



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

**JULIANA GOMES PEREIRA**

**EFEITOS DO POLISSACARÍDEO SULFATADO DA ALGA MARINHA  
VERMELHA *DIGENEA SIMPLEX* (J. AGARDH) NA NOCICEPÇÃO E  
INFLAMAÇÃO**

**FORTALEZA  
2014**

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)

---

- G1e GOMES PEREIRA, JULIANA.  
Efeito do polissacarídeo sulfatado da alga marinha vermelha *Digenea simples* (J. Agardh) na nocicepção e inflamação : efeito do polissacarídeo sulfatado da alga marinha vermelha *Digenea simples* (J. Agardh) na nocicepção e inflamação / JULIANA GOMES PEREIRA. – 2014.  
90 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2014.  
Orientação: Prof. Dr. Ana Lúcia Ponte Freitas.  
Coorientação: Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa.

1. polissacarídeos sulfatados. 2. ação anti-inflamatória. 3. efeito antinociceptivo .. I. Título.

CDD 572

---

**JULIANA GOMES PEREIRA**

**EFEITOS DO POLISSACARÍDEO SULFATADO DA ALGA MARINHA  
VERMELHA *DIGENEA SIMPLEX* (J. AGARDH) NA NOCICEPÇÃO E  
INFLAMAÇÃO**

Tese submetida ao Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica do  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular  
Universidade Federal do Ceará  
como requisito parcial para obtenção  
do título de Doutora em Bioquímica.  
Orientador: Profa Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas.  
Co- orientador: Prof. Dr. André Luiz dos Reis  
Barbosa.

**FORTALEZA  
2014**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Aprovada em 25 / 02 / 2014

## BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Ana Lucia Ponte Freitas  
Orientadora da Tese  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa  
Co-Orientador  
Departamento de Farmacologia  
Universidade Federal do Piauí

---

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza  
Conselheiro  
Departamento de Engenharia de Pesca  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dra. Ana Cristina O. M. Moreira  
Conselheiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Universidade de Fortaleza

À Deus, por me proporcionar a vida, a saúde e a  
tranquilidade para superar os obstáculos impostos pela vida, dedico.

## AGRADECIMENTOS

À professora. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas que proporcionou minha iniciação científica e acompanhou meus passos desde o início, não apenas com valiosos conselhos acadêmicos, mas também, com orientações para a vida, sempre enfatizando o lado espiritual e humano do profissional.

Professor Dr. André Luiz dos Reis Barbosa pela contribuição com os ensaios biológicos durante todo o período de desenvolvimento dos experimentos deste trabalho de tese e pela valiosa presença na banca de avaliação.

À Professora. Dra. Regina Célia Monteiro de Paula por proporcionar o desenvolvimento de caracterização química no Laboratório de Polímeros da Universidade Federal do Ceará e pela disponibilidade e conselhos imprescindíveis a esse trabalho.

Ao Prof. Edilberto Rocha Silveira por disponibilizar o Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) para a realização dos experimentos de RMN.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará pela colaboração na minha formação acadêmica durante o curso de mestrado.

Aos meus pais Aldi e Ana Maria, por terem sempre se esforçado para me proporcionar uma boa formação e pelo exemplo de honestidade, perseverança e força . Obrigado pela segurança e a certeza de que nunca caminho sozinha.

Aos meus amigos do Laboratório de Algas Marinhas, Luciano, Victor, Jacilane, Joana em especial ao meu amigo Dráulio pelo companheirismo e conselhos desde o início das minhas pesquisas no laboratório.

Aos meus colegas de doutorado que me acompanharam durante essa jornada, pelo companheirismo e amizade.

Às minhas amigas de pós-graduação Patrícia, Sandra e Denise pela convivência diária no departamento, pela amizade valiosa, pelos preciosos conselhos e pelo incentivo sempre. Espero que nossos momentos de “fortalecer a amizade” se multipliquem.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica pela colaboração e convivência diária durante o curso de doutorado.

## **INSTITUIÇÕES COLABORADORAS**

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, sede do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e onde este trabalho foi executado.

Departamento de Química Orgânica e Inorgânica do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará cujo foi realizado grande parte do estudo da estrutura química do polissacarídeo.

Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN) onde foram realizados parte do estudo da estrutura química do polissacarídeo através de experimentos de RMN.

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro por meio da bolsa e auxílios imprescindíveis à realização desse trabalho.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos convênios com o curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

## Resumo

Polissacarídeos sulfatados (PLS) têm nitidamente diversas propriedades farmacológicas. No presente estudo, investigamos as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva anteriormente inexploradas da fração PLS isolado da marinha alga vermelha *Digenea simplex*. Observou-se que a fração de PLS reduzem o edema induzido por carragenina em uma maneira dependente da dose, e inibiu a inflamação induzida por dextrano, por histamina, por serotonina e por bradicinina. A fração também foi capaz de inibir a migração de neutrófilos tanto em pata do rato quanto na cavidade peritoneal dos mesmos. Este efeito foi acompanhado por uma diminuição nos níveis de IL-1 e TNF -  $\beta$  -  $\alpha$  no fluido peritoneal. O pré - tratamento de ratinhos com PLS ( 60 mg / kg) reduziu significativamente contorções abdominais induzidas por ácido acético. Esta mesma dose de PLS também reduziu o tempo total de lambertura em ambas as fases do teste de formalina, e aumentou a latência em teste da placa quente. Portanto, concluímos que o PLS extraído de *D. simplex* possuem atividades anti-inflamatória e antinociceptiva e podem ser úteis como agentes terapêuticos contra doenças inflamatórias .

Palavras-chave: polissacarídeos sulfatados; ação anti-inflamatória; efeito antinociceptivo .

## **Abstract**

Sulfated polysaccharides (PLS) have notably diverse pharmacological properties. In the present study, we investigated the previously unexplored anti-inflammatory and antinociceptive activities of the PLS fraction isolated from the marine red alga *Digenea simplex*. We found that the PLS fraction reduced carrageenan-induced edema in a dose-dependent manner, and inhibited inflammation induced by dextran, histamine, serotonin, and bradykinin. The fraction also inhibited neutrophil migration into both mouse paw and peritoneal cavity. This effect was accompanied by decreases in IL1- $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels in the peritoneal fluid. Pre-treatment of mice with PLS (60 mg/kg) significantly reduced acetic acid-induced abdominal writhing. This same dose of PLS also reduced total licking time in both phases of a formalin test, and increased latency in a hot plate test. Therefore, we conclude that PLS extracted from *D. simplex* possess anti-inflammatory and antinociceptive activities and can be useful as therapeutic agents against inflammatory diseases.

**Key words:** Sulfated polysaccharides; anti-inflammatory action; antinociceptive effect.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AM 251 - Antagonista do receptor canabinóide tipo I  
AM 630 - Antagonista do receptor canabinoide tipo II  
AMPc - Adenosina monofosfato cíclico  
ATP - Adenosina tri-fostato  
2-AG - 2-Araquidonoilglicerol  
Cg - Carragenina  
CBI - Receptor canabinóide tipo I  
CBII - Receptor canabinóide tipo II  
cm - Centímetro  
DSS - Dextran sulfóxido solúvel  
DII - Doenças inflamatórias intestinais  
DC - Doença de Crohn  
DXT - Dextrana  
DMSO - Dimetil sulfóxido  
NOSe - Oxido nítrico sintetase endotelial  
EPM - Erro padrão da média  
GMPc - Guanosina monofostato cíclico  
Glib - Glibenclamida  
GTP - Guanosina tri-fostato  
g - grama  
hrs - Horas  
h - Hora  
ipl. - Intraplantarmente  
ip - Intraperitoneal  
IL-17 - Interleucina 17  
IL-1 - Interleucina 1  
IL-10 - Interleucina 10  
IL-1 $\alpha$  - Interleucina 1  $\alpha$   
IL-2 - Interleucina 2  
IL-4 - Interleucina 4  
IL-5 - Interleucina 5  
IL-6 - Interleucina 6  
IL-8 - Interleucina 8  
NOSi- Óxido nítrico sintetase induzível  
IASP - Associação internacional de estudos da dor  
K<sup>+</sup>ATP - Canais de potássio ATP dependentes  
KT 5823 - Bloqueador específico da proteína quinase tipo G  
L-Noarg - L-nitro-L-arginina  
M - Molar  
ml - mililitro  
 $\mu$ g - Micro grama  
 $\mu$ mol - Micro mol  
 $\mu$ l - Micro litro  
NOSn - Oxido nítrico sintetase neuronal  
NF $\kappa$  $\beta$  - Fator de transcrição nuclear  $\kappa$  $\beta$   
NOS - Óxido nítrico sintetase  
NO - Óxido nítrico  
ONOO<sup>-</sup> - Ânion peroxinitrito

NaCl - Cloreto de sódio  
nm - nanômetro  
ng - nanograma  
ODQ - 1H-[1,2,4] - oxadiazolo [4,3-a] quinoxalina  
PKG - Proteína quinase tipo G.  
POMC - Pro-ópiomelanocortina  
PENC - Pró-encefalina  
PGE2 - Prostaglandina E tipo 2  
PBS - Solução salina tamponada  
RCUI - Retocolite ulcerativa  
rpm - Rotações por minuto  
sp - Sub-plantar  
Sal - Salina  
Th17 - Células T helper 17  
Th1 - Células T helper 1  
Th2 - Células T helper 2  
TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral  $\alpha$   
TNBS - Ácido trinitrobenzeno sulfônico  
TGF- $\beta$  - Fator de crescimento de fibroblastos tipo  $\beta$

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - Representação esquemática estrutural das galactanas de algas vermelhas.....	10
<b>FIGURA 2</b> - Estrutura básica repetitiva de agaranas, com unidades D- e L-alternantes.....	20
<b>FIGURA 3</b> - Estruturas extremas encontradas em agaranas: Agarose (I); Precursor da Agarose (II).....	34
<b>FIGURA 4</b> - Padrão estrutural do dissacarídeo presente nas carragenanas.....	37
<b>FIGURA 5</b> - Representação esquemática estrutural das galactanas DL-híbridas de algas vermelhas.....	47
<b>FIGURA 6</b> - Mediadores inflamatórios ativando e sensibilizando os nociceptores Modificado de Julius & Basbaum, 2001.....	49
<b>FIGURA 7</b> - O caminho no qual a dor percorre, da periferia até o cérebro.....	51
<b>FIGURA 8</b> - Sequência de eventos leucocitários na inflamação.....	58
<b>FIGURA 9</b> - Espectro de FT - IR de polissacarídeo solúvel da alga marinha <i>D. simplex</i> .....	60
<b>FIGURA 10</b> - Espectro de RMN de polissacarídeo solúvel da alga marinha <i>D. simplex</i> .....	62
<b>FIGURA 11</b> - Efeito de PLS sobre o edema da pata induzido por carragenina.....	65
<b>FIGURA 12</b> - Efeito de PLS sobre o edema da pata induzido por vários agentes inflamatórios.....	67
<b>FIGURA 13</b> - Efeito de PLS na atividade de MPO induzida por carragenina no tecido da pata do rato.....	68
<b>FIGURA 14</b> - Efeito anti - inflamatório de PLS na peritonite induzida por carragenina em ratos.....	69
<b>FIGURA 15</b> - Efeito da fração PLS sobre a produção de citocinas induzida por carragenina em exsudato peritoneal.....	70
<b>FIGURA 16</b> - Efeito de PLS no teste de formalina.....	72

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1.1 Algas marinhas.....	14
1.2 Importância econômica das algas marinhas.....	15
1.3 O papel da doença de Crohn na fisiopatologia do processo inflamatório agudo.....	3
1.4 Algas vermelhas.....	17
1.5 Polissacarídeos sulfatados.....	19
1.6 Polissacarídeos de algas marinhas .....	22
1.6.1 Galactanas sulfatadas de Rhodophytas .....	24
1.6.2. Agaranas.....	24
1.6.3. Carragenana.....	27
1.6.4. Híbrido D/L .....	30
2.0 Efeitos biológicos de polissacarídeo de Rhodophytas .....	31
1.8 Dor.....	32
1.8.1. Tipos de dor.....	33
1.9 Inflamação.....	36
1.9.1. Eventos vasculares .....	38
1.9.2. Eventos celulares.....	39
1.9.3. Mediadores químicos.....	44
1.9.3.1. Citocininas.....	46
1.9.3.2. Óxido nítrico.....	47
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>48</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
<b>4 MATERIAIS E METODOS.....</b>	<b>50</b>
4.1 Extração dos polissacarídeos.....	50
4.2 Métodos analíticos para análises dos polissacarídeos.....	50
4.3 Soluções, drogas e corantes utilizados.....	50
4.2.1 Determinação do rendimento do polissacarídeo extraído de <i>D. simplex</i> .....	50
4.2.2 Dosagem de proteínas.....	50
4.2.3 Dosagem de sulfato.....	51
4.2.4 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	51
4.2.5 Ressonância magnética nuclear (RMN <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H).....	51
4.3 Ensaio biológicos.....	51
4.3.1 Animais.....	51
4.3.2 Aparelhos e equipamentos laboratoriais.....	52
4.3.3 Soluções, drogas e corantes utilizados.....	53
4.3.4 Grupos experimentais.....	54
4.4 Edema de pata induzido por carragenina ou dextrano.....	54
4.5 Ensaio da mieloperoxidase no cólon e na pata de animais.....	55
4.6 Migração de neutrófilos para a cavidade pleural induzida por carragenina.....	55
4.7 Avaliação da atividade antinociceptiva.....	56
4.8 Análise estatística.....	57
<b>5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>58</b>
5.1 Análise estrutural da galactana sulfatada de <i>D. simplex</i> .....	58
5.1.1. Espectro de FT-IR de polissacarídeo solúvel de <i>D. simplex</i> .....	58
5.2 Atividade anti-inflamatória de PLS no edema de pata induzido por dextrano.....	61

5.3 Efeito do PLS sobre o edema de pata induzido por vários agentes anti-inflamatórios.....	63
5.4 Efeito do PLS na atividade de MPO induzida por carragenina no tecido da pata de rato.....	65
5.5 Efeito anti-inflamatório de PLS na peritonite induzida por carragenina em ratos.....	66
5.6 Efeito da fração PLS sobre a produção de citocinas induzida por carragenina em exudato peritoneal.....	67
5.7 Efeito antinociceptivo do PLS em contorção induzida por ácido acético.....	69
5.8 Efeito do PLS no teste da formalina.....	70
5.9 Efeito do PLS no teste da placa quente.....	71
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁICAS.....</b>	<b>74</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Algas Marinhas

O termo alga refere-se a um grupo polifilético, com organismos que não compartilham uma origem comum, mas que seguem múltiplas e independentes linhas evolucionárias. As algas são consideradas organismos talófitos (não são diferenciados em raízes, caules e folhas), fotossintetizantes (exceto algumas espécies parasitas) que possuem em comum o pigmento clorofila a e, com raras exceções, não apresentam um envoltório de células estéreis nas células reprodutivas (Lee, 2008). São organismos com estrutura e organização simples e primitiva e que podem assumir formas de vida planctônica (microalgas) e bentônica (macroalgas).

Estão incluídas no reino Protista, são seres avasculares, ou seja, não possuem mecanismos específicos de transporte e circulação de fluidos, água, sais minerais, e outros nutrientes, como ocorre com as plantas superiores. Podem ser encontradas em diversos tipos de habitats, ocorrendo em ambientes de água doce e salgada, sobre troncos de árvores, rochas, desertos, superfície de neves e geleiras, e fontes termais (Raven et al., 2007). Nos ecossistemas aquáticos as algas incorporam energia solar em biomassa, produzem o oxigênio que é dissolvido na água e usado pelos demais organismos aquáticos, atuam na mineralização e no ciclo dos elementos químicos, e servem como alimento para animais herbívoros e onívoros. Ao morrerem, seus constituintes químicos sofrem transformações nos sedimentos, são solubilizados e reciclados na água. Estas diferentes “funções” desempenhadas pelas algas nos sistemas aquáticos dependem da temperatura, da intensidade da radiação solar, da concentração de nutrientes na água e da alimentação dos animais presentes no sistema (Vidotti e Rollemberg, 2004).

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

As algas marinhas podem variar desde indivíduos unicelulares microscópicos (podendo formar colônias ou viverem isolados) até formas multicelulares complexas com muitos metros de comprimento. Do ponto de vista botânico, as algas macroscópicas são classificadas de acordo com a estrutura física, função e ciclo reprodutivo em: **Chlorophyta** (algas verdes), **Phaeophyta** (algas pardas) e **Rhodophyta** (algas vermelhas) (RAVEN, 2001).

As algas verdes podem ser unicelulares ou pluricelulares, podem ser encontradas em uma ampla variedade de habitat (água doce e água salgada), como também na superfície da neve, em troncos de árvores, no 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. As algas pardas são pluricelulares e predominantemente marinhas. Compreendem as algas mais conspicuas das águas temperadas, boreais e polares, mas também são encontradas em regiões tropicais. Existem somente cerca de 1.500 espécies e apresentam a laminarina como polissacarídeo de reserva. Sua parede celular é constituída por celulose e algina. As algas vermelhas são pluricelulares, particularmente abundantes em águas tropicais quentes. Possuem 4.000 a 6.000 espécies distribuídas em aproximadamente 680 gêneros, dentre os quais poucas são unicelulares (RAVEN *et al.*, 2007).

## 1.2. Importância Econômica das Algas

As algas são utilizadas nos mais diferentes setores da economia mundial. Milhões de toneladas de algas são colhidas, anualmente, em todo o mundo, sendo os principais produtores os chineses, japoneses, seguidos pelos norte-americanos e noruegueses. Das algas, é possível obter produtos de baixo custo e em grandes quantidades e estes produtos têm sido imprescindíveis para a vida do homem moderno, com valores que ultrapassam alguns bilhões de dólares anuais. A exploração comercial de algas marinhas, em grande parte baseada no cultivo de espécies comestíveis ou produção de ágar, carragenana e alginatos, se tornou uma indústria que gera milhões de dólares (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

Nos últimos anos, empresas farmacêuticas estão utilizando os organismos marinhos, incluindo as algas marinhas, em busca de novas substâncias naturais, para a utilização em pesquisas médicas e bioquímicas (SMIT, 2004).

