



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

JANE DE FATIMA TEIXEIRA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE UMA FRAÇÃO
POLISSACARÍDICA SULFATADA DA ALGA MARINHA VERDE *Ulva lactuca*
(LINNAEUS)**

FORTALEZA

2016

JANE DE FATIMA TEIXEIRA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE UMA FRAÇÃO
POLISSACARÍDICA SULFATADA DA ALGA MARINHA VERDE *Ulva lactuca*
(LINNAEUS)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de Farmácia da Universidade Federal
do Ceará como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Farmacêutico.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ianna Wivianne
Fernandes de Araújo

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- S578a Silva, Jane de Fatima Teixeira.
Avaliação da atividade antinociceptiva de uma fração polissacarídica sulfatada da alga marinha verde *Ulva lactuca* (Linnaeus) / Jane de Fatima Teixeira Silva. – 2016.
51 f. : il.
- Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Departamento de Farmácia, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profa. Dra. Ianna Wivianne Fernandes de Araújo.
1. Alga Marinha. 2. Polissacarídeos. 3. Nociceptividade. 4. Toxicidade. I. Título.

CDD 586.39815

JANE DE FATIMA TEIXEIRA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE UMA FRAÇÃO
POLISSACARÍDICA SULFATADA DA ALGA MARINHA VERDE *Ulva lactuca*
(LINNAEUS)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de Farmácia da Universidade Federal
do Ceará como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Farmacêutico.

APROVADA EM ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ianna Wivianne F. de Araújo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Edfranck de Sousa Oliveira Vanderlei
Faculdade do Nordeste DEVRY (FANOR)

Dr^a. Ana Luíza Gomes Quinderé
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha família

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, por todas as oportunidades que ele me deu, pelas maravilhas que tem feito em minha vida, por ter me dado força e graça para que eu alcançasse essa grande vitória.

À Professora norma por ter me recebido em seu laboratório de braços abertos e por todos os seus ensinamentos.

À Professora Ianna Wivianne Fernandes de Araújo, pelo apoio constante, pela paciência durante os experimentos, ensinamentos transmitidos e dedicação. Obrigada pela colaboração e carinho.

A todos do Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CARBOLEC) com quem eu tive o prazer de conviver diariamente: Ticiania Lima, Ticiania Abreu, Trycia Magalhães, Natássia Ribeiro, Gabrielle Freitas, Érika Bessa, Ismael Nilo, Neto Silva, Ana Luíza Quinderé, Luana Maria, Márjory Holanda, Edfranck Vanderlei, Ianna Araújo, José Ariévilo, Chistiane Coura, Ygor Eloy, Gardênia Prado, Bruno Fontes, Ricardo Bastos, Gabriela de Paula, Willame Alves, José Gerardo, Valdécio Silvano, Fabíola Moura e Felipe Barros.

Em especial agradeço a Ticiania Lima, Ticiania Abreu, Trycia Magalhães, Natássia Ribeiro, Érika Bessa e Gabrielle Freitas, vocês tornaram os meus dias mais alegres e divertidos, amizades que eu quero levar para toda a vida.

Ao José Ariévilo, Edfranck Vanderlei, Ianna Wivianne, Natássia Ribeiro, Ana Luiza, Trycia Magalhães, pelo apoio constante durante os experimentos.

À banca examinadora: Ianna Wivianne, Ana Luíza e Edfranck Vanderlei, por ter aceitado o meu convite.

À minha turma maravilhosa Farmácia UFC 2015.2 vocês foram uma segunda família para mim, foram cinco anos de convivência diária: Lívia Maria, Rita de Cássia, Maria Gizele, Juliana Spinosa, Ana Elóá, Naiara Ximenes, Davi Damasceno, Mariana Bona, Suzzy Dantas, Cristianne Medina, Rosana Portela, Angelina Bastos, Ana Luiza, Nickolas Marlles, Elana Figueiredo, Juliana Alves, Jessilane Bruna, Marcos Romário, Karine Lima, Kelly Kaliana, Tamara Vasconcelos, Ícaro Belmino, Alisson Andrade. Obrigada a cada um por ter tornado meus dias mais alegre e divertido, com vocês a caminhada se tornou mais leve.

Em especial agradeço:

Aos meus pais, José Neri e Maria de Fátima pelo apoio incondicional, por terem sonhado junto comigo, assistido a minha caminhada até aqui e agora estão comigo para comemorar esta grande vitória. Amo muito vocês!

Ao meu grande amor, Miguel Junior, meu esposo, companheiro, obrigada pelo apoio diário em tudo, você foi sem dúvidas o maior incentivador que eu encontrei durante essa caminhada, obrigada por ter me compreendido quando eu não tinha tempo para está ao seu lado, pois tinha que estudar, por ter sempre me dado forças e tornado meu dia-a-dia mais leve, divertido e colorido. Eu te amo muito!

Às minhas irmãs Ângela Maria, Bárbara Teixeira e Marta Teixeira, pelo companheirismo, força e por sempre estarem ao meu lado.

Aos meus irmãos Antônio Carlos, Péricles Teixeira, Walisson Teixeira, Emerson Teixeira e Neri Júnior, pela irmandade, força e apoio constate.

Aos meus sobrinhos Gabriel Teixeira, Ruth Duarte, Mateus Duarte, Éricles Teixeira, Robert Juan, Emerson Júnior, Wanderson Teixeira e Pedro Henrique, pelo carinho.

As minhas cunhadas e cunhados Eliza Teixeira, Elisangela Gomes, Hávila Linhares, Juliana Silva, Wanessa Santos, Remo Araújo e Luciano Brito, por tornarem nossa família mais alegre e divertida com suas presenças.

À minha sogra Angelina Santos, por todo apoio e carinho.

À Layla Mesquita e Maria Rebeca, por tornarem meus dias mais divertidos.

RESUMO

As algas marinhas são fontes abundantes de polissacarídeos sulfatados com várias atividades biológicas, dessa forma, suas biomoléculas são de grande interesse comercial, principalmente nas indústrias farmacêutica e alimentícia. O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos de uma fração polissacarídica sulfatado da alga marinha verde *Ulva lactuca* utilizando modelos clássicos de nocicepção. Os polissacarídeos sulfatados totais (PST) foram extraídos (6 h; 60°C) por digestão enzimática e fracionados por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. A atividade antinociceptiva foi avaliada através dos ensaios de contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,8%), teste da formalina (1%) e da placa quente. O fracionamento indicou a separação de três diferentes frações (FI-0,5, FII-0,75 e FIII-1M), respectivamente. A fração com maior rendimento foi utilizada nos ensaios FII (PS-UI). Camundongos *Swiss* machos (n=6) foram pré-tratados com PS-UI (1; 3 ou 9 mg/kg; i.v.) ou salina estéril (i.v.), 30 min antes de receber os estímulos de dor (ácido acético ou formalina) ou exposição ao estímulo térmico. O teste de toxicidade subcrônica foi realizado em camundongos (machos; n=6), os quais receberam: salina (i.p.) e PS-UI (9 mg/kg; i.p.), durante 14 dias consecutivos. O PS-UI (1, 3 ou 9 mg/kg) reduziu ($p < 0,05$) o número de contorções abdominais na ordem de 48,19; 42,66 e 39,89%, respectivamente. PS-UI não reduziu ($p > 0,05$) o tempo lambadura na primeira fase (neurogênica) no teste da formalina. Enquanto que na segunda fase (inflamatória) do teste PS-UI (1, 3 ou 9 mg/kg) reduziu ($p < 0,05$) o tempo de lambadura em torno de 72,06; 35,99 e 35,66%, respectivamente. PS-UI não aumentou ($p > 0,05$) o tempo de reação nos intervalos 30, 60 e 90 min no teste da placa quente. Desta forma, PS-UI apresentou ação antinociceptiva através de mecanismos periféricos. Finalmente, os resultados mostraram que as administrações dos PS-UI não alteraram a massa corporal ($p > 0,05$) dos animais avaliados. Além disso, não houve diferença ($p > 0,05$) no peso dos órgãos (coração, fígado e rim) em relação à massa corporal. Os testes bioquímicos do fígado (ALT e AST) e função renal não apresentaram alterações. Portanto, a alga marinha verde *Ulva lactuca* apresenta um polissacarídeo sulfatado seguro e com atividade antinociceptiva promissora.

Palavras-chave: alga marinha, polissacarídeos sulfatados, nocicepção

ABSTRACT

Marine algae are abundant sources of sulfated polysaccharides with various biological activities, thereby altering its biomolecules are great of commercial interest, especially in the pharmaceutical and food industries. This study aimed to evaluate the effects of a sulfated polysaccharidic fraction from green seaweed *Ulva lactuca* in classical models of nociception. The total sulfated polysaccharides were extracted by enzymatic digestion (6h; 60°C) and then purified by ion exchange chromatography on DEAE-cellulose. The antinociceptive activity was evaluated by the writhings of abdominal constrictions induced by acetic acid, formalin tet and hot plate. The elution profile indicated the separation of three different fractions (FI, FII and FIII) eluted at 0.50, 0.75 and 1.00 M of NaCl, respectively. The fraction with higher yield was used in the assays (FII – PS-UI). We used male *Swiss* mice were pre-treated with PS-UI (1, 3 or 9 mg/kg, i.v) or sterile saline (iv) 30 min before receiving pain stimuli (acetic acid 0.8% or 2% formalin) or heat exposure. Subchronic toxicity test was conducted in groups of 6 mice (males), which received: saline (0.15 M, i.p.) and PS-UI (9 mg/kg, i.p.) for 14 consecutive days. The PS-UI was able to reduce ($p < 0.05$) the number of writhing induced by 0.8% acetic acid (48.19; 42.66 and 39.89%, for 1, 3 and 9 mg/kg, respectively). PS-UI did not reduced the licking time in the first phase (neurogenic) of the test. However, in the second phase (inflammatory) of the test, PS-UI reduced ($p < 0.05$) the licking time by 72.06; 35.99 and 35.66%, for 1, 3 and 9 mg/kg, respectively. PS-UI did not increase the reaction time in the 30, 60 and 90 min intervals. Therefore, PS-UI isolated from *U. lactuca* presented antinociceptive action through peripheral mechanisms. Finally, the results showed that the administrations of PS-UI did not show to differences in body mass ($p > 0.05$). Additionally, the PS-UI did not produce changes in organ weights (heart, liver and kidney) in relation to body mass of animals. No change for liver biochemical tests (AST and ALT) or renal function was also observed ($p > 0.05$). Thus, the green seaweed *Ulva lactuca* sulfated polysaccharide present security and antinociceptive activity.

