated scaffold for skin tissue regeneration application. **Int J Biol Macromol.**, v. 81, p. 504-13, 2015.

CHEN, Y.; ZHAO, B.; HUANG, X.; ZHAN, J.; ZHAO, Y.; ZHOU, M.; GUO, L. Purification and neuroprotective effects of polysaccharides from *Opuntia Milpa Alta* in cultured cortical neurons. **Int J Biol Macromol.**, v. 1;49(4) p. 681-7, 2011.

CHERMAT, R.; THIERRY, B.; MICO, J.A.; STÉRU, L.; SIMON, P. Adaptation of the tail suspension test to the rat. **Journal de Pharmacologie**, v. 17 (3), p. 348-350, 1986.

- CLARK, G.; KOSTER, A. G.; PERSON, D. W. **Psychopharmacology**, v. 20, p. 169-171, 1971
- COSTA, L. S., FIDELIS, G. P., CORDEIRO, S. L., OLIVEIRA, R. M., SABRY, D. A., CAMARA, R. B. G. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 64, p. 21–28, 2010.
- COURA, C. O.; DE ARAÚJO, I. W. F.; VANDERLEI, E. S. O.; RODRIGUES, J. A. G.; QUINDERÉ, A. L.; FONTES, B. P.; QUEIROZ, I. N. L.; MENEZES, D. B.; BEZERRA, M. M.; SILVA, A. A. R.; CHAVES, H. V.; JORGE, R. J. B.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of sulfated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 2011.
- COURVOISIER, H; MOISAN, M.P; SARRIEAU, A; HENDLEY, E.D; MORMÈDE, P. Behavioral and neuroendocrine reactivity to stress in the WKHA/WKY inbred rat strains: a multifactorial and genetic analysis. **Brain Research**, v. 743, n. 1-2, p. 77-85, 1996.
- CRAWLEY, J. N. Exploratory behavior models of anxiety in mice. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 9, p. 37-44, 1985.
- CRYAN JF; MARKOU A; LUCKI I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23(5), p. 338-245. 2002.
- DANTAS-SANTOS, N.; GOMES, D. L.; COSTA, L. S.; CORDEIRO, S. L.; COSTA, M. S.; TRINDADE, E. S.; FRANCO, C. R.; SCORTECCI, K. C.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. Freshwater plants synthesize sulfated polysaccharides: heterogalactans from Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **Int J Mol Sci.**, v. 13(1), p. 961-76, 2012.
- DAWSON, R. A.; UPTON, Z.; MALDA, J.; HARKIN, D. G. Preparation of cultured skin for transplantation using insulin-like growth factor I in conjunction with insulin-like growth factor binding protein 5, epidermal growth factor, and vitronectin. **Transplantation**, v. 81, p. 1668–76, 2006.
- DAY, J.G. et al. In vitro cultura and conservation of microalga: applications for aquaculture, biotechnology and environmental research. **In vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, v.35, p.127-136, 1999.
- DETERS, A.; DAUER, A.; SCHNETZ, E.; FARTASCH, M.; HENSEL, A. High molecular compounds (polysaccharides and proanthocyanidins) from *Hamamelis virginiana* bark: influence on human skin keratinocyte proliferation and differentiation and influence on irritated skin. **Phytochemistry**, v. 58, p. 949–958, 2001.
- DETERS, A.; ZIPPEL, J.; HELLENBRAND, N.; PAPPAL, D.; POSSEMEYER, C.; HENSEL, A. Aqueous extracts and polysaccharides from Marshmallow roots (*Althea officinalis* L.): Cellular internalisation and stimulation of cell physiology of human epithelial cells in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 62–69, 2010.
- DIALLO, D.; PAULSEN, B.S.; LILJEBÄCK, T.H.A Polysaccharides from the roots of *Entada africana* Guill. et Perr., Mimosaceae, with complement fixing activity Terje E. Michaelsen. **Journal of Ethnopharmacology** v,74, p. 159–171, 2001.

DORE, C.M.P.G.; ALVES, M.G.C.F.; WILL, L.S.E.P.; COSTA, T.G.; SABRY, D.A.; RÊGO, L.A.R.S.; ACCARDO, C.M.; ROCHA, H.A.O.; FILGUEIRA, L.G.A.; LEITE, E.L. A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. **Carbohydrate Polymers**, v.91, p. 467–475, 2013.

ENOCH, S. e LEAPER, D.J. Basic science of wound healing. **Elsevier Ltd.** Basic Science, surgery 26:02, 2007.