Desde 1975, três áreas de pesquisa em produtos naturais aquáticos surgiram: toxinas, bioprodutos e ecologia química. Mais de 15 mil novos compostos foram quimicamente determinados (Cardozo, K.H.M., et.al., 2007). Focalizando bioprodutos, recentes tendências na pesquisa de drogas provenientes de fontes naturais sugerem que, algas são um grupo promissor para fornecer novas substâncias bioquimicamente ativas (Tringali, 1997; Burja et al., 2001; Hamann Mayer, 2004, 2005, Singh et al. 2005, Blunt et al., 2005). Estudos com microalgas por exemplo, apontam que estas atendem aos principais pré-requisitos de uma matéria-prima sustentável para a produção de biocombustíveis por biorrefinarias de algas (KRAFT, M., 2013).

As algas têm atraído grande interesse por serem fonte alternativa de energia renovável aos combustíveis fósseis nos últimos anos. Tanto as algas assim como outras plantas, utilizam a fotossíntese para converter energia solar em energia química. Elas armazenam esta energia na forma de óleos, carboidratos e proteínas. Vale ressaltar que, o óleo vegetal pode ser convertido em biodiesel (DEMIRBAS; DEMIRBAS, 2011).

No Extremo Oriente e na Ásia, o consumo de algas é tradição, como parte da dieta da população, enquanto, em países ocidentais, elas são utilizadas industrialmente como uma fonte de hidrocolóides, tais como ágar, carragenana e alginato (Escrig-Jimenez & Sánchez-Muniz, 2000). O consumo de produtos de algas tem aumentado nos países europeus, existindo cerca de 15-20 espécies comestíveis de algas, que são comumente consumidas na Europa. (Dawczynski, Schubert, & Jahreis, 2007). Vários trabalhos sobre propriedades nutricionais das algas têm mostrado que estas são pobres em lipídios, mas ricas em proteínas, polissacarídeos não amiláceos, minerais e vitaminas (Darcy-Vrillon, 1993; Mabeau & Fleurence, 1993; Dawczynski et al. 2007). Os polissacarídeos de algas não podem ser totalmente digeridos por enzimas humanas intestinal, e por esta razão, são considerados como fonte de fibras dietéticas e ingredientes alimentares (Lahaye, 1991; Mabeau & Fleurence, 1993). O consumo humano de fibras de algas tem sido provado ser de promoção da saúde, reduzindo a ocorrência de algumas doenças crônicas (diabetes, obesidade, doenças cardíacas, câncer), que estão associados à dietas pobres em fibras dos países ocidentais (Kuda, Goto, Yokoyama & Fujii, 1998; Kuda, Yokoyama, Fujii & 1997; Southgate, 1990).

Em virtude da persistência e toxicidade ambiental da maioria dos pesticidas sintéticos, vem sendo observado um maior interesse por compostos naturais nas aplicações agroquímicas. Biofertilizantes a base de extrato de algas marinhas podem

substituir os fertilizantes sintéticos convencionais permitindo sua utilização na agricultura orgânica (Koyama, R., 2012).

Muitas rodofíceas são utilizadas comercialmente como alimento para homens e para o gado, na extração do agar utilizado na fabricação de gomas, laxantes ou, ainda, como meio de cultura para bactérias. Outro aspecto de interesse econômico é a extração da carragenana, um hidrocolóide usado na produção de alimentos, principalmente nas indústrias de laticínios (iogurtes, flans, sorvetes, achocolatados) e embutidos (salsichas, presuntos), na fabricação de gelatinas e geléias, e como espessante em sopas e molhos. A carragenana é usada, também, como emulsificante e estabilizante; sua aplicação substitui o amido e a gordura na preparação de certos produtos alimentícios, com a vantagem de não ser energética, não ter cheiro, cor nem sabor. Também são encontradas diversas aplicações em indústrias não alimentícias (tintas, têxteis, perfumes) e farmacêuticas (produtos anticoagulantes e antiinflamatórios). As algas pardas são utilizadas na alimentação humana e também como fertilizantes, sendo importante fonte de ácidos algínicos, cujas propriedades coloidais são aproveitadas, por exemplo, na farmacologia em pomadas e suspensões. Algumas algas verdes e cianofíceas apresentam, ainda, propriedades larvicidas (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

No tocante à economia, observa-se então a grande variedade de espécies de algas com aplicabilidades diversificadas em vários países no mundo, da indústria alimentícia à de medicamentos, da cosmética à agricultura.

### 1.3. Algas Vermelhas

As algas vermelhas ocupam, em sua maioria, ambientes marinhos bentônicos, mas há também, algumas espécies de água doce (Silva, I. B., 2010). E foi neste ambiente marinho (oceanos e mares) que vida teve origem. As águas dos oceanos são comparadas a um meio de cultura de composição praticamente constante para a grande maioria de seus parâmetros, como por exemplo a porcentagem dos sais dissolvidos, que mantem-se em torno de 3,5%. Este equilíbrio é sustentado por uma série de reações químicas e de processos físico-químicos<sup>1,2</sup>. Nesse imenso laboratório, os organismos aquáticos e o ambiente abiótico estão interrelacionados e interagem entre si. Por isso, os organismos marinhos adaptaram-se às altas concentrações de sais do meio e desenvolveram mecanismos para utilizar os solutos disponíveis, onde os mais

importantes íons são o sulfato, o cloreto, o brometo e o iodeto. Pela abundância destes elementos é esperado que os organismos marinhos produzam substâncias halogenadas e sulfatadas em abundância, com maior ou menor eficiência (Carvalho, L. R. & Roque, N. F., 2000). As Rhodophytas se sobressaem à todos os organismos marinhos produtores dessas substâncias, sendo capazes de sintetizar metabólitos halogenados da mais fascinante diversidade, que podem pertencer a praticamente todas as classes químicas, desde hidrocarbonetos de baixo peso molecular, cetonas simples, fenóis, acetogeninas até sofisticados terpenos<sup>3</sup> Além disso, são eficientes na produção de polissacarídeos sulfatados (carragenanas e agar), que chegam a representar mais de 70% do seu peso seco.

As algas marinhas pardas (Phaeophyta) e verdes (Chlorophyta) são menos eficientes na produção de substâncias halogenadas e ambas produzem polissacarídeos sulfatados.

As Rhodophytas se caracterizam por apresentar como principais pigmentos fotossintetizantes, a clorofila **a** (clorofila **d** também é referida), e os pigmentos acessórios compostos de **carotenos** (como o betacaroteno) e **ficobilinas** (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina), que são responsáveis pela coloração avermelhada destas algas. Estes pigmentos permitem que as algas ocupem desde a zona superior da região entremarés até grandes profundidades, pois são capazes de absorver a luz com menores comprimentos de onda (SILVA, I.B, 2010).

O principal produto de reserva das algas vermelhas são os grânulos de amido das florídeas. Armazenados no citoplasma, o amido das florídeas é um composto que possui propriedades intermediárias entre o amido (que é o produto de reserva das plantas) e o glicogênio (reserva alimentar dos fungos, bactérias e de muitos organismos não-vegetais).

A parede celular das Rhodophytas, assim como das Phaeophyta e Chlorophyta, tem como componente principal a celulose (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). A celulose da parede celular das Rhodophytas encontra-se embebida por um material amorfo e mucilaginoso, responsável pela flexibilidade, resistência e textura das algas. Os principais componentes mucilaginosos das algas vermelhas são o ágar, a carragenana e o alginato (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

#### 1.4. Polissacarídeos sulfatados

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

Os polissacarídeos sulfatados vem chamando atenção dos pesquisadores por estarem envolvidos em diversos processos celulares (HAN *et al.*, 2005) e por apresentarem diversas atividades farmacológicas (TOIDA *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2004; ATHUKORALA *et al.*, 2007). Eles não são encontrados em todos os seres vivos, ocorrendo em todos os representantes do reino animal (BRITO *et al.*, 2008; MOURA, 2004; SANTOS, 2006), no reino protista, são encontrados nas macroalgas (MARQUES, 2007; FARIAS *et al.*, 2008; CARDOSO, 2007; AZEVEDO, 2008; MEDEIROS, 2008) e há também registro da presença de PS em bactéria, a cianobactéria *Synechocystis aquatilis* (VOLK *et al.*, 2006). No reino plantae há registro de poucas espécies que sintetizam polissacarídeos sulfatados. Aquino (2005) detectou a presença de PS em 03 espécies de vegetais marinhos enquanto Santos (2007) verificou a presença de PS em vegetais dulcícolas. Não há registro de polissacarídeos sulfatados em vegetais terrestres, fungos ou vírus.

O primeiro grupo de PS estudados foram os encontrados em animais. Nesses seres vivos os principais PS encontrados são os glicosaminoglicanos sulfatados (GAGS). Esses polímeros são polissacarídeos lineares com repetições de unidades dissacarídicas constituídas de um resíduo de açúcar não nitrogenado (ácido idurônico, ácido glucurônico, ou galactose) e de um resíduo de hexosamina (glucosamina ou galactosamina). Os GAGS

se encontram ligados covalentemente a proteínas, formando um grupo de glicoconjugados complexos denominados de proteoglicanos (DIETRICH, 1984).

A classificação dos GAGS baseia-se principalmente na estrutura química dos polissacarídeos sendo considerados os seguintes fatores: tipo de hexosamina encontrada; açúcar não nitrogenado; tipo de ligação glicosídica e quantidade e posição dos grupamentos sulfato (PAVÃO *et al.*, 1995; NADANAKA *et al.*, 1998; NADER *et al.*, 1999).

Nos vegetais superiores, maiores estudos são necessários para a caracterização dos polissacarídeos sulfatados. Aquino e colaboradores (2005) estudaram três espécies de angiospermas marinhas e detectaram a presença de D-galactana sulfatada. Santos e colaboradores (2007) também encontraram galactana sulfatada como principal constituinte de três espécies de macrófitas marinhas.

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

### 1.5. Polissacarídeos de Algas Marinhas

Polissacarídeos são polímeros de açúcar que contém mais de 20 unidades monossacarídicas, podendo ter cadeias de centenas ou milhares destas unidades. Dessa forma, são polímeros de média até alta massa molecular (NELSON & COX, 2002).

As algas marinhas são a fonte mais importante de PS de origem não-animal e sua estrutura química varia de acordo com as diferentes espécies de algas (COSTA *et al.*, 2010). Os polissacarídeos de algas apresentam em sua estrutura açúcares bastante comuns como glicose, xilose e galactose, assim como possuem açúcares bastante específicos e incomuns, diferentes dos encontrados em animais e vegetais terrestres como é o caso da fucose e da anidrogalactose (ZHANG *et al.*, 2003).

As algas são filogeneticamente divididas em 3 classes: Phaeophyceas ou algas marrons, Rhodophyceas ou algas vermelhas e Chlorophyceas ou algas verdes. Cada classe apresenta sua peculiaridade devido à presença marcante de um grupo específico de polissacarídeo sulfatado, característicos da espécie daquela classe, não sendo encontrado em outros seres vivos. Encontrados na matrix extracelular, estes polissacarídeos parecem desempenhar a função de regulação mecânica, osmótica e

iônica nas algas, adaptando-as ao meio ambiente (KLOAREG; QUATRANO, 1998; ROCHA, *et al.*, 2006). Ainda com função de osmorregulação, as algas biossintetizam carboidratos de baixo peso molecular e/ou polióis (KARSTEN *et al.* 1993).

Os PS de algas marinhas vermelhas ocorrem na forma de galactanas sulfatadas (PEREIRA *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2010), de fucanas sulfatadas nas algas pardas (MOURÃO, 2004; AZEVEDO *et al.*, 2009) e, nas algas verdes, os mais encontrados são as arabino-galactanas e as raminoses (GHOSH *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2008).

Nas algas marrons encontram-se polissacarídeos sulfatados que têm como principal característica a presença do monossacarídeo  $\alpha$ -L-fucose sulfatada (ALBUQUERQUE *et al.*, 2004). O termo geral para designar esses polissacarídeos é fucana. Quando uma fucana apresenta menos de 90% de resíduos de  $\alpha$ -L-fucose sulfatada, elas são chamadas de fucoidanas ou heterofucanas (ROCHA *et al.*, 2006).

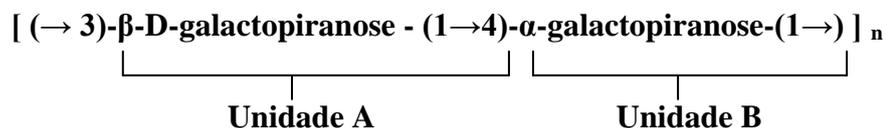
Os polissacarídeos das algas verdes são polímeros heterogêneos altamente ramificados, ricos em galactose, manose, xilose, arabinose, glicose e/ou ácidos urônicos, porém, homopolissacarídeos como xilanas e galactanas podem ser encontrados e não apresentam unidades repetitivas dissacarídicas como ocorre nos glicosaminoglicanos (MATSUBARA, *et al.*, 2001; FARIAS, *et al.*, 2008).

Das algas vermelhas são obtidas as agaranas e as carragenanas, cuja estrutura básica é composta de uma cadeia linear, formada por unidades de  $\beta$ -D-galactose ligadas 1 $\rightarrow$ 3 (unidade A) a  $\alpha$ -D/L-galactose ligados nas posições 1 $\rightarrow$ 4 (unidade B) arranjadas na forma de uma unidade de repetição (AB) $_n$ . As unidades  $\alpha$ -D-galactose no dissacarídeo podem ser biologicamente convertidas no derivado 3,6 anidro pela eliminação de grupos sulfato na posição 6. Nas agaranas, a unidade B está presente como  $\alpha$ -L-galactose, que pode estar na forma de 3,6-anidro ou pode ser substituída na posição 6 por grupos sulfato. As carragenanas diferenciam-se das agaranas por possuírem a unidade B na forma de  $\alpha$ -D-galactose. As carragenanas são encontradas nas espécies *Soliera*, *Euclima*, *Maristiella* e *Callophucus*, e as agaranas nas espécies *Gracilaria*, *Gelidium* e *Pterocladia*s (CUNHA *et al.*, 2009). Há uma variação estrutural entre os polissacarídeos obtidos de galactanas sulfatadas de diferentes espécies de algas vermelhas coletadas em ambientes diferentes ou em períodos diferentes do ano (SORIANO, *et al.*, 2005). Além das carragenanas terem grande importância nas indústrias alimentícias e cosméticas, elas vêm sendo utilizadas como ferramentas para investigar o processo inflamatório em ratos e camundongos (LEVY, 1969).

## 1.6. Galactanas Sulfatadas de Rhodophytas

As algas vermelhas biossintetizam uma grande variedade de galactanas sulfatadas que são os principais componentes da matriz intercelular. As galactanas consistem de polímeros de galactose, mais especificamente, por cadeias lineares de dissacarídeos repetitivos. Cada dissacarídeo é constituído por duas subunidades, A e B, e o polissacarídeo é formado pela alternância dessas unidades (AB)<sub>n</sub> (FIGURA 01). A unidade A é representada pela β-D-galactopiranosose ligadas através dos carbonos C-1 e C-3 enquanto a subunidade B é representada pela α-galactopiranosose ligadas através dos carbonos C-1 e C-4. Algumas unidades B podem ocorrer na forma ciclizada entre os carbonos C-3 e C-6, formando o composto 3,6-anidro-α-L-galactose (PAINTER, 1983).

Segundo RESS (1961 *apud* USOV, 1998) o resíduo de α-L-galactose 6-sulfato é o precursor biológico do resíduo de 3,6-anidrogalactose-α-L-galactose. Há duas formas de promover essa conversão. A primeira, natural, a reação é catalisada nos tecidos algais por uma enzima específica chamada sulfato eliminase. Uma segunda forma pode ser realizada quimicamente por tratamento alcalino dos polissacarídeos.



**FIGURA 01:** Representação esquemática estrutural das galactanas de algas vermelhas

A mais simples classificação das galactanas de algas marinhas é feita de acordo com a estereoquímica da unidade B: sendo a unidade B pertencente à série D, estas galactanas são classificadas como carragenanas; sendo a unidade B pertencente à série L, as galactanas são classificadas como agaranas. No entanto, estudos estruturais detalhados demonstram um terceiro grupo de galactanas onde a unidade B apresenta configuração D- e L- na mesma molécula. Polissacarídeos com essa estrutura são denominados de carrágar (CHOPIN et al., 1999) ou híbridos – D/L (STORTZ & CERREZO, 2000). Uma característica bastante comum nas galactanas de Rhodophytas é

a possibilidade de substituição dos grupos hidroxila por ésteres de sulfato, grupos metil, grupos acetal de ácido pirúvico e em alguns casos, por monossacarídeos adicionais (PAINTER, 1983; FALSHAL; FURNEAUX; STEVENSON, 2005; USOV, 1998; MOLLET; RAHAOUI; LEMOINE, 1998; MARINHO-SORIANO, 2001). Esses grupos substituintes ocorrem nas agaranas e carragenanas de forma bem peculiar: geralmente as carragenanas têm maior conteúdo de sulfato que as agaranas. Por outro lado, as agaranas apresentam maior grau de substituição por grupos metil e piruvatos que as carragenanas (LAHAYE, 2001).

Com o intuito de facilitar e homogeneizar a escrita das unidades dissacarídicas repetitivas das galactanas KNUTSEN *et al.* (1994) desenvolveram uma nomenclatura simbólica, na qual as unidades A ( $\beta$ -galactopiranosose) são simbolizadas pela letra G, e as unidades B quando pertencentes ao grupo das carragenanas são simbolizadas pela letra D ( $\alpha$ -D-galactopiranosose) e DA (3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose). As substituições por grupos metil, sulfato e xilose recebem o número correspondente ao carbono que está sendo substituído e as letras correspondentes ao tipo de substituinte M, S e X, respectivamente. Acetal de ácido pirúvico substituindo as unidades A são representados simbolicamente de GP. Segundo essa nomenclatura, pode-se observar na TABELA 01 algumas unidades monossacarídicas com suas correspondentes letras codificadas.

**TABELA 01:** Codificação dos resíduos de açúcar e grupos substituintes presentes nas galactanas (KNUTSEN *et al*, 1994). Números correspondem o átomo de carbono no qual o substituinte encontra-se ligado.