Keywords: seaweed, sulfated polysaccharides, nociception

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	O caminho no qual a dor percorre, da periferia até o cérebro	22
FIGURA 2	Espécime da alga <i>Ulva lactuca</i> (Linnaeus) e sua classificação taxonômica	26
FIGURA 3	Fluxograma de extração dos polissacarídeos sulfatados totais	28
FIGURA 4	Comportamento de um camundongo apresentando contorção abdominal seguida por extensão das patas posteriores induzida por ácido acético a 0,8%	30
FIGURA 5	Comportamento de um camundongo lambendo a pata traseira após aplicação de formalina a 1%.....	31
FIGURA 6	Comportamento do animal durante o teste da placa quente	32
FIGURA 7	Cromatografia de troca iônica dos PST em coluna de DEAE-celulose	35
FIGURA 8	Eletroforese em gel de agarose 0,5% dos PST e das frações F I, F II e F III da alga <i>Ulva lactuca</i> obtidas por cromatografia em DEAE-celulose, corada com azul de toluidina	37
FIGURA 9	Atividade antinociceptiva do PS-UI em modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético	38
FIGURA 10	Atividade antinociceptiva no teste da formalina do PS-UI	40
FIGURA 11	Efeito do PS-UI no teste da placa quente em camundongo	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Composição química dos PST e frações da alga <i>Ulva lactuca</i>	36
TABELA 2	Avaliação sistêmica dos camundongos após tratamento durante 14 dias com a fração F II (9 mg/kg; i.p.) de <i>Ulva lactuca</i>	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Algas Marinhas	16
2.2 Polissacarídeos sulfatados	17
2.3 Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas	17
2.4 Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas	19
2.5 Dor e Nocicepção	20
3. OBJETIVO	25
3.1 Geral	25
3.2 Específicos	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Materiais	26
4.1.1 Coleta e identificação da alga marinha	26
4.1.2 Animais	26
4.2 Métodos	27
4.2.1 Extração dos polissacarídeos sulfatado totais	27
4.2.2 Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose	28
4.2.3 Eletroforese em gel de agarose	29
4.2.4 Análise da composição química	29
4.2.5 Modelos de nocicepção	30
4.2.5.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético	30
4.2.5.2 Teste da formalina	30
4.2.5.3 Teste da placa quente	31
4.2.6 Avaliação da toxicidade por dose repetida em camundongos	32
4.2.6.1 Análises bioquímica do plasma	32
4.2.7 Análise estatística	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
5.1 Rendimento dos polissacarídeos sulfatados totais e das frações obtidas por cromatografia de troca iônica	34
5.2 Análises da composição química	35

5.3 Eletroforese em gel de agarose	36
5.4 Atividade antinociceptiva	37
5.4.1 Testes de contorções induzidas por ácido acético	37
5.4.2 Efeito do PS-UI sobre o tempo de lambadura da pata induzido por formalina ...	39
5.4.3 Efeito do PS-UI no teste da placa quente	40
5.5 Avaliação sistêmica de PS-UI da alga marinha <i>U. lactuca</i>.....	42
6. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	48
Anexo: Declaração da comissão de ética em pesquisa animal (CEPA) da Universidade federal do Ceará	53

1 INTRODUÇÃO

Durante muito tempo estudos têm tentado esclarecer os motivos que justifiquem a ocorrência da dor e vários procedimentos tem sido desenvolvido para o seu controle. A dor ou nocicepção é um componente importante da homeostase e seu propósito é alertar sobre estímulos que podem provocar lesão tecidual (estímulos nocivos ou potencialmente nocivos), permitindo que mecanismos de defesa ou fuga sejam adotados (MILLAN, 1999; JULIUS & BASBAUM, 2001; BENEDITO, 2009).

A indústria farmacêutica, juntamente com pesquisadores, tem se preocupado em desenvolver terapias de controle da dor, apesar da variedade de substância que existem no mercado. Porém, ainda existe uma grande necessidade de analgésicos mais potentes e com menos efeitos adversos, tanto para o tratamento da dor aguda, quanto para dor crônica, onde a melhor alternativa farmacológica continua sendo a morfina, mesmo com seus efeitos indesejáveis.

Vários fármacos se destinam no controle da dor, incluindo-se os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), os agentes semelhantes à morfina (opióides), os anestésicos e as várias substâncias não opióides (BENYHE, 1994).

Os AINEs são a classe de fármacos mais prescritos e utilizados no mundo, sendo utilizados para tratar diversas patologias, pois além de seu efeito anti-inflamatório, esses fármacos também apresentam atividades analgésica e antipirética. O mecanismo anti-inflamatório dos AINEs está relacionado, principalmente, com a redução da síntese de prostaglandinas pela inibição das ciclo-oxigenases (Cox) através da prostaglandinas-endoperóxido sintase que catalisa a conversão de ácido araquidônico a prostaglandinas H₂ (PGH₂), a primeira reação requerida para a biossíntese de prostaglandinas e de tromboxanos (IÑIGUEZ *et al.*, 1999; OLIVEIRA, 2003).

Dentre os problemas relatadas por pacientes que utilizam AINEs convencionais, as mais comuns são a nível gastrointestinal e renal, em pacientes que fazem uso crônico desses medicamentos, as queixas mais comuns são náuseas, dispepsia e ulceração. Os efeitos adversos estão associados com a inibição da COX-1, responsável por formar prostaglandinas homeostáticas (PGE₂ e PGI₂), consideradas protetoras da mucosa gástrica e também presentes nos rins (SOSTRES *et al.*, 2010; WARNER; MITCHEL, 2002).

Com relação aos opiáceos são compostos que continuam sendo a melhor opção de tratamento para dor que varia de moderada a grave em trauma induzidos, pós-operatório e na

dor oncológica. O uso de opióides em dor crônica benigna tem sido assunto de muitos debates e controvérsias (MCQUAY, 1999). A morfina ocasiona alguns efeitos indesejáveis, como: euforia, náuseas, vômitos, depressão respiratória, dependência física e psicológica, redução da motilidade gastrointestinal e espasmo do músculo liso, levando à constipação e algumas vezes a espasmo biliar e uretral (SILVA; SAKATA; ISSY, 2004).

A busca incessante pela descoberta de novas moléculas a partir de produtos naturais, que apresentam potencial biológico ativo, tem sido de grande interesse para a indústria farmacêutica e seus pesquisadores, embora nos dias atuais, existam diversas estratégias e metodologias para que se possa sintetizar e descobrir novos fármacos.

Os polissacarídeos sulfatados derivados de algas marinhas têm surgido, nos últimos anos, como uma importante fonte viável de compostos naturais com atividade biológica, as aplicações desses polissacarídeos como agentes terapêuticos têm sido cada vez mais importantes temas de intensas pesquisas (NA *et al.*, 2010). Portanto, diversos grupos de pesquisa têm sua atenção voltada para moléculas obtidas a partir de produtos naturais, dentre elas, destacam-se os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas, que vêm sendo utilizados como ferramentas biotecnológicas para o controle da nocicepção (ASSREUY *et al.*, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2011; FARIAS *et al.*, 2011; QUINDERÉ *et al.*, 2013; CARNEIRO *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2014).

Diante do problema exposto, é necessário que se faça maiores investimentos no desenvolvimento de analgésicos que possuam vantagens em relação aos que estão sendo prescritos atualmente. Nesse contexto, surgem os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas, como uma fonte promissora no desenvolvimento de novos fármacos com atividade analgésica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Algas marinhas

As algas representam um grupo diversificado de organismos fotossintetizantes encontradas nos mais diversos ambientes aquáticos e terrestres úmidos, podendo assumir estilos de vida na forma de seres planctônicos, que são células únicas e microscópicas ou de seres bentônicos, que apresentam tecidos especializados (SZE, 1997).

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

As algas marinhas representam a base da cadeia alimentar nos oceanos e sustentam mais de dois terços da biomassa mundial. São ainda responsáveis por aproximadamente metade da atividade fotossintética global. Sua distribuição depende da salinidade da água, da disponibilidade de luz solar, das correntes oceânicas e das condições físicas e químicas afins (DAY *et al.*, 1999). Além disso, as algas marinhas estão divididas em três grandes grupos: algas verdes (Chlorophyta), algas pardas ou marrons (Phaeophyta) e algas vermelhas (Rhodophyta) (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). A investigação de muitos de seus metabólitos (polissacarídeos, lectinas, lipídios, carotenóides, etc) tem sido alvo de interesse crescente, tendo em vista que as algas são organismos promissores para a síntese de novas substâncias biologicamente ativas e de compostos que são fundamentais para a nutrição humana (CARDOZO *et al.*, 2007).

Atualmente, muitas espécies de algas marinhas vêm sendo usadas na indústria principalmente para extração de ficocolóides (alginatos, ágar e carragenanas) para indústria alimentícia e como fonte de substâncias utilizadas pela indústria farmacêutica (composto bioativos) (GRESSLER *et al.*, 2010). Dentre os diversos compostos bioativos obtidos das algas marinhas, os polissacarídeos sulfatados vêm se destacando como fonte de diversas atividades biológicas.

2.2 Polissacarídeos sulfatados

Os carboidratos ou sacarídeos (do grego sakcharon, açúcar) são consideradas as moléculas biológicas mais abundantes do nosso planeta. Quando essas moléculas estão na forma de polímeros, eles são conhecidos como polissacarídeos e constituem um dos quatro grupos de macromoléculas que compõem os seres vivos (carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos). Até 1960 acreditava-se que eles desempenhavam apenas funções passivas como fontes de energia (p. ex., glicose, amido, glicogênio) e como materiais estruturais (p. ex., celulose) (LEHNINGER *et al.*, 2006), contudo, os carboidratos encontram-se na natureza desempenhando diversas 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).

Os polissacarídeos sulfatados são um grupo de macromoléculas complexas com grande variedade estrutural, que se caracterizam por apresentar alta densidade de cargas negativas. O caráter aniônico desses polímeros provém da presença de ésteres de sulfato e, em alguns casos, de um grupamento carboxila. Esses polímeros também são encontrados em gramíneas marinhas, que constituem um grupo de plantas vasculares presentes em ambientes marinhos (AQUINO *et al.*, 2005), são raramente encontrados em plantas terrestres ou de água doce (DANTAS-SANTOS *et al.*, 2012). No entanto, os polissacarídeos sulfatados são encontrados em maior concentração em algas marinhas (JIAO *et al.*, 2011) e no reino animal (MEDEIROS *et al.*, 2000).

Nas algas marinhas, os polissacarídeos sulfatados são encontrados na matriz extracelular da parede celular. Sua função fisiológica nestes organismos seria de formação da estrutura da parede celular e de proteção contra a desidratação que ocorre em maré baixa. Isso explicaria o maior teor de polissacarídeos sulfatados de algas no nível entre marés (MICHEL *et al.*, 2010; DANTAS-SANTOS *et al.*, 2012).

2.3 Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas

As algas marinhas são a fonte vegetal mais importante de polissacarídeos sulfatados, e as estruturas químicas desses polímeros variam de acordo com as espécies de algas (CARNEIRO *et al.*, 2014). Esses polissacarídeos sulfatados contribuem para a natureza viscosa destes organismos tornando-os flexíveis e maleáveis o bastante para que possam

crescer em um ambiente marinho e, ao mesmo tempo, contribuem também com certa rigidez necessária para que as algas permaneçam estendidas, aumentando assim sua capacidade de captar a luz e de absorver os nutrientes existentes ao seu redor (PERCIVAL; MACDOWELL, 1967). As estruturas dos polissacarídeos sulfatados dependem das classes de algas dos filos Rhodophyta, Phaeophyta e Chlorophyta. Os polissacarídeos sulfatados mais conhecidos nas algas vermelhas são as galactanas sulfatadas, que são divididas em carragenanas e agaranas (USOV, 2011). As algas pardas são homo e heteropolissacarídeos contendo α -L-fucose sulfatada denominadas fucanas e fucoïdanas, respectivamente (COSTA *et al.*, 2011). Em algas verdes, geralmente são encontrados heteropolissacarídeos aniônicos contendo xilose, galactose, arabinose, ácido glucurônico, manose ou glucose. Portanto, existe uma predominância de um monossacarídeo, em detrimento de outros em várias ordens de algas (CIANCIA; QUINTANA; CEREZO, 2010).

As fucoïdanas, que representam os polissacarídeos sulfatados de algas pardas, são constituídas principalmente de α -L-fucopiranosose, estes constituintes podem ser extraídas da parede celular com água quente ou solução ácida e podem ser responsáveis por mais de 40% do peso seco das células isoladas (BERTEAU; MULLOY, 2003). Estão presentes também em sua composição outros monossacarídeos como galactose, manose, xilose, ácidos urônicos (USOV, BILAN, 2009).