FARIAS, W.R. *et al.* Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 275, p. 29299-29307, 2000.

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

FERNANDEZ-TERUEL, A.; ESCORIHUEL, R. M.; NUNEZ, J. F.; GOMA, M.; DRISCOLL, P.; TOBEN, A. A. Early stimulation effects on novelty-induced behavior in two psychogenetically-selected rat lines with divergent emotionality profiles. **Neurosci Lett.**, v. 137, p. 185–8, 1992

FILE, E. S.; PELLOW, S. The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the holeboard. **Br. J. Pharmac.**, v. 86, p. 729-735, 1985.

FONSECA, R. J. C.; OLIVEIRA, S. N.M. C. G.; MELO, F. R.; PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B; MOURAO, P. A. S. Slight differences in sulfatation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 99, p. 5390-545, 2008.

GESCHER, K; DETERS, A. M. *Typha latifolia* L. fruit polysaccharides induce the differentiation and stimulate the proliferation of human keratinocytes in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 352–358, 2011.

GHADIRYANFAR, M.; ROSENTRATER, K. A.; KEYHANI, A.; OMID, M. A review of macroalgae production, with potential applications in biofuels and bioenergy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 54, p. 473–481, 2016.

GLAUSER, B. F.; REZENDE, R. M.; MELO, F. R.; PEREIRA, M. S.; FRANCISCHETTI, I. M. B.; MONTEIRO, R. Q.; REZAIE, A. R.; MOURAO, P. A. S. Anticoagulant activity of a sulfated galactan: serpin-independent effect specific interaction with factor Xa. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 102, p. 1183-1193, 2009.

GRICE A. ELIZABETH., KONG H. HEIDI., RENAUD. GABRIEL., YOUNG C. ALICE., BOUFFARD G. GERARD., BLAKESLEY W. ROBERT., WOLFSBERG G. TYRA., TURNER L. MARIA & SEGRE A. JULIA. A diversity profile of the human skin microbiota. **Genome Research** 18: 1043 a 1050, 2008.

GUNIN, A. **Atlas of histological images**. <http://www.histol.chuvashia.com/tablen/000-en.htm>. Acessado em dezembro de 2015.

HALLER J, MANO A. Current animal models of anxiety, anxiety disorders, and anxiolytic drugs. **Curr Opin Psychiatry**, v. 25, p. 59-64, 2011.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of “fear” motivated behavior. **Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, v. 327 (1), p. 1-5, 1984.

HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 2, p. 53-58, 2007.

HAYES, A. W. Principles and Methods of Toxicology; fourth edition; **Massachusetts**; 2001

HEDLUND, C. S. Cirurgia do sistema Tegumentar. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2005. P. 135-230.

HÉDOU, G., PRICE, C., Di IORIO, L., HEIDBREDER, C. A., FELDON, J. An automated analysis of rat behavior in the forced swim test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 70, p. 65-76; 2001.

HUANG, Y.; JIANG, C.; HU, Y.; ZHAO, X.; SHI, C.; YU, Y.; LIU, C.; TAO, Y.; PAN, H.; FENG, Y.; LIU, J.; WU, Y.; WANG, D. Immunoenhancement effect of rehmannia glutinosa polysaccharide on lymphocyte proliferation and dendritic cell. **Carbohydr Polym**, v. 25, p. 516-21, 2013.

HYDE, C.; HOLLIER, B.; ANDERSON, A.; HARKIN, D.; UPTON, Z. Insulin-like growth factors (IGF) and IGF-binding proteins bound to vitronectin enhance keratinocyte protein synthesis and migration. **J Invest Dermatol.**, v. 122, p. 1198–206, 2004.

JETTANACHEAWCHANKIT, S.; SASITHANASATE, S.; SANGVANICH, P.; BANLUNARA, W. e THUNYAKITPISAL, P. Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 109, n. 4, p. 525-531. 2009

JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H. S. Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. **Marine Drugs**, v. 9, p. 196-223, 2011.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 11a ed., Rio de Janeiro: **Guanabara-Koogan**, 528p., 2008.

KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **Eur J Dermatol**, Vol. 12, n. 4, p. 390-401, Jul/Aug., 2002.

KNUTSEN, S. H.; MYSLABODSKY, D. E.; LARSEN, B.; USOV, A. I. A modified system of nomenclature for red algal galactans. **Bot. Mar.**, v. 37, p. 163-169, 1994.