<b>Código</b>	<b>Unidade monossacarídica correspondente</b>
D	(1→4)- $\alpha$ -D-galactopiranosil
DA	(1→4)-3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosil
G	3-ligado - $\beta$ -D-galactopiranosil
L	(1→4)- $\alpha$ -L-galactopiranosil
LA	(1→4)-3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactopiranosil
M	O-metil
P	4,6-O-(1-carboxietilideno)
S	Ester Sulfato
L2M,6S	(1→4)-2-O-metil- $\alpha$ -L-galactopiranosil-6-sulfato
G4S-DA-G	→3)- $\beta$ -D-galactopiranosil 4-sulfato (1→4) 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactopiranosil (1→3) $\beta$ -D-galactopiranosil (1→

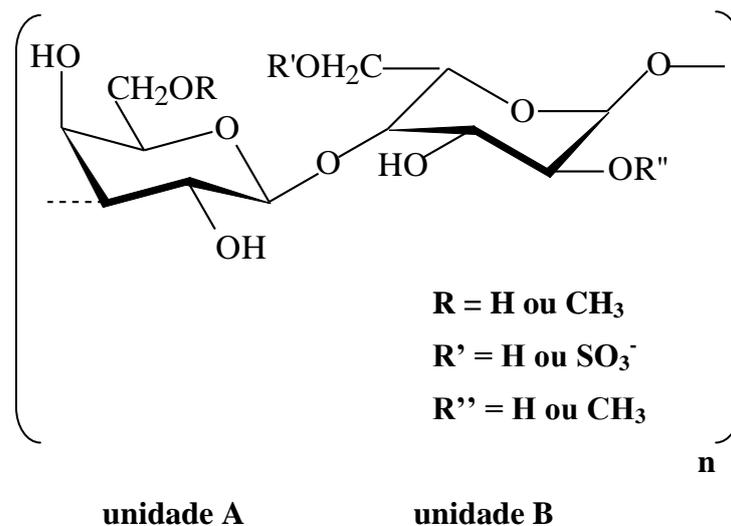
A caracterização química das galactanas de algas vermelhas, bem como o número e os tipos de substituintes, é um passo essencial para o estudo das propriedades e aplicações desses polímeros. Métodos químicos e espectroscópicos são as principais ferramentas para a caracterização de galactanas de Rhodophytas (FALSHAW; FURNEAUX, 1994; USOV, 1998).

### 1.6.1. Agaranas

As agaranas formam uma classe de galactanas que ocorrem na matriz extracelular de diversas espécies de algas marinhas vermelhas (Rhodophyta), especialmente os membros das famílias Gelidiaceae e Gracilariaceae (ARMISEN; GALACTAS, 1987 apud MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005). Sua função, se

assemelha à dos polissacarídeos de parede celular de plantas terrestres, porém, enquanto estas requerem uma estrutura rígida capaz de resistir à constante atração da gravidade, as algas marinhas precisam de uma maior flexibilidade em sua estrutura para acomodar as variações nas correntes marinhas e movimento das ondas.

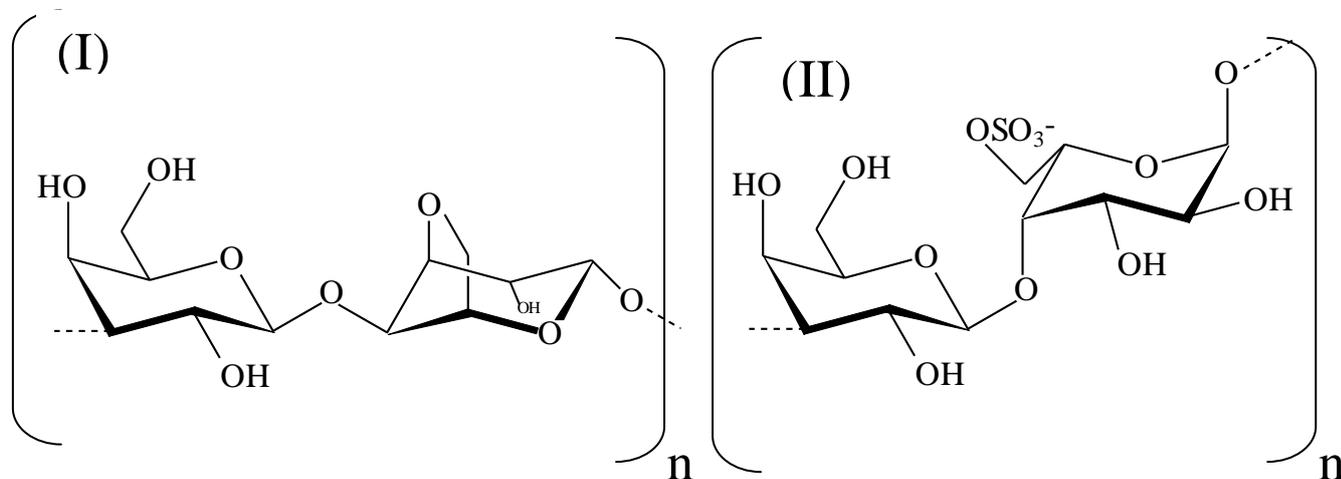
O ágar consiste em dois diferentes componentes: agarose e agarpectina. A agarose é um polissacarídeo neutro, caracterizado por uma estrutura linear de unidades repetidas do dissacarídeo agarobiose [(1→3)-β-D-galactose e (1→4)-3,6-anidro-α-L-galactose]. Já a agarpectina caracteriza-se como um polissacarídeo ácido contendo sulfato, metil, ácido pirúvico e ácido D-glucurônico adicionado à agarobiose (ARAKI, 1966 apud MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005). KNUTSEN, *et al* (1994) propuseram que o termo “agarana” deveria ser empregado para designar polissacarídeos constituídos por monômeros de dissacarídeos repetitivos de (→ 3)-β-D-galactose ligada a (1→4)-α-L-galactose (FIGURA 02).



**FIGURA 02.** Estrutura básica repetitiva de agaranas, com unidades D- e L-alternantes.

Por outro lado, o termo “agarose” designaria o polissacarídeo semelhante às agaranas, porém, sua unidade B (4-O-ligada) ocorreria na forma de 3,6-anidro-α-L-galactose, ou simplesmente 3,6-anidrogalactose (FIGURA 03 I). Segundo NOSEDA e CERZO (1995) a agarose teria como precursor biológico natural o composto α-L-galactose-6-sulfato. (FIGURA 03 II). A agarose é a galactana com maior propriedade

gelificante devido à presença da ligação anídrica entre os carbonos C-3 e C-6 da unidade B das galactanas. (KNUTSEN *et al*, 1994).



**FIGURA 03.** Estruturas extremas encontradas em agaranas: Agarose (I); Precursor da Agarose (II).

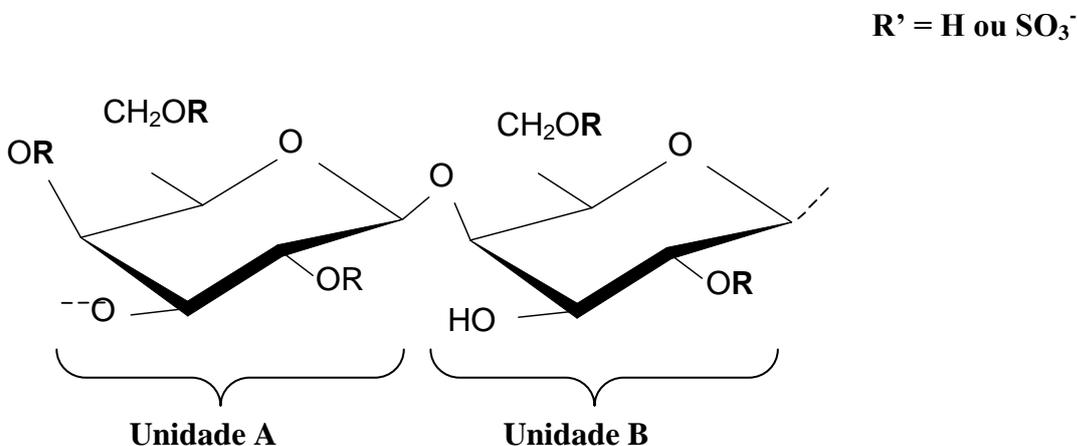
Geralmente, espécies do gênero *Gracilaria* produzem ágar com baixa qualidade devido ao alto conteúdo de sulfato (MARINHO-SORIANO, 2001). No entanto, a qualidade do ágar pode ser aumentada através do tratamento de hidrólise alcalina, com conversão de L-galactose-6-sulfato para 3,6-anidro-L-galactose (ARMISEN; GALACTAS, 1987).

Géis de agarose modificados quimicamente são utilizados em laboratórios em cromatografias de troca-iônica (DEAE-Sepharose, CM-Sepharose). Estes géis estão entre os meios mais utilizados para eletroforese, assim como também o ágar é amplamente utilizado para solidificar meios de cultura de microorganismos (NOSEDA, 1994).

As agaranas podem ser utilizadas na fabricação de cápsulas de vitaminas e outras drogas, em materiais odontológicos e como base para cosméticos. São igualmente empregados como agentes que impedem a dessecação de produtos de confeitaria, na preparação de geléias e sobremesas e como conservantes temporários para carne e peixe em regiões tropicais (RENN, 1997).

### 1.6.2. Carragenanas

As carragenanas são polissacarídeos sulfatados extraídos de Rhodophytas, com cadeia linear, solúveis em água e são muito explorados comercialmente devido suas propriedades gelificantes e estabilizantes (DE RUITER; RUDOLPH, 1997; VAN DE VELDE *et al.*,2002). Esse grupo de galactanas é formado por unidades repetitivas de dímeros contendo (1→3)-β-D-galatopirranose (unidade A) ligadas a (1→4)-α-D-galactopirranose (unidade B). (FALSHAW, FURNEAUX; STEVENSON, 2005; USOV, 1998; MOLLET; RAHAOUI; LEMOINE, 1998 MARINHIO-SORIANO, 2001; DE RUITER; RUDOLPH, 1997; VAN DE VELDE *et al.*,2002). Esta última unidade pode ser encontrada na forma totalmente ciclizada de 3,6-anidro-α-D-galactose, ou ainda na sua forma precursora de anidro-açúcar α-D-galactose-6-sulfato. Geralmente as carragenanas apresentam uma alta porcentagem de grupos sulfato e uma baixa porcentagem de grupos O-metil naturais (PAINTER,1983).



**FIGURA 04:** Padrão estrutural do dissacarídeo presente nas carragenanas.

Tradicionalmente, as carragenanas são classificadas por letras gregas, que indicavam o maior componente de uma amostra. Essa identificação é bastante utilizada na ciência, legislação e regulação, porém, apresenta problemas no ponto de vista científico, pois se trata de uma nomenclatura não lógica, inflexível, e incapaz de descrever, sem ambigüidade, polímeros complexos (DE RUITER; RUDOLPH, 1997).

Tendo em vista esse problema, uma nova nomenclatura foi proposta por KNUTSEN *et al* (1994), e atribuía letras-código para identificar cada monômero que compunha a galactana. Essa nomenclatura baseada em letras-código, apresentada na TABELA 02, é atualmente adotada pela “International Union of Pure and Applied Chemistry” (IUPAC), e proporciona uma classificação sistemática para polímeros complexos (VAN DE VELDE *et al.*, 2002).

**TABELA 02:** Nomenclatura alternativa para as carragenanas proposta por Knutsen *et al* (1994), modificada por Cauduro *et al.* (2000)

<b>Unidade A (1→3)</b>	<b>Unidade B (1→4)</b>	<b>Carragenana</b>	<b>Família</b>
G4S	DA	$\kappa$ (kappa)	<b>Kappa</b>
G4S	DA2S	$\iota$ (iota)	
G4S	D6S	$\mu$ (mu)	
G4S	D2S,6S	$\nu$ (nu)	
G4S	D2S	$o$ (omicron)	
G	DA	$\beta$ (beta)	<b>Beta</b>
G	D6S	$\gamma$ (gamma)	
G	D2S,6S	$\delta$ (delta)	
G	DA2S	$\alpha$ (alpha)	
G2S	D2S,6S	$\lambda$ (lambda)	<b>Lambda</b>
G2S	DA2S	$\theta$ (theta)	
G2S	D2S	$\xi$ (xi)	
GP,2S	D2S	$\pi$ (pi)	<b>Omega</b>
G6S	DA	$\omega$ (omega)	
G6S	D6S	$\psi$ (psi)	

Geralmente, as carragenanas naturais são misturas de diferentes polissacarídeos sulfatados. Diferentes tipos de híbridos de carragenanas são bastante relatados como  $\kappa / \iota$ -híbrido,  $\kappa / \beta$ -híbrido,  $\xi / \theta$ -híbrido,  $\nu / \iota$ -híbrido, e mais estruturas complexas contendo unidades metiladas e piruvatadas (VAN DE VELDE, 2008). As misturas e

proporções de carragenana podem variar de acordo com espécies, ciclo de vida, condições fisiológicas e ambientais. Os estágios do ciclo reprodutivo de espécies da família Gigartinaceae afetam as estruturas de suas carragenanas, a alga *Gigartina pistillata* biossintetiza na sua fase gametofítica um heteropolissacarídeo constituído majoritariamente por kappa/iota-carragenana, e baixas proporções de nu-carragenana. Já na fase tetrasporofítica a alga biossintetiza um complexo de lambda/xi/pi-carragenana, com grande parte das unidades A 2,6-dissulfatadas (AMIMI et al., 2001).

O conteúdo de  $-O-SO_3^-$  nos polissacarídeos sulfatados pode variar entre 0-41%(m/m), podendo resultar em polímeros altamente carregados negativamente. Carragenanas comerciais, como a  $\kappa$ ,  $\iota$  e  $\lambda$  contém 22, 32 e 38% (m/m) de sulfato, respectivamente, e massa molecular entre 400 e 600 kDa. A determinação do conteúdo de sulfato, bem como as posições desses grupos, é importante para o estudo das propriedades reológicas dos polímeros, suas aplicações em alimentos e cosméticos e suas possíveis aplicações médicas (DE RUITER; RUDOLPH, 1997).

Entre as carragenanas, as gelificantes (kappa- e iota-) e as não gelificantes (lambda-carragenana) são amplamente utilizadas em diversos setores da indústria. As carragenanas gelificantes diferem nas propriedades dos hidrogéis (PICULELL,1995)

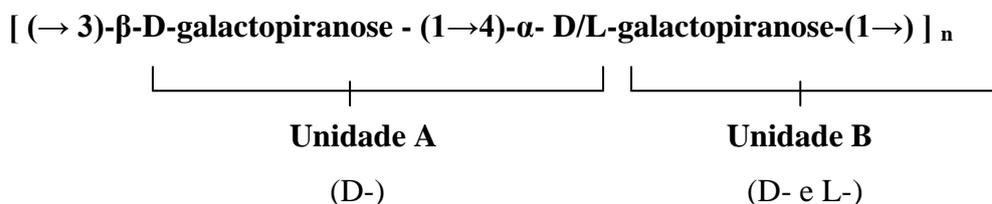
A lambda-carragenana é a carragenana mais sulfatada (G2S-D2,6S). Hélices ordenadas não são formadas por essa estrutura, dessa forma, a lambda-carragenana não forma gel. As espécies formadoras de gel geralmente apresentam a unidade B na forma de 3,6-anidrogactose (PICULELL, 1995).

As carragenanas do tipo  $\kappa$  e  $\iota$  têm a propriedade de formar gel devido à presença de um resíduo de 3,6-anidrogactose na unidade B do dissacarídeo enquanto a  $\lambda$ -carragenana, caracteriza-se pela alta viscosidade, e pela incapacidade de formar gel (DE RUITER; RUDOLPH, 1997; VAN DE VELDE *et al.*, 2002).

As carragenanas podem ser usadas como géis, espessantes ou em suspensão, elas estabilizam emulsões e controlam a sinerese (perda de água), proporcionando dispersão, ligação e corpo ao produto final. O principal uso das carragenanas, em particular na indústria alimentícia é em produtos derivados do leite (GUISELEY *et al.*,1980)

### 1.6.3. Híbrido D/L

Alem dos principais tipos de galactanas (agaranas e carragenanas), um terceiro tipo foi identificado. Trata-se de um grupo de galactanas que apresentam características tanto de agaranas quanto de carragenanas. Inicialmente, esse novo grupo foi chamado de carrágar (CHOPIN; KERIN; MAZEROLLE, 1999), mas, posteriormente, STORTZ e CEREZO (2000) propuseram o nome galactana DL-híbrida. A principal característica das galactanas DL-híbridas está na unidade B da estrutura regular das galactanas, que pode ocorrer tanto na forma D quanto na forma L. Dessa forma, a determinação das unidades enantioméricas é o ponto fundamental para a caracterização dessas galactanas.



**FIGURA 05:** Representação esquemática estrutural das galactanas DL-híbridas de algas vermelhas

As galactanas DL-híbridas são definidas de acordo com a proporção da configuração presente na unidade B das galactanas. Quando a molécula é constituída principalmente por carragenanas ( $\alpha$ -D-galactose), a galactana híbrida é denominada carragenana-híbrida-D/L, mas quando as principais unidades dissacarídicas são moléculas de agaranas ( $\alpha$ -L-galactose), o polímero híbrido é denominado de agarana-híbrida-D/L (ESTEVEZ; CIANCIA; CEREZO, 2004).

A recente descoberta das galactanas do DL-híbridas proporcionou o estudo mais minucioso das algas consideradas anteriormente como agarófitas ou carragenófitas exclusivas. Apesar de o gênero *Gymnogongrus* ser considerado como carragenófito, ESTEVEZ, CIANCIA e CEREZO (2004) encontraram uma galactana DL-híbrida, com maiores quantidades de agaranas e carragenanas típicas e menores quantidades de agaranas com padrão não usual. A alga *Kappaphycus alvarezii* apresentou uma galactana DL-híbrida constituída de agaranas e agarana- $\kappa$ -carragenana, e marcante

presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Os cátions divalentes atuam como agente agregante entre galactanas híbridas (ESTEVEZ; CIANCIA; CERREZO, 2004).

## 1.7 EFEITOS BIOLÓGICOS DOS POLISSACARÍDEOS DAS RODOPHYTAS

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

As atividades biológicas dos polissacarídeos sulfatados dependem da sua estrutura química, peso molecular e cadeia de conformação (WIJESEKARA, *et al.*, 2011).

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

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

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

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

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

A formação de células cancerosas no corpo humano pode ser diretamente induzida por radicais livres e drogas naturais anticâncer, dessa forma, agentes preventivos ganharam uma popularidade positiva no tratamento de câncer. A  $\lambda$ -carragenana de *Chondrus ocellatus*, uma alga de importância econômica na China, após fracionamento, apresentou cinco produtos de massas moleculares diferentes: 650, 240, 140, 15 e 9,3 kDa. Esses produtos apresentaram atividades antitumorais e imuno-moduladoras em diferentes graus (ZHOU *et al.*, 2004).