As galactanas sulfatadas que são os polissacarídeos das algas vermelhas sendo bastante utilizada na indústria alimentícia. As carragenanas são classificadas de acordo com suas características estruturais, incluindo o seu padrão de sulfatação e da presença ou ausência de anidrogalactana na D-unidade. Há pelo menos 15 diferentes estruturas de carragenanas (JIAO *et al.*, 2011). Dentre as diversas estruturas de carragenanas existentes, as mais comuns comercialmente são: κ (Kappa), ι (Iota) e λ (lambda), onde elas apresentam teores de sulfatação e massa molecular diferentes (VAN DE VELDE *et al.*, 2002).

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

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

2.4 Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas

Os polissacarídeos derivados de algas marinhas têm surgido nos últimos tempos 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).

Além do uso comercial, o interesse por essa molécula tem aumentado nos últimos anos na área da medicina e na biotecnologia, isto se deve a relatos na literatura dessas moléculas apresentarem atividades biológicas, tais como anticoagulante (ATHUKORALA *et al.*, 2007; FARIAS *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2008), antitrombótica (FARIAS; NAZARETH; MOURÃO, 2001), imunestimulante (RODRIGUES, 2006), antinociceptiva e anti-inflamatória (RIBEIRO *et al.*, 2014; CARNEIRO *et al.*, 2014) e contra arteriosclerose (QUINDERÉ *et al.*, 2015).

Uma fração polissacarídica sulfatada da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* demonstrou efeito antinociceptivo em modelos clássicos de nocicepção (contorções induzidas por ácido acético e o teste do tempo de lambadura induzido por formalina) (ARAÚJO *et al.*, 2011).

Um estudo realizado com extrato metanólico da alga verde *Caulerpa prolifera* evidência que o extrato metanólico dessa alga tem desempenhado um papel vital na melhoria da dislipidemia e suas complicações em particular stress oxidativo e inflamação (HANNA *et al.*, 2011). O efeito de um extrato total de polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Caulerpa mexicana*, em modelos clássicos de nocicepção e inflamação em roedores, sugere que a ação antinociceptiva desses polissacarídeos sulfatados ocorre através de um mecanismo periférico, sendo, portanto, considerados agentes moduladores naturais promissores para a

nocicepção e condições inflamatórias (CARNEIRO *et al.*, 2014). Rodrigues *et al.*, (2012) isolaram uma fração polissacarídica da alga marinha *Caulerpa cupressoides*, e essa molécula reduziu as contorções abdominais induzidas por ácido acético; o tempo de lambedura das patas dos camundongos em ambas as fases do teste da formalina; a migração neutrofilica no ensaio de peritonite e o edema de pata induzido por carragenana.

Uma fração polissacarídica sulfatada da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi*, obtida por cromatografia de troca iônica em DEAE-celulose, apresentou efeito antinociceptivo significativo, sendo capaz de reduzir o tempo de lambedura da pata em camundongos em ambas as fases do ensaio de formalina (FARIAS *et al.*, 2011).

Polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Ulva lactuca* possuem efeito hipocolesterolêmico e antioxidante em modelo experimental. A administração oral destes polissacarídeos causou diminuição significativa dos níveis séricos de lipídios totais, triglicérides, colesterol total, LDL-colesterol, VLDL-colesterol, transaminases e fosfatase alcalina (HASSAN *et al.*, 2011).

2.5 Dor e Nocicepção

A integridade dos organismos vivos é garantida através da interação de dois sistemas altamente especializados: o sistema imune e o sistema nervoso. O principal componente do sistema nervoso central, o encéfalo, tem a capacidade de receber e integrar as informações recebidas de todas as partes do organismo (JULIUS, BASBAUM, 2001). Assim, o encéfalo tem a habilidade de recordar e detectar qualquer agressão. Considerando que em condições fisiológicas as atividades do sistema imune nunca atingem a consciência, a dor é o mecanismo utilizado pelo organismo como alerta sobre a presença de um estímulo agressor (VANDERAH, 2007).

Segundo a Associação Internacional de Estudos sobre Dor (IASP, 2011), dor é definida como sendo uma experiência emocional e sensorial desagradável, associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termo de tal lesão. Dessa forma, a dor envolve componentes neurofisiológicos, comportamentais, psicossociais e afetivos (MCDUGALL, 2011).

A dor é uma experiência subjetiva, podendo ser uma resposta direta a um evento desfavorável, associado a danos teciduais, como lesão, inflamação ou câncer, e pode também surgir de modo independente. Assim, a transmissão da dor ocorre através de um mecanismo

que envolve uma interação muito complexa de estruturas periféricas e centrais da superfície da pele ao córtex cerebral central (FÜRST, 1999).

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

A maioria dos tipos de dor começa na periferia com estímulo nocivo não especializado, ativando as terminações nervosas livres associadas com neurônios aferentes primários de pequeno diâmetro. Este estímulo físico é posteriormente transduzido em um sinal eletroquímico, que é transmitido da periferia para o sistema nervoso central (MCDOUGALL, 2011).

Os nociceptores têm a habilidade de detectar uma grande variedade de estímulos, incluindo os de natureza física e química, e de convertê-los em sinais eletroquímicos (JULIUS, BASBAUM, 2001). Ao entrar no corno dorsal da medula espinal, estes impulsos são transmitidos através de neurônios de segunda ordem ao longo de vias ascendentes para o cérebro (Figura 1). Ao veicular esses impulsos para áreas específicas do cérebro, como o córtex somatosensorial e a amígdala os sinais eletroquímicos são moldados em uma experiência física que incorpora reflexos motores de proteção e respostas emocionais. Detalhes importantes de todo este processo ainda não são totalmente compreendidos (MCDOUGALL, 2011).

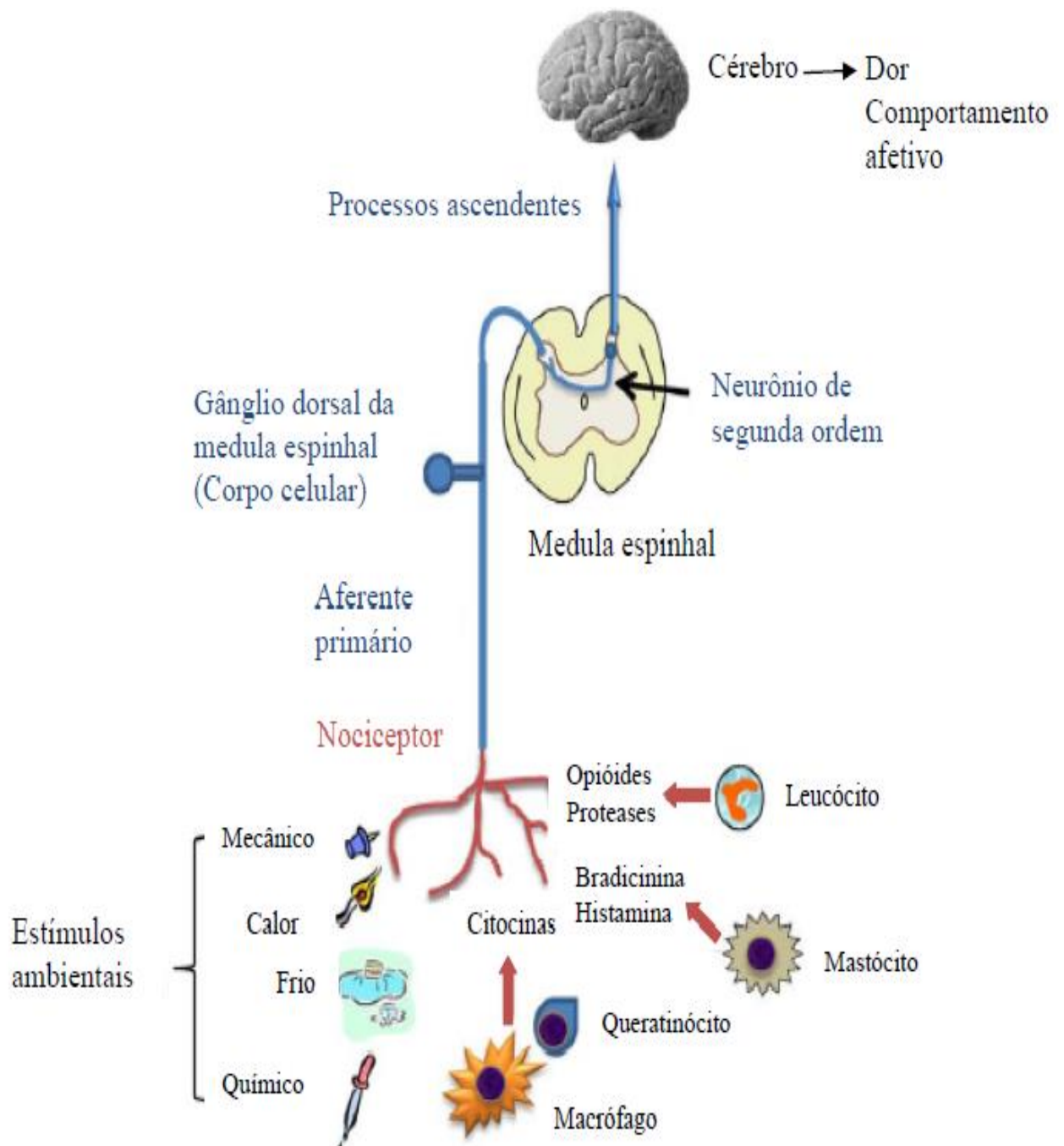


Figura 1 – Trajeto percorrido pelo estímulo doloroso. Estímulos nocivos podem ativar os nociceptores causando a sensação de dor. Células residentes nas proximidades das terminações nervosas podem liberar mediadores que podem tanto aumentar quanto reduzir o limiar de ativação dos nervos. McDougall (2011) adaptado por Quinderé (2011).

O sistema nociceptivo também possui fibras nervosas distribuídas nos tecidos, sendo responsáveis pela informação dolorosa. Dentre estas fibras, a A-delta (A δ) e a C estão associadas à 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 δ são mielinizadas e permitem uma rápida transmissão de estímulos cerca de (10 a 30 m/s) 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/s) por um período mais longo (JULIUS; BASBAUM, 2001). Vários metabólitos e substâncias são liberados de células lesadas ou isquêmicas ou de tecidos inflamados, incluindo ATP, prótons (produzidos por ácido láctico), (5-HT), histamina e K⁺, muitos dos quais afetam as reações nociceptivas. O pH baixo excita os neurônios aferentes nociceptivos em parte por abertura de canais de cátions ativados por prótons e em parte por facilitação do receptor vanilóide (RANG *et al.*, 2007).

A dor pode ser de curta duração (aguda) ou mais prolongada (crônica). A dor aguda é geralmente benéfica para o indivíduo, uma vez que adverte de dano tecidual real ou iminente permitindo rápida ação reflexa. Esta dor nociceptiva surge na periferia com estímulos térmicos ou químicos. A dor aguda geralmente pode ser aliviada pela administração local de agentes analgésicos (por exemplo, a lidocaína, um anti-inflamatório não-esteróidal) ou abordagens não farmacológicas (por exemplo, esfregando a área afetada ou aplicação de gelo no local) (MCDOUGALL, 2011).