LI, N.; MAO, W.; YAN, M.; LIU, X.; XIA, Z.; WANG, S.; XIAO, B.; CHEN, C.; ZHANG, L.; CAO, S. Structural characterization and anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from the green alga *Codium divaricatum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 121, p. 175–182, 2015.

LIMA, A.P. **Dissertação** (Mestrado em Biopatologia) *Análise Bioquímica e Histológica da toxicidade do *Symphytum officinale* fitoterápico e homeopático em fígado e rins de ratos*. Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, São José dos Campos, 2009

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 29, p. 180-185, 1987

LUO, D.; ZHANG, Q.; WANG, H.; CUI, Y.; SUN, Z.; YANG, J.; ZHENG, Y.; JIA, J.; YU, F.; WANG, X. Fucoïdan protects against dopaminergic neuron death in vivo and in vitro. **Euro. J. Pharmacol.**, v. 617, p. 33-40, 2009.

MABEAU, S.; CAVALOC, E.; FLEURENCE, J.; LA HAYE, M. New seaweed based ingredient for the food industry. **International Food Ingredient**, v. 3, p. 38 - 44, 1992.

MACARTAIN, P.; Gill, C. I. R.; Brooks, M.; Campbell, R.; Rowland, I. R. Nutritional Value of Edible Seaweeds. **Nutrition Reviews**, v. 65, n. 12, p. 535–543, 2007.

MACIEL, J.S. *et al.* Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharides from red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Carbohydrate Polymers**, v.71, n.4, p.559-565, 2008.

MAGOULASA, G. E.; KOSTOPOULOU, O. N.; GARNELISA, T.; ATHANASSOPOULOSA, C. M.; KOURNOUTOU, G. G.; LEOTSINIDIS, M.; DINOS, G. P.; PAPAIOANNOU, G. KALPAXIS, D. L. Synthesis and antimicrobial activity of chloramphenicol–polyamine conjugates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, Issue 13, p. 3163–3174, 2015.

MAJERUS, P. W.; TOLLEFSEN, D. M. Em Goodman & Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica; Gilman, A. G.; Hardman, J. G.; Limbird, L. E., eds.; **McGraw-Hill**: Rio de Janeiro, 10ª ed., 2007, cap. 55.

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

MANN, K. G.; BRUMMEL-ZIEDINS, K.; ORFEO, T.; BUTENAS, S. Models of blood coagulation. **Blood Cells Mol Dis.**, v. 36, p. 108, 2011.

MARTIN, P.; LEIBOVICH, S. J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends Cell Biol.** 2005;15:599-607

MATTO, V; ALLIKMETS, L. Acute and chronic citalopram treatment differently modulates rat exploratory behavior in the exploration box test: no evidence for increased anxiety or changes in the [3H]raclopride binding. **Pharmacology**, v. 58, n. 2, p. 59-69. 1999.

MAYER, A. M. S.; RODRÍGUEZ, A. D.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O.; FUSETANI, N. 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. **Mar Drugs**. V. 11(7), p. 2510–2573, 2013.

MCGOVERN, J. A. Investigating epidermogenesis in a human skin equivalent model. Faculty of Health, 2012, p. 314, **Tese**. School of Biomedical Science, Queensland University of Technology, Brisbane, Austrália.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.

MERCER, P. F.; CHAMBERS, R. C. Coagulation and coagulation signalling in fibrosis. **Biochim Biophys Acta**. v. 1832(7), p. 1018-27, 2013.

MILHAM, C. N.; TORNESI, M. B.; PALASZ, A. T.; ARCHER, J. Effect of donor bovine serum fractionation on preimplantation mouse embryos in culture. **Theriogenology, Stoneham**, v. 41, p. 241-257, 1994

MIRZA, R., KOH, T. J. Dysregulation of monocyte/macrophage phenotype in wounds of diabetic mice. **Cytokine**; v. 56, p. 256-264. 2011.

MONTEIRO, V. S.; TELES, F. B.; COURA, C. O.; SOUZA, R. B.; LIMA, C. N. C.; COSTA, D. V. S.; JUNIOR, E. R. H.; ESCUDEIRO, S. S.; CHAVES, E. M. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; BENEVIDES, N. M. B. Involvement of the GABAergic system in the anxiolytic effect of sulfated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **J Appl Phycol**. DOI 10.1007/s10811-015-0724-0, 2015.

MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 48, p. 254-260, 1955.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for growth and survival – application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOURAO, P. A. A carbohydrate-based mechanism of species recognition in sea urchin fertilization. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, pp. 5–17, 2007.