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

## 1.8 DOR

A dor é uma experiência sensorial desagradável e de complexa percepção, ocorre desde um pequeno desconforto até um processo destrutivo, com graves danos aos tecidos, sendo expressa por reação orgânica e emocional. No entanto, a melhor definição para dor foi determinada pela IASP – Associação Internacional para Estudo da Dor, definindo-a como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada ao dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termo de tal lesão (RAINVILLE, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2004). A dor pode ser diferenciada principalmente em dor aguda e crônica (ÖZKAY *et al.*, 2013). A dor aguda, que também é conhecida como dor

rápida, dor de picadas e dor elétrica, atua como um mecanismo de alerta importante para a pessoa, instruindo o cérebro para remover o indivíduo do estímulo da dor particular. A dor crônica, que também é conhecido como dor em queimação, lenta, forte, latejante e que pode provocar náuseas, geralmente é associado com a destruição dos tecidos. A dor crônica leva a um sofrimento insuportável prolongado (ÖZKAY *et al.*, 2013; BUSCHMANN *et al.*, 2002; GUYTON and HALL, 2006).

A dor é uma experiência subjetiva difícil de definir, podendo ser uma resposta direta a um evento desfavorável, associado a danos teciduais, como lesão, inflamação ou câncer, ou, surgir de modo independente. Assim, a transmissão da dor ocorre através de um mecanismo que envolve uma interação muito complexa de estruturas periféricas e centrais da superfície da pele ao córtex cerebral central (FÜRST, 1999).

O tratamento da dor é atualmente uma área muito ativa na pesquisa farmacológica, porque compostos analgésicos utilizados clinicamente podem causar efeitos colaterais inaceitáveis. Em particular, os medicamentos anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs) tradicionais estão associados com complicações gastrointestinais graves, tais como sangramentos, lesões e úlceras. Além disso, por causa dos efeitos colaterais percebidos e temores de dependência e tolerância associado com potentes analgésicos opiáceos, seu uso é polêmico e restrito. Assim, são necessários mais estudos para descobrir novas alternativas para o tratamento da dor. Além disso a novos compostos químicos sintetizados através de métodos de química medicinal, substâncias naturais, obtidos a partir de plantas medicinais ganharam importância no processo de descoberta e desenvolvimento de novos candidatos a fármacos analgésicos. (LAPA FDA *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2012; LOSCALZO *et al.*, 2011).

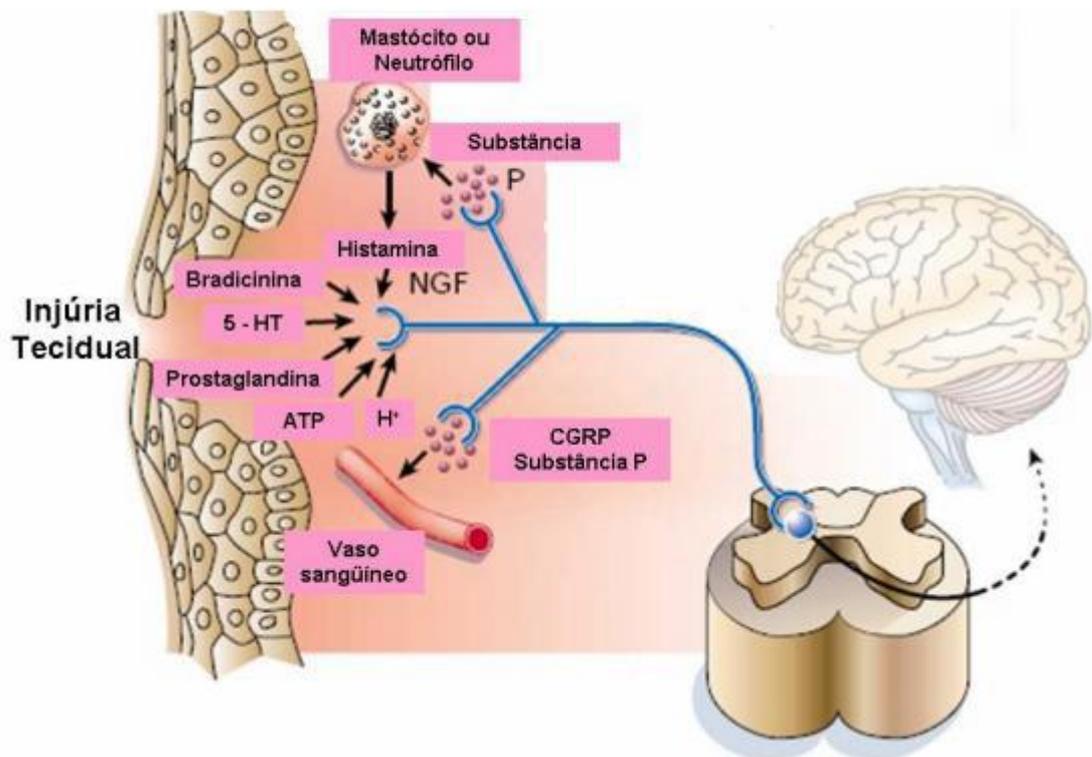
### 1.8.1. Tipos de Dor

A dor é um fenômeno biológico complexo que envolve intrincados componentes neurofisiológicos, comportamentais, psicossociais e afetivo (MCDOUGALL, 2011). Do ponto de vista temporal a dor pode ser classificada em aguda, que é aquela de curta duração, e crônica, dor demorada, que quase sempre denota um estado patológico.

Outros tipos de dor que podem ser citados são (RANG *et al.*, 2003):

1) Nociceptiva – é a dor cujo mecanismo resulta da ativação de determinadas subpopulações de neurônios sensitivos primários específicos que transmitem a informação nociceptiva da medula espinhal de onde é retransmitido para níveis supra-espinhal (JULIUS; BASBAUM, 2001; VERRI *et*

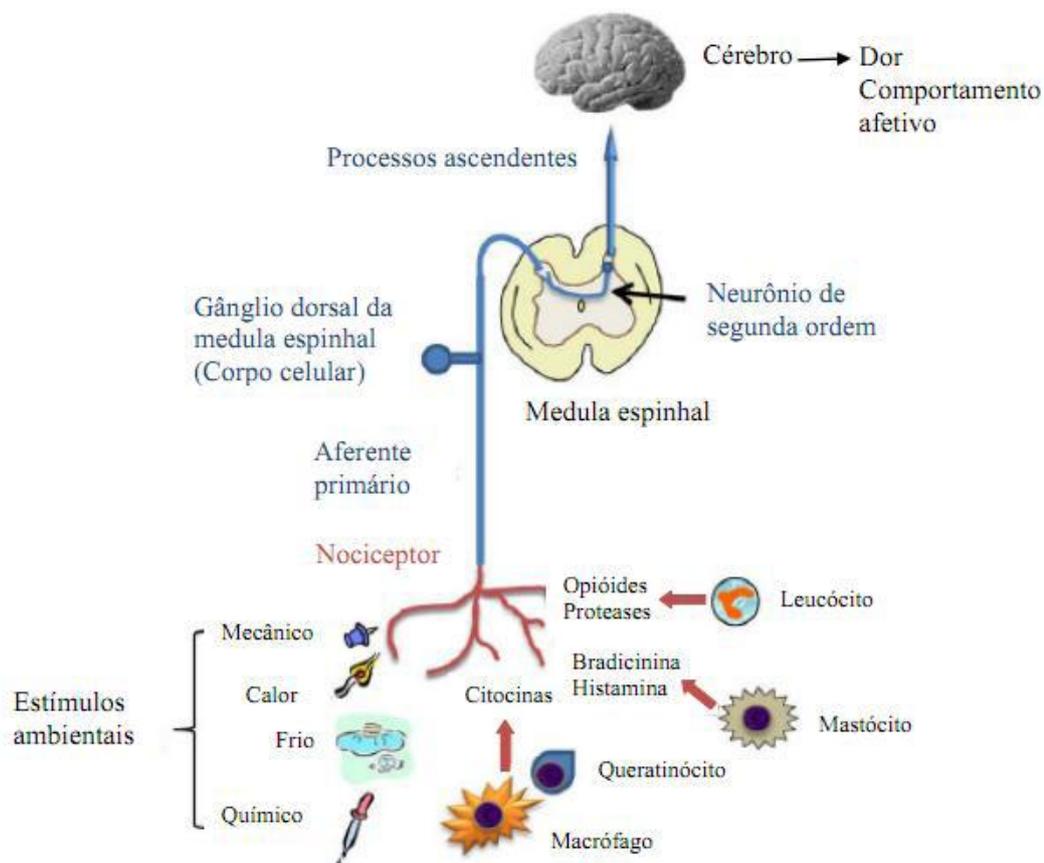
*al.*, 2006). Portanto é uma resposta direta a um evento indesejado associado à lesão tecidual e difere de dor simplesmente por não apresentar o componente afetivo (RANG *et al.*, 2007). Nociceptores são receptores em tecidos que são ativados automaticamente por estímulos dolorosos específicos. Há dois tipos de nociceptores, os de alto limiar, que respondem a deformações mecânicas e os nociceptores polimodais, que respondem a uma variedade de mediadores inflamatórios como: íons de hidrogênio (prótons), citocinas, bradicinina, histamina, 5-hidroxitriptamina (5-HT), prostaglandinas e leucotrienos. Estes mediadores inflamatórios agem nos nociceptores, ativando-os e sensibilizando-os (Figura 1) (STEEDS, 2009). Os nociceptores polimodais correspondem ao principal tipo de neurônio sensitivo periférico que responde a estímulos nocivos.



**Figura 6** – Mediadores inflamatórios ativando e sensibilizando os nociceptores  
Modificado de Julius & Basbaum, 2001.

O sistema nociceptivo também possui fibras nervosas caracteristicamente distribuídas nos tecidos, sendo responsáveis pela informação dolorosa. Dentre estas fibras, a A-delta ( $A\delta$ ) e a C estão associadas a inflamação e são capazes de transduzir impulsos provenientes de estímulos químicos, térmicos e mecânicos, em impulsos elétricos, que são transmitidos ao sistema nervoso central, após a sua sensibilização. As fibras  $A\delta$  são mielinizadas e permitem uma rápida transmissão de estímulos (cerca de 12 a 30 m/segundo) que perdura por um curto período, enquanto que as fibras C, não mielinizadas, transmitem seus impulsos mais lentamente (cerca de 0,5 a 2 m/segundo) por um período mais longo (RANG *et al.*, 1991; JULIUS; BASBAUM, 2001).

Ao entrar no corno dorsal da medula espinhal, os impulsos são transmitidos através de neurônios de segunda ordem ao longo de vias ascendentes para o cérebro (Figura 2). Ao veicular esses impulsos para áreas específicas do cérebro, como o córtex somatosensorial e a amígdala os sinais eletroquímicos são moldados em uma experiência física que incorpora reflexos motores de proteção e respostas emocionais (MCDUGALL, 2011).



**Figura 7** – O caminho no qual a dor percorre, da periferia até o cérebro. Estímulos nocivos podem ativar os nociceptores causando a sensação de dor. Varias células residentes nas proximidades das terminações nervosas podem liberar mediadores que podem tanto aumentar quanto reduzir o limiar de ativação dos nervos. Adaptado de McDougall (2011).

- 2) Neurogênica – é aquela que ocorre com o dano diretamente sobre as inervações. A distribuição da dor neuropática pode ser variável de indivíduo para indivíduo, devido a peculiaridades anatômicas. Existem fibras sensitivas e motoras que fazem conexões intradurais entre segmentos de medula (um dano neural perto do forame intervertebral pode afetar fibras nervosas associadas com mais de um nível de medula). Os neurônios do SNC se tornam sensibilizados depois de danos dos nervos periféricos e ampliam seus campos receptivos. Em decorrência disto, sintomas neuropáticos periféricos podem ir além dos limites dermatomais típicos (NEE E BUTLER, 2010).
- 3) Neuropática – dor causada por lesão ou disfunção do sistema nervoso, como resultado da ativação anormal da via nociceptiva (fibras de pequeno calibre e trato espinotalâmico) (SCHESTATSKY, P., 2008).
- 4) Inflamatória – caracterizada pela sensibilização dos neurônios produzida pela ativação da cascata de citocininas, as quais são substâncias de natureza peptídica, liberadas no tecido inflamatório e de células do sistema imunobiológico.
- 5) Dor psicogênica – é aquela que não possui causa orgânica, mas se expressa em consequências de problemas psicológicos (MENEZES, 1999) .

## 1.9 INFLAMAÇÃO

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

Os sinais cardeais visíveis da inflamação do tecido já foram descritos por Cornelius Celsus, e incluem: edema, eritema, calor, dor e perda da função já sendo

conhecidos por civilizações antigas. Hieróglifos egípcios e textos antigos da Grécia e China já descreviam a inflamação. Séculos mais tarde, em 1794, John Hunter, um cirurgião escocês, escreveu que “A inflamação em si não deve ser considerada como uma doença, mas como uma operação salutar conseqüente a alguma violência ou alguma doença” (SERHAN, 2007).

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

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

O processo inflamatório é composto de três fases, cada qual mediada por diferentes mecanismos: a fase inicial, chamada de fase aguda que é caracterizada principalmente por vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular, geralmente tem duração relativamente curta e as primeiras manifestações clínicas observadas incluem os sinais cardinais da inflamação. Além disso, esta fase apresenta infiltrado predominantemente neutrofílico; uma fase tardia, com a infiltração de leucócitos e células fagocitárias; e a fase proliferativa crônica, na qual ocorre degeneração tecidual e fibrose (SPINOSA *et al.*; GILMAN *et al.*, 2006).

A resposta inflamatória aguda para ser bem sucedida deve resultar na eliminação dos agentes infecciosos seguido por uma resolução e fase de reparação, que é mediada principalmente por macrófagos recrutados e macrófagos residentes nos tecidos (MEDZHITOV, 2008). Devido à sua localização estratégica, próximo ao local da lesão, as células residentes do tecido são os indutores primários da reação inflamatória (SCHRODER; TSCHOPP, 2010). A resposta de fase aguda também compreende

mudanças na concentração plasmática de proteínas hepáticas (proteínas de fase aguda), hormônios, metabólitos intermediários, neutrofilia e alteração do *set point* cerebral de controle dos sinais de doença, sendo coletivamente chamados de “comportamento de doença”. Esse comportamento inclui o desenvolvimento de febre, perda do apetite, aumento do ciclo de sono, diminuição da atividade motora, redução da libido e diminuição do comportamento de alerta (ROTH *et al.*, 2009).

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

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

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

#### 1.9.1. Eventos vasculares

As células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos regulam uma variedade de funções como tônus vascular, coagulação do sangue, inflamação, angiogênese e a

homeostasia do sangue. Um aumento significativo e duradouro da permeabilidade vascular é uma marca registrada de doenças inflamatórias agudas, como acidose, é um componente essencial de metástase do tumor, angiogênese, e arteriosclerose. A seletividade da barreira em relação as proteínas plasmáticas e outros solutos é um fator chave na manutenção do equilíbrio de fluidos dos tecidos (WANG; DUDEK, 2009).

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

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

### 1.9.2. Eventos celulares

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

As células endoteliais são células achatadas de espessura variável que recobre o interior dos vasos sanguíneos, especialmente os capilares, formando parte da sua parede.

Essas células atuam principalmente na homeostasia, regulando a angiogênese, participando da resposta imune, gerando citocinas que modulam a atividade dos linfócitos, entre outros.

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

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

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

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

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

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

Os basófilos por sua vez, estão localizados imediatamente na parte externa de muitos dos capilares do organismo e diferentemente dos demais granulócitos, não são encontrados no tecido conjuntivo e é a menor célula granulocítica, possuindo um núcleo volumoso, bilobado ou multilobado, cromatina nuclear perifericamente condensada em grânulos citoplasmáticos menores do que os outros granulócitos. Constituem menos de

1% dos leucócitos do sangue, sendo difíceis de ser encontrados nos esfregaços de sangue, apresentando a função de secretar mediadores inflamatórios que aumentam a permeabilidade vascular e fatores quimiotáticos que recrutam outras células inflamatórias (RANG *et al.*, 2007).

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

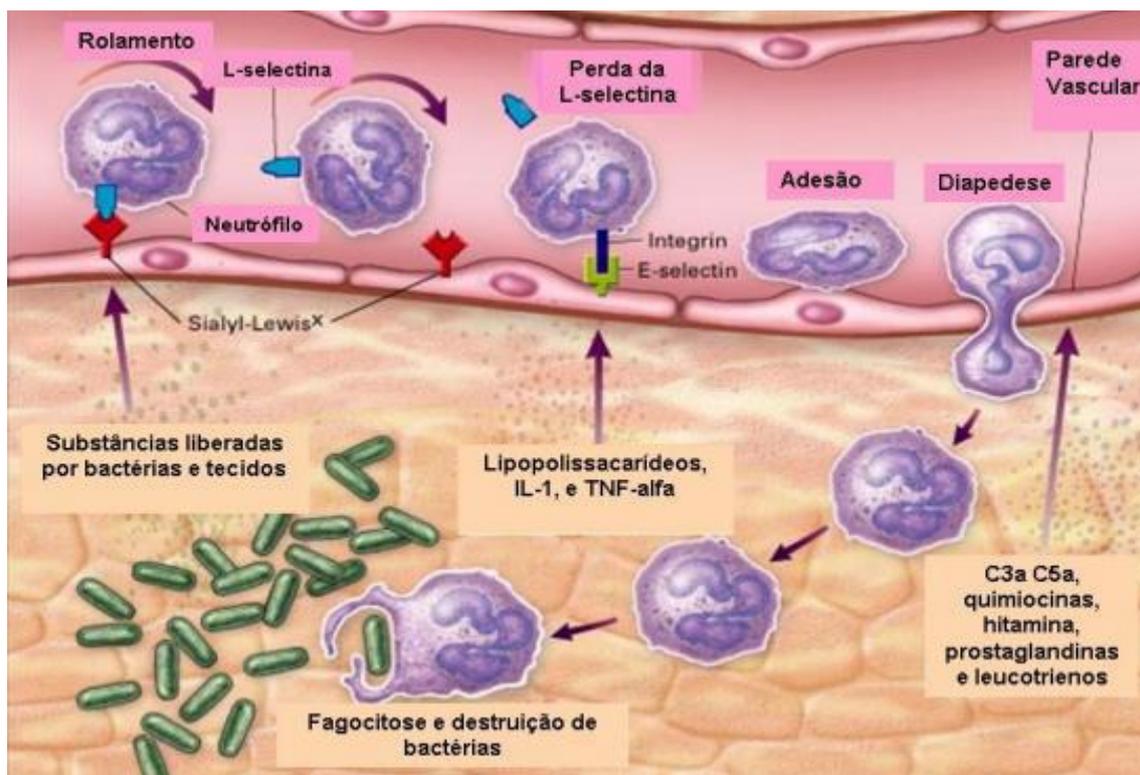
Os monócitos são células de núcleo ovóide em forma de rim ou de ferradura, que representam o estágio mais maduro. Os monócitos do sangue representam uma fase na maturação da célula mononuclear fagocitária originada na medula óssea. Essa célula passa para o sangue, onde permanece por alguns dias, e atravessando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

Os linfócitos têm núcleo esférico e citoplasma escasso, que aparece como anel delgado em volta do núcleo. São divididos de acordo com suas propriedades e nos receptores localizados em suas membranas em 2 tipos: Linfócito B e Linfócito T. Quando entra em contato com antígenos, os linfócitos B se dividem e se diferenciam em células plasmáticas, que sintetizam e secretam anticorpos para o sangue, linfa e fluido intercelular. Os linfócitos T são os responsáveis pelas respostas imunitárias de base celular, que não dependem dos anticorpos circulantes (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004).