A dor crônica, por sua vez, não possui caráter protetor. Sua duração excede a do reconhecimento natural de um estímulo e pode estar presente na ausência de qualquer agente indutor identificável (SERRA, 1999; AGUGGIA, 2003). Geralmente não é bem localizada e tende a ser maciça, contínua ou recorrente (FÜRST, 1999). A dor crônica pode acarretar conseqüências físicas, comportamentais, mentais, psicológicas e psicossociais, além de envolver grave estresse emocional. A dor crônica difere substancialmente da dor aguda em relação à sua persistência, alterações adaptativas, tais como neuroplasticidade em vários níveis do sistema nervoso, e dificuldade de tratamento (BESSON, 1999; BASBAUM *et al.*, 2009).

O cérebro e a medula espinal desempenham um papel importante nos mecanismos de dor central. No entanto, o conhecimento dos mecanismos no cérebro ainda é relativamente limitado. O corno dorsal da medula espinal é dotado de vários neurotransmissores e receptores, incluindo: a substância P, somatostatina, neuropeptídeo Y, aminoácidos excitatórios, inibidores de

aminoácidos, o óxido nítrico, opióides endógenos, a adenosina, e as monoaminas, entre outros. A transmissão da dor para o cérebro está sob diversos controles fisiológicos. Sem dúvida, isso contribui para um difícil desafio na descoberta de formas de inibir as sensações de dor, sem causar efeitos indesejáveis (MCCURDY; SCULLY, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1. Geral

Isolar, fracionar e avaliar os efeitos de uma fração polissacarídica sulfatada da alga marinha verde *Ulva lactuca* em modelos clássicos de nocicepção.

3.2. Específicos

- ✓ Extrair por digestão enzimática e avaliar o rendimento da extração de polissacarídeos sulfatados totais (PST) da alga marinha verde *U. lactuca*, fracionar os PST por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) e determinar a composição química dos PST e das frações obtidas por cromatografia (DEAE-celulose);
- ✓ Verificar a separação das frações obtidas (DEAE-celulose) por eletroforese em gel de agarose;
- ✓ Investigar o efeito antinociceptivo de uma fração polissacarídica obtida por DEAE-celulose, por meio dos testes de contorções abdominais, formalina e placa quente em camundongos;
- ✓ Avaliar a toxicidade da fração polissacarídica por dose repetida (14 dias) em camundongos através de parâmetros bioquímicos e avaliação macroscópica dos órgãos (coração, fígado e rim).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Coleta e identificação da alga marinha

Exemplares da alga marinha verde *U. lactuca* foram coletados na Praia de Flecheiras, município de Trairi – CE, durante a maré baixa de sizígia, sendo conduzidos ao Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CarboLec), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade federal do Ceará (UFC), em sacos plásticos. No laboratório, as algas foram limpas para a retirada de epífitas e outros organismos incrustantes, lavadas com água destilada e armazenadas (-20°C) até o uso. (Figura 2).



Filo: Chlorophyta (alga verde)
Classe: Ulvophyciae
Ordem: Ulvales
Família: Ulvaceae
Gênero: *Ulva*
Espécie: *Ulva lactuca* (Linnaeus)

Figura 2 - Aspecto macroscópico da alga marinha verde *Ulva lactuca* (Linnaeus) e sua classificação taxonômica.

4.1.2 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos (20-25 g), no total de seis animais por grupo, fornecidos pelo Biotério Central da UFC - *Campus do Pici*, os animais receberam água e ração livremente. Os ensaios com os animais seguiram os padrões exigidos de ética e biossegurança, e somente foram iniciados após aprovação da comissão de ética em pesquisa

animal (CEPA) desta instituição, como parte do projeto “Bioprospecção de polímeros de algas marinhas com potencial biotecnológico” aprovado sob o processo de número 80/10.

4.2 Métodos

4.2.1 *Extração dos polissacarídeos sulfatados totais*

A extração dos polissacarídeos sulfatados totais (PST) foi realizada de acordo Farias *et al.* (2000) com modificações. Inicialmente, a alga desidratada em temperatura ambiente e macerada com nitrogênio líquido (5g), foi hidratada em 250 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) contendo EDTA 5 mM e cisteína 5 mM e digerida com 17 mL de uma solução de papaína bruta (30 mg mL⁻¹), durante 6 horas a 60°C em banho-maria. Em seguida, o material foi filtrado em nylon. Os polissacarídeos presentes no filtrado foram precipitados por meio da adição de 16 mL de cloreto de cetilpiridínio (CCP) a 10% (24 h; 25 °C). Logo após a precipitação, o material (filtrado) foi lavado (CCP 0,05%; 200 mL) e posteriormente centrifugado (7965 x g; 30 min; 10°C) e depois dissolvido em 174 mL de NaCl 2 M: etanol comercial (100: 15; v v⁻¹) e novamente precipitado através da adição de 200 mL de etanol comercial (24 h; 4 °C). Após a segunda precipitação, o material assim obtido foi lavado duas vezes com 200 mL etanol comercial diluído a 80% e uma vez com etanol comercial (200 mL), seguido de centrifugação (7965 x g; 30 min; 10 °C). Em seguida, foi dialisado contra água destilada e liofilizado para obtenção dos PST. (Figura 3).

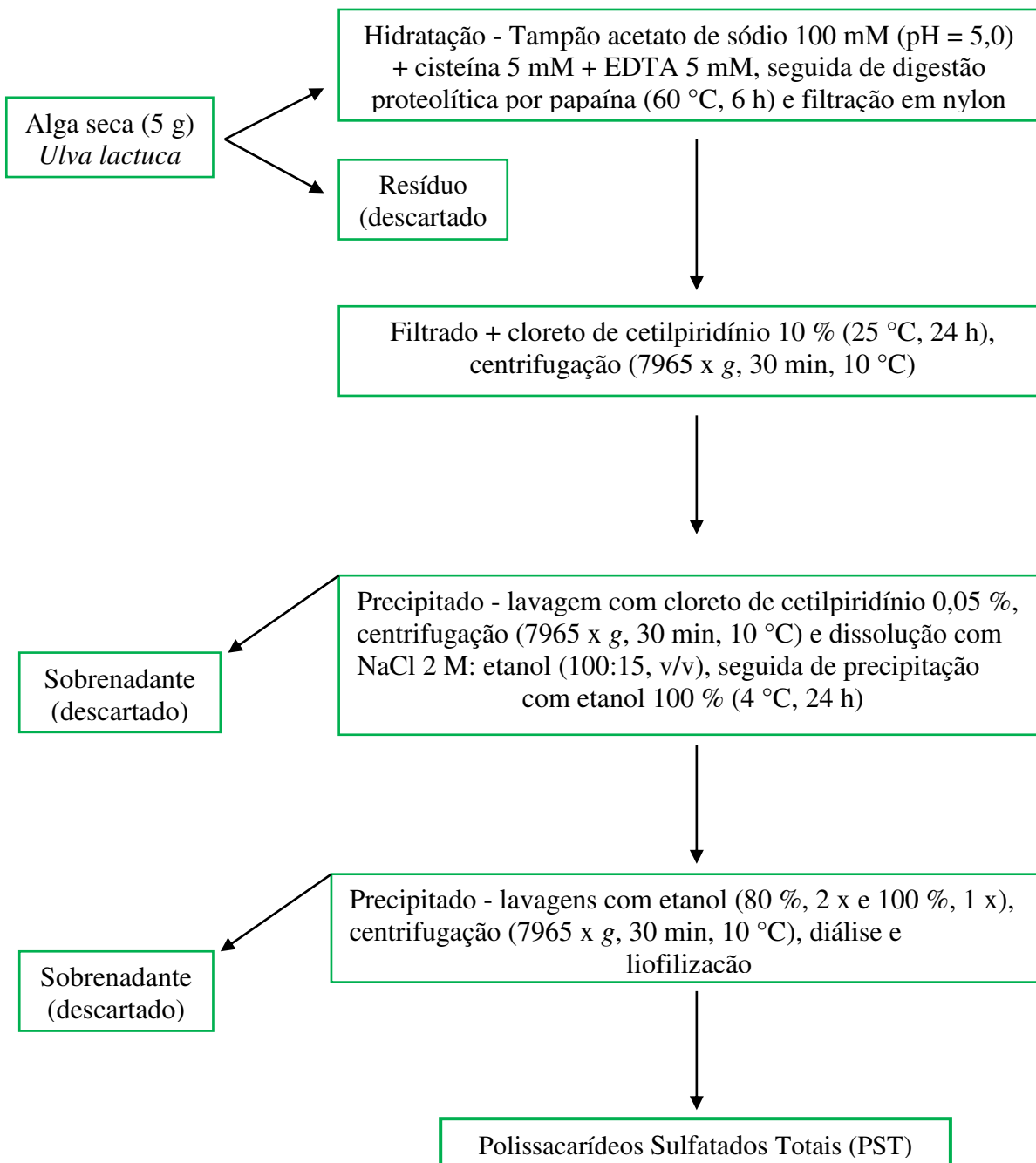


Figura 3 - Fluxograma de extração dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Ulva lactuca*

4.2.2 Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose

Os PST (50 mg) foram dissolvidos em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) (2 mg/mL) e submetidos à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose equilibrada com o mesmo tampão. A coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio e as

frações de polissacarídeos sulfatados foram eluídas por “*stepwise*” com NaCl nas concentrações de 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,5 M adicionado ao tampão de equilíbrio. As frações foram obtidas e monitoradas por meio da reação metacromática usando o azul de 1,9-dimetilmetileno (ADM) em espectrofotômetro ajustado em 525 nm (FARNDALE; BUTTLE; BARRET, 1986). As frações sulfatadas majoritárias foram dialisadas contra água destilada, liofilizadas e estocadas para uso posterior.

4.2.3 Eletroforese em gel de agarose

Os PST e as frações de polissacarídeos sulfatados (25 µg) foram analisados por eletroforese em gel de agarose (0,5%) utilizando tampão 1,3 - acetato diaminopropano 50 mM (pH 9,0). Os polissacarídeos sulfatados foram aplicados no gel e a corrida realizada em voltagem constante (110 V) durante 60 min. Após o procedimento, os PST e as frações polissacarídicas presentes no gel foram fixados com uma solução de *N*-cetil-*N,N,N*-brometo de trimetilamônio a 0,1% por 24 horas. Em seguida, o gel foi corado com azul de toluidina a 0,1% e, finalmente, descorado com uma solução contendo etanol absoluto, água destilada e ácido acético concentrado (4,95: 4,95: 0,1; v⁻¹v⁻¹v⁻¹), como descrito por Dietrich e Dietrich (1976).

4.2.4 Análise da composição química

Os carboidratos totais foram determinados pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) e monitorados em espectrofotômetro (AMERSHAM BIOSCIENCES, modelo BIOTRAK II), ajustado à 490 nm, utilizando-se a D-galactose como padrão.

As concentrações de proteínas contaminantes (PC) foram realizadas segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se Albumina Sérica Bovina (BSA) como padrão e monitoradas em espectrofotômetro à 525 nm.

O teor de sulfato livre (SL) foi determinado após hidrólise ácida (HCl 1 M, 5 horas, 105°C) pelo método da gelatina-bário (DODGSON; PRICE, 1962) e monitorado em espectrofotômetro à 360 nm. O sulfato de sódio anidro foi empregado como padrão.

4.2.5 Modelos de nocicepção

4.2.5.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

O teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético é um modelo clássico de nocicepção periférica, em que após a injeção intraperitoneal do agente nociceptivo, foram observadas as respostas que consistem em uma sequência de contorções no abdômen acompanhadas por extensão dos membros inferiores (KOSTER *et al.*, 1959).