MOURAO, P. A. S.; PEREIRA, M. S. Searching for alternatives for to heparin: Sulfated fucans from marine invertebrates. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 9, pp. 225–232, 1999.

MURPHY, K. E.; HALL, C. L.; MCCUE, S. W.; McELWINS, D. L. S (2011). A two-compartment mechanochemical model of the roles of transforming growth factor α and tissue tension in dermal wound healing. **Journal of Theoretical Biology**, v. 272, p. 145-159, 2011.

NA, Y. S. *et al.* Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens*. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 364–370, 2010.

NAYAK, B. S.; SANDIFOR, S.; MAXWELL, A. Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda cetrifolia* L. Leaf. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6(3), p. 351-356, 2009.

O'SULLIVAN, L.; MURPHY, B.; MCLOUGHLIN, P.; DUGGAN, P.; LAWLOR, P. G.; HUGHES, H.; GARDINER, G. E. Prebiotics from Marine Macroalgae for Human and Animal Health Applications. **Mar Drugs**. v. 8(7), p. 2038–2064, 2010.

OKAMOTOA, Y.; YANO, R.; MIYATAKEA, K.; TOMOHIROB, I.; SHIGEMASAC, I.; MINAMI, S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, p. 337–342, 2003.

ORTIZ, J.; UQUICHE, E.; ROBERTI P.; ROMERO, N.; QUITRAL, V.; LLANTEN, C. Functional and nutritional value of the Chilean seaweeds *Codium fragile*, *Gracilaria chilensis* and *Macrocystis pyrifera*. **European Journal of Lipid Science and Technology**. v. 110, 2009.

PAINTER, T.J. Algal polysaccharides. **In: The polysaccharides**. New York: Academic Press, 1983.

PATHER, N.; VILJOENB, A. M.; KRAMER, B. A biochemical comparison of the in vivo effects of *Bulbine frutescens* and *Bulbine natalensis* on cutaneous wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, pp. 364–370, 2011.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PERCIVAL, E.; McDOWELL, R. H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. **Academic Press**, New York, 1967.

PERDIGUERO, E., SOUSA-VICTOR, P., RUIZ-BONILLA, V., JARDÍ, M., CAELLES, C., SERRANO, A. L., MUÑOZ-CÁNOVES, P. p38/MKP-1-regulated AKT coordinates macrophage transitions and resolution of inflammation during tissue repair. **J Cell Biol**; v. 195, p. 307e322, 2011.

PITA, J.C.R.L. Dissertação (**Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**). Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do Trachylobano-360 de *Xylopija langsdorffiana*. Universidade Federal da Paraíba, 2011.

PORSOLT, R. D.; ANTON, N. B.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v. 229, p. 327-336, 1987.

PORSOLT, R.D.; LePICHNON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatment. **Nature**, v. 277, p. 730-732, 1977.

PORSOLT, RD; ANTON G; BLAVET N; JALFRE M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, p. 379-391. 1978.

QUERLEUX, B.; BALDEWECK, T.; DIRIDOLLOU, S.; DE RIGAL, J.; HUGUET, E.; LEROY, F.; HOLLOWAY BARBOSA, V. Skin from various ethnic origins and aging: an in vivo cross-sectional multimodality imaging study. **Skin Res Technol.**, v. 15, n. 3, p. 306-13, Aug., 2009.

RAMSEY M.W, GOODFELLOW J, JONES C.J.H, LUDDINGTON, L.A., LEWIS, M.J., HENDERSON, A.H. Endothelial control of arterial distensibility is impaired in chronic heart failure. **Circulation**, v. 92, p. 3212-9, 1995

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E. *Biologia vegetal*. 7ª ed., **Guanabara Koogan** S.A., Rio de Janeiro, 906 pp., 2007.

REX, A., STEPHENS, D. N.; FINK, H. “ANXIOLYTIC” action of diazepam and abecarnil in a modified open field test. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 53, p. 1005-1012, 1996.

RHEINWALD, J. G.; GREEN, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. **Cell**, v. 6, p. 331–43, 1975.

RIBEIRO, N. A Efeito do polissacarídeo sulfatado da alga marinha vermelha *cryptonemia crenulata* (halymeniaceae) no processo inflamatório agudo. **Monografia**, Centro de Ciências, Ciências biológicas, Universidade federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, 2009.