Os fenômenos celulares da inflamação envolvem a ativação das capacidades celulares de movimentação, adesão e englobamento de partículas. O principal fenômeno é a saída de leucócitos da luz vascular e sua migração para o local lesado (Figura 3). Os leucócitos podem sair do interior do vaso para o foco infeccioso atraídos por agentes

quimiotáticos, tanto de origem endógena (produtos liberados pelas próprias células através da cascata do sistema do complemento, da lipoxigenase, citocinas, etc.) quanto de origem exógena (agentes liberados pelo microrganismo invasor). Além disso, os agentes quimiotáticos podem ser de ação direta, que atraem diretamente a célula imune ou de ação indireta, que agem estimulando as células residentes (macrófagos, mastócitos, fibroblastos, etc) a liberar agentes quimiotáticos como o lipopolissacarídeo bacteriano, IL-1 e TNF- $\alpha$  (RIBEIRO *et al.*, 1991).

Com a descoberta de integrinas, selectinas e seus ligantes respectivos, e quimiocinas e seus receptores, a cascata de adesão leucocitária emergiu como um conceito que começou a explicar o recrutamento de subconjuntos de leucócitos para locais específicos (LEY *et al.*, 2007). Os leucócitos são recrutados para o local da inflamação em uma série de passos adesivo que permitem que eles se locomovam ao longo da fronteira das paredes endoteliais, atravessam o endotélio e a membrana basal endotelial e migram através do tecido intersticial (MULLER, 2011).



**FIGURA 08** - Seqüência de eventos leucocitários na inflamação. A figura representa às etapas de rolamento, adesão e migração celular ativadas após a invasão tecidual por bactérias, bem como a liberação de mediadores locais, que estarão estreitamente relacionados aos eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória, adaptado de DELVES;ROITT, (2000).

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

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

### 1.9.3. Mediadores químicos

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

Histaminas e serotoninas são liberadas na degranulação de mastócitos e plaquetas e apresentam efeitos complexos sobre a vasculatura, provocando aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação ou vasoconstrição. As conseqüências imediatas de sua liberação podem resultar em problemas vascular e respiratório durante o choque anafilático (MEDZHITOV, 2008).

O fator de ativação plaquetária (acetil-gliceril-éter-fosfricolina - PAF) é um potente mediador lipídico pró-inflamatório que atua em concentrações extremamente

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

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

desenvolvimento neuronal, na cicatrização de feridas, na função renal, no tônus vascular e nas respostas imunes (KUMMER; COELHO, 2002; KVATERNICK *et al.*, 2007). As lipoxigenases, presentes principalmente no citosol, são encontradas nos pulmões, plaquetas, mastócitos e leucócitos. A principal enzima do grupo é a 5-lipoxigenase, que atua sobre o ácido aracdônico produzindo o ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE), que é convertido em leucotrieno A4 (LTA4). O LTA4 pode ser convertido em leucotrieno B4 (LTB4) que é um importante agente responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, causa aderência, quimiotaxia e ativação de polimorfonucleares e monócitos, além de estimular a proliferação de macrófagos e linfócitos e a produção de citocinas por essas células (GOODMAN *et al.*, 2009).

#### 1.9.3.1. Citocinas

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

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

#### 1.9.3.2. Óxido nítrico

O óxido nítrico é um mediador de pequeno peso molecular com diversas funções que incluem vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e remodelação vascular. Ele é um radical livre formado endogenamente por uma família de enzimas, óxido nítrico sintases (NOS, EC 1.14.13.399) (EISERICH *et al.*, 1998), através da conversão de L-arginina em L-citrulina. Nos líquidos orgânicos, o NO produzido se oxida nos ânions nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), sequencialmente (IGNARRO, 1990, MONCADA *et al.*, 1991). Foram identificadas três diferentes isoformas de NOS em células de mamíferos (produtos de diferentes genes): NOS endotelial (eNOS ou NOS III) em células endoteliais, epiteliais e miócitos cardíacos; NOS neuronal (nNOS ou iNOS) em neurônios, células musculares esqueléticas e neutrófilos (GREENBERG *et al.*, 1998) e a NOS induzida (iNOS ou NOS II), em macrófagos, hepatócitos, células musculares lisas (TITHERADGE, 1999). O NO está envolvido em diversos processos fisiológicos e patológicos. Sua importância biológica é representada pela capacidade de atuar como um importante segundo-mensageiro, ativando ou inibindo moléculas-alvo envolvidas em diferentes processos como regulação do tônus vascular, controle imunológico e neurotransmissão (RÄTHEL *et al.*, 2003; BARRETO *et al.*, 2005).

## 2. JUSTIFICATIVA

As plantas possuem macromoléculas de grande interesse biotecnológico que incluem grupos como, polifenóis, estrógenos, lectinas, oligossacarídeos e ácidos graxos poliinsaturados. Além disso, elementos de natureza protéica, glicídica, lipídica e outros constituintes químicos, mostram-se possuidores de atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* (ORZECHOWSKI *et al.*, 2002). Portanto, a bioprospecção de novos compostos biológicos, principalmente de organismos aquáticos, com possíveis usos nas ciências médicas e na biotecnologia, vem se expandindo nos últimos anos (TARANTINO, 2005). Segundo Haefner. (2003), esses bioprodutos tornaram-se candidatos a novas drogas, onde a maioria dessas moléculas já se encontra no estágio pré-clínico e algumas já estão no mercado, como a citarabina.

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

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

### 3.0. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

Isolar e avaliar os efeitos na nocicepção e inflamação de uma fração polissacarídica da alga marinha vermelha *Digenea simplex* em modelos clássicos de nocicepção (em camundongos) e inflamação aguda (em ratos).

#### 3.2. Específicos

- Extrair por digestão enzimática e avaliar o rendimento dos polissacarídeos sulfatados totais da alga *D. simplex*;
- Determinar a composição química dos polissacarídeos sulfatados obtidos da extração enzimática da alga *D. simplex*;
- Investigar o efeito antinociceptivo do PS de *D. simplex*, em camundongos, através dos testes de contorções abdominais, placa quente e formalina;
- Avaliar os efeitos antiinflamatório, em ratos, utilizando o modelo de colite e edema de pata;
- Avaliar a toxicidade do PS de *D. simplex* por dose repetida em camundongos, através da análise de parâmetros bioquímicos e histológicos dos órgãos.

## 4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Extração dos Polissacarídeos

A alga marinha úmida *Digenea simplex*, coletada na região costeira da Praia de Flecheiras, Trairí, Estado do Ceará, passou por um processo de lavagem com água destilada para retirada de epífitas e resíduos incrustantes, secagem à temperatura ambiente, exposição ao sol para despigmentação, seguido por maceração com nitrogênio líquido. A extração do polissacarídeo de *Digenea simplex* foi realizada como previamente reportado (PONTES et al., 2009), com algumas modificações. Inicialmente, a alga triturada (5 g) foi previamente hidratada em 250 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (AcNa) (Vetec Química) (pH 5,0) contendo EDTA 5 mM (QEEL) e cisteína 5 mM (Sigma Chemical), e digerida com uma solução de papaína bruta (30 mg mL<sup>-1</sup>) (Vetec Química) durante 6h a 60°C em banho-maria (MARCONI, modelo MA 159). Em seguida, o material foi filtrado, centrifugado (2725 × g; 4°C; 30 min.) e, ao sobrenadante, foram adicionados 48 mL de cloreto cetilpiridínio (CCP) (Sigma Chemical) a 10% (24h; 25°C) para a precipitação dos carboidratos. Logo após uma nova centrifugação, o extrato polissacarídico foi lavado (200 mL; CCP 0,05%), dissolvido em uma solução (aproximadamente 150 mL) de NaCl 2 M: etanol comercial (100: 15; v v-1) e novamente precipitado pela adição de 200 mL de etanol comercial (24h; 4°C). Em seguida, o material foi lavado com 200 mL de etanol comercial a 80% (2 ×), etanol comercial (200 mL; 1 ×) e, finalmente, submetido à secagem por estufa em circulação de ar (3h; 60°C) (MARCONI, modelo MA 035).

### 4.2. Métodos Analíticos para Análise dos Polissacarídeos

#### 4.2.1. Determinação do Rendimento do Polissacarídeo Extraído de *D. simplex*

O rendimento da extração foi calculado à partir de 5 g da alga seca triturada em nitrogênio líquido. Após a extração e secagem dos polissacarídeos, estes foram pesados em balança analítica e foi calculado o rendimento da extração.

#### 4.2.2. Dosagem de Proteínas

A quantificação de proteínas nas amostras de polissacarídeos foi calculada por microanálise elementar a partir da porcentagem de nitrogênio (%N) usando um fator de correção de 6,25, proposto por MARKS, BAUM e SWAIN (1985).

#### 4.2.3. Dosagem de Sulfato

As dosagens de sulfato nos polissacarídeos de *D.simplex* obtidos por extração enzimática foram determinadas por microanálise elementar (Perkin Elmer CHN 2400), proposto por MARKS, BAUM e SWAIN (1985)

#### 4.2.4. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FT-IR)

Espectros na região do infravermelho das amostras dos polissacarídeos de *G. birdiae* foram produzidos com espectrofotômetro Shimadzu IR (modelo 8300) na região de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ , em pastilhas de KBr.

#### 4.2.5. Ressonância Magnética Nuclear (RMN $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$ )

Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN)  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  foram feitas no Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará em espectroscópio da marca Bruker, modelo AVANCE – DRX – 500.

Para a obtenção dos espectros de RMN, uma amostra do polissacarídeo foi dissolvida em água deuterada ( $\text{D}^2\text{O}$  -  $\sim 30\text{ mg/mL}^{-1}$ ) em tubos de diâmetro externo de 5 mm. O ensaio foi realizado a  $70^\circ\text{ C}$  por 12 horas usando Sodium 2,2 - dimethylsilapentane - 5 - Sulfonate (DSS) como padrão interno (0.00 ppm para  $^1\text{H}$ ).

### 4.3. Ensaio Biológicos

#### 4.3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando 180 - 220 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos com água e alimentação *ad libitum* no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Dezesesseis a dezoito horas antes, em todos os experimentos, os

animais foram colocados em jejum, mas com livre acesso à água. Todos os tratamentos e procedimentos cirúrgicos foram realizados de acordo com o “Guia de cuidados em uso de animais de laboratório” do National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA). Todos os experimentos foram realizados três dias após a indução da colite.

#### 4.3.2. Aparelhos e equipamentos laboratoriais

- Agitador para tubos de ensaio (Marconi, modelo TE089).
- Agulhas.
- Alicate para deslocamento cervical.
- Balanças analíticas (Marte, modelo AL200 e Ohaus , modelo AS260D).
- Balança para pesagem de animais (Filizola, modelo ID 1500).
- Béqueres.
- Câmara de Neubauer (0,100/0,0025mm<sup>2</sup>)
- Centrifuga excelsa Baby (FANEM , modelo 248 )
- Contador diferencial de células de 8 teclas (Clay Adams)
- Contador de células totais (Veeder Root)
- Espátulas
- Estufa (Olidef, modelo A42)
- Freezer
- Geladeira
- Laminas e lamínulas para microscopia
- Luvas cirúrgicas
- Material cirúrgico (pinças , bisturi e tesouras)
- Micropipetas (Gilson)
- Microscópio óptico binocular (EMBRAEME)
- Papel de filtro
- Pipetas Pasteur de plástico (Sigma )
- Plestimografo (UGO - BASILE )
- Ponteiras.
- Provetas (Simax)
- Seringas 1; 5 e 10 ml (BD PLASTIPÁK) e agulhas 29 G e 25 G (Benson-Dickson)
- Tubos de polipropileno para centrifuga de 15 ml (Falcon)
- Tubos de ensaio de vidro e plástico (Gibco)

#### 4.3.3. Soluções, drogas e corantes utilizados

- Carragenina (BDH Chemicals Ltda, SIGMA)
- Dextrana (Dextran 70 , Pharmacia , UPPSALA)
- Eosina (MERCK)
- Hematoxilina (REAGEN)
- Heparina sódica (5000 ui / ml; Cristalia)
- Cloreto de Sódio (Vetec)
- Álcool 70% (Alcoollux)
- Naloxona (Sigma)
- PGE2 (Sigma)
- TNBS (Sigma)
- PBS-tween 20, 0,1% (v/v);
- Etanol absoluto (Merck)

#### **Solução de Turk** (diluidor de glóbulos brancos):

- Acido acético Glacial P. A (Merck)..... 20 ml
- Violeta Genciana..... 2,0 ml
- Água destilada..... 1000 ml

#### **Solução para Pletismografo:**

- Cloreto de Sódio (Vetec )..... 45,0 mg
- Solução Padrão.....0,3 ml
- Água destilada.....100 ml

#### **Solução para o ensaio de mieloperoxidase.**

- Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB):

HTAB (Sigma) ----- 5 g;

Tampão fosfato de potássio ----- 1 L.

#### **Peróxido de hidrogênio 0,1%:**

Peróxido de hidrogênio 30% (Vetec) -----1 mL;

Água destilada -----29 mL.

#### **Solução de o-dianisidina (DDI):**

O-dianisidina (Sigma) -----16,7 mg;

Tampão fosfato de potássio -----10,0 mL;

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -----50,0 µL;

Água destilada -----90,0 mL.

#### 4.3.4. Grupos experimentais

**Grupo 1:** Salina administrada via transanal será o grupo controle.

**Grupo 2:** Etanol a 50% via transanal, com realização dos protocolos experimentais sugeridos **3 ou 14** dias após a administração dessa substância.

**Grupo 3:** Etanol + TNBS (20%) via transanal, com a realização dos protocolos experimentais sugeridos **3 ou 14** dias após a administração dessa solução.

**Grupo 4:** Sal + carragenina ou PGE2.

**Grupo 5:** TNBS + carragenina ou PGE2.

**Grupo 6:** Etanol à 50% + carragenina ou PGE2.

**Grupo7:** TNBS+ L-Noarg (antagonista da NOSn) + L-Arginina+ carragenina ou PGE2

**Grupo 8:** Salina+ L-Noarg (antagonista da NOSi) + carragenina ou PGE2

**Grupo 9:** TNBS ou salina + Naloxona + carragenina ou PGE2.

#### 4.4 Edema de pata induzido por carragenina ou dextran

Os animais foram divididos nos seguintes grupos: controle (sem colite) + carragenina ou dextran, TNBS + carragenina ou dextran e etanol a 50% + carragenina ou dextran. Esses experimentos foram realizados 3 ou 14 dias após a indução das colites. A carragenina (500 µg/pata, 100µl) ou dextran (500 µg/pata, 100µl) foram administrados intraplantarmente (ipl.). O volume da pata traseira direita de cada rato foi medido usando pletismômetro (UGO BASILI) antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero). Em seguida, foi injetado 0,1 ml do estímulo por via subplantar nos animais nessa mesma pata. O volume da pata foi avaliado 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção da carragenina ou 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 hrs após a injeção do dextran, usando o mesmo pletismômetro. Foram utilizados esses tempos de medição já que o pico do edema induzido por carragenina ocorre na 3ª h após a injeção desse estímulo e o do dextran entre 30 min e 1h após o estímulo. O edema foi calculado como a variação de volume, isto é, a diferença entre o volume em um determinado tempo após o estímulo e o volume da pata antes do estímulo inflamatório (tempo zero).

#### 4.5. Ensaio para mieloperoxidase no colon e na pata de animais com ou sem colite

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente, predominantemente, nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos. Resumidamente, 50 a 100 mg de colon submetidos ao tratamento com TNBS ou etanol a 50% e dos animais controle (salina), ou a região subplantar de patas de ratos com ou sem colite tratadas com carragenina foram colocados num tampão 1 (NaCl 0,1 M + NaEDTA 0,015 M/L de NaPO<sub>4</sub> 0,02 M em pH 4,7). Posteriormente, homogeneizados num Politron (13000 rpm). Sendo centrifugado a 15 minutos (3000 rpm). Logo em seguida, o sobrenadante foi retirado e o precipitado, novamente foi centrifugado no tampão 1 e colocado para centrifugar nas mesmas condições. O sobrenadante foi, mais uma vez, retirado e, então, o precipitado foi homogeneizado (Politron - 13000 rpm) em um tampão 2 [HTAB (0,05%)/200 ml de NaPO<sub>4</sub> 0,05M]. A próxima etapa foi colocar esse homogenato para congelar e descongelar em nitrogênio líquido (2X). Posteriormente, o homogenato foi centrifugado a 10000-20000 rpm por 15 minutos. Finalmente, o sobrenadante foi pipetado na placa (5-10 µl) + 45 µl de NaPO<sub>4</sub> 0,08M e mais a solução de leitura [TMB 25 µl (5 min) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µl (5 min)]. A reação foi terminada com o acréscimo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 µl (4M) e lida em um leitor de placa a 450nm. Assim, o infiltrado neutrofílico foi obtido a partir de uma curva padrão de neutrófilos.