Trinta minutos após a administração da fração polissacarídica de *U. lactuca* nas doses de 1, 3 ou 9 mg/kg (i.v.; 0,1 mL/10 g de peso) ou salina estéril (0,9% (i.v.)) foi feita a injeção do estímulo nociceptivo, ou seja, foi administrado ácido acético 0,8% na cavidade peritoneal dos animais (0,1 mL/10 g de peso do animal). Imediatamente após administração do ácido acético a contagem das contorções foi iniciada, durante um período de 30 minutos consecutivos (Figura 4). Foram utilizados indometacina (5 mg/kg; s.c.), um anti-inflamatório não-esteroidal e morfina (5 mg/kg; s.c.), um agonista opióide, como controles positivos (HULL; GADNER; HAWCROFT, 2003).



Figura 4 - Comportamento de um camundongo apresentando contorção abdominal seguida por extensão das patas posteriores induzida por ácido acético a 0,8%.

4.2.5.2 Teste da formalina

Este teste caracteriza-se por apresentar resposta bifásica distinta em resposta a um estímulo químico, sendo a primeira fase considerada neurogênica e a segunda inflamatória (BRAGGIO *et al.*, 2002).

O teste da formalina foi realizado seguindo a metodologia de Dubuisson e Dennis (1977) modificado por Hunskaar e Hole (1987). Grupos de animais receberam 30 min antes

da injeção intraplantar (i.pl.) de formalina 1%: salina estéril 0,9% (i.v.); fração polissacarídica de *U. lactuca* nas doses de 1; 3 ou 9 mg/kg (i.v.; 0,1 mL/10 g de peso). Indometacina (5 mg/kg; s.c.) e morfina (5 mg/kg; s.c.) foram utilizados como controles. Nesse teste, 20 µL da solução de formalina foi injetada na pata direita de camundongos e o tempo de lambedura foi registrado simultaneamente durante os primeiros 5 min (1ª fase, que corresponde ao estímulo químico direto dos nociceptores – fase inicial) e durante 5 min, após um período de 20 min (2ª fase, que envolve a inflamação – fase tardia) (Figura 5).



Figura 5 - Comportamento de um camundongo lambendo a pata traseira após aplicação de 20 µL de formalina a 1%.

4.2.5.3 Teste da placa quente

A atividade analgésica central foi avaliada pelo teste da placa quente, segundo o método de Eddy e Leimbach (1953), que consiste em registrar o tempo (s) que os animais, quando em contato com uma placa de metal aquecida (51 ± 1 °C), levam para manifestar uma resposta, que corresponde ao ato de retirar ou lambe a pata traseira e/ou saltar. Este teste é específico para verificar a nocicepção central. Os animais, primeiramente, foram familiarizados com a placa quente, para observação do tempo de reação controle. Os animais que apresentaram um tempo de reação superior a 10 s foram descartados do teste. Grupos de animais receberam 30 min antes do estímulo térmico: salina estéril 0,9% (i.v.); fração polissacarídica de *U. lactuca* nas doses de 1; 3 ou 9 mg/kg (i.v.; 0,1 mL/10 g de peso). morfina (5 mg/kg; s.c.) e indometacina (5 mg/kg; s.c.) foram utilizados como controles. As medidas do tempo de resposta foram registradas em intervalos de 30 minutos após a administração, durante 90 min (tempos: 30 min; 60 min e 90 min) com um tempo de corte de 40 s (Figura 6).



Figura 6 - Comportamento do animal durante o teste da placa quente.

4.2.6 Avaliação da toxicidade por dose repetida em camundongos

Para uma avaliação preliminar das propriedades tóxicas da fração FII de *Ulva lactuca* (9 mg/kg), a mesma foi administrada (i.p.) em camundongos machos, divididos em grupos de seis animais, durante quatorze dias consecutivos, rigorosamente pesados, sendo mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica da UFC com livre acesso à água e ração. Durante este período, foram observados sinais físicos como coçar nariz, lamber as patas, rodopiar, ereção de pêlos, além de sinais comportamentais, como apatia e/ou agressividade.

No 15º dia, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10% e amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo citrato para as dosagens bioquímicas do plasma e armazenado em freezer a -80 °C para posteriores dosagens séricas de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e uréia.

Em seguida, os camundongos foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical sob anestesia, seguido da retirada e pesagem dos órgãos (coração, fígado e rim), mantendo correlações com as respectivas massas corpóreas. Todos os parâmetros toxicológicos observados foram comparados aos de animais controle que receberam apenas salina estéril 0,9% (i.p.), nas mesmas condições que os animais tratados.

4.2.6.1 Análises bioquímica do plasma

A enzima aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima liberada no sangue quando ocorre uma lesão hepática, muscular, cardíaca ou cerebral. A enzima alanina

aminotransferase (ALT) também é liberada no sangue quando ocorre uma lesão hepática. Portanto, sua mensuração é útil para detectar danos hepato-celular.

O procedimento para a dosagem de AST constitui-se em adicionar 50 µL do substrato AST em tubos de ensaio (solução de 0,2 M de L-aspartato, 0,002 M α -cetogluturato, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4), que foram incubados em banho-maria a 37°C por 2 min, seguido da adição de 10 µL da amostra (plasma) de cada animal. Após incubação a 37°C por 30 minutos, foram adicionados 50 µL da solução 0,001 M de 2,4 Dinitrofenilhidrazina, homogeneizado e deixado em repouso à temperatura ambiente (20-30°C), durante 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 500 µL de hidróxido de sódio 0,4 M e a solução deixada em repouso durante 5 minutos, a temperatura ambiente (20-30°C). As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro AMERSHAM BIOSCIENCES ULTROSPEC 1100 a 505 nm.

Para a dosagem de ALT, o procedimento constitui-se em adicionar 50 µL de substrato ALT em tubos de ensaios (solução de 0,2 M de L-alanina, 0,002 M α -cetogluturato, tampão de fosfatos 0,1 M pH 7,4), que foram incubados em banho-maria (37°C; 2 min), seguido da adição de 10 µL da amostra (plasma), homogeneizado e incubado a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 50 µL da solução 0,001 M de 2,4 Dinitrofenilhidrazina, homogeneizado e deixado em repouso à temperatura ambiente (20 - 30 °C), durante 20 minutos. Em seguida, adicionou-se 500 µL de hidróxido de sódio 0,4 M e a solução ficou em repouso durante 5 min, à temperatura ambiente (20 - 30 °C). As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro a 505nm.

A dosagem de uréia tem a finalidade de observar possíveis alterações na função renal dos animais. foram coletadas as amostras de sangue, como descrito anteriormente, e desse foram utilizados 10 µL de plasma de cada animal para a dosagem de uréia, segundo metodologia descrita pelo fabricante (Labtest®) e utilizando absorvância de 600 nm em espectrofotômetro. Esta metodologia baseia-se em um sistema enzimático-colorimétrico, cuja intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de uréia na amostra.

4.2.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (erro padrão da média). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos será realizada Análise de Variância (ANOVA) e, quando observado diferenças significativas entre as médias, foi aplicado o teste de Bonferroni. Os dados toxicológicos foram analisados por *t*-Student para testes não pareados. Foi considerado significativo $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

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

A partir da extração de 5 g de alga seca *U. lactuca*, obteve-se 110,9 mg de polissacarídeos sulfatados totais (PST), perfazendo um rendimento de 2,218%, semelhantemente ao encontrado por Ribeiro (2012), utilizando a mesma metodologia para extração de PST da alga verde *Caulerpa racemosa* obtiveram rendimento de 2,2%. Este rendimento é considerado baixo quando comparado aos PST obtidos para algumas espécies de algas vermelhas e pardas. Como por exemplo, a alga vermelha *Halymenia pseudofloresia* utilizando-se o mesmo protocolo de digestão enzimática, mas com tempo de hidrólise mais prolongado (24 h) e secagem em estufa a 60 °C, apresentou um rendimento de 40,5% (RODRIGUES *et al.*, 2009), e os PS totais da alga marinha parda *Lobophora variegata* obtidos por extração enzimática apresentaram 28,4% (ALENCAR, 2007).

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

Várias metodologias podem ser empregadas para a extração de polissacarídeos de algas marinhas, tais como aquosas, a frio e a quente, e enzimática (FARIAS *et al.*, 2000), dentre outras. Porém, a extração por digestão enzimática possui a propriedade de eliminar contaminantes protéicos (PERCIVAL; McDOWELL, 1967). Além disso, o rendimento de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas é variável com o protocolo de obtenção e espécie de alga utilizada (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2003).

No presente estudo, o fracionamento dos PST foi realizado, através de cromatografia de troca-iônica em coluna de DEAE-celulose, resultando em três frações de polissacarídeos sulfatados majoritárias denominadas de FI, FII e FIII, eluídas respectivamente com 0,5; 0,75 e 1 M de NaCl (Figura 7), cujo rendimentos obtidos após diálise e liofilização foram de 2,0; 19,2 e 1,6%, respectivamente.

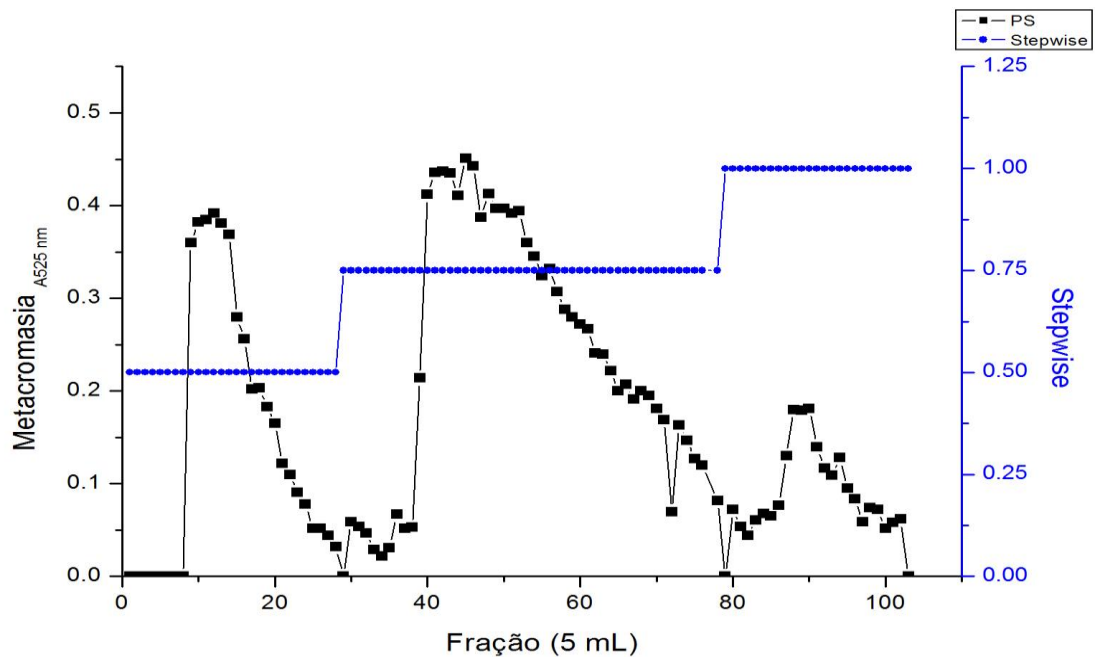


Figura 7 - Cromatografia de troca iônica dos PST da alga marinha *Ulva lactuca* em coluna de DEAE-celulose. As frações majoritárias foram eluídas por “stepwise” com NaCl (-) nas concentrações de 0,5; 0,75 e 1 M e monitoradas por metacromasia com DMB (■-----■).