RIBEIRO, N. A.; ABREU, T. M.; CHAVES, H. V.; BEZERRA, M. M.; MONTEIRO, H. S.; JORGE, R. J.; BENEVIDES, N .M. B. Sulfated polysaccharides isolated from the green seaweed *Caulerpa racemosa* plays antinociceptive and anti-inflammatory activities in a way dependent on HO-1 pathway activation. **Inflamm Res.**, v. 63(7), p. 569-80, 2014

RODERO, M. P.; KHOSROTEHRANI, K. Skin wound healing modulation by macrophages. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v.3(7), p. 643-653, 2010.

RODRIGUIEZ, A.E. I.; BROITMEAN, S. T.; FOSCOLO, M. R. Effects of the chronic ingestion os chlorimipramine and desipramine on the hole-board response to acute stress in male rats. **Pharmacology biochemistry and behavior**, v. 26, p. 201-207, 1987.

ROSENBERG, R. D.; AIRD, W. C. Vascular bed specific hemostasis and hypercoagulable states. **N Engl J Med.**, v. 340, p. 1555-64, 1999.

SANTORO, M. M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Experimental Cellular Research**, v.304, v.274- 86, 2005.

SCHIRATO, G. V., MONTEIRO, F. M. F., SILVA, F. O., FILHO, J. L. L., LEÃO, A. M. A. C., PORTO, A. L. F. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciência Rural**, v. 36, p. 149-154, 2006.

SCHULTZ. G.; SIBBALD, G.; FALANGA, V. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. **Wound Repair Regen.** v. 11, p. 1–28, 2003.

SENEL, S.; McCLURE, S.J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 1467–1480, 2004.

SEPHEL, G.C.; WOODWARD, S.C. Reparação, regeneração e fibrose. In: RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. Rubin, **Patologia: bases clinico patológicas da medicina**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.89-120.

SHAH, J.M.Y.; OMAR, E.; PAI, D.R.; SOOD, S. Cellular events and biomarkers of wound healing. **Indian J Plast Surg.**, v. 45(2), p. 220–228, 2012.

SILVA, L. C. C. P.; CHUMBINHO, L. C.; PIZZINI, C. C.; BATISTA, W. S.; OLIVEIRA, F. S.; OLIVEIRA, G. M. O uso de animais de laboratório como modelos experimentais para o estudo de transtornos psiquiátricos. **Rescal**, São Paulo, v.1 n.3, p. 270-278, 2012.

SIQUEIRA, R.C.L. *et al.* *In vivo* anti-inflammatory effect of a sulfated polysaccharide isolated from the marine brown algae *Lobophora variegata*. **Pharm. Biol.**, v. 49, p. 167-174, 2011.

SMELTZER, S. C.; BARE, B. G. **Brunner & Suddarth: Tratado de enfermagem Médico-cirúrgica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

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

SPIELMANN, H. Animal use in the safety evaluation of chemicals: harmonization and emerging needs. **ILAR Journal**, 2002.

STEPHANIE, B. *et al.* Carrageenan from *Solieria chordalis* (Gigartinales): Structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 448–460, 2010.

STÉRU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, p. 367-370; 1985.

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

SUDHARSAN, S.; SUBHAPRADHA, N.; SEEDEVI, P.; SHANMUGAM, V.; MADESWARAN, P.; SHANMUGAM, A.; SRINIVASAN, A. Antioxidant and anticoagulant activity of sulfated polysaccharide from *Gracilaria debilis* (Forsskal). **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 81, P. 1031–1038, 2015.

SUN, T.; JACKSON, S.; HAYCOK, J. W.; MACNEIL, S. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. **J. Biotechnol.** V, 122, p. 372-81, 2006.

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.350, p.21-29, 1998.

TALARICO, L. B. *et al.* Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, p. 63–71, 2004.

TAZIMA, M. F. G. S., ANDRADE, Y. A. M. V. V., MORIYA, T. Wound biology and healing. **Simpósio: fundamentos em clínica cirúrgica**, v. 41, n. 3, p. 259-64, 2008.

THEORET, C.L. The pathophysiology of wound repair. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v. 21, p. 1-13, 2005.

TORNESI, B.; PALASZ, A. T.; DEL CAMPO, M. R.; ROUSSEAU, C. G.; ARCHER, F. J.; MAPLETOFT, R. J. In vitro culture of preimplantation mouse embryos and day 12 limb buds: effects of serum and albumin. **Reproduction Toxicology**, Cambridge, v. 7, p.623-630, 1993.

TOSCANO MC, MENGUE, SS. Avaliação do plano de reorganização da atenção a hipertensão arterial e ao Diabetes mellitus no **Brasil/Ministério da Saúde** – Organização Pan-Americana da Saúde Brasília; ed MS, p.13. 2004.

USOV, A. I. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. **Food Hydrocol.**, v. 12, p. 301-308, 1998.

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

USTYUZHANINA, N. E.; BILAN, M. I.; GERBST, A. G.; USHAKOVA, N. A.; TSVETKOVA, E. A.; DMITRENOK, A. S.; USOV, A. I.; NIFANTIEV, N. E. Anticoagulant and antithrombotic activities of modified xylofucan sulfate from the brown alga *Punctaria plantaginea*. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 826-833, 2016.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.3, n.2, p. 93-98, 2006.

VAN DE VELDE, F.; KHUTSEN, S.H.; USOV, A. I.; ROLLEMA, H. S.; CEREZO, A. S. H.; High resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Food Science & Technology**, v. 13, p. 73-92, 2002.

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

VO, T.; KIM, S. Fucoidans as a natural bioactive ingredient for functional foods. **Journal of Functional Foods.**, v. 5, p. 16–27, 2013.

WAGENER, F. A. D. T. G.; CARELS, C. E.; LUNDVIG, D.M.S. Targeting the Redox Balance in Inflammatory Skin Conditions. **Int. J. Mol. Sci.** v.14, p. 9126-9167, 2013.

WANG, X.; ZHANG, Z.; YAO, Z.; ZHAO, M.; QI, H. Sulfation, anticoagulant and antioxidant activities of polysaccharide from green algae *Enteromorpha linza*. **International Journal of Biological Macromolecules.**, v. 58, p. 225–230, 2013.

WANG, Y.; WU, F.; DU, L.; LI, G.; TAKAHASHI, K.; XUE, Y.; XUE, C. Effects of polysaccharides from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) on HepG2 cell proliferation. **International Journal of Biological macromolecules**, v. 66, p. 354–361, 2014.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 3, p. 835-870, 2003.

Wijesekara, i.; kim, s. k. Angiotensin-I-convertingenzyme (ACE) inhibitors from marine sources: Prospects in the pharmaceutical industry. **Marine Drugs**, V. 8, p. 1082-1093, 2011.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIMA, S.K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 14–21, 2011.

WILLENBORG, S., LUCAS, T., VAN LOO, G., KNIPPER, J.A., KRIEG, T., HAASE, SMELI, BRACHVOGEL, B., HAMMERSCHMIDT, M., NAGY, A., FERRARA, N., PASPARAKIS, M., EMING, S.A. CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. **Blood**, 120: 613e625. 2012.

WRIGHT, H.L.; MOOTS, R.T.; BUCKNALL, R.C.; EDWARDS, S.W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology**, v. 49(9), p. 1618-1631, 2010.

XING, W.; GUO, W.; ZOU, CH.; FU, T. T.; LI, X, Y.; ZHU, M.; QI, J. H.; SONG, J.; DONG, C. H.; LI, Z.; XIAO, Y.; YUAN, P. S.; HUANG, H.; XU, X. Acemannan accelerates cell proliferation and skin wound healing through AKT/mTOR signaling pathway. **J Dermatol Sci**. v. 79(2), p. 101-9, 2015.

YANNAS, I. V. Tissue and Organ Regeneration in Adults. New York : **Springer**, 2001.

YAO, H.; CHEN, Y.; LI, S.; HUANG, L.; CHEN, W. e LIN, X. Promotion proliferation effect of a polysaccharide from *Aloe barbadensis* Miller on human fibroblasts in vitro. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 45, n. 2, p. 152-156. 2009.

YE, Y. N.; SO, H. L.; LIU, E. S.; SHIN, V. Y.; CHO, C. H. Effect of polysaccharide from *Angelica sinensis* on gastric ulcer healing. **Life Sciences**, v. 72, p. 925-932, 2003.

YOUNG, A. e MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing. **Elsevier Ltd**. Basic Science, surgery 29:10, 2011.

ZIPPEL, J.; WELLS, T.; HENSEL, A. Arabinogalactan protein from *Jatropha curcas* L. seeds as TGF β 1-mediated inductor of keratinocyte in vitro differentiation and stimulation of GM-CSF, HGF, KGF and in organotypic skin equivalents. **Fitoterapia**, v. 81, p. 772–778, 2010.