#### 4.6 Migração de neutrófilos para a cavidade pleural induzida por carragenina

Os animais foram divididos nos seguintes grupos: controle (sem colite) + salina estéril (cavidade pleural), controle + carragenina (500 µg/cavidade), colite induzida por etanol a 50% + carragenina (500 µg/cavidade) e colite induzida por TNBS + carragenina (500 µg/cavidade). Todos os experimentos foram realizados três dias após a indução das colites. Com o objetivo de se avaliar a migração de neutrófilos para a cavidade pleural, foram injetados nessa cavidade 500 µg de carragenina diluídos em 1 mL de salina estéril ou apenas 1 mL de salina estéril. Após quatro horas, a cavidade peritoneal foi lavada com 10 mL da solução de PBS heparinizado, massageada e incisada com bisturi para coleta do líquido com pipeta Pasteur. As contagens totais e diferenciais foram feitas de acordo com o método descrito por Souza e Ferreira (1985).

#### 4.7 Avaliação da atividade antinociceptiva da colite induzida por tnbs – participação da via do óxido nítrico

Três dias após a indução ou não das colites, as atividades antinociceptivas das mesmas foram avaliadas 3 e 4 horas após a injeção intraplantar de carragenina (500µg/pata; 100 µl) ou PGE2 (400ng/pata; 50µl) nas patas direitas de animais com ou sem colite através da medida da força em gramas (g), aplicada por meio de um analgesímetro digital (Insight). Lnoarg (100µg/pata; 100 µl), que é um antagonista da enzima óxido nítrico sintetase neuronal, foi administrado subcutâneamente na região plantar das patas direitas de ratos 1 hora antes da administração da carragenina ou PGE2. A L-arginina, que é um substrato para enzima óxido nítrico sintetase, foi administrada intraperitonealmente 10 minutos antes da injeção do L-Noarg. Todas essas drogas foram diluídas em solução salina a 0,9%. Nesse teste os animais foram transferidos para gaiolas individuais onde serão mantidos previamente por trinta minutos e condicionados a receber estímulos mecânicos no tempo zero (basal) que é antes do estímulo hipernociceptivo, e três ou quatro horas após a administração do estímulo (Carragenina ou PGE2). Os resultados foram expressos como a variação da força expressa em gramas entre os tempos avaliados, isto é, a diferença entre a média da força em gramas antes do estímulo hipernociceptivo e a média da força em gramas num determinado tempo após o estímulo (3 e 4 horas após o estímulo).

#### 4.7 Avaliação da atividade antinociceptiva – participação da enzima guanilato ciclase solúvel (GMPc)

Três dias após a indução ou não das colites, as atividades antinociceptivas das mesmas foram avaliadas 3 e 4 horas após a injeção intraplantar de carragenina (500µg/pata; 100 µl) ou PGE2 (400ng/pata; 50µl) nas patas direitas de animais com ou sem colite através da medida da força em gramas (g), aplicada por meio de um analgesímetro digital (Insight). Todas essas drogas foram diluídas em solução salina a 0,9%. ODQ (8µg/pata, 50µl) foi diluído em uma solução de DMSO a 2% em solução salina a 0,9%. Essa droga, que é uma bloqueadora específica da guanilato ciclase solúvel, foi administrada 30min antes da administração de carragenina ou PGE2. Nesse

teste os animais foram transferidos para gaiolas individuais onde serão mantidos previamente por trinta minutos e condicionados a receber estímulos mecânicos no tempo zero (basal) que é antes do estímulo hipernociceptivo, e três ou quatro horas após a administração do estímulo (Carragenina ou PGE2). Os resultados foram expressos como a variação da força expressa em gramas entre os tempos avaliados, isto é, a diferença entre a média da força em gramas antes do estímulo hipernociceptivo e a média da força em gramas num determinado tempo após o estímulo (3 e 4 horas após o estímulo).

#### 4.8 Análise estatística

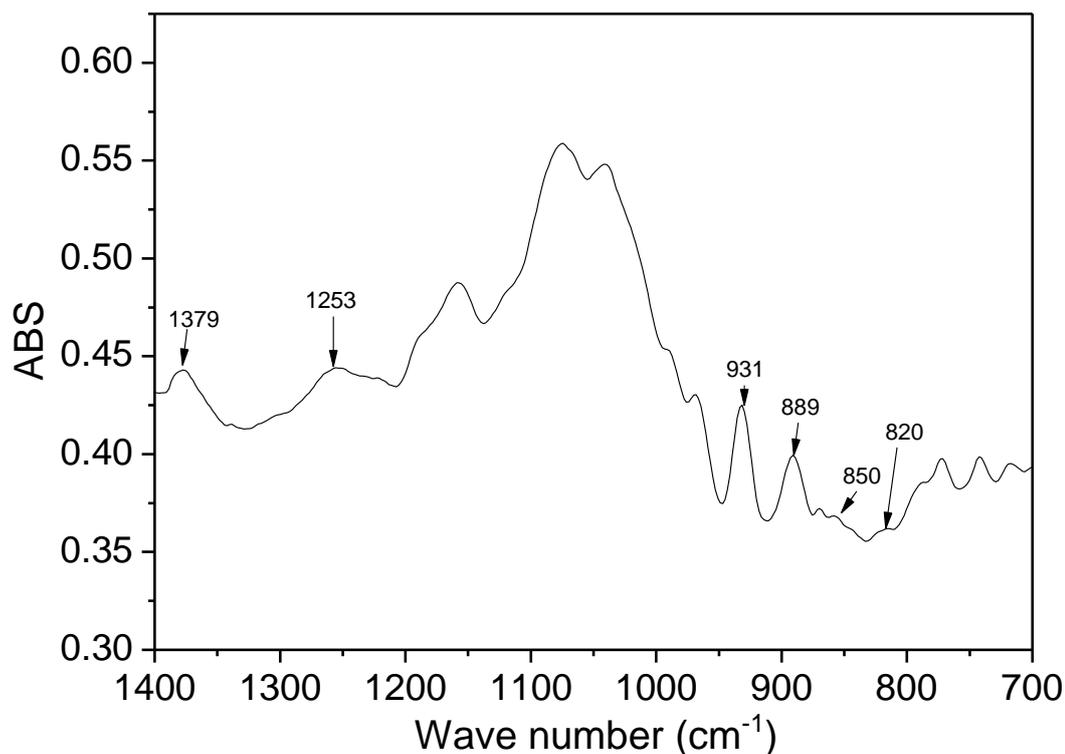
A análise estatística foi realizada empregando o teste de análise de variância (ANOVA). Quando houve diferença significativa entre os grupos, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis/Dunn ou teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos ou como média  $\pm$  E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana  $\pm$  desvio padrão (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Análise estrutural da galactana sulfatada de *D. simplex* (PLS)

#### 5.1.1. Espectro de FT - IR de polissacarídeo solúvel de *D. simplex*

O espectro de FT - IR de polissacarídeo solúvel a partir de *D. simplex* é descrito na Figura 9 . As bandas na região de  $1400 - 700 \text{ cm}^{-1}$  são características de agarocoloides ( Lahaye & Yaphe , 1989 ; Mollet et al , 1998 ; Rochas, Lahaye e Yaphe , 1986; Chopin & Whalen , 1993; Prado - Fernandes , Rodrigues - . Vazquez, Tojo & Andrade, 2003 , Maciel et al, 2008 , Melo et al. , 2002). A banda a  $1253$  e  $931$   $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída à vibração  $\text{S} = \text{O}$  do grupos sulfato  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  de 3,6-androgactose respectivamente . A região de  $800-850 \text{ cm}^{-1}$  é usado para caracterizar o padrão de sulfato de agarocoloides dos polissacarídeos de algas. A presença de bandas de baixa intensidade a  $850$  e  $820 \text{ cm}^{-1}$  pode sugerir um pequeno grau de substituição de sulfato em C- 4 e C - 6 de galactose .

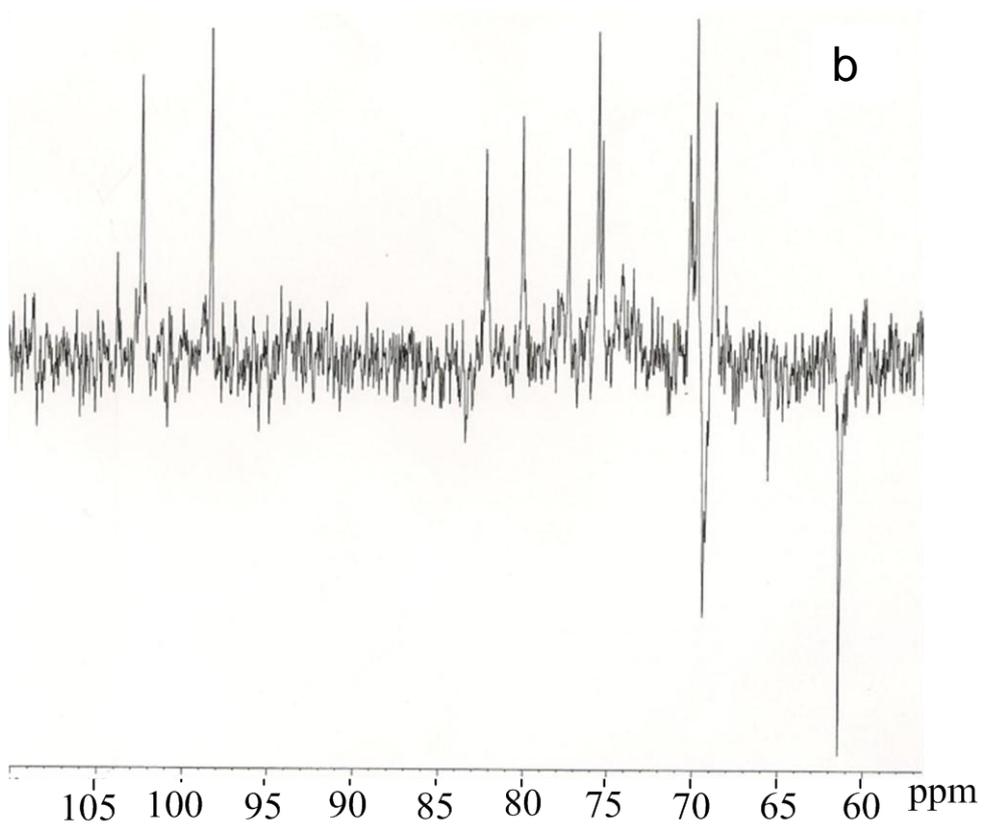
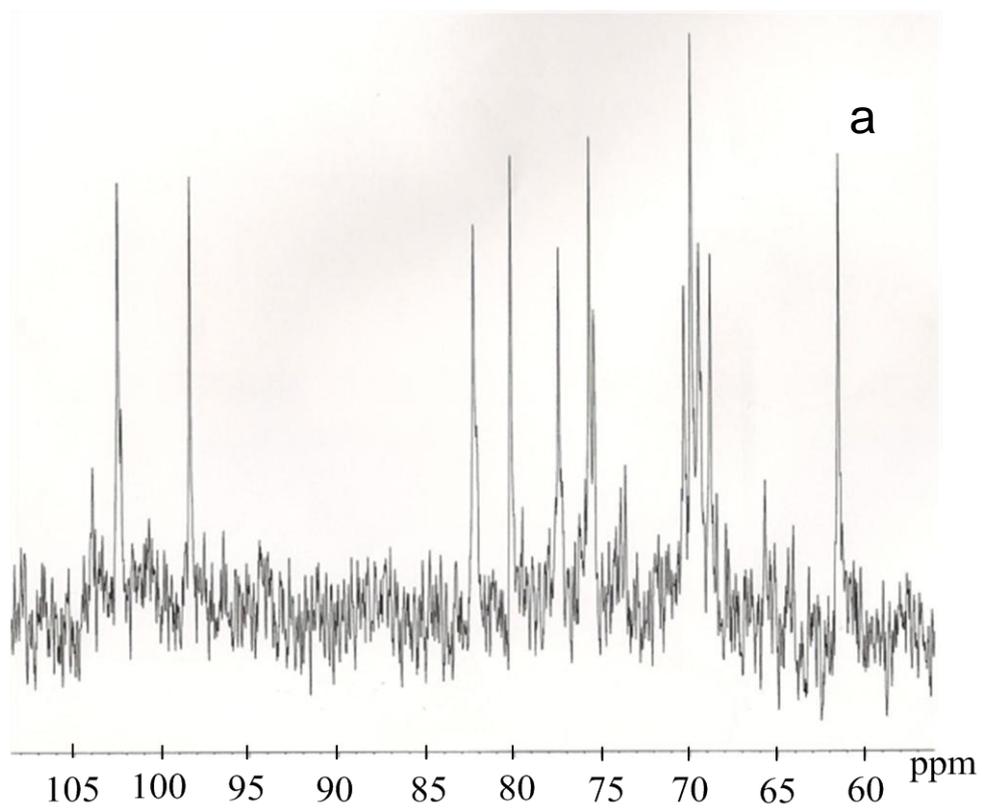


**FIGURA 9** - Espectro de FT - IR de polissacarídeo solúvel da alga marinha *D. simplex*

A região anomérica de RMN de  $^{13}\text{C}$  ( Figura 10a ) mostra dois sinais principais, que foram atribuídas com base nos dados da literatura ( Miller & Furneaux , 1997 ; Usov , Yarotsky & Shashkov , 1980 ; Lahaye , Yaphe , Vietname & Rochas, 1989 ; Valente et al . , 1992), C - 1 de  $\beta$  - D - galactose ligada a 3,6  $\alpha$  - L - anidrogactose em  $\delta$  102,6 e C - 1 de 3,6- anidro-  $\alpha$  - L - galactopiranoose em  $\delta$  98,4 . A DEPT 135 ° experimento foi utilizado para investigar a presença de grupos CH<sub>2</sub> , considerando que os sinais de seqüência de pulso dos carbonos que carregam dois prótons têm amplitude oposta aos carbonos CH e CH<sub>3</sub>. A DEPT 135 ° espectro de D. simplex (Fig. 10b ) mostra dois sinais intensos CH<sub>2</sub> em  $\delta$  61,5 e 69,5  $\delta$  atribuído a C - 6 da  $\beta$  - D - galactose e 3,6  $\alpha$  - L - anidrogactose respectivamente . O sinal de baixa intensidade CH<sub>2</sub> observado em  $\delta$  65.7 pode ser atribuído a C - 6 da  $\alpha$  - L - galactose - 6 sulfato .

Os doze principais sinais observados no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  podem ser atribuídos com base nos dados da literatura ( Miller & Furneaux , 1997 ; Usov , Yarotsky & Shashkov , 1980 ; Lahaye , Yaphe , Vietname & Rochas, 1989 ; . Valente et al , 1992 , . Maceiel , et al , 2008, Melo et al , 2002) a C1 e C- 6 de  $\beta$  - D - galactose ( 102,5 ; 70,3 ; 82,3 ; 68,9 ; 75.5 e 61.5 ) e de , 6  $\alpha$  - L - anidrogactose ( 98,4 ; 69.9 ; 80.2 ; 77.4 ; 75.7 e 69.5 ) .

Os espectros de  $^{13}\text{C}$  - RMN e de FT-IR indica que a fração principal polissacarídeo extraído a partir de D. simplex é uma agarocoloide , corroborando com estudos prévios de Tomoda et al (1992 ) e El - Sayed (1983 ) .



## 5.2. Atividade anti-inflamatória de PLS no edema da pata induzido pela carragenina e dextrano

Desde que os PLS derivados de algas passaram a representar um importante candidato terapêutico para o tratamento de inflamação (Chen, Wu, e Wen, 2008; Groth, Grunewald, & Alban, 2009), a atividade anti-inflamatória de PLS extraídos de *D. simplex* foi avaliada usando abordagens farmacológicas e moleculares. A Tabela 1 resume os efeitos de PLS no edema da pata em animais experimentais. O tratamento de ratinhos com carragenina (500 µg / pata) ou dextrano (500 mg / pata) induziu um aumento significativo no volume da pata ao longo dos intervalos de tempo. Uma redução significativa do edema foi observada em todos os grupos tratados com o PLS antes do tratamento com carragenina, começando dentro de 1 h e que se estende até à quarta hora após a administração do agente inflamatório ( $p < 0,05$ ). O efeito máximo induzido pela administração de PLS, em doses de 10, 30 e 60 mg / kg, foi observada na terceira hora, com taxas de inibição de 65,0%, 66,0% e 87,5%, respectivamente, em comparação com os animais que receberam carragenano sozinho. O efeito inibitório de PLS no edema da pata induzido pela carragenina foi dose dependente. A dose mais eficaz foi de 60 mg / kg e esta dose foi, portanto, escolhida para posterior avaliação, incluindo o dos seus efeitos sobre o edema da pata induzida por dextrano. A seguir, foi observado que o PLS também inibiu o edema induzido pelo dextrano. Uma taxa de inibição de 80,6%, foi observado após a primeira hora, em comparação com a descoberta observada no grupo de controlo tratado com dextrano sozinho. O efeito anti-edematogênico de PLS contra a inflamação induzida por dextrano foi mantida até à quarta hora de análise em que o edema estava quase completamente ausentes (95,6% de inibição). É bem documentado que os eventos inflamatórios desencadeados por administração de dextrano para o desenvolvimento de edema via degranulação residente, enquanto que aqueles induzidos por carragenina envolvem migração celular (Lo, Almeida, & Beaven, 1982). Nossos dados estão de acordo com os de outros estudos em que foram relatados efeitos anti-inflamatórios do PLS extraídos de algas marinhas contra - carragena ou inflamação induzida por dextrano (Chaves et al, 2013; Damasceno et al, 2013). Além disso, PLS (60 mg / kg) foi tão eficaz como a indometacina ( $p > 0,05$ ), um fármaco comercial utilizado como um agente anti-inflamatório, reforçando o potencial farmacológico de PLS extraído desta espécie de algas.

**Tabela 1:** A atividade anti-inflamatória do polissacarídeo sulfatado de *D. simplex* em edema de pata induzido por carragenina ou dextrano.