5.2 Análises da composição química

Os teores de carboidratos totais nos PST de *Ulva lactuca* e nas frações F I, F II e F III foram 54,72, 61,92, 53,12 e 32,72%, respectivamente. Os teores de sulfato nas amostras hidrolisadas de PST e nas frações F I e F II foram de 15,10; 7,15; 12,52% respectivamente. Na fração FIII não foi detectado o teor de sulfato livre. Não foram encontrados teores de contaminantes protéicos em nenhuma das amostras avaliadas, comprovando dessa forma, a eficiência do método de extração empregado (Tabela 1). De uma maneira geral, a composição química de PST e frações polissacarídicas de algas marinhas pode variar de espécie para espécie (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Tabela 1 – Composição química dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Ulva lactuca*

<i>Ulva lactuca</i>	Carboidratos totais (%)	Sulfato livre (%)	Proteínas totais (%)
PST	54,72	15,10	-
Fração I	61,92	7,15	-
Fração II	53,12	12,52	-
Fração III	32,72	-	-

(-) Não detectado

5.3 Eletroforese em gel de agarose

O procedimento de eletroforese em gel de agarose mostrou uma única banda polissacarídica para os PST e para as frações (F I, F II e F III) (Figura 8).

Durante o presente estudo, uma maior intensidade de sinais de carga negativa foi observada na banda dos PST da alga marinha *Ulva lactuca*, durante a corrida da eletroforese no gel de agarose, conseqüentemente, por ser mais heterogênea. No entanto, as bandas únicas das frações F I e FII, apresentaram discretamente maior mobilidade, sendo mais homogêneas e polidispersas no gel de agarose em relação aos PST. Enquanto que a fração FIII, apresentou a menor intensidade de cargas negativas sobre o gel. Possivelmente, a menor intensidade da fração FIII está relacionada com uma menor quantidade de grupos sulfatados na estrutura química do polissacarídeo sulfatado.

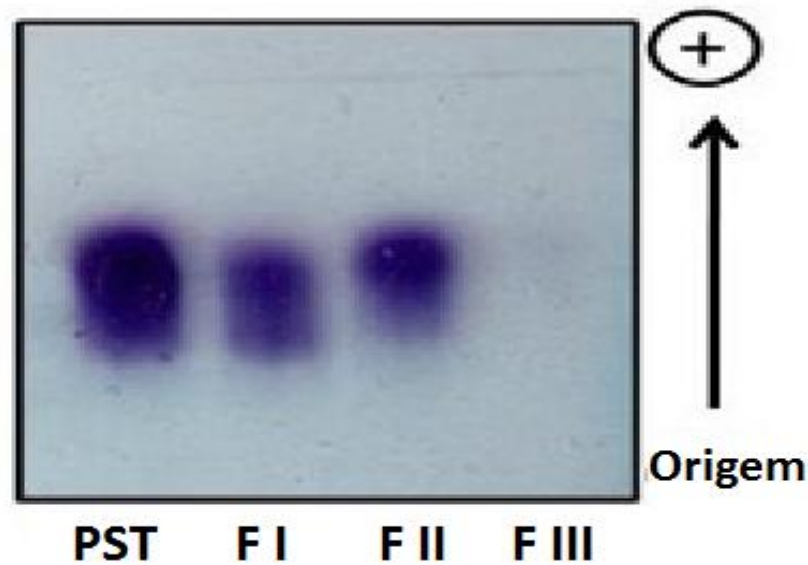


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose (0,5%) dos PST e das frações (F I, F II e F III) da alga marinha *Ulva lactuca*. As frações foram obtidas por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose e colocadas no gel (1 mg/mL). A corrida foi realizada em voltagem constante (110 V) durante 60 min e as bandas coradas com azul de toluidina a 0,1%.

Portanto, o procedimento de separação dos PST por cromatografia de troca iônica (DEAE-celulose) combinada à técnica de eletroforese em gel de agarose revelou-se bastante eficiente para a caracterização parcial destes compostos isolados da espécie em questão.

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

5.4 Atividade antinociceptiva

O efeito antinociceptivo da fração polissacarídica sulfatada PS-UI da alga marinha verde *Ulva lactuca*, foi investigado através da utilização de modelos clássicos de nocicepção conhecidos por teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste do tempo de lambadura induzido por formalina e o teste do tempo de latência utilizando placa quente.

5.4.1 Testes de contorções induzidas por ácido acético

O pré-tratamento (i.v.) dos animais com PS-UI nas doses de 1 e 3 mg/kg reduziu significativamente ($p < 0,05$) o número de contorções abdominais em 48,19 e 42,66% quando

comparados ao grupo controle salina, já a dose de 9,0 mg/kg reduziu em 39,89%, porém não diferiu estatisticamente do controle salina. A morfina e indometacina, utilizadas como controles positivos, reduziram as contorções em 93,83 e 29,40%, respectivamente. (Figura 9).

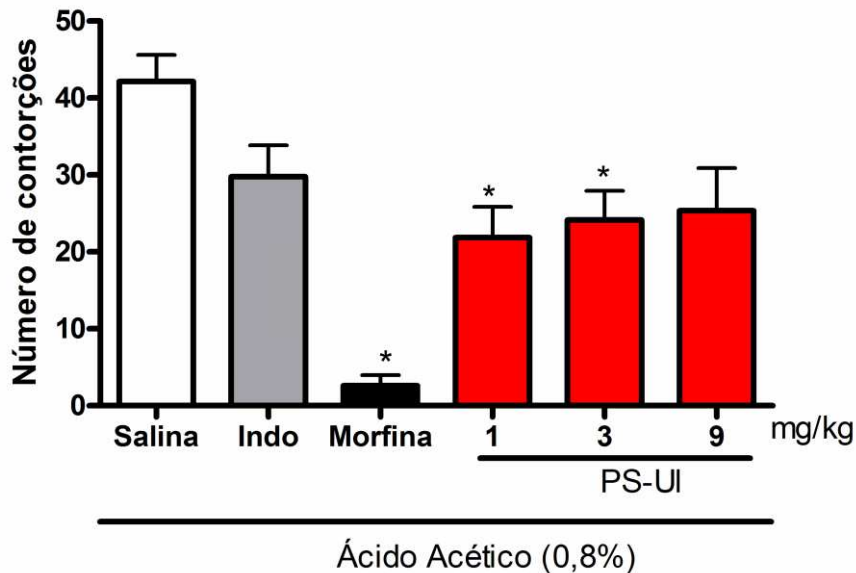


Figura 9 - Efeito da administração da fração F II (PS-UI) da alga *Ulva lactuca* em modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os animais foram tratados 30 min antes da aplicação de ácido acético (0,8%; i.p.) com salina estéril 0,9% (i.v.), morfina (5 mg/kg; s.c.), indometacina (5 mg/kg; s.c.) ou F II (1; 3 ou 9 mg/kg; i.v.). As barras representam a média ± E.P.M. de seis animais por grupo. *p<0,05 indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle salina (ANOVA; Bonferroni).

O PS-UI na dose de (1mg/kg - 48,19%) apresentou resposta antinociceptiva de acordo com a literatura quando comparada aos polissacarídeos sulfatados obtidos das algas marinhas verde *Caulerpa. cupressoides* (3,0 mg/kg, i.v - 57%) (RODRIGUES *et al.*, 2012), *Caulerpa. racemosa* (0,1mg/kg, i.v - 49%) (RIBEIRO *et al.*, 2014) e *Caulerpa mexicana* (10mg/kg, i.v - 88,6%) (CARNEIRO *et al.*, 2014), sendo essa ultima utilizada em uma dose bem mais elevada quando comparada a alga em estudo.

O teste de contorção abdominal induzida por ácido acético trata-se de um modelo de nocicepção periférica no qual a irritação local desencadeia a liberação de vários mediadores como a bradicinina, substância P e prostaglandinas, bem como citocinas. Tais mediadores ativam nociceptores quimiossensíveis que contribuem com o desenvolvimento da dor de origem inflamatória, sendo uma ferramenta para a avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória de novos compostos (IKEDA *et al.*, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2000).

Desta forma, a atividade antinociceptiva de PS-UI da alga *U. lactuca* é possivelmente decorrente da sua ação sobre os ligantes destes mediadores inflamatórios e uma ação direta sobre as terminações nervosas também é possível.

5.4.2 Efeito do PS-UI sobre o tempo de lambertura da pata induzido por formalina

O modelo de nociceção induzida por formalina, amplamente utilizado como modelo de dor persistente (SHIELDS *et al.*, 2010). foi utilizado neste estudo para avaliar a propriedade antinociceptiva de PS-UI. Este teste é específico e caracteriza-se por apresentar resposta bifásica distinta, a primeira fase é caracterizada pela dor neurogênica causada pela estimulação química direta dos nociceptores, enquanto, que a segunda fase é caracterizada pela dor inflamatória desencadeada por uma combinação de estímulos, incluindo a inflamação dos tecidos periféricos e dos mecanismos centrais de sensibilização (TJØLSEN *et al.*, 1992). Durante a segunda fase do teste ocorre a liberação de mediadores inflamatórios nos tecidos periféricos, tais como prostaglandinas, histamina, serotonina e bradicinina. Além disso, é caracterizada por alterações funcionais nos neurônios do corno dorsal da medula espinal, promovendo a longo-prazo a transmissão sináptica a nível espinal (FRANÇA *et al.*, 2001; OLIVEIRA; SOUSA; ALMEIDA, 2008).

O PS-UI apresentou um efeito antinociceptivo em camundongos, como mostrado na Figura 10. O pré-tratamento (i.v.) dos animais com PS-UI (1; 3 ou 9 mg/kg), 30 min antes do estímulo químico (formalina a 1%), não reduziu o tempo de lambertura da pata na primeira fase (neurogênica) do ensaio (Figura 10A). Na segunda fase (inflamatória), PS-UI (1, 3 e 9 mg/kg) reduziram o tempo de lambertura na ordem de 72,06; 35,99 e 35,66%, respectivamente. Portanto, apenas as doses de 1 e 3 mg/kg promoveram efeito analgésico, enquanto que a dose de 9 mg/kg não reduziu significativamente o tempo de lambertura durante a segunda fase do teste (Figura 10B). O grupo controle positivo morfina (5 mg/kg; s.c.) foi capaz de reduzir o tempo (s) de lambertura dos animais em ambas as fases do teste ($p < 0,05$), enquanto, o grupo controle positivo indometacina (5 mg/kg; s.c.) mostrou ação significativa somente na segunda fase do teste ($p < 0,05$).

Tem sido bastante relatado na literatura que fármacos que agem primariamente no sistema nervoso central inibem igualmente ambas as fases, enquanto os que agem periféricamente como, antiinflamatórios não-esteroidais e corticosteróides, inibem predominantemente a segunda fase (HUNSKAAR *et al.*, 1985; BITENCOURT *et al.*, 2008). Portanto, neste ensaio realizado com PS-UI o efeito ocorreu somente na segunda fase do teste sugerindo que sua propriedade antinociceptiva está relacionada à dor inflamatória.

Esses resultados corroboram com os dados da literatura, onde, frações polissacarídicas sulfatadas das algas marinhas verdes *Caulerpa racemosa* (1 mg/kg, i.v – 98%) e *Caulerpa mexicana* (10 mg/kg, i.v – 88,6%) apresentaram redução no tempo de lambertura de patas somente na segunda fase do ensaio da formalina (RIBEIRO *et al.*, 2014; CARNEIRO *et al.*, 2014). Portanto, a menor dose de PS-UI usado neste ensaio apresentou um resultado semelhante.

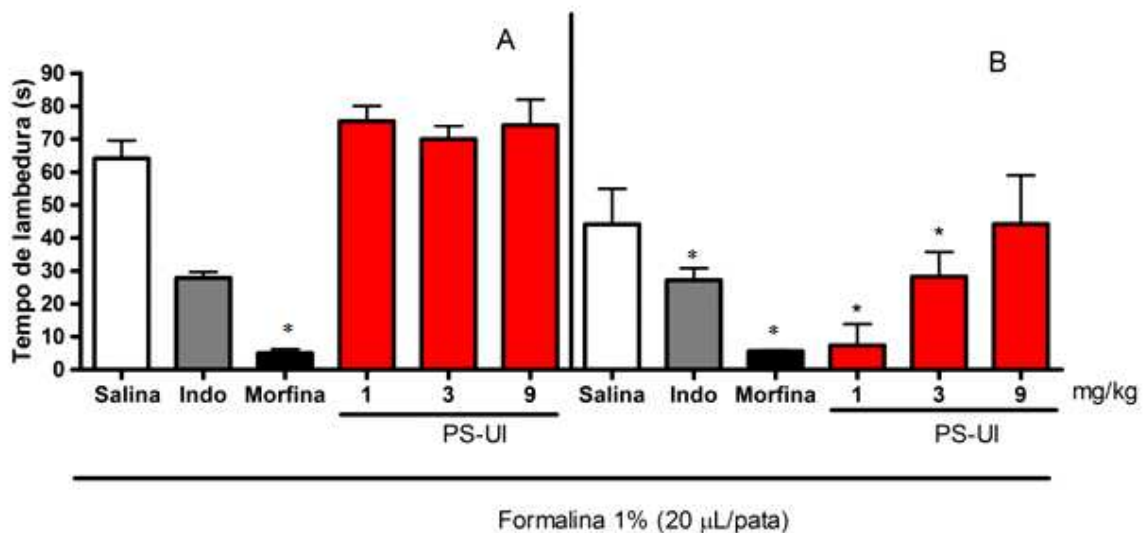


Figura 10 - Efeito da administração da fração FII (PS-UI) da alga *Ulva lactuca* no teste da formalina a 1%. Os animais foram tratados 30 min antes da injeção de formalina (1%; i.pl.) com salina estéril 0,9% (i.v.), morfina (5 mg/kg; s.c.), indometacina (5 mg/kg; s.c.) ou PS-UI (1; 3 ou 9 mg/kg; i.v.). Imediatamente após a administração da formalina o tempo de lambertura foi registrado: 1ª fase (5 min) (painel A) e 2ª fase (20 a 25 min) (painel B). As barras representam a média ± E.P.M. do tempo (s) de lambertura de seis animais por grupo. * $p < 0,05$ indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle salina (ANOVA; Bonferroni).

5.4.3 Efeito do PS-UI no teste da placa quente

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

O pré-tratamento dos animais com PS-UI (1; 3 ou 9 mg/kg; i.v.), indometacina (5 mg/kg; s.c.) ou salina estéril 0,9% (i.v.), 30 min antes do estímulo térmico, não produziu efeito antinociceptivo no decorrer dos 90 min do teste. O pré-tratamento com morfina (5 mg/kg; s.c.), utilizado como controle positivo, foi capaz de induzir analgesia ($p < 0,05$) prolongando o tempo (s) de resposta dos animais, comparado ao grupo salina (Figura 11).

Desta forma, os resultados sugerem que a atividade antinociceptiva do PS-UI não está relacionada aos receptores opióides centrais e que possivelmente atue por mecanismo periférico. Estes resultados mostraram-se semelhantes aos obtidos para a atividade antinociceptiva de ação periférica de uma fração polissacarídica sulfatada da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (RIBEIRO *et al.*, 2014), mas diferem da fração polissacarídica obtida por Rodrigues *et al.*, (2012), em que, os PS da alga verde *Caulerpa cupressoides* foram capazes de prolongar significativamente o tempo, em segundos, da resposta aos estímulos térmicos.

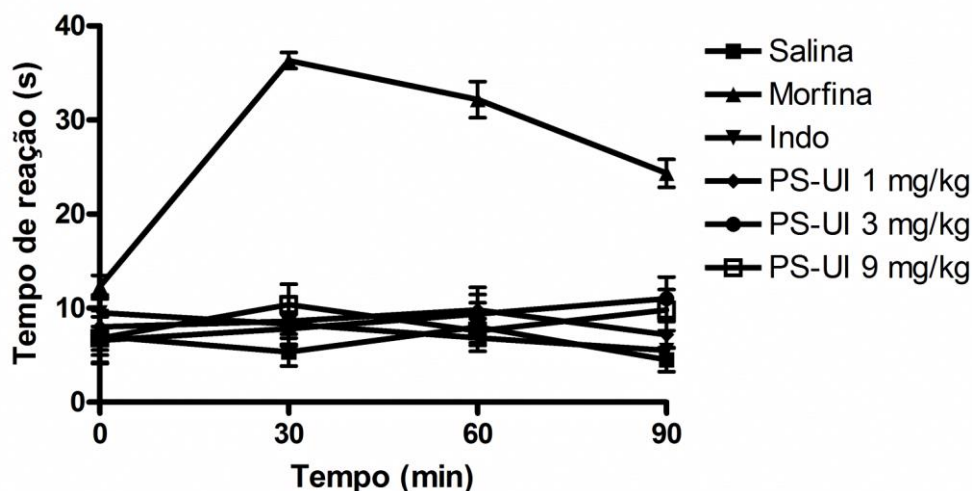


Figura 11 - Efeito da administração da fração F II (PS-UI) da alga *Ulva lactuca* no teste da placa quente ($51 \pm 1^\circ\text{C}$). Antes do estímulo térmico, os animais foram tratados 30 min antes com solução salina estéril 0,9% (i.v.), morfina (5 mg/kg; s.c.), indometacina (5 mg/kg; s.c.) ou PS-UI (1; 3 ou 9 mg/kg; i.v.). Os pontos sobre as linhas representam a média \pm E.P.M. do tempo (s) de reação de seis animais por grupo no decorrer de 90 min do ensaio. * $p < 0,05$ indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle salina (ANOVA; Bonferroni).

5.5 Avaliação sistêmica de PS-UI da alga marinha *U. lactuca*

No desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, os estudos de toxicidade com animais é uma das ferramentas importantes para avaliar a segurança desses novos produtos. Estudos de toxicidade sistêmica são definidos a partir da redução da massa corpórea dos animais utilizados nos experimentos. Além da manifestação de toxicidade através das alterações de comportamento, apatia e má condição da pelagem, como a presença de pêlos arrepiados. Outros sinais de toxicidade podem se expressar pela alteração da massa relativa e histológica dos órgãos, alterações hematológicas e bioquímicas sanguíneas (GONZALEZ; SILVA, 2003; RAZA *et al.*, 2002).

Para avaliar a segurança da utilização de PS-UI da alga *U. lactuca* como um possível agente terapêutico, foram analisados alguns parâmetros de toxicidade utilizando camundongos (machos) tratados com a dose de 9 mg/kg (i.p.). Durante um período de 14 dias consecutivos, não se verificou mortalidade dos animais, ou qualquer tipo de alterações físicas ou comportamentais e os mesmos mostraram-se saudáveis visualmente ao longo do período avaliado.

A massa corpórea e o peso dos órgãos (coração, fígado e rim) dos animais tratados com PS-UI não diferiram ($p > 0,05$) comparados ao grupo controle salina (Tabela 2), sugerindo que o polissacarídeo sulfatado de *U. lactuca* não afetou sistemicamente os animais submetidos ao tratamento. As análises bioquímicas demonstraram que os valores obtido para ALT, AST e uréia, utilizados como marcadores de função hepática e renal não sofreram alterações, em relação ao grupo salina ($p > 0,05$).

Tabela 2 – Avaliação sistêmica dos camundongos após tratamento durante 14 dias com a fração F II (9 mg/kg; i.p.) de *Ulva lactuca*. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de seis animais por grupo. * $p < 0,05$ indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle salina (*t*-Student para testes não pareados).

Parâmetros	Tratamento (9 mg/kg; i.p.)	
	Machos	
	Salina	F II
Massa corpórea (g) inicial	29,50 \pm 0,99	29,67 \pm 1,11
Massa corpórea (g) final	34,80 \pm 0,90	34,17 \pm 1,01
Fígado (g)/ massa corpórea	5,12 \pm 0,05	5,95 \pm 0,15
Rim (g)/ massa corpórea	0,70 \pm 0,06	0,71 \pm 0,04
Coração (g)/ massa corpórea	0,54 \pm 0,01	0,56 \pm 0,02
Uréia (mg/dL)	49,34 \pm 2,08	40,83 \pm 4,25
AST (U/L)	78,28 \pm 8,37	78,45 \pm 19,09
ALT (U/L)	42,35 \pm 3,83	44,99 \pm 6,82

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, observamos que os polissacarídeos sulfatados da alga marinha *Ulva lactuca* apresentam baixo rendimento quando extraídos com papaína, além disso as frações obtidas por cromatografia de troca iônica, a partir dos polissacarídeos sulfatados totais, mostraram-se mais homogêneas e polidispersas quando submetidas a eletroforese em gel de agarose, tendo a FII (PS-UI) o maior teor de sulfato e, conseqüentemente, apresentando maior rendimento após o fracionamento. Com relação a atividade biológica, o efeito antinociceptivo da fração polissacarídica (PS-UI) parece ser mediante ação periférica. E por fim, a administração de PS-UI durante quatorze dias em camundongos não mostrou sinais de toxicidade em todos os parâmetros avaliados.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, D. B. **Extração, purificação e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Lobophora variegata***. 2007. 30 f. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.
- ALMEIDA, R. N.; OLIVEIRA, T. M. L. Triagem farmacológica comportamental. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 11, p. 131-137. 2006.
- AQUINO, R. S. *et al.* Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. **Glycobiology**, Oxford, v.5, n.1, p.11-20, 2005.
- ARAÚJO, I. W. F. *et al.* Effects of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1207-1215, 2011.
- ASSREUY, A.M.S. *et al.* Biological effects of a sulfated-polysaccharide isolated from the marine red algae *Champia feldmannii*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.31, n.4, p.691-695, 2008.
- ATHUKORALA, Y. *et al.* Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 9, p. 1711-1716, 2007.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Algae – **Anatomy, Biochemistry and Biotechnology**. 1ª Ed. Boca Ratn: Taylor & Francis Group, LCC, 2006.
- BASBAUM, A. I. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.
- BENEDITO, R. B. **Efeito antinociceptivo do monoterpeno (s)-(-)-álcool pirílico em camundongos**. 2009. 85 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.
- BENYHE, S. Morphine: new aspects in the study of an ancient compound. **Life sciences**, v. 55, n. 13, p. 969-979, 1994.
- BERTEAU, O; MULLOY, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. **Glycobiology**, v. 13, n. 6, p. 29R-40R, 2003.
- BESSION, J. M. The neurobiology of pain. **The Lancet**. v.353, n.9164, p.1610–15, 1999.
- BITENCOURT, F. S. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 377, n. 2, p. 139-148, 2008.