Treatmento	Dose (mg/kg)	Edema de pata em mL (tempo após administração de agentes inflamatórios)				
		30 min	1 h	2 h	3 h	4 h
<b>Animais tratados com carragenina (500µg/paw)</b>						
Controle	-	-	0.065 ±	0.088 ±	0.100 ±	0.106 ±
(Cg) <sup>(1)</sup>	-	-	0.007	0.003	0.003	0.012
Salina	-	-	0.006 ±	0.000 ±	0.005 ±	0.012 ±
			0.003 <sup>a</sup>	0.000 <sup>a</sup>	0.003 <sup>a</sup>	0.006 <sup>a</sup>
		-	0.026 ±	0.020 ±	0.008 ±	0.015 ±
Indometacina	10		0.002 <sup>a</sup>	0.005 <sup>a</sup>	0.003 <sup>a</sup>	0.003 <sup>a</sup>
			(60.0%)	(77.2%)	(92.0%)	(85.8%)
		-	0.055 ±	0.051 ±	0.035 ±	0.046 ±
	10		0.004	0.011 <sup>a</sup>	0.007 <sup>a,b</sup>	0.012 <sup>a,b</sup>
			(15.4%)	(41.5%)	(65.0%)	(56.6%)
		-	0.042 ±	0.065 ±	0.034 ±	0.045 ±
PLS	30		0.008 <sup>a</sup>	0.010 <sup>a</sup>	0.005 <sup>a,b</sup>	0.009 <sup>a,b</sup>
			(35.3%)	(26.4%)	(66.0%)	(57.5%)
		-	0.043 ±	0.030 ±	0.012 ±	0.016 ±
	60		0.006 <sup>a</sup>	0.009 <sup>a</sup>	0.007 <sup>a</sup>	0.004 <sup>a</sup>
			(33.3%)	(66.3%)	(87.5%)	(84.9%)
<b>Animais tratados com dextrano (500µg/pata)</b>						
Controle	-	0.052 ±	0.062 ±	0.037 ±	0.047 ±	0.046 ±
(Dx) <sup>(2)</sup>	-	0.004	0.004	0.005	0.005	0.009
Salina	-	0.010 ±	0.016 ±	0.012 ±	0.010 ±	0.000 ±
		0.003 <sup>c</sup>	0.006 <sup>c</sup>	0.004 <sup>c</sup>	0.005 <sup>c</sup>	0.000 <sup>c</sup>
		0.010 ±	0.010 ±	0.007 ±	0.003 ±	0.002 ±
Indometacina	10	0.005 <sup>c</sup>	0.004 <sup>c</sup>	0.003 <sup>c</sup>	0.003 <sup>c</sup>	0.002 <sup>c</sup>
		(80.8%)	(83.9%)	(81.0%)	(93.6%)	(95.6%)

		0.025 ±	0.012 ±	0.003 ±	0.005 ±	0.002 ±
PLS	60	0.007 <sup>c</sup>	0.006 <sup>c</sup>	0.003 <sup>c</sup>	0.005 <sup>c</sup>	0.002 <sup>c</sup>
		(51.9%)	(80.6%)	(91.9%)	(98.9%)	(95.6%)

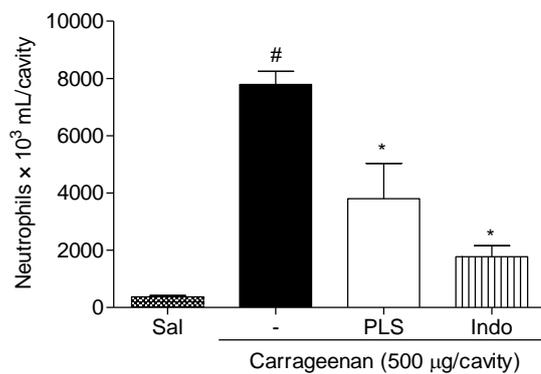
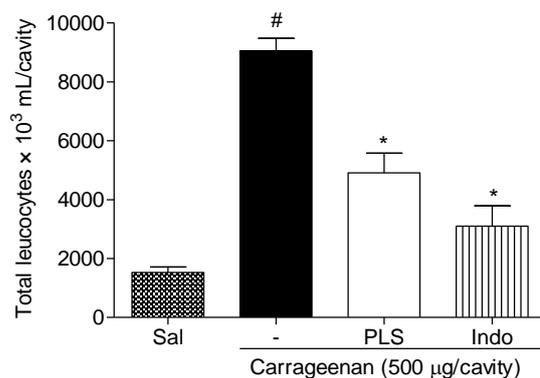
Os valores são dados como médias ± S.E.M. de cinco animais , tal como analisada por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman Keuls (  $p < 0,05$  ) . PLS : sulfatada fração polissacarídeos ; Cg : carragenina ; Dx : dextrano . aComparado grupo com Carragenina ( 1 ) ; bComparado com PLS 60m

### 5.3. Efeito de PLS sobre o edema da pata induzido por vários agentes inflamatórios

Em comparação com a injeção da solução salina do grupo controle, a injeção de vários agentes inflamatórios na superfície subplantar da pata posterior do rato produziu um acentuado aumento no volume da pata (  $p < 0,05$  ) (Fig. 11 ).

**FIGURA 11.**

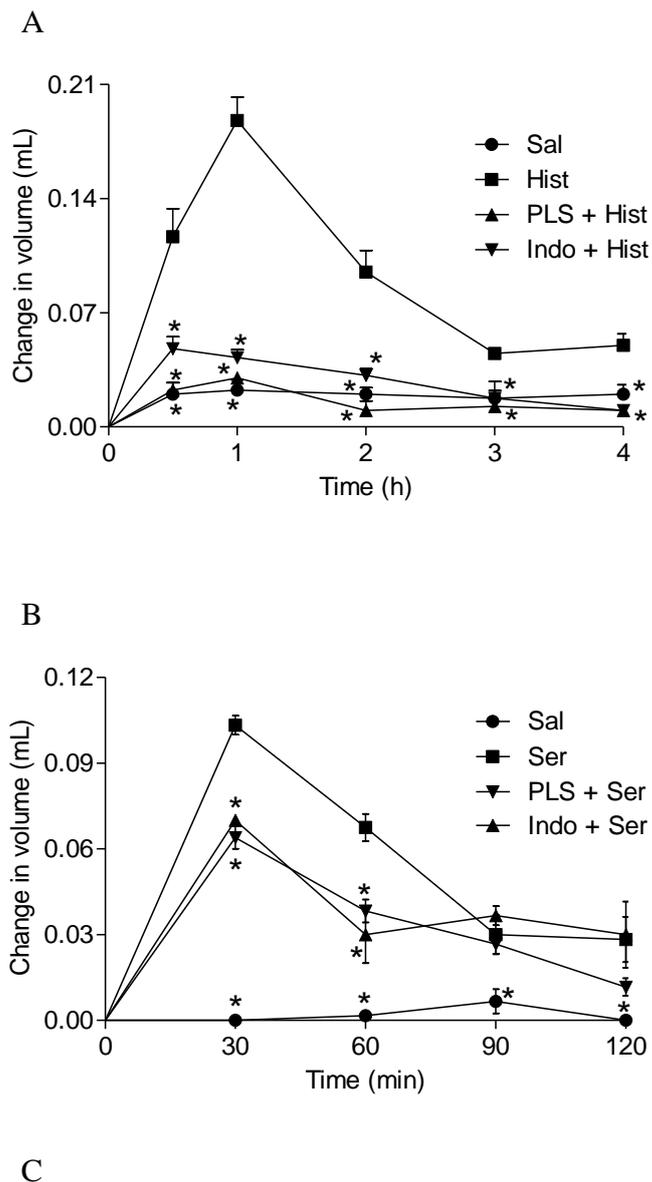
A

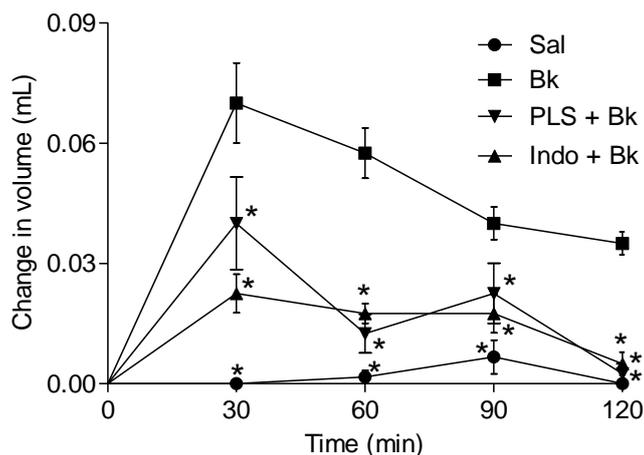


B

A injeção de PLS ( 60 mg / kg , ip ) reduziu significativamente o edema induzido por agentes flogísticos durante todos os cursos de tempo testados. Aos 30 min, o ponto de tempo do efeito de pico dos agentes testados, o volume do edema no grupo de PLS foi  $0,022 \pm 0,004$  mL em comparação com  $0,117 \pm 0,017$  mL no grupo de histamina, o que corresponde a 80,7 % de inibição (Fig. 12A ).

**FIGURA 12.**





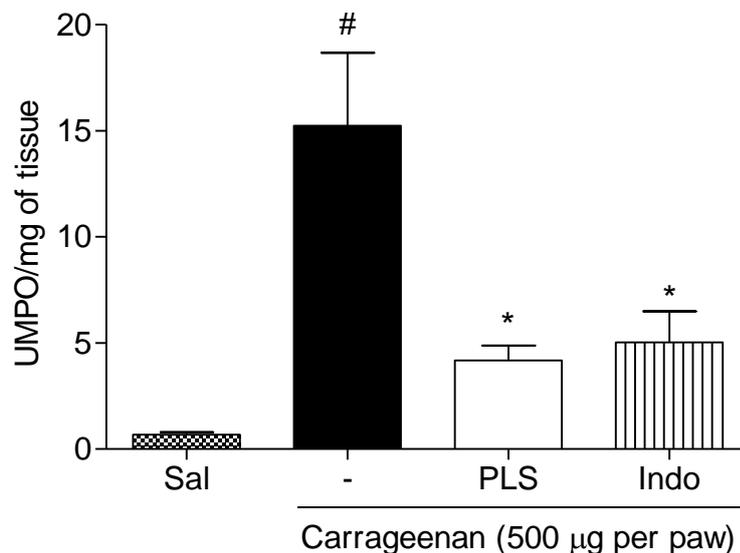
O PLS foi mais eficaz do que a indometacina, o que produziu apenas uma inibição de 58,9 % . PLS também inibiu significativamente o aumento do volume da pata de animais tratados com a serotonina ou a bradicinina por 38,0 % e 42,8 % , respectivamente (Fig12. B e C ). É bem conhecido que os mediadores químicos, incluindo a histamina, a serotonina, e bradicinina estão envolvidos no edema da pata induzido por carragenina ( Vinegar et al , 1987; Chen , Tsai , e Wu , 1995). Neste modelo, o edema é acreditado ser bifásico, com a primeira fase sendo mediado pela libertação de histamina e serotonina, seguido da libertação subsequente da bradicinina e da fase tardia edema ser dependente da produção de citocinas por células residentes e infiltração de neutrófilos ( Kulkarni , Mehta, e Kunchandy, 1986; vinagre, Schreiber , e Hugo, 1969; Barbosa et al, 2009 ). Em contraste, o edema da pata induzido por dextrano é mediada pelo aumento da permeabilidade vascular induzida por desgranulação de mastócitos de histamina e serotonina ( Metcalfe , 2008). O fluido edematoso formada por injeção de dextrano contém pouca proteína e alguns neutrófilos ( Gupta et al., 2003). Portanto, podemos inferir que a ação anti-edematogênico do PLS pode ser por causa da inibição diferencial de mediadores inflamatórios específicos e modulação da infiltração de neutrófilos no tecido plantar inflamado.

#### 5.4. Efeito de PLS na atividade de MPO induzida por carragenina no tecido da pata do rato

Como mostrado na fig. 13 , a 4 h após o tratamento com estímulos inflamatórios, um aumento significativo na atividade de MPO foi encontrado nos animais tratados com carragenina (  $15,23 \pm 3,45$  UMPO tecido plantar / mg ), em comparação com os doentes tratados com solução salina (  $0,68 \pm 0,11$  UMPO / mg tecido plantar ) . Pré - tratamento

com PLS ( 60 mg / kg ) reduziu consistentemente a atividade de MPO em tecido da pata (  $4,17 \pm 0,71$  UMPO / mg de tecido ), o efeito foi semelhante ao da indometacina (  $5,03 \pm 1,48$  UMPO / tecido plantar mg ) . A resposta inflamatória induzida pela carragenina no tecido da pata é conhecido por ser acompanhada por grave infiltração de neutrófilos para o local da inflamação ( De Smet , 1997; Souza , Cunha , Mello , & Ferreira , 1988) . A atividade de MPO foi encontrada nos grânulos azurofílicos de neutrófilos , indicando isso a infiltração de células em tecidos ( Bradley , Priebat , Christensen , e Rothstein , 1982 ) . Uma vez que os níveis de atividade de MPO em animais tratados com PLS foram menores do que os dos animais tratados com carragenana sozinho, é plausível que esta resposta envolve a inibição da migração de neutrófilos .

**FIGURA 13.**

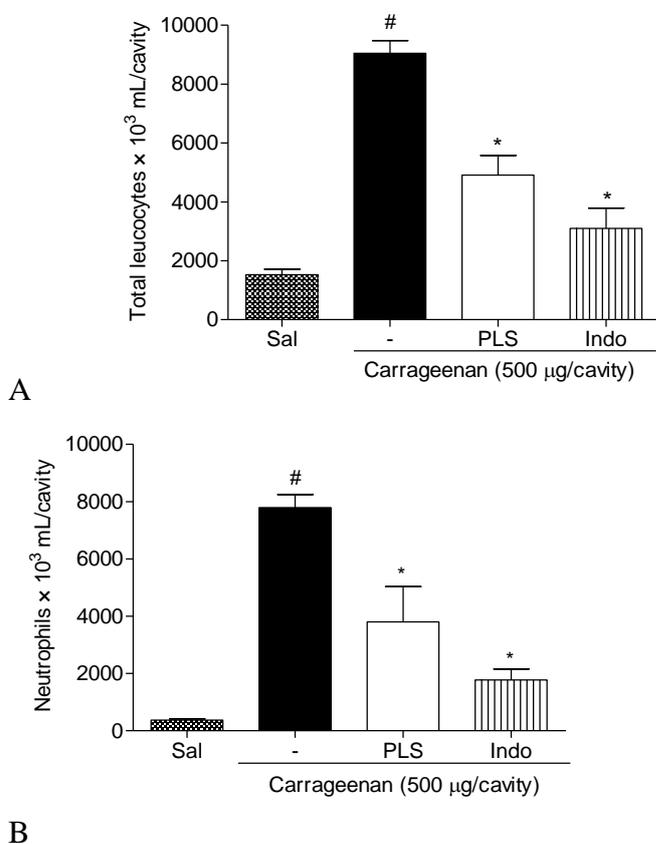


#### 5.5. Efeito anti - inflamatório de PLS na peritonite induzida por carragenina em ratos

A hipótese de que o efeito anti-edematogênico de PLS contra a inflamação induzida por carragenina foi relacionada com uma redução da infiltração de neutrófilos para o local da inflamação, foi investigada num modelo de rato experimental de peritonite. Este modelo permite a quantificação de células e níveis de vários mediadores inflamatórios e é uma ferramenta farmacológica bem caracterizada para o exame da migração de neutrófilos (Montanher, Zucolotto, Schenkel , e Frode , 2007) . Em comparação com os animais tratados apenas com solução salina, os doentes tratados com a administração intraperitoneal de carragenina apresentaram um aumento

significativo na contagem de leucócitos e neutrófilos totais no fluido peritoneal (  $1525 \pm 185,4 \times 10^3$  leucócitos / ml vs  $9050 \pm 429,1 \times 10^3$  leucócitos / mL ;  $370,6 \pm 42,9 \times 10^3$  neutrófilos / ml vs  $7789 \pm 459,1 \times 10^3$  neutrófilos / ml,  $p < 0,05$  ) (Fig. 14 ) . Pré - tratamento dos animais com 60 mg / kg de PLS reduziu o total de leucócitos (  $4913 \pm 668,4 \times 10^3$  células / ml ) e a migração de neutrófilos (  $3,804 \pm 1,228 \times 10^3$  células / mL ) a níveis comparáveis com os correspondentes níveis observados na solução salina e grupos de indometacina (  $p > 0,05$  ) .

**FIGURA 14**

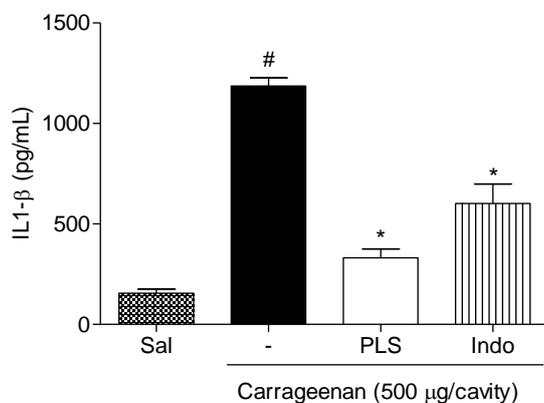


### 5.6. Efeito da fração PLS sobre a produção de citocinas induzida por carragenina em exsudato peritoneal

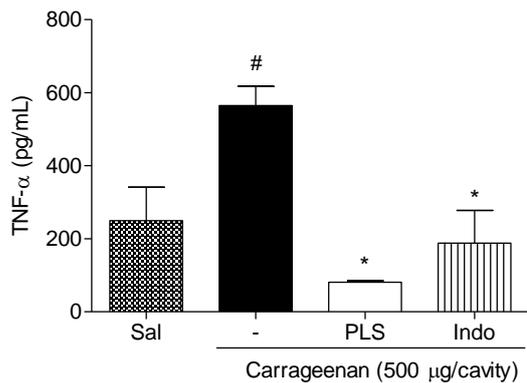
A resposta inflamatória induzida pela carragenina no modelo de peritonite foi associado com um aumento nos níveis de IL-1 e TNF -  $\beta$  -  $\alpha$  (Fig. 15A e B ) . Os níveis de IL-1 e TNF -  $\beta$  -  $\alpha$  no fluido peritoneal do grupo controlo de solução salina foi  $155,4 \pm 19,7$  pg / ml e  $249,5 \pm 91,5$  pg / ml , respectivamente , os correspondentes níveis

foram mais elevados nos animais tratados com carragenina ( IL1 -  $\beta$  nível :  $1.187 \pm 39,8$  pg / mL e TNF-  $\alpha$  nível :  $564,9 \pm 52,3$  pg / mL). Carragenina induz a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal através de um mecanismo indireto que implica a ativação de macrófagos e a liberação de citocinas pró-inflamatórias , tais como IL -  $1\beta$  e TNF -  $\alpha$  ( Lo et al . , 1982) . Tais aumentos dos níveis de citocinas pode resultar em extravasamento de proteína do plasma e infiltração celular em locais de inflamação (Rosenbaum e ósseo 1991; Thorlacius , Lindbom , & Raud 1997) . No presente estudo, em comparação com o grupo tratado com a carragenina , os animais tratados com o PLS exibiram uma redução significativa de ambos os níveis de IL-1 e TNF -  $\beta$  -  $\alpha$  em exsudato peritoneal (  $330,9 \pm 45,1$  pg / mL e  $81,1 \pm 4,3$  pg / ml , respectivamente ) (  $p < 0,05$  ) . TNF  $\alpha$  e IL -  $1\beta$  são potentes citocinas próinflamatórias que possuam múltiplos efeitos , incluindo ativação células inflamatórias indução vários proteínas inflamatórias edema e neutrófilo migração ( Haddad 2002; Hopkins 2003) . Com base nesta constatação, propomos que o tratamento PLS diminuição da migração de neutrófilos através da diminuição da produção e liberação de citocinas pro-inflamatórias.

**FIGURA 15**



A



B

### 5.7. Efeito antinociceptivo do PLS em contorção induzida por ácido acético

Há uma forte associação entre o desenvolvimento da dor e do processo inflamatório ( Bitencourt et al. , 2008) . Foi anteriormente demonstrado que a inibição da migração de neutrófilos reduz hipernocicepção induzida por diferentes estímulos inflamatórios ( Hopkins , 2003 ; Tjølsen e Hole, 1997) . Vários estudos têm demonstrado que o PLS extraído de algas prometem mostrar como agentes antinociceptivos ( Brito et al , 2013; . Chaves et al , 2013; . . Damasceno et al , 2013). Assim, no presente estudo, o potencial antinociceptivo do PLS de *D. simplex* também foi avaliada por meio de três modelos bem aceitos dor murinos. A Tabela 2 mostra o efeito anti-nociceptivo de PLS de contrações abdominais induzidas por ácido acético . Como esperado , a morfina mostrou uma resposta analgésica potente em comparação com a observada em animais de controlo (  $p < 0,05$  ) . A administração de PLS ( 60 mg / kg) 30 minutos antes do estímulo doloroso reduziu significativamente contorção abdominal induzida por ácido acético ( 77,0 % de inibição ) em relação ao controlo (  $p < 0,05$  ) . O teste de contorção é comumente usado para o rastreio compostos analgésicos periféricamente ativos. Agentes algogênico, como o ácido acético, provocar um comportamento estereotipado em ratos caracterizadas por contrações abdominais, movimentos do corpo no seu todo, e torção dos músculos abdominais dorsais (bares, Gozariu , & Cadden , 2001). Este modelo envolve diferentes mecanismos nociceptivos , tais como a libertação de aminas biogênicas ( histamina e serotonina ) , bradicinina , e de PGE2 ( Collier et ai , 1968 ; Duarte , Nakamura , & Ferreira , 1988 ) . Além disso, é bem estabelecido que a resposta nociceptiva causada por ácido acético é também dependente da libertação de algumas citocinas, tais como TNF -  $\alpha$  e IL - 1 $\beta$  através da modulação de macrófagos e as células localizadas na cavidade peritoneal ( Ribeiro et

al., 2000) . Assim, pode reduzir PLS contorção por inibição da libertação de mediadores nociceptivos em resposta ao ácido acético.

**Tabela 2:** Efeito antinociceptivo do PLS de *D. simplex* induzido por ácido acético no modelo de contorções abdominais.

Treatment	Dose (mg/kg)	Number of abdominal constrictions (20 min)	Inhibition (%)
Control (acetic acid)	-	47.0 ± 5.6	-
Morphine	5	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	100
PLS	60	10.8 ± 3.6 <sup>a</sup>	77.0

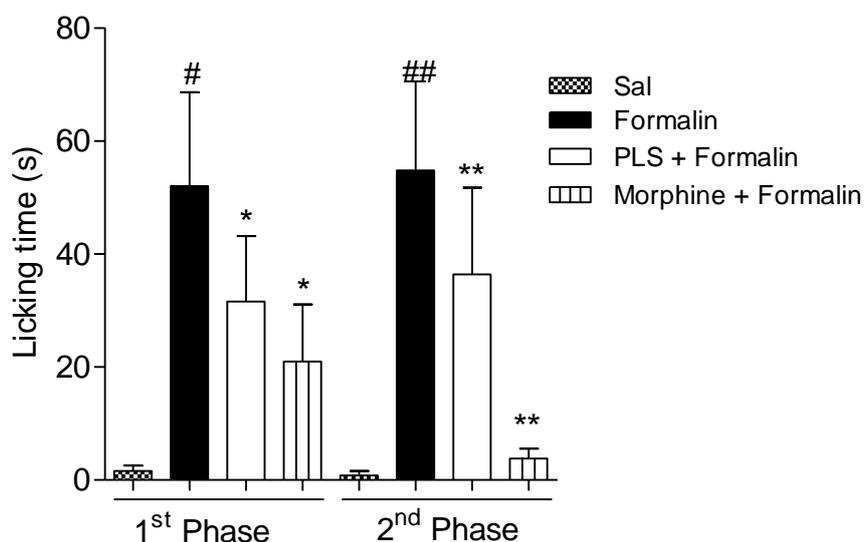
Os valores são dados como médias ± S.E.M. de cinco animais, tal como analisada por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman Keuls (p <0,05). PLS: sulfatados fração polissacarídeos. <sup>a</sup>Comparado com acético grupo controle ácido.

#### 5.8. Efeito de PLS no teste de formalina

A Figura 16 mostra que a injeção intraplantar de formalina ( 2,5 % / pata ) aumentou significativamente o tempo total de lamber nas primeira e segunda fases de tratamento em comparação com solução salina ( p > 0,05 ) . Este evento foi fortemente inibida em ambas as fases de pré - tratamento com a fração de PLS ( 60 mg / kg ) . Observou-se que o tempo de lamber dos animais tratados com o PLS foi inibida por 60,5 % e 61,7 % nas primeira e segunda fases , respectivamente , em comparação com os resultados observados no grupo de formalina. O efeito inibitório de PLS foi semelhante ao observado no grupo de morfina ( Primeira e segunda fases ) . Dor persistente induzida por formalina em ratinho patas envolve duas fases distintas. A primeira fase ( neurogénica ) caracteriza-se por estimulação química directa de nociceptores , e a segunda fase é acompanhada pela libertação de mediadores inflamatórios , tais neuropeptídeos , prostaglandinas, a serotonina , a histamina e a bradiquinina ( Hunskaar et al , 1985; . Hunskaar , et al , 1987; . Murray , Porreca , e Cowan , 1988) . Desde PLS exibiram atividade em ambas as fases, suspeita-se que atua

centralmente, e uma possível interação com receptores opióides também é indicada ( Shibata, Ohkubo, Takahashi & Inoki, 1989) .

**FIGURA 16.**



### 5.9. Efeito do PLS no teste da placa quente

O efeito da administração intraperitoneal de PLS ( 60 mg / kg ) em animais avaliados no teste da placa quente variou de acordo com o tempo de observação utilizado ( Tabela 3 ) . No tempo zero e 120 minutos , nenhum efeito antinociceptivo significativa foi observada em relação ao grupo controle (  $p > 0,05$  ) . Aos 30, 60 , e 90 min , PLS aumentou os tempos de reacção de ratinhos de 34,4 % , 122,9 % e 160,5 % , respectivamente . A morfina fármaco de referência , um agonista receptor opióide , induziu um aumento significativo na latência , como esperado . O teste da placa quente é um modelo bem conhecido por nocicepção térmica aguda. Aumentos no tempo de reacção indicam efeitos analgésicos via receptores supra- espinhal e ( Nemirovsky , Chen , Zelman , e Jurna , 2001). Além disso , o teste ajuda a avaliar especificamente nocicepção central ( Vilela, Padilha , Dos Santos, Silva, & Paiva, 2009) e medir as respostas complexas para inflamação e nocicepção promovidas por agentes opióides ( Bhandare , Kshirsagar , Vyawahare , Hadambar , e Thorve , 2010) . Com base nos

nossos resultados, concluímos que a PLS pode inibir a nocicepção tanto por mecanismos periféricos e centrais

**Tabela 3:** Efeito antinociceptivo dos polissacarídeos sulfatados de *D. simplex* no teste da placa quente.

Treatment	Dose (mg/kg)	Reaction time (sec)				
		0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Saline	-	4.8 ± 1.0	9.3 ± 1.4	6.1 ± 1.3	4.3 ± 1.4	7.2 ± 0.9
Morphine	5	9.7 ± 2.0	28.6 ±	24.9 ±	18.4 ±	17.4 ±
			6.7 <sup>a</sup>	3.3 <sup>a</sup>	3.2 <sup>a</sup>	8.2
PLS	60	11.4 ±	12.5 ±	13.6 ±	11.2 ±	11.2 ±
		0.7	0.7 <sup>a</sup>	2.2 <sup>a</sup>	1.5 <sup>a</sup>	1.7

Os valores são dados como médias ± S.E.M. de cinco animais, tal como analisada por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman Keuls (p <0,05). PLS: sulfatados fração polissacarídeos. Comparadas com grupo controle salina.

## 6. CONCLUSÃO

A alga marinha vermelha *Digenea simplex* apresentou baixo rendimento de PS totais (1,2%) por digestão proteolítica.

Os espectros de RMN para  $^{13}\text{C}$  e de FT-IR indicaram que a fração principal do polissacarídeo extraído a partir de *D. simplex* é uma agarocolóide, com pequeno grau de substituição de sulfatos em C-4 e C-6.

A baixa substituição de grupos sulfato foi confirmada pelo baixo teor de sulfatos (3%) obtido por dosagem de sulfato pelo método da gelatina-bário (DODGSON, 1961).

Observou-se que a fração de PLS reduziu o edema induzido por carragenina de uma maneira dose dependente.

O PLS inibiu a inflamação induzida por dextrano, histamina, serotonina e bradicinina.

A fração também inibiu a migração de neutrófilos tanto no ensaio de edema de pata do rato quanto da cavidade peritoneal.

O PLS de *D. simplex* (60 mg / kg) também mostrou-se eficaz na redução do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético e na redução do tempo total de lambadura de pata em ambas as fases do teste de formalina.

No ensaio da placa quente o PLS de *D. simplex* aumentou a latência nos animais testados.

Os resultados obtidos neste trabalho, com o PLS extraído de *D. simplex*, sugerem eficiência na atividades anti-inflamatória e antinociceptiva da biomolécula investigada e podem ser úteis como agentes terapêuticos contra doenças inflamatórias.

## 7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, T. M.; ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, J. G.; FIGUEIREDO, I. S. T.; TEIXEIRA, C. M.; BITENCOURT, F. S.; SECCO, D. D.; ARAÚJO, E. S.; LEÃO, C. A. A. M.; RAMOS, M. V. Vascular permeability, neutrophil migration and edematogenic effects induced by the latex of *Cryptostegia grandiflora*. **Toxicon**, v. 53, p. 15–23, 2009.

ADAMS, H. R. Prostaglandinas. In: BOOTH, N. H. & Mc DONALD, L. E. **Farmacologia e terapêutica veterinária**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 23. p. 363-381, 1992.

AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sci**, v. 25, p. 639-653, 2004.

ALENCAR, D.B. Extração, purificação e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Lobophora variegata* [Monografia de Graduação]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará, 2007.

ALVES, A. P.; MULLOY, B.; DINIZ, J. A.; MOURÃO, P. A . S. Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrosomal reaction in sperms of sea urchins. **J. Biol. Chem**, v. 272, p. 6965-6971, 1997.

ANANTHI, S.; RAGHAVENDRAN, H. R. B.; SUNIL, A. G.; GAYATHRI, V.; RAMAKRISHNAN, G.; VASANTHI, H. R. In vitro antioxidant and in vivo anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 187–192, 2010.

ARAÚJO, I. W. F.; VANDERLEI, E. S. O; RODRIGUES, J. A. G.; COURA, C. O.; QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. P.; QUEIROZ, I. N. L.; JORGE, R. J. B.; BEZERRA, M. M.; SILVA, A. A. R.; CHAVES, H. V.; MONTEIRO, H. S. A.; PAULA, R C. M.; BENEVIDES, N. M. B. Effects of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1207– 1215, 2011.

ASSREUY, A. M. S., GOMES, D. M., SILVA, M. S. J., TORRES, V. M., SIQUEIRA, R. C. L., PIRES, A. F. Biological effects of a sulfated-polysaccharide isolated from the marine red algae *Champia feldmannii*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 691–695, 2008.

ASSREUY, A. M. S., PONTE, G. C., RODRIGUES, N. V. F. C., GOMES, D. M., XAVIER, P. A., ARAUJO, G. S. Vascular effects of a sulfated polysaccharide from the red marine alga *Solieria filiformis*. **Natural Product Communications**, v. 5, p. 1267–1272, 2010.

BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Química Nova** v13 1990.

BARRETO, R. L.; CORREIA, C. R. D.; MUSCARÁ, M. N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1046-1054, 2005.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Algae – **Anatomy, Biochemistry and Biotechnology**. 1ª Ed. Boca Ratn: Taylor & Francis Group, LCC, 2006.

BAUHMANN, H.; GAUDIE, J. The acute phase response. **Immunology Today**, v. 15, p. 74-80, 1994.

BENVENISTE, J. Platelet activating factor, a new mediator of anaphylaxis and immune complex deposition from rabbit and human basophils. **Nature**, v. 249, p. 581–582, 1974.

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

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

BEZERRA-NETO, J.T.B. (2005). Extração, fracionamento, purificação e atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Caulerpa sertularioides*

(*Caulerpales*, *Caulerpaceae*). [Monografia de Graduação]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CIANCIA, M.; QUINTANA, I.; VIZCARGUENAGA, M. I.; KASULIN, L.; DIOS, A.; ESTEVEZ, J. M.; CERESO, A. S. Polysaccharides from the green seaweeds *Codium*

*fragile* and *C. vermilara* with controversial effects on hemostasis. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 41, p. 641–9, 2007.

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

COURA, C. O.; DE ARAÚJO, I. W. F.; VANDERLEI, E. S. O.; RODRIGUES, J. A. G.; QUINDERÉ, A. L.; FONTES, B. P.; QUEIROZ, I. N. L.; MENEZES, D. B.; BEZERRA, M. M.; SILVA, A. A. R.; CHAVES, H. V.; JORGE, R. J. B.;

EVANGELISTA, J. S. A. M.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of sulfated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956. 97

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

GOODMAN, L., TORRES, B., PUNKE, J., REYNOLDS, L., SPEAS, A., ELLIS, A., BUDSBERG, S. Effects of firocoxib and tepoxalin on healing in a canine gastric mucosal injury model. **J Vet Intern Med**, v. 23, p. 56-62, 2009. 98

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

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

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

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

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

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

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

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

HAYAKAWA, Y.; HAYASHI, T.; LEE, J.; SRISOMPORN, P.; MAEDA, M.; OZAWA, T.; SAKURAGAW, N. Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides

isolated from green algae. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, p. 86-94, 2000.

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

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

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

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

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

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

IOZZO, R. V. Matriz proteoglycans from molecular design to cellular function. **Annu Rev Biochem**, v. 67, p. 609-652, 1998. 99

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LEITE, E. L.; MEDEIROS, M. G. L.; ROCHA, H. A. O.; FARIAS, G. G. M.; SILVIA, L. F.; CHAVANTE, S. F.; ABREU, L. D.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schröederi*. **Plant Sci**, v. 132, n. 2, p. 215-228, 1998. 100

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature**, v. 7, p. 678-689, 2007.

LI, X.; CLARJ, J. D. Chronic morphine exposure and the expression of heme oxygenase type 2. **Brain Res Mol**, v. 75, p. 179-184, 2000.

LIN E.; CALVANO, S. E.; LOWRY S.F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, p. 117-126, 2000.

LIU, X. M.; CHAPMAN, G. B.; WANG, H.; DUARTE, W. Adenovirus mediated heme oxygenase-1 gene expression stimulates apoptosis in vascular smooth muscle cells. **Circulation**, v. 105, p. 79-84, 2002.

LO, T. N.; ALMEIDA, A. P.; BEAVEN, M. A. Dextran and carrageenin evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 221, p. 261-7, 1982.

LUCAS, S. M.; ROTHWELL, N. J.; GIBSON, R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease. **Br J. Pharmacol**, v. 147, p. S232-S240, 2006.

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

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

MATHEWS, M. B. **Polyanionic proteoglycans**. Em: Connective tissue: Macromolecular structure and evolution. Kleinzeller, A., Springer, G. F. and Witmann, H. G., eds. Springer-Verlag, Berlin, p. 93-125, 1975.

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

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

MCNEIL, H.P. The mast cell and inflammation. Australian and New Zealand **Journal of Medicine**, v. 26, p. 216-225, 1996.

MEDEIROS, V. P.; QUEIROZ, K. C.; CARDOSO, M. L.; MONTEIRO, G. R.; OLIVEIRA, F. W.; CHAVANTE, S. F.; GUIMARAES, L. A.; ROCHA, H. A.; LEITE, E. L. Sulfated galactofucan from *Lobophora variegata*: anticoagulant and anti-inflammatory properties. **Biochemistry (Mosc)**, v. 73 p. 1018-24, 2008.

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

MENDIS, E.; KIM, S. K. Present and Future Prospects of Seaweeds in Developing Functional Foods. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 64, 2011.

MEYR, A. J.; STEINBERG, J. S. – DPM. The Physiology of the Acute Pain Pathway. **Clin Podiatr Med Surg**, v. 25, p. 305–326, 2008.

MITRIONE, S. M.; VILLALON, P.; LUTTON, J. D.; LEVERE, R. D.; ABRAHAM, N. G. Inhibition of human adult and fetal heme oxygenase by new synthetic heme analogues. **Am. J. Med. Sci**, v. 296, p. 180-186, 1988.

MOHSIN, S.; KURUP, G. M. Mechanism underlying the anti-inflammatory effect of sulphated polysaccharide from *Padina tetrastromatica* against carrageenan induced paw edema in rats. **Biomedicine & Preventive Nutrition**,