- BEZERRA-NETO, J. T. B. **Extração, fracionamento, purificação e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Caulerpa sertularioides* (*Caulerpales*, *Caulerpaceae*)**. 2005. 29 f. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2005.
- BRAGGIO, M. M. *et al.* Atividades farmacológicas das folhas da *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v. 69, n.4, p. 49-53, 2002.
- BUSH, C. A.; MARTIN-PASTOR, M.; IMBERY, A. Structure and conformation of complex carbohydrates of glycoproteins, glycolipids, and bacterial polysaccharides. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 28, n. 1, p. 269-293, 1999.
- CARDOZO, K. H. M. *et al.* Review: metabolites from algae with economical impact. **CompBiochem Physiol C 367 Toxicol Pharmacol**. v.146, p. 60–78, 2007.
- CARNEIRO, J. G. *et al.* Peripheral Antinociception and Anti-Inflammatory Effects of Sulphated Polysaccharides from the Alga *Caulerpa mexicana*. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 115, p. 335-342, 2014.
- CASSARO, C. M.; DIETRICH, CARL P. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 7, p. 2254-2261, 1977.
- CIANCIA, M. *et al.* Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermilara* with controversial effects on hemostasis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, n. 5, p. 641-649, 2007.
- CIANCIA, M.; QUINTANA, I.; CEREZO, A. S. Overview of anticoagulant activity of sulfated polysaccharides from seaweeds in relation to their structures, focusing on those of green seaweeds. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 23, p. 2503-2529, 2010.
- COSTA, L.S. *et al.* Heterofucan from *Sargassum filipendula* induces apoptosis in HeLa cells. **Marine Drugs**, v.9, p.603–614, 2011.
- DANTAS-SANTOS, N. *et al.* Freshwater Plants Synthesize Sulfated Polysaccharides: Heterogalactans from Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **Int. J. Mol. Sci.**, v.13, p. 961-976, 2012.
- 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.
- DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.
- DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochemical Journal**, v. 84, n. 1, p. 106, 1962.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

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

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

FARIAS, W.R. *et al.* Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 275, p. 29299-29307, 2000.

FARIAS, W. R. *et al.*, Dual effects of sulfated D-galactans from the red algae *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. **Thromb Haemost**, v. 86, n. 6, p. 1540-1546, 2001.

FARIAS, W. R.; NAZARETH, R. A.; MOURÃO, P. AS. Dual effects of sulfated D-galactans from the red algae *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. **Thrombosis and haemostasis-stuttgart**, v. 86, n. 6, p. 1540-1546, 2001.

FARIAS, W. R. *et al.* A novel antinociceptive sulphated polysaccharide of the brown marine alga *Spatoglossum schroederi*. **Natural product communications**, v. 6, n. 6, p. 863-866, 2011.

FARNDALE, R. W.; BUTTLE, D. J.; BARRETT, A.J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 883, n. 2, p. 173-177, 1986.

FRANÇA, D. S. *et al.* B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. **European journal of pharmacology**, v. 421, n. 3, p. 157-164, 2001.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain research bulletin**, v. 48, n. 2, p. 129-141, 1999.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, p.179-198, 2003.

GRESSLER, V. *et al.* Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. **Food Chemistry**, v.120, p. 585–590, 2010.

GUNN, A. *et al.* The influence of non-nociceptive factors on hot-plate latency in rats. **The Journal of Pain**, v. 12, n. 2, p. 222-227, 2011.

HANNA, H. *et al.* ***Caulerpa prolifera* ameliorates the impact of dyslipidemia–induced oxidative stress and inflammation**. Hormones Department , National Research Centre,

Dokki, Cairo, Egypt. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencepub.net/researcher>. Acesso em 15 set. 2014.

HULL, M. A.; GARDNER, S. H.; HAWCROFT, G. Activity of the non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin against colorectal cancer. **Cancer treatment reviews**, v. 29, n. 4, p. 309-320, 2003.

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.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.

ÑIGUEZ, M. A.; PUNZÓN, C.; FRESNO, M. Induction of cyclooxygenase-2 on activated T lymphocytes: regulation of T cell activation by cyclooxygenase-2 inhibitors. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 1, p. 111-119, 1999.

IOZZO, R. V. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. **Annual review of biochemistry**, v. 67, n. 1, p. 609-652, 1998.

IKEDA, Y. *et al.* Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life sciences**, v. 69, n. 24, p. 2911-2919, 2001.

JIAO, G. *et al.* Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine Drugs**, v.9, p.196–223, 2011.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

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

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

LAHAYE, M.; ROBIC, A. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1765-1774, 2007.

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

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

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

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 Sciences**, v. 78, p. 476-484, 2005.

MCDOUGALL, J.J. Peripheral analgesia: Hitting pain where it hurts. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1812, n. 4, p. 459-467, 2011.

MCQUAY, Henry. Opioids in pain management. **The Lancet**, v. 353, n. 9171, p. 2229-2232, 1999.

MEDEIROS, G.F. *et al.* Distribution of sulfated glycosaminoglycans in the animal kingdom: Widespread occurrence of heparin-like compounds in invertebrates. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1475, p.287–294, 2000.

MELZACK, R.; KATZ, J. Pain measurement in persons in pain. In: WALL, P. D.MELZACK, R.; **Textbook of Pain**. 4. ed. Churchill Livingstone. p.409 426, 1999.

MICHEL, G. *et al.* The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. **New Phytol.**, v.188, p.82–97, 2010.

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

NA, Y e S. *et al.* Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens*. **International immunopharmacology**, v. 10, n. 3, p. 364-370, 2010.

NEMIROVSKY, A.; CHEN, L.; ZELMA, V.; JURNA, I. The antinociceptive effect of the combination of spinal morphine with systemic morphine or buprenorphine. **Anesthesiol Analgesic**, v. 93, p. 197-203, 2001.

YALCIN, I. *et al.* Differentiating thermal allodynia and hyperalgesia using dynamic hot and cold plate in rodents. **The Journal of pain**, v. 10, n. 7, p. 767-773, 2009.

OLIVEIRA, F.S.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N. Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.31, p.588–591, 2008.

OLIVEIRA, M. S. **Atividade antinociceptiva, antipirética e antiinflamatória do extrato bruto e do ácido fumarprotocetrárico isolado de *Cladonia verticillaris* (Líquén)**. 2003. 82 f. Dissertação (Mestrado em ciências biológicas) – Universidade federal de Pernambuco, Recife, 2003.

PAINTER, T. J. **Algal Polysaccharides**. In: *The Polysaccharides*, ASPINALL, G. O., Ed., 1st ed.; New York: Academic Press, v. 2, p 195-285, 1983.

- PERCIVAL, E.; McDOWELL, R. H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. **Academic Press**, New York, 1967.
- QUINDERÉ, A. L. G. **Propriedades na nocicepção e na inflamação de uma fração polissacarídica sulfatada da alga marinha *Acanthophora muscoides***. 2011. 81f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, 2011.
- QUINDERÉ, A. L. G. *et al.* Peripheral antinociception and anti-edematogenic effect of a sulfated polysaccharide from *Acanthophora muscoides*. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 3, p. 600-613, 2013.
- QUINDERÉ, A. L. G. *et al.* Treatment with sulphated galactan inhibits macrophage chemotaxis and reduces intraplaque macrophage content in atherosclerotic mice. **Vascular pharmacology**, v. 71, p. 84-92, 2015.
- RANG, H.P. *et al.* **Farmacologia**. 6a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, 829p.
- RAZA, M. *et al.* Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. **Scientia Pharmaceutica**, v. 70, n. 2, p. 135-145, 2002.
- RIBEIRO, R. A. *et al.* Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, n. 1, p. 111-118, 2000.
- RIBEIRO, N. A. **Efeitos de uma fração polissacarídica sulfatada da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (FORSSKÅL) J. AGARDH na nocicepção e inflamação**. 2012. 105 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade federal do Ceará, 2012.
- RIBEIRO, N. A. *et al.* Sulfated polysaccharides isolated from the green seaweed *Caulerpa racemosa* plays antinociceptive and anti-inflammatory activities in a way dependent on HO-1 pathway activation. **Inflammation Research**, v.63, p. 1-12, 2014.
- RODRIGUES, J. A.G. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Caulerpa cupressoides*. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 2, p. 282-292, 2012.
- ROSEMAN, S. Reflections on glycobiology. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 45, p. 41527-41542, 2001.
- RODRIGUES, J. A. G. **Atividade anticoagulante de galactanas sulfatadas de algas marinhas vermelhas do gênero *Halymenia* e seu efeito imunoestimulante no camarão marinho *Litopenaeus vannamei***. 2006. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- RODRIGUES, J. A. G.; FARIAS, W. R. L. Purificação e atividade anticoagulante in vitro de galactanas sulfatadas extraídas da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 3, 2007

- RODRIGUES, J. A. G. *et al.* Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 40, n. 2, p.224-231, 2009.
- RODRIGUES, J. A. G. *et al.* Carragenana da epífita *Hypnea musciformis* obtida do cultivo experimental de *Solieria filiformis* em Flecheiras, Estado do Ceará, Brasil. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 2, p. 137-144, 2011.
- RODRIGUEZ, M. C. *et al.* Agar from *Gracilaria gracillis* (*Gracilariales*, Rhodophyta) of the Patagonic coast of Argentina – Content, structure and physical properties. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1435-n 1441, 2009.
- SERRA, J. Overview of neuropathic pain syndromes [new advances in the treatment of neuropathic pain]. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 100 (Supplementum), n. 173, p. 7-11, 1999.
- SHIELDS, S. D. *et al.* Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. **Pain**, v. 151, n. 2, p. 422-429, 2010.
- SILVA, N. de S. F.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M. Effects of different spinal morphine doses in rats. **Revista brasileira de anestesiologia**, v. 54, n. 1, p. 60-67, 2004.
- SOSTRES, Carlos *et al.* Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, n. 2, p. 121-132, 2010.
- STORTZ, C. A.; CERREZO, A. S. Novel findings in carragenans, agaroids and “hybrid” red seaweed galactans. **Curr Top Phytochem**, v. 4, p. 121-134, 2000.
- SZE, P. **A biology of the algae**. 3. ed. New York: McGraw-Hill. 1997. 278p.
- TJØLSEN, A; BERGE, D. G; HUNSKAAR, S; ROSLAND, J. H; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v.51, p.5–17, 1992.
- USOV, A. I.; BILAN, M. I. Fucoïdâns-sulfatados polissacarídeos de algas marrons. **Russian Chemical Reviews** v. 78 n. 8 p. 785-799, 2009.
- VANDERAH, Todd W. Pathophysiology of pain. **Medical Clinics of North America**, v. 91, n. 1, p. 1-12, 2007.
- VAN DE VELDE, F. *et al.* ¹H and ¹³C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: Application in research and industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, p. 73–92, 2002.
- VERRI JR, W. A. *et al.* Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development?. **Pharmacology & therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 116-138, 2006.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, MC do E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 139-145, Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v27n1/18822.pdf>> Acesso em: 15 set. 2014.

VILLANUEVA, R. D.; ROMERO, J. B.; RAGASA, A. L. R.; MONTANO, M. N. E. Agar from the red seaweed, *Laurencia flexillis* (Ceramiales, Rhodophyta) from northern Philippines. **Phycological research**, v. 58, p. 151-156, 2010.

WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A. Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum?. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 21, p. 13371-13373, 2002.

ZHANG, Hui-Juan *et al.* Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*. **Carbohydrate polymers**, v. 71, n. 3, p. 428-434, 2008.

ANEXO A: DECLARAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL (CEPA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº80/10, sobre o projeto intitulado: **“BIOPROSPECÇÃO DE POLÍMEROS DE ALGAS MARINHAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO”**, de responsabilidade de Norma Maria Barros Benevides, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 24 de março de 2011.

Fortaleza, 25 de março de 2011

Profa. Dra.  Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA