



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**CAROLINA BARBOSA BRITO DA MATTA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA**  
**DAS MACROALGAS *Caulerpa mexicana* e *Caulerpa sertularioides***  
**(CAULERPACEAE)**

**Maceió**

**2012**

**CAROLINA BARBOSA BRITO DA MATTA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA  
DAS MACROALGAS *Caulerpa mexicana* e *Caulerpa sertularioides*  
(CAULERPACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em cumprimento às exigências para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências da Saúde com área de concentração em Terapêutica Experimental.

Orientadora: Professora Dra. Magna Suzana  
Alexandre Moreira

Maceió  
2012



Universidade Federal de Alagoas  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Praça Afrânio Jorge, s/n. Prado  
CEP 57.010-020. Maceió-AL  
(82) 3223-5613; 3336-0757  
e-mail: [ppgcs9@gmail.com](mailto:ppgcs9@gmail.com)

Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna Carolina Barbosa Brito da Matta, intitulada: "Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória das macroalgas *Caulerpa mexicana* e *Caulerpa sertularioides* (Caulerpáceae)", orientada pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Magna Suzana Alexandre Moreira, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 20 de agosto de 2012.

Os membros da Banca Examinadora consideraram a candidata Aprovada.

Banca Examinadora:

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tania Maria Sarmiento da Silva – (UFRPE)

  
Prof. Dr. João Xavier Araújo Júnior - (UFAL)

  
Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva – (ICBS/UFAL)

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos**

M435a    Matta, Carolina Barbosa Brito da.  
            Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória das microalgas  
            *Caulerpa mexicana* e *Caulerpa sertularioides* (Caulerpaceae) / Carolina Barbosa  
            Brito da Matta. – 2013.  
            81 f. : il.

            Orientador: Magna Suzana Alexandre Moreira.  
            Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de  
            Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2013.

            Bibliografia: f. 67-79.  
            Anexos: f. 80-81.

            1. Atividade anti-inflamatória. 2. Atividade antinociceptiva. 3. Algas marinhas –  
            Potencial terapêutico. 4. Gênero *Caulerpa*. 5. Produtos naturais.  
            I. Título.

CDU: 615.276:615.615.322

*Dedico esse trabalho aos  
meus pais, Flávio e Janete,  
pelo amor incondicional,  
incentivo e compreensão  
durante esta trajetória.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por toda proteção e saúde, por iluminar os meus caminhos e pelas pessoas maravilhosas que estão presentes em minha vida.

Aos meus pais, Flávio Barbosa da Matta e Janete Barbosa de Brito, exemplos de sabedoria e honestidade. Os grandes espelhos da minha vida. Obrigada por todo amor, dedicação, incentivo e paciência em todas as horas. Palavras sempre serão muito pouco para demonstrar-lhes meus sinceros agradecimentos. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Carinne, Rafael e Gabriel, pelo carinho, paciência e compreensão. Amo vocês!

Ao meu amor, Raphael de Souza, por estar sempre ao meu lado, pelo carinho, companhia, paciência e compreensão. Obrigada por todo amor!

À minha querida e numerosa família: primos, primas, tios, tias e meus amados avós! Muito obrigada pela presença em minha vida. Pela confiança, amor, amizade, enfim, obrigada por ser a minha família.

À Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira, que realmente me orientou, buscando o melhor em mim. Obrigada por todos os conhecimentos compartilhados, conselhos, incentivo, confiança e essencial contribuição durante este trabalho.

Aos professores Bárbara Viviana de Oliveira Santos, José Maria Barbosa Filho e George Emmanuel C. de Miranda por nos conceder os extratos.

A todos os animais utilizados, simplesmente essenciais para a realização deste trabalho, dedico todo o meu respeito e agradecimento.

As minhas queridas amigas, Carla Alves, Elenise Pinheiro e Ediane Pinheiro, pelo carinho, conselhos, amizade, compreensão e por todos os momentos únicos que passamos juntas. Obrigada amigas!

À Luiz Henrique Agra e Morgana Vital de Araújo pela colaboração extremamente importante no desenvolvimento deste trabalho, e, com certeza, de muitos que estão por vir. Obrigada por tudo!

Aos amigos do laboratório, que se tornaram grandes companheiros do dia a dia. Agradeço-os pela amizade, auxílio nos experimentos, conhecimentos compartilhados diariamente e momentos de descontração: Yolanda Karla, Aline Queiroz, Eliane Campesatto, Éverton Tenório, Thays Dias, Maria Alice, Diego Farias, Gabriela Muniz, Mariana Santos, Amanda Evelyn e Ariane Priscilla. Cada um teve sua importância e sua participação, obrigada a todos por terem tornado esse trabalho possível.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, professores e funcionários.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FAPEAL pelo apoio financeiro.

Agradeço, dessa forma, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, fazendo parte deste caminho de crescimento profissional e pessoal. Muito obrigada!

## RESUMO

O gênero *Caulerpa* compreende espécies de macroalgas marinhas com potenciais aplicações biotecnológicas e farmacêuticas, no entanto suas atividades biológicas têm sido pouco exploradas. Tendo em vista o interesse crescente de novos fármacos com perfil anti-inflamatório e analgésico e o potencial terapêutico de produtos naturais marinhos, este trabalho vem avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória dos extratos hexânico (EH), clorofórmico (EC), acetato de etila (EA) e metanólico (EM) obtidos das espécies de macroalgas *C. mexicana* e *C. sertularioides* visando à identificação de novos protótipos de fármacos analgésicos e anti-inflamatórios, bem como contribuir para o estudo científico de macroalgas bentônicas oriundas do nordeste brasileiro. Para tanto, foram utilizados modelos murinos como: ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético, ensaio de placa quente e teste de formalina, visando à avaliação da atividade antinociceptiva; e o ensaio de peritonite induzida por carragenina, para avaliar a atividade anti-inflamatória. Em todos os ensaios os extratos foram testados na dose de 100 mg/kg por via oral (v.o.). No ensaio de contorção abdominal, todos os extratos, de ambas as espécies, induziram inibição significativa ( $p < 0,001$ ) com porcentagem de inibição superior a 60%. No ensaio de placa quente, apenas os extratos de *C. mexicana* aumentaram de maneira estatisticamente significativa o tempo de permanência do animal sobre a placa aquecida. Já no ensaio de formalina todos os extratos de *C. mexicana* reduziram o tempo de lambida do animal em ambas as fases do teste, enquanto apenas os EC e o EA de *C. sertularioides* foram ativos na fase neurogênica e os EH, EA e EM foram ativos na fase inflamatória desse ensaio. Por outro lado, no ensaio de peritonite induzida por carragenina todos os extratos, de ambas as espécies de *Caulerpa* avaliados, reduziram a migração celular de maneira estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Dessa forma, os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que os EH, EC, EA e EM das macroalgas *C. mexicana* e *C. sertularioides* possuem atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, podendo ser empregados como protótipos de fármacos, fitofármacos ou fitoterápicos.

Palavras-chave: Anti-inflamatório. Antinociceptivo. Algas marinhas. *Caulerpa*.



## ABSTRACT

The genus *Caulerpa* comprises species of marine macroalgae with potential biotechnological and pharmaceutical applications, however little research has been done about its biological activities. Owing to increasing interest in new drugs with anti-inflammatory and analgesic properties and the therapeutic potential of marine natural products, the aim of this work is evaluate antinociceptive and anti-inflammatory activities of hexanic (HE), chloroformic (CE), ethila acetate (AE) and methanolic (ME) extracts obtained from macroalgae *C. mexicana* and *C. sertularioides* species aiming identify new analgesic and anti-inflammatory lead compounds, also contribute to scientific study of macroalgae originating of Brazilian northeast. In order to evaluate the potential antinociceptive, the following tests were carried out: acetic acid-induced writhing, hot plate and formalin test. To investigate an anti-inflammatory activity, carrageenan-induced peritonitis was applied. The tests were conducted by using doses of 100 mg/kg orally (p.o.). In the acetic acid-induced writhing test, all extracts of both species showed a significant inhibition ( $p < 0.001$ ) with inhibition above 60%. In the hot plate test, only extracts from *C. mexicana* induced a statistically significant increase in the time that animals remained on the hot plate. Furthermore, in the formalin test all extracts from *C. mexicana* reduced the animal's licking time in both phases of the test, while only CE and AE from *C. sertularioides* were active in the neurogenic phase and in the inflammatory phase only HE, AE and ME showed activity. Moreover, in the test of carrageenan-induced peritonitis, the reduction of cell migration was seen in both macroalgae evaluated, in a way statistically significant ( $p < 0.001$ ). Thus, the present results allow concluding that the HE, CE, AE and ME from macroalgae *C. mexicana* and *C. sertularioides* have anti-inflammatory and antinociceptive properties and may be used as prototypes of drugs, natural medicines or herbal remedies.

Keywords: Anti-inflammatory. Antinociceptive. Marine Algae. *Caulerpa*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Processamento sensorial normal.....	18
Figura 2 -	Percepção da dor.....	20
Figura 3 -	Ilustração dos cinco sinais da inflamação: calor, rubor, tumor, dor e perda de função.....	21
Figura 4 -	Etapas do recrutamento de leucócitos para o sitio de inflamação.....	23
Figura 5 -	Fluxograma da Cascata da Inflamação.....	27
Figura 6 -	Compostos químicos identificados no gênero <i>Caulerpa</i> agrupados por classe.....	32
Figura 7 -	<i>C. mexicana</i> Sond. ex Kuet.....	34
Figura 8 -	<i>C. sertularioides</i> (S.G. Gmel.) Howe.....	35
Figura 9 -	Esquema do processo de obtenção dos extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico das macroalgas <i>C. mexicana</i> e <i>C. sertularioides</i> em aparelho de Soxhlet.....	38
Figura 10 -	Contorção abdominal induzida por ácido acético.....	40
Figura 11 -	Ensaio de placa quente.....	41
Figura 12 -	Ensaio de nocicepção induzida por formalina.....	42
Figura 13 -	Ensaio de peritonite induzida por carragenina.....	43
Figura 14 -	Efeito dos extratos de <i>C. mexicana</i> (100 mg/kg, v.o) no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético.....	46
Figura 15 -	Efeito dos extratos de <i>C. sertularioides</i> (100 mg/kg, v.o) no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético.....	47

Figura 16 -	Efeito dos extratos de <i>C. mexicana</i> (100 mg/kg, v.o.) e indometacina (35,7 mg/kg, v.o.) na fase neurogênica do ensaio de nociceção induzida por formalina.....	49
Figura 17 -	Efeito dos extratos de <i>C. sertularioides</i> (100 mg/kg, v.o.) e indometacina (35,7 mg/kg, v.o.) na fase neurogênica do ensaio de nociceção induzida por formalina.....	50
Figura 18 -	Efeito antinociceptivo dos extratos de <i>C. mexicana</i> (100 mg/kg, v.o.) e indometacina (35,7 mg/kg, v.o.) na fase inflamatória do ensaio de nociceção induzida por formalina.....	51
Figura 19 -	Efeito antinociceptivo dos extratos de <i>C. sertularioides</i> (100 mg/kg, v.o.) e indometacina (35,7 mg/kg, v.o.) na fase inflamatória do ensaio de nociceção induzida por formalina.....	52
Figura 20 -	Efeito dos extratos de <i>C. mexicana</i> (100 mg/kg, v.o.) e da indometacina (35,7 mg/kg, v.o.) no ensaio de peritonite induzida por carragenina em camundongos).....	53
Figura 21 -	Efeito dos extratos de <i>C. sertularioides</i> (100 mg/kg, v.o.) e da indometacina (35,7 mg/kg, v.o.) no ensaio de peritonite induzida por carragenina em camundongos).....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Efeito dos extratos de <i>C. mexicana</i> (100 mg/kg, v.o) em camundongos no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético.....	45
Tabela 2 -	Efeito dos extratos de <i>C. sertularioides</i> (100 mg/kg, v.o) em camundongos no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético.....	46
Tabela 3 -	Efeito antinociceptivo central dos extratos de <i>C. mexicana</i> (100 mg/kg, v.o.) e morfina (4,3 mg/kg, s.c.) no ensaio de placa quente.....	48
Tabela 4 -	Efeito dos extratos de <i>C. mexicana</i> na (100 mg/kg, v.o) fase neurogênica do ensaio de nocicepção induzida por formalina.....	48
Tabela 5 -	Efeito dos extratos de <i>C. sertularioides</i> (100 mg/kg, v.o) na fase neurogênica do ensaio de nocicepção induzida por formalina.....	49
Tabela 6 -	Efeito dos extratos de <i>C. mexicana</i> (100 mg/kg, v.o) na fase inflamatória do ensaio de nocicepção induzida por formalina.....	50
Tabela 7 -	Efeito dos extratos de <i>C. sertularioides</i> (100 mg/kg, v.o) na fase inflamatória do ensaio de nocicepção induzida por formalina.....	51
Tabela 8 -	Efeito dos extratos de <i>C. mexicana</i> (100 mg/kg, v.o) no número de leucócitos recrutados em camundongos no ensaio de peritonite induzida por carragenina.....	53
Tabela 9 -	Efeito dos extratos de <i>C. sertularioides</i> (100 mg/kg, v.o) no número de leucócitos recrutados em camundongos no ensaio de peritonite induzida por carragenina.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-Inflamatórios Não Esteroidais
ANOVA	Análise de Variância
ASIC	Canais Iônicos Sensíveis ao Ácido
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
CMC	Carboximetilcelulose
COX	Ciclooxigenase
DCF/CCS	Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde
EA	Extrato Acetato de Etila
EC	Extrato Clorofórmico
EH	Extrato Hexânico
EM	Extrato Metanólico
E.P.M.	Erro Padrão da Média
I.P.	Via Intraperitoneal
IL	Interleucinas
LaFI	Laboratório de Farmacologia e Imunidade
LOX	Lipoxigenase
LT	Leucotrieno
NF-κB	Fator Nuclear-κB
NGF	Fator de Crescimento do Nervo
NO	Óxido Nítrico

NOS	Óxido Nítrico Sintase
PBS	Tampão Fosfato Salina
PG	Prostaglandina
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
S.C.	Via Subcutânea
S.PI	Via Subplantar
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SP	Substância P
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Vaniloide 1
V.O.	Via Oral

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Dor.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2 Inflamação.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3 Produtos Naturais de Origem Marinha.....</b>	<b>28</b>
1.3.1 Macroalgas Marinhas.....	29
1.3.2 Considerações Sobre o Gênero <i>Caulerpa</i> .....	31
1.3.3 Considerações Sobre as Espécies <i>C. mexicana</i> e <i>C. sertularioides</i> .....	33
<b>2.OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>36</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>36</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Material Botânico.....</b>	<b>37</b>
3.1.1 Coleta e Classificação Botânica.....	37
3.1.2 Preparação e Obtenção dos Extratos de <i>C. mexicana</i> e <i>C. sertularioides</i> .....	37
<b>3.2 Ensaios Farmacológicos.....</b>	<b>38</b>
3.2.1 Aprovação Pelo Comitê de Ética.....	38
3.2.2 Animais.....	39
3.2.3 Reagentes, Soluções e Fármacos Utilizados.....	39
3.2.4 Extratos.....	39
<b>3.3 Avaliação da Atividade Antinociceptiva e Anti-Inflamatória dos Extratos de</b>	<b>40</b>
<b><i>C. mexicana</i> e <i>C. sertularioides</i>.....</b>	

3.3.1 Ensaio de Contorção Abdominal Induzida por Ácido Acético.....	40
3.3.2 Ensaio de Placa Quente.....	41
3.3.3 Ensaio de Nocicepção Induzida por Formalina.....	42
3.3.4 Ensaio de Peritonite Induzida por Carragenina.....	43
3.3.5 Análise Estatística.....	47
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1 Efeito Antinociceptivo e Anti-Inflamatório dos Extratos de <i>C. mexicana</i> e <i>C. sertularioides</i>.....</b>	<b>45</b>
4.1.1 Ensaio de Contorção Abdominal Induzida por Ácido Acético.....	45
4.1.2 Ensaio de Placa Quente.....	47
4.1.3 Ensaio de Nocicepção Induzida por Formalina.....	48
4.1.4 Ensaio de Peritonite Induzida por Carragenina.....	52
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>5.1 Avaliação da Atividade Antinociceptiva e Anti-Inflamatória dos Extratos de <i>C. mexicana</i> e <i>C. sertularioides</i>.....</b>	<b>55</b>
5.1.1 Ensaio de Contorção Abdominal Induzida por Ácido Acético.....	56
5.1.2 Ensaio de Placa Quente.....	58
5.1.3 Ensaio de Nocicepção Induzida por Formalina.....	60
5.1.4 Ensaio de Peritonite Induzida por Carragenina.....	62
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>80</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Dor

Durante o processo de seleção natural, o homem desenvolveu diversos mecanismos fisiológicos que permitiram sua sobrevivência. Entre os mais importantes, certamente a dor ocupa um lugar de destaque, já que é um dos sintomas que faz com que o indivíduo tenha consciência de que sua integridade está sendo ameaçada ou que há alguma disfunção em seu organismo (CUNHA, 2009).

Esse mecanismo de proteção pode ser definido como uma experiência consciente influenciada por memórias emocionais, patológicas, genéticas e fatores cognitivos (NOEL et al., 2012; ROY et al., 2009). Portanto, a dor é um evento altamente subjetivo, como ilustrado pela definição dada pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP): "uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano" (TRACEY; MANTYH, 2007). Ela fornece um aviso rápido no sistema nervoso para iniciar uma resposta motora e minimizar os danos físicos, além de induzir a manter em repouso regiões lesionadas. Reforçando a importância da sensação dolorosa, sabe-se que pessoas que apresentam a condição rara de insensibilidade congênita à dor, apresentam baixa expectativa de vida e raramente vivem mais que 20 anos (BASBAUM et al., 2009).

Existem vários critérios utilizados na classificação da dor, sendo a duração da sensação dolorosa o critério mais utilizado. Dessa forma, a dor pode ser transitória, aguda ou crônica (FUCHS; WANNMACHER; FERREIRA, 2006). A dor transitória é de curta duração e ocorre por ativação de nociceptores periféricos independente da existência de qualquer dano tecidual, sendo, então, sua função proteger o organismo de um possível dano. A dor aguda está relacionada a algum estímulo nocivo com substancial lesão tecidual (traumas, intervenções cirúrgicas e algumas doenças), estando associada à estimulação direta de nociceptores, conexões nervosas no sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso autônomo (SNA). Tanto na dor transitória quanto na dor aguda, a causa é bem definida e o curso temporal de ambas é limitado, podendo os mesmos se extinguir antes da remoção da causa ou reparo do dano tecidual. Dessa forma, a dor aguda tem função biológica de preservação, da integridade e da defesa corporal, pois denota uma lesão ou iminência de lesão tecidual (LOESER; MELZACK, 1999; MILLAN, 1999).

Ao contrário desses propósitos claramente protetores, a dor pode se tornar persistente ou crônica em situações em que o organismo não é capaz de produzir resolução da lesão ou quando são estabelecidos mecanismos adaptativos inadequados (D'MELLO; DICKENSON, 2008). A dor crônica pode ser gerada por processos inflamatórios crônicos ou ocorrer sem estímulo precipitante. Esse tipo de dor é distinto dos demais por persistir após a recuperação da lesão, podendo se prolongar por meses ou anos (BARROS, 2006).

A dor crônica tem uma etiologia multifatorial, tornando seu diagnóstico e tratamento mais complexos, envolvendo múltiplas abordagens e nem sempre alcançando pleno êxito na sua erradicação (ZIMMERMANN et al., 2001). Por isso, ela apresenta-se como um grande desafio na atualidade, ocasionando sofrimento intenso, incapacidade, redução da qualidade e expectativa de vida, custos socioeconômicos, além de estar associada com comorbidades como distúrbios de sono e depressão (TRACEY; DICKENSON, 2012).

Quanto a sua origem, a dor pode ser classificada em nociceptiva, inflamatória e neuropática. A dor nociceptiva é uma resposta fisiológica ao funcionamento normal tanto do SNC quanto do SNP, protegendo o organismo de um dano potencial ou iminente. As dores somática e visceral são exemplos de dor nociceptiva, a primeira aparece a partir da lesão da pele ou tecidos mais profundos e é usualmente bem localizada (SALTER, 2005). A dor visceral se origina em vísceras abdominais e/ou torácicas. Ambos os tipos de dor usualmente são tratadas por analgésicos opioides e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). Apesar das múltiplas abordagens terapêuticas, o tratamento da dor visceral continua sendo um desafio significativo, ao passo que a dor somática apresenta excelente resposta aos tratamentos existentes (DISTRUTTI et al., 2010).

Já dor de origem inflamatória resulta basicamente da interação entre o tecido danificado e os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos, por meio da participação de mediadores inflamatórios que induzem modificações funcionais na excitabilidade neuronal. Tais mediadores são liberados diretamente pelas células danificadas pelo trauma tecidual ou pelo reconhecimento de um elemento estranho ao organismo por células residentes, como, por exemplo, os macrófagos (CUNHA, 2009).

A dor neuropática é definida como “uma consequência direta de lesão ou doença que afete o sistema somatosensorial” (TREEDE et al., 2008). Esse tipo de dor é relativamente comum e está associado a diversos tipos de injúrias no sistema nervoso, podendo ser iniciada após lesão nervosa, uso crônico de medicamentos ou associadas a algumas patologias (câncer, herpes, AIDS) e alterações metabólicas (diabetes) (BARON, 2000). A modulação e geração da dor neuropática envolvem tanto mecanismos periféricos quanto centrais. No entanto,

quando a dor provém de danos aos nervos periféricos é denominada de dor neurogênica. Assim, a dor neuropática é uma condição complexa com uma variedade de causas, na qual os analgésicos convencionais muitas vezes não conseguem atingir globalmente alívio efetivo da dor (GORMSEN et al. 2010; WETERING et al., 2010).

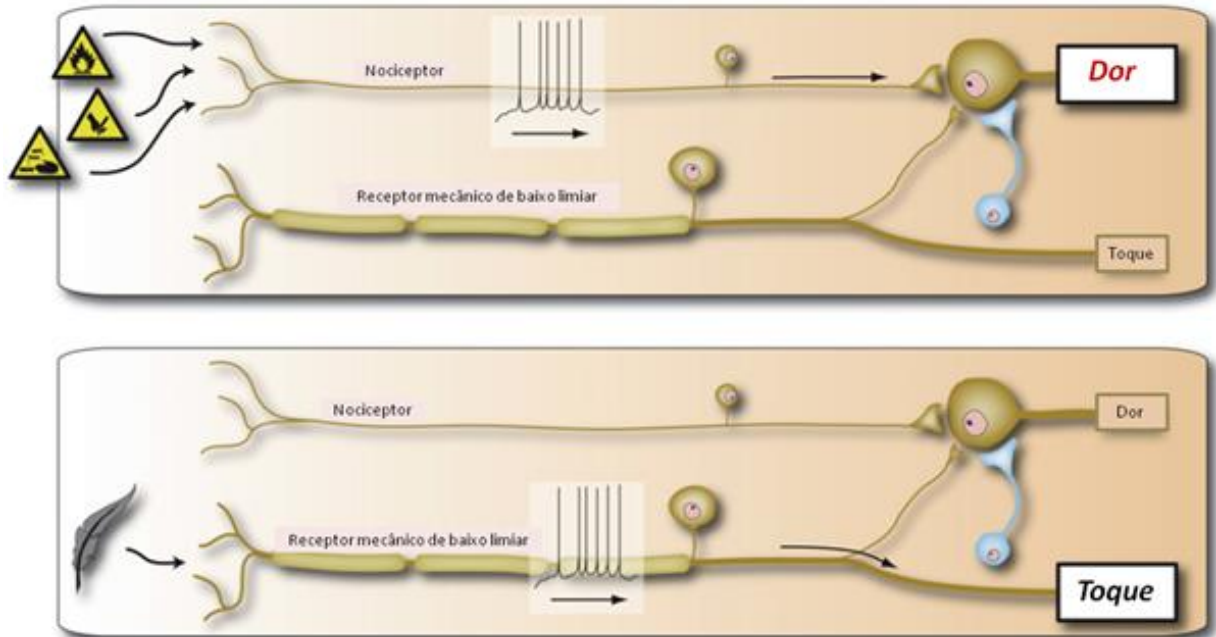
A dor inflamatória e a neuropática podem exceder a duração da causa primária da dor, podendo se tornar síndromes de dor crônica (ZEILHOFER, 2007). Pode-se dizer, também, que a dor crônica é um estado de constante facilitação da condução nervosa, quando estímulos, que normalmente inócuos, são percebidos como dolorosos (fenômeno conhecido como alodinia) ou quando há sensibilidade aumentada a um suave estímulo nocivo (hiperalgesia) (KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE, 2006; LOESER; TREEDE, 2008).

Apesar dos avanços nas áreas de conhecimentos relacionadas à dor, os resultados dos tratamentos bem como a prevenção de queixas recorrentes ainda não são satisfatórios. Assim, a analgesia efetiva para síndromes dolorosas ainda é um grande desafio e o entendimento da neuroanatomia das vias de condução, da fisiopatologia da dor e da farmacologia é fundamental na busca de novas alternativas terapêuticas (ROCHA et al., 2007; TEIXEIRA, 2006).

Da mesma forma que a visão e a audição, a dor possui um sistema neuronal próprio, denominado sistema nociceptivo. A nociceção é uma forma especializada de sinalização sensorial, que converte a informação sobre lesões teciduais em sinais dolorosos (CUNHA, 2009). Assim, enquanto a nociceção refere-se às manifestações neurofisiológicas geradas pelo estímulo nocivo, a dor é a desagradável experiência emocional que normalmente acompanha nociceção (LOESER; TREEDE, 2008).

Os nociceptores, receptores sensoriais especializados para a dor, inervam o sistema cutâneo, músculos, vísceras e outros órgãos e são capazes de alertar sobre um dano potencial. Pois, esses neurônios são ativados apenas por estímulos nocivos que excedem um limite considerado fisiológico, sugerindo que eles possuem propriedades biofísicas e moleculares que lhes permitem detectar e responder seletivamente a estímulos potencialmente lesivos. Quando ativados, os nociceptores sofrem alterações na membrana, permitindo a deflagração de potenciais de ação que serão transmitidos até o SNC através da medula espinal, o que pode ser interpretado como sensação dolorosa no córtex cerebral (TRACEY; DICKENSON, 2012; MEYER et al., 2008). A Figura 1 resume o processamento sensorial em condições normais.

**Figura 1 - Processamento sensorial normal.**



Fonte: Autora, 2012 – Adaptado de WOOLF, 2011.

Nota: Neurônios sensoriais primários altamente especializados, que codificam estímulos de baixa intensidade, ativam apenas as vias centrais que levam a sensações inócuas. Enquanto estímulos de alta intensidade, que ativam nociceptores, só estimulam as vias centrais que levam a dor.

Existem duas classes principais de nociceptores, a primeira inclui fibras aferentes ( $A\delta$ ) de diâmetro médio, mielinizadas com velocidade de condução rápida, que transmitem a dor rápida e bem localizada, ou sinais de dor aguda pulsátil, designada dor primária (CUELLAR et al, 2010). Essas diferem consideravelmente das fibras de maior diâmetro ( $A\beta$ ) e rápida condução, que respondem a estímulos mecânicos inócuos como um leve toque. A segunda classe de nociceptores inclui fibras C não mielinizadas de pequeno diâmetro e condução lenta, que são responsáveis pela transmissão da dor difusa, também chamada de queimação persistente ou dor secundária (BASBAUM et al., 2009).

A fibra nervosa aferente primária detecta estímulos ambientais (de natureza térmica, mecânica ou química) e transduz essa informação na linguagem do sistema nervoso, ou seja, corrente elétrica (BASBAUM et al., 2009). Na última década, muitas moléculas de transdução da nocicepção têm sido identificadas e o maior grupo de detectores de estímulos nocivos é a família dos receptores de potencial transitório (TRP) (CHENG; JI, 2008; PATAPOUTIAN; TATE; WOOLF, 2009). Esses canais participam na geração de sensações dolorosas evocadas por estímulos químicos, térmicos e mecânicos (LEVINE; ALESSANDRI-HABER, 2007). O receptor de potencial transitório vaniloide 1 (TRPV1), originalmente chamado de receptor vaniloide 1 e comumente referido como receptor da capsaicina, foi o primeiro descrito como

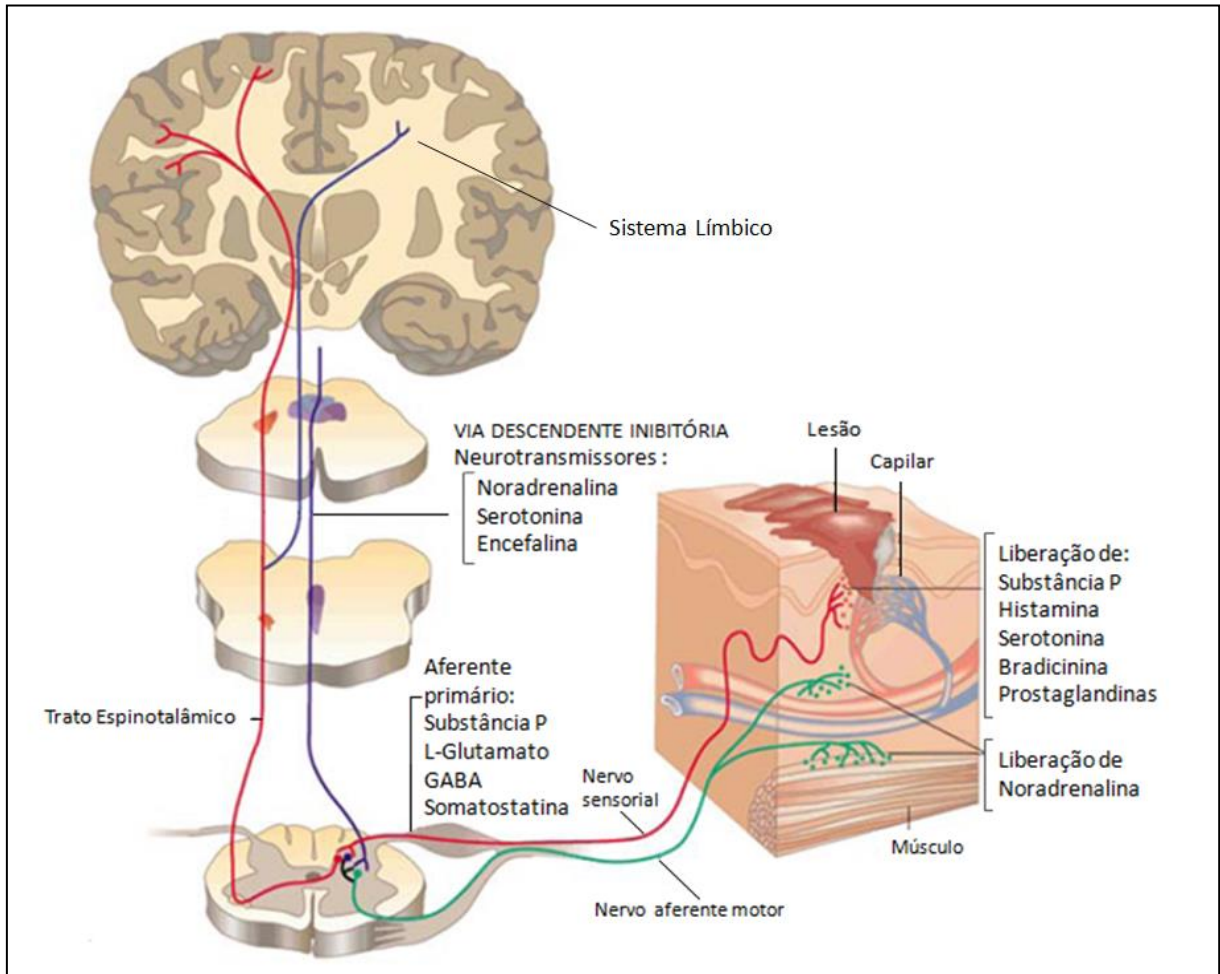
receptor polimodal ativado por três estímulos dolorosos; compostos vaniloides (capsaicina, resiniferatoxina), calor nocivo ( $> 43\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e pH baixo ( $< 5,9$ ) (CATERINA; JULIUS, 2001, TOMINAGA, 2007).

Outros receptores que participam da transdução da nocicepção são os canais iônicos sensíveis ao ácido (ASICs), que são canais de cátions insensíveis à voltagem (PETROFF et al., 2008). Os ASICs são ativados por prótons extracelulares e alguns estudos demonstraram que a sua expressão é aumentada por mediadores pró-inflamatórios, como fator de crescimento do nervo (NGF), serotonina, interleucina 1 (IL-1) e bradicinina (MAMET et al., 2002; VOILLEY et al., 2001).

Diversos são os mediadores inflamatórios que, quando liberados por macrófagos, mastócitos, células endoteliais ou nervos traumatizados, ativam as fibras nervosas tipos A $\delta$  e C, facilitando a transmissão dolorosa e as alterações inflamatórias periféricas (KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE, 2006). Dentre os mediadores inflamatórios (também denominados algogênicos) incluídos neste grupo estão a acetilcolina, bradicinina, histamina, serotonina, leucotrieno (LT), fator de ativação plaquetário (PAF), íons potássio, prostaglandinas (PGs), tromboxanos, interleucinas (ILs), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), NGF e recentemente serinas proteases (VERGNOLLE, 2008).

Como mostrado na Figura 2 (p. 21), a lesão tecidual e liberação de mediadores químicos locais como substância P (SP), histamina, serotonina, bradicinina e PGs desencadeia um processo de transmissão do estímulo doloroso até níveis centrais. Estes mediadores interagem com receptores específicos levando à sensibilização ou ativação direta dos nociceptores periféricos. Com isso, ocorre geração de potenciais de ação que culminam na liberação de neurotransmissores no corno dorsal da medula espinal, tais como SP, L-glutamato, ácido gama aminobutírico, peptídeo intestinal vasoativo, colecistocinina, somatostatina e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (MARCON, 2009).

**Figura 2 - Percepção da dor.**



Fonte: Autora, 2012 - Adaptado de MARCON, 2009.

Esses neurotransmissores ativam neurônios de segunda ordem e o sinal nociceptivo ascende para regiões do sistema límbico para o tálamo, pelo trato espinotalâmico. No tálamo ocorre a somatização do estímulo nocivo onde existe o componente emocional que discrimina a dor. O tálamo e o córtex são regiões finais das projeções das vias de nocicepção, o tálamo informa que existe sensação nociceptiva e o córtex discrimina o tipo de sensação (ROY et al., 2009). Em resposta a estimulação nociceptiva ascendente, ocorre ativação de algumas vias descendentes de controle da nocicepção, culminando na liberação de substâncias como noradrenalina, serotonina e encefalinas na região do corno dorsal medular, modulando assim o sinal nociceptivo (BASBAUM et al., 2009).

## 1.2 Inflamação

A inflamação é uma resposta dos tecidos conjuntivos vascularizados às agressões de diversas naturezas (física, química ou biológica) que induz a liberação de uma gama de mediadores exógenos e endógenos. Esta resposta tem as suas desvantagens, causando inchaço, vermelhidão, calor e dor, sinais cardinais da inflamação descritos por Cornelius Celsus, um médico romano do século I d.C. Tais sinais, de fato, justificam o termo “inflamação”, derivado do verbo latino *inflammare*, o que significa incendiar. Já a perda da função, quinto sinal clínico da inflamação, foi adicionada posteriormente por Rudolph Virchow em 1858 (ALLER et al., 2007; SERHAN; SAVIL, 2005). A Figura 3 ilustra os cinco sinais característicos da inflamação.

**Figura 3 - Ilustração dos cinco sinais da inflamação: calor, rubor, tumor, dor e perda de função.**



Fonte: DUNDER, 2009.

Nota: Ilustração médica da faculdade de medicina de St Bartholomeu.

Não há dúvidas de que a resposta inflamatória inicial à lesão tecidual é uma resposta positiva ao trauma que tem como objetivo principal eliminar o agente agressor e proteger o organismo (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). No entanto, durante a última década tornou-se amplamente aceito que a inflamação é uma força motriz por trás de doenças crônicas que tendem a levar à morte. Mais recentemente foi identificado um complexo



oligomérico multiproteico denominado “inflamossoma”, responsável pela ativação do processo inflamatório e indução de morte celular programada. Desde então, alguns trabalhos mostram o envolvimento do inflamossoma com doenças metabólicas, como obesidade, diabetes tipo 2 e gota, já que cada vez mais se relaciona a inflamação crônica com a etiologia destas doenças (HENAQ-MEJIA et al., 2012). Outros exemplos de desordens nas quais a presença de estados inflamatórios persistentes provocam um piora no quadro da doença incluem câncer, doença de Alzheimer e aterosclerose (COUZIN-FRANKEL, 2010; TRINCHIERI, 2012).

Na reação inflamatória aguda, estágio inicial da resposta, predominam os eventos vasculares/exsudativos, que são fenômenos inespecíficos, isto é, constituem a fase inicial de qualquer tipo de resposta inflamatória. Esses eventos, mediados principalmente por NO e PGs, são caracterizados por vasodilatação e envolvem primariamente as arteríolas, levando a abertura de novos capilares normalmente hipofuncionantes e aumento do fluxo sanguíneo para a região, justificando o calor e rubor (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; VERGNOLLE, 2008). Simultaneamente, mediadores químicos como histamina, bradicinina, PAF e LTs provocam aumento da permeabilidade das vênulas, que permitem a passagem de um fluido rico em proteínas plasmáticas (exsudato) para o espaço extravascular, ocasionando aumento da pressão oncótica e retenção de água no interstício, responsável pelo edema. O exsudato formado facilita a liberação de outros mediadores que amplificam a resposta inflamatória (GILROY et al., 2004). A dor, outro sinal característico da inflamação, pode decorrer de diversos fatores que incluem: aumento da pressão sobre tecidos e terminações nervosas, lesão das fibras nervosas, irritação por substâncias produzidas por microorganismos ou células lesadas e, também, pela ação de alguns mediadores inflamatórios que intensificam a dor associada à inflamação (BHANDARI et al., 2005; ROTH et al., 2009).

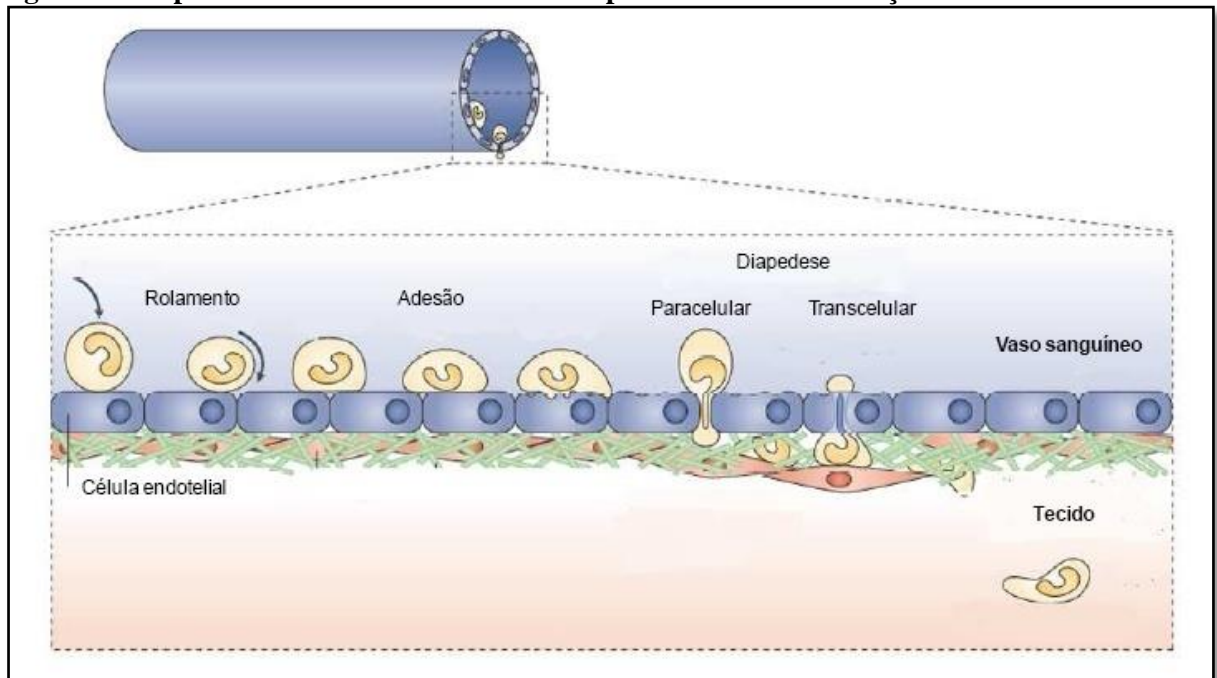
Concomitantemente aos eventos vasculares, diferentes tipos de células participam do processo inflamatório, desempenhando funções distintas, mas muitas vezes sobrepostas. Na fase celular ocorre a transmigração de leucócitos ao longo de um gradiente químico, esse evento celular é denominado de quimiotaxia (MEDZHITOV, 2008). Essa transmigração ocorre através da marginação (movimentação do neutrófilo do centro para a periferia do vaso), rolamento (desaceleração do neutrófilo através da ligação com moléculas de adesão chamadas selectinas), adesão e diapedese (o neutrófilo atravessa o endotélio através de junções entre as células) (Figura 4, p. 24) (MARSHALL et al., 2003). Quando os leucócitos atingem o foco inflamatório, tornam-se ativados e tentam eliminar o patógeno liberando o conteúdo tóxico de seus grânulos, os quais incluem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio



(ROS), proteinases, catepsinas, elastases, mieloperoxidase, entre outros (MEDZHITOV, 2008).

Tanto substâncias endógenas como exógenas podem agir como agentes quimiotáticos, dentre as substâncias endógenas estão os componentes do sistema complemento como o C5a; produtos da via da lipoxigenase (LOX), em especial o LTB<sub>4</sub>; PAF; e as citocinas, principalmente as da família das quimiocinas. Ou seja, inúmeros mediadores químicos que se originam de proteínas plasmáticas ou de células. Um bom exemplo de substância exógena é o lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina bacteriana (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

**Figura 4 - Etapas do recrutamento de leucócitos para o sítio de inflamação.**



Fonte: Autora, 2012 - Adaptado de NOURSHARGH; HORDIJK; SIXT, 2010.

A mobilização adequada dos leucócitos circulantes é fundamental para a defesa do organismo, devido a sua capacidade fagocítica e de destruição do agente nocivo (LEES et al., 2004). O tipo celular predominante nesta fase varia em função do tempo e do tipo de agressão: nas primeiras 24 horas após as agressões, predominam os polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), que são progressivamente substituídos pelos monócitos nas próximas 24-48 horas. No entanto, os linfócitos podem ser as primeiras células a chegar, nas infecções virais, e, em alguns tipos de reações de hipersensibilidade, os eosinófilos são desde o início o principal tipo celular. Outras células tais como as células endoteliais,

macrófagos, mastócitos e plaquetas também podem estar envolvidas (LAMANO, 2008; SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

Essas células quando ativadas iniciam um processo de sinalização de vias intracelulares culminando na síntese de mediadores que participam diretamente do processo inflamatório. Os mediadores da inflamação são substâncias formadas e liberadas, concomitante ou sequencialmente, no local da lesão. Essas substâncias estão envolvidas na geração e manutenção dos eventos característicos da reação inflamatória e interagem com receptores específicos nas células alvo podendo, inclusive, estimular a liberação de outros mediadores (MEDZHITOV, 2010; ZHOU et al., 2007). Dentre os mediadores da inflamação, encontram-se histamina, bradicinina, metabólitos do ácido araquidônico (PGs, TXs e LTs), PAF, óxido nítrico (NO), neuropeptídeos e citocinas (PASSOS et al., 2007).

Uma das principais vias que podem ser ativadas no processo inflamatório é a do fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), que regula a expressão de genes para muitas proteínas pró-inflamatórias. Os produtos dos genes regulados pelo NF- $\kappa$ B como TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$  geram um efeito cíclico, pois, além de serem ativados pelo NF- $\kappa$ B, eles também o ativam em outras células após se ligarem a receptores específicos, perpetuando a resposta inflamatória. Enzimas inflamatórias como a cicloxigenase – 2 indutiva (COX-2) e a óxido nítrico sintase (iNOS) também são reguladas pelo NF- $\kappa$ B (Figura 4) (HUTTI et al, 2007; SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

Através de estímulos mecânicos, químicos, físicos ou por meio de outros mediadores, como a bradicinina, os fosfolipídios de membranas liberam o ácido araquidônico, a partir da ativação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). O ácido araquidônico livre pode ser metabolizado por duas classes principais de enzimas: cicloxigenases (COXs), sendo a isoforma COX-2 envolvida na inflamação iniciando a biossíntese de PGs e TXs (prostanoides) e pelas LOXs, originando a biossíntese de LTs (Figura 4) (BOTTING, 2006).

Dentre as COXs, a COX-1 é constitutivamente expressa, ou seja, está presente nas células em condições fisiológicas, principalmente nos vasos sanguíneos, plaquetas, estômago e rins, sendo uma das responsáveis por manter as condições de homeostase no organismo. A COX-2, por outro lado, é geralmente ausente na maioria dos tecidos normais, mas pode ser induzida por inúmeros estímulos, como IL-1, TNF- $\alpha$  e demais mediadores inflamatórios. Ela é também, responsável pela produção de concentrações elevadas de prostanoides durante a inflamação. Existe ainda, uma terceira isoforma de COX, a COX-3, que se encontra distribuída principalmente no córtex cerebral, medula espinal e coração. Alguns estudos sugerem que a inibição da COX-3 poderia representar o mecanismo central primário pelo qual

os fármacos analgésicos e antipiréticos, como os AINEs, desenvolveriam suas atividades de redução da dor e da febre (CHANDRASEKHARAN; DAI; ROOS, 2002; HIKIJI et al., 2008).

Os prostanoides mais importantes na inflamação são: PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> (prostaciclina) e TXA<sub>2</sub>. A prostaciclina possui ação vasodilatadora, além de potencializar os efeitos quimiotáticos e aumentar a permeabilidade de outros mediadores. As prostaglandinas PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> e PGF<sub>2α</sub> também são vasodilatadoras, além de exacerbarem o edema. Além disso, as PGs também estão envolvidas na patogenia da dor e da febre durante a inflamação, como a PGE<sub>2</sub>, que torna a pele hipersensível a estímulos dolorosos (PECCHI et al., 2009).

Os LTs, por sua vez, constituem uma família de substâncias produzidas a partir do ácido araquidônico, por ação da 5-LOX. São enzimas citosólicas solúveis, encontradas preferencialmente nos pulmões, plaquetas, células endoteliais, monócitos, mastócitos, eosinófilos e linfócitos B (MONTUSHI et al., 2007). Dentre os LTs, o LTB<sub>4</sub> exerce potente atividade quimiotática para neutrófilos, eosinófilos e monócitos, promovendo a migração destes tipos celulares para o local afetado. Uma vez no sítio, os LTs ativam os leucócitos, promovendo a degranulação e a produção de superóxidos, que contribuem para os danos teciduais característicos da inflamação. Alguns LTs como LC<sub>4</sub>, LD<sub>4</sub> e LE<sub>4</sub> aumentam a permeabilidade vascular (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; WIENECKE, 2008).

Outro mediador importante na vasodilatação é o NO, que é um gás solúvel derivado do metabolismo da L-arginina por da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que pode ser encontrada em três isoformas, endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), que são constitutivamente expressas, e a forma induzida (iNOS), que é produzida após a ativação de leucócitos em condições inflamatórias (VALLANCE; CHAN, 2001). O NO está envolvido no relaxamento vascular, na inibição da agregação plaquetária e adesão leucocitária, na neurotransmissão e nas atividades antimicrobiana e antitumoral dos macrófagos (ZOCCALI, 2007). Alguns de seus efeitos deletérios são decorrentes da ação citotóxica de alguns de seus metabólitos, que são capazes de danificar o DNA, os lipídeos microbianos e as células vizinhas saudáveis, sendo esse o mecanismo responsável pela maioria dos processos inflamatórios observados em doenças autoimunes (SZABÓ, 2003).

A histamina, mediador armazenado e liberado por mastócitos e basófilos, é outro mediador que exerce ação sobre células musculares lisas e células endoteliais, provocando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Esse mediador é encontrado em vários tecidos, destacando-se os pulmões, pele e trato gastrointestinal. Na pele, a histamina acarreta uma resposta tripla, ocasionando vermelhidão, edema e dilatação associada à vasodilatação

indireta via estimulação por reflexos axonais. Já no trato gastrointestinal a histamina é essencial para a secreção ácida (THURMOND; GELFAND; DUNFORD, 2008).

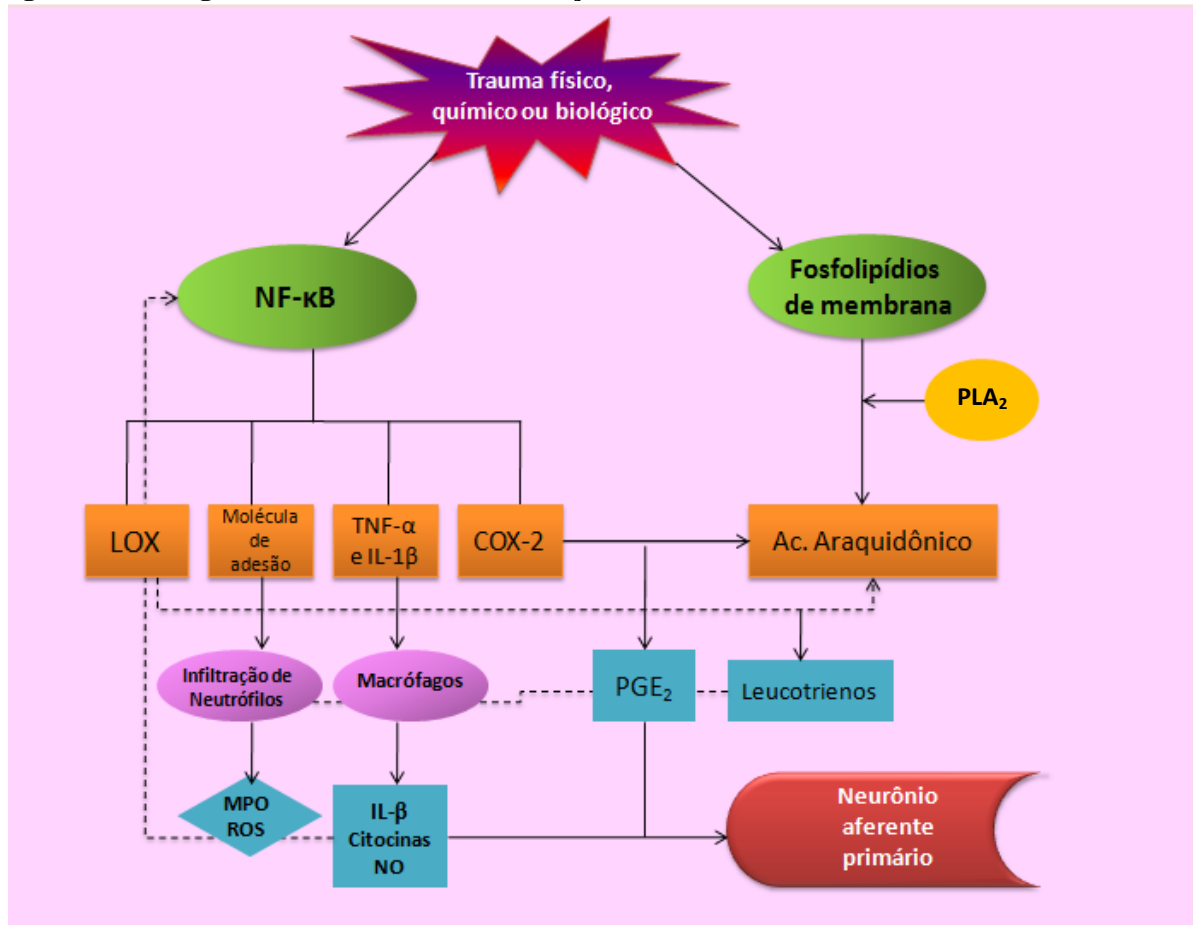
A bradicinina, mediador importante no processo inflamatório, é um peptídeo vasoativo que provoca vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Além disso, a bradicinina exerce outros efeitos, dentre os quais se destaca a indução da liberação de mediadores inflamatórios como os prostanoídes, a partir de diversos tipos celulares, citocinas (IL-1 e TNF- $\alpha$ ) de macrófagos, além do NO liberado das células endoteliais vasculares (ELIIS; FOZARD, 2002). Sua ação vasodilatadora resulta, em parte, pela produção de PGI<sub>2</sub> e pela liberação de NO. Trata-se, também, de um potente mediador álgico, ação que é potencializada pelas PGs (LEEB-LUNDBERG, 2005).

As citocinas são liberadas por uma variedade de células envolvidas na resposta inflamatória, incluindo macrófagos, neutrófilos e células endoteliais, possuindo diferentes efeitos dependentes do tipo de citocina liberada e da célula envolvida. De um modo geral, as citocinas influenciam a ativação, divisão, apoptose e quimiotaxia celular. Elas podem também estar envolvidas na diferenciação celular, na inflamação, na imunidade e no reparo tecidual (PECCHI et al., 2009; HANADA; YOSHIMURA, 2002). As citocinas são classificadas em subgrupos, como: ILs, fatores de crescimento, quimiocinas, interferons e fatores estimuladores de colônia, ou ainda, podem ser classificadas conforme sua atividade biológica como, por exemplo: pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatórias (IL-1RA, IL-4 e IL-10) (WONG; FISH, 2003).

Alguns exemplos importantes de citocinas incluem a IL-8, que atua como fator quimiotático em atrair o neutrófilo e outras células para a o local da inflamação. Estão também, envolvidas nesse processo, as quimiocinas, que são fundamentais para os leucócitos, pois atuam em seu crescimento, diferenciação e ativação, imprescindíveis para que ocorra quimiotaxia (TOWNSEND; MCKENZIE, 2000). Outro fator bastante importante é o TNF- $\alpha$ , que inibe a apoptose do neutrófilo elevando sua sobrevivência no sítio de ação. Adicionalmente, citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , são importantes no processo da dor por aumentarem a excitabilidade neuronal e a força sináptica, bem como, por aumentarem o número destes receptores na membrana dos neurônios (Figura 5) (STELLWAGEN; MALENKA, 2006).

O fluxograma abaixo resume as principais vias e mediadores envolvidos no processo inflamatório.

Figura 5 - Fluxograma da Cascata da Inflamação.



Fonte: Autora, 2012 - Adaptado de DUNDER, 2009.

O estudo dos mecanismos e dos mediadores envolvidos nos processos dolorosos e inflamatórios vem sendo alvo de numerosas pesquisas ao longo dos últimos anos (BASBAUM et al., 2009; CAFFREY; FITZGERALD, 2012; HUA; CABOT, 2010; KANAZAWA, 2012; MEDZHITOV, 2010). Embora existam diversos produtos, de origem natural ou sintética, utilizados para o tratamento desses processos, até o momento, não foi identificado ainda o anti-inflamatório ou analgésico ideal, quer seja pela limitação de sua eficácia, quer seja pela amplitude dos seus efeitos adversos (GRIS et al., 2010). Neste aspecto, é importante destacar que, muitos anti-inflamatórios disponíveis atualmente são capazes de induzir lesões gástricas por inibirem a síntese de PGs, o que representa uma importante limitação ao uso desses produtos. Dessa forma, a procura por substâncias que apresentem potente atividade anti-inflamatória e efeitos adversos limitados continua sendo bastante estimulada na comunidade científica. Assim, diversos modelos *in vivo* têm sido utilizados na pesquisa de compostos com atividade anti-inflamatória/antinociceptiva (VERGNOLLE, 2008).

### 1.3 Produtos Naturais de Origem Marinha

Entre as várias fontes para o desenvolvimento de fármacos os produtos naturais são de particular importância. O uso desses produtos está bem documentado ao longo da história humana e sua contribuição na indústria farmacêutica vem sendo mostrada ao longo dos anos em diversos trabalhos (BUTLER, 2008; HARVEY, 2008; NEWMAN; CRAGG, 2007). Estima-se que 80% dos fármacos em uso são produtos naturais ou foram inspirados pela natureza. Dessa forma, o homem tem obtido inovações para o seu benefício na produção de fármacos, usando, copiando ou modificando substâncias bioativas produzidas pelos seres vivos (COSTA-LOTUFO; WILKE; JIMENEZ, 2009).

Neste contexto, os organismos terrestres são responsáveis por quase a totalidade dessas substâncias, enquanto que os organismos marinhos, apesar de muito promissores, passaram a ser investigados apenas recentemente, quando comparados aos estudos com produtos de origem terrestre (COSTA-LOTUFO; WILKE; JIMENEZ, 2009). O meio marinho é um reservatório excepcional de produtos naturais bioativos, muitos dos quais exibem características químicas e estruturais não encontradas em produtos naturais terrestres (SULLIVAN et al., 2010). O fato é que os organismos marinhos evoluíram mecanismos bioquímicos e fisiológicos que incluem a produção de compostos bioativos para fins de reprodução, comunicação e proteção contra infecções, predação e competição (YUAN; WALSH, 2006). Devido às condições físicas e químicas adversas existentes no ambiente marinho, quase todas as classes de organismos originados desse ambiente expõem uma variedade de moléculas com características estruturais complexas e potentes atividades biológicas, que interagem em alvos celulares inusitados (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Apesar da investigação sobre as propriedades farmacológicas dos produtos naturais marinhos ser relativamente recente, ela levou à descoberta de muitos agentes potencialmente ativos considerados dignos de aplicação clínica, os quais demonstram a importância desses produtos e ilustram sua quimiodiversidade. O pesquisador Werner Bergmann da Universidade de Yale (E.U.A.) foi um dos pioneiros, com a descoberta dos nucleosídeos espongouridina e espongotimidina derivados da esponja *Tethya crypta* (BERGMANN; FEENEY, 1951). Análogos sintéticos, como a adenina-arabinosídeo (ara-A) e a citosina-arabinosídeo (ara-C) são até hoje utilizados na terapêutica como antiviral e antineoplásico, respectivamente (NEWMAN; CRAGG, 2007). No entanto, apenas após a descoberta de grandes quantidades de prostaglandinas no octocoral *Plexaura homomalla*, em 1978, por Alfred J. Weinheimer e Robert L. Spraggins da Universidade de Oklahoma

(E.U.A.) foi que o interesse e o investimento das indústrias farmacêuticas em laboratórios de pesquisa de produtos naturais na busca de novos fármacos de origem marinha foram despertados (WEINHEIMER; SPRAGGINS, 1969). Desde então, bem mais de 14.000 diferentes produtos naturais de organismos marinhos têm sido descritos, centenas de patentes descrevendo novos produtos naturais bioativos marinhos têm sido apresentadas e cerca de 10-15 diferentes produtos naturais marinhos passaram por ensaios clínicos, principalmente nas áreas de câncer, dor ou doenças inflamatórias (PROKSCH; EDRADA; EBEL, 2003).

O peptídeo conotoxina MVIIA (Ziconotide<sup>®</sup>), isolado do caracol marinho *Conus magus* é o primeiro fármaco de origem marinha e foi liberado pela FDA, em 2004, para o tratamento da dor crônica severa (WILLIAMS; DAY; HEAVNER, 2008). Seu mecanismo de ação consiste no bloqueio de canais do tipo N, que são canais de cálcio dependentes de voltagem expressos em nociceptores (RAUCK et al., 2009). Diversos produtos naturais de origem marinha são também promissores, como o sesquiterpeno manoalido, isolado de uma esponja do Pacífico (*Luffariella variabilis*), essa substância é um inibidor irreversível da PLA<sub>2</sub>, e encontra-se em fase de ensaios clínicos como protótipo anti-inflamatório de uso específico para o tratamento de psoríase (CASTRO et al., 2008). Outro importante derivado de produtos marinhos é a zidovudina, que foi descoberta a partir das propriedades identificadas em nucleosídeos isolados de algas marinhas, no laboratório Wellcome<sup>®</sup>. Essa substância é um inibidor potente da enzima transcriptase reversa viral, tornando-se um dos poucos recursos quimioterápicos contra este tipo de retrovírus (FAHMY et al., 2004). Há ainda a briostatina 1, um antileucêmico especialmente importante, devido sua potente atividade apresentada por via oral que tem também origem marinha (BLACKHALL, et al., 2000).

Dentre os organismos marinhos de destaque estão as macroalgas, que são recursos biologicamente ativos da natureza (SULLIVAN et al., 2010).

### 1.3.1 Macroalgas Marinhas

Os organismos denominados “alga” constituem um grupo muito diverso quanto as suas características morfológicas, estruturais e metabólicas, podendo ser encontradas nos mais diversos ambientes aquáticos e terrestres úmidos (REVIERS, 2006). Nos ambientes aquáticos, sua distribuição está relacionada com a temperatura e salinidade da água, disponibilidade de luz solar, correntes dos oceanos e condições físicas e químicas (RAVEN, EVERT, EITCHOM, 1996).

Alguns autores consideram as algas integrantes de três reinos distintos: Monera, Protista e Plantae. As algas azuis ou cianobactérias, organismos do reino Monera, são unicelulares (embora existam formas pluricelulares de organização simples), autótrofos ou heterótrofos e suas células apresentam envoltório nuclear e organelas membranosas. No reino Plantae são encontrados os organismos pluricelulares, eucariontes e autótrofos (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

Com relação à forma de vida, as algas podem ser encontradas na forma de seres planctônicos, unicelulares e microscópicos, ou, na forma de seres bentônicos com tecidos especializados, dentre as quais estão incluídas as macroalgas, que pertencem ao reino Plantae (GARSON, 1989). Os organismos denominados bentônicos são aqueles encontrados fixos a um substrato sólido, sendo assim, necessitam competir por espaço, luz e nutrientes. Além disso, esses organismos precisam defender-se de predadores e da colonização por outras espécies competitivas ou microorganismos patógenos. Por isso, esses seres frequentemente sintetizam metabólitos secundários que atuam mecanismo químico de defesa. Essas substâncias, independente da função para o organismo que a produziu, possuem muitas vezes atividades farmacológicas de interesse (PALERMO, 2004).

As macroalgas, em geral, sintetizam metabólitos secundários como terpenos, alcaloides, flavonoides, taninos, acetogeninas, polifenóis polares e polissacarídeos complexos, que podem ocorrer em altas concentrações (PEREIRA et al., 2003; TEIXEIRA; KELECOM; GOTTLIEB, 1991). Embora a composição dos metabólitos secundários de algas marinhas seja, em partes, idêntica àquela de plantas e animais terrestres, a principal característica dos de origem marinha é a presença de halogênios em sua estrutura (TEIXEIRA; KELECOM; GOTTLIEB, 1991). As altas concentrações de haletos presentes no meio marinho ( $\text{Cl}^-$ , 19.000 mg/L;  $\text{Br}^-$ , 65 mg/L e  $\text{I}^-/\text{IO}_3^-$ , 0,06 mg/L), permitem que as espécies que ali vivem incorporem facilmente esses elementos em seus processos de metabolização, sob a forma de ligações covalentes. Essa incorporação de halogênio contribui para o aumento da diversidade e da complexidade estrutural dessas substâncias e é um processo raro na formação de metabólitos em organismos terrestres (FENICAL, 1982).

Embora usualmente as macroalgas sejam usadas na produção de agentes gelificantes nas indústrias de alimentos e farmacêutica, algumas revisões atuais mostram seus potenciais usos medicinais contra o câncer, alergia, diabetes, estresse oxidativo, trombose, obesidade, dislipidemia, hipertensão e algumas doenças degenerativas (MOHAMED; HASHIM; RAHMAN, 2012). Além disso, Mayer e colaboradores (2011) identificaram diversas atividades antimicrobianas em diferentes espécies de algas marinhas, enquanto Jaswir e



Monsur (2011) mostraram diversos compostos derivados de macroalgas com atividade anti-inflamatória.

De acordo com a classificação botânica, as macroalgas são agrupadas em divisões, de acordo com sua estrutura física, pigmentação, função e ciclo de vida em: Chlorophyta (algas verdes); Phaeophyta, (algas pardas) e Rhodophyta (algas vermelhas) (SULLIVAN et al., 2010). As Clorophytas, em especial, representam o grupo mais diversificado dentre todas as algas, compreendendo aproximadamente 17.000 espécies amplamente distribuídas em diversos ambientes costeiros do mundo. A denominação de algas verdes se deve ao fato delas apresentarem uma maior quantidade de clorofila a e b, com relação aos outros pigmentos, na mesma proporção que as plantas superiores (EL GAMAL, 2010; RAVEN; EVERT; EITCHOM, 1996). Além disso, são conhecidas como produtoras de sesquiterpenos e diterpenos, em sua maioria, produzidos por espécies de *Caulerpa* (PEREIRA; DA GAMA, 2008).

### 1.3.2 Considerações sobre o Gênero *Caulerpa*

Dentre as Clorophytas estão as algas do gênero *Caulerpa* (Caulerpacae), distribuídas mundialmente em regiões tropicais e subtropicais, reconhecidas por Lamouroux em 1809 (FAMA et al., 2002). Embora o número de espécies de *Caulerpa* seja um dado variável na literatura, Dumay e colaboradores (2002) identificaram 100 espécies espalhadas pelo mundo, sendo as espécies *C. cupressoides*, *C. mexicana*, *C. sertularioides* e *C. racemosa* as mais comuns no litoral brasileiro, formando extensas áreas verdes na zona entre marés (JOLY, 1965; SZÉ, 1997).

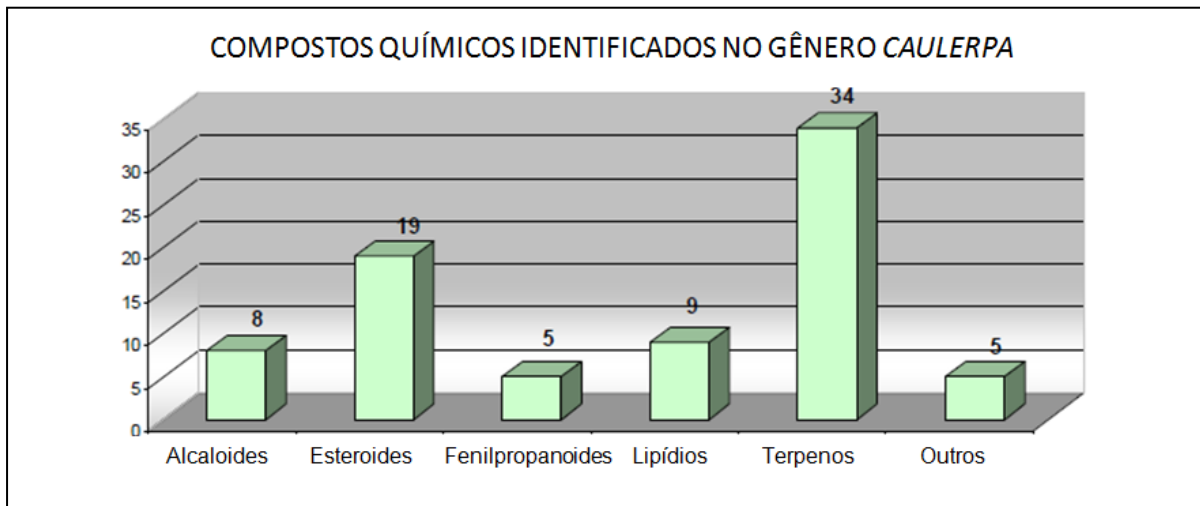
As macroalgas *Caulerpa* spp. são morfologicamente distintas, por serem unicelulares com células gigantes e diferenciadas (MENZEL, 1988), contendo substâncias incomuns que podem ser fornecidas por preparações brutas, extratos e metabólitos secundários com potenciais aplicações farmacêuticas (CAVAS; POHNERT, 2010).

Diferentes atividades de preparações obtidas de *Caulerpa* spp. têm sido relatadas: Shen e colaboradores (2008) investigaram a atividade imunomoduladora de um polissacarídeo modificado, obtido de *C. racemosa*; a atividade hemaglutinante de uma lectina obtida de *C. cupressoides* foi observada por Benevides e colaboradores (2001); Ara e colaboradores (2002) demonstraram que extratos etanólicos de *C. racemosa* exibem atividade hipolipidêmica e diminuem significativamente o colesterol total e triglicerídeos em ratos; Santoso e colaboradores (2004) encontraram potente atividade antioxidante em extratos metanólicos de

*C. sertularioides*. Em 2010, Tierney, Croft e Hayes identificaram a atividade inibidora da enzima conversora de angiotensina em algas do gênero *Caulerpa* e mais recentemente, Lin e colaboradores (2012) observaram propriedades antitumorais *in vitro* em extratos de *C. microphysia*.

Um levantamento realizado por Lorenzo em 2009 identificou diferentes classes de substâncias em algas do gênero *Caulerpa*. As de maior prevalência foram os alcaloides, terpenoides e esteroides. A Figura 6 mostra alguns dos compostos químicos encontrados no gênero *Caulerpa*.

**Figura 6 - Compostos químicos identificados no gênero *Caulerpa* agrupados por classe.**



Fonte: LORENZO, 2009.

Dentre os vários metabólitos encontrados em algas do gênero *Caulerpa*, o mais abundante é o sesquiterpeno caulerpenina, que pode ser encontrado em concentrações de até 4% do peso seco da alga (ERICKSON et al., 2006) e tem sido associado a atividades antitumoral, antiproliferativa, antibacteriana, antiviral e anti-inflamatória (CAVAS; POHNERT, 2010). Outro composto importante é o alcaloide bisindólico caulerpina, constituinte isolado em cerca de vinte espécies de *Caulerpa*, que tem demonstrado atividade antitumoral, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e antiviral em diferentes trabalhos (GÜVEN; PERCOT; SEZIK, 2010; SOUZA et al., 2009a; MACEDO et al., 2012). Estudos com as espécies *C. ashmeadii*, *C. paspaloides*, *C. lentillifera*, *C. racemosa* e *C. sertularioides* levaram ao isolamento de hidroxiamidas, cuja mistura é denominada caulerpicina (NIELSEN; CARLE; CHRISTOPHERSENC, 1982; VEST; DAWES; ROMEO, 1983). Além desses, outros metabólitos encontrados no gênero incluem: a flexilina (BLACKMAN; WELLS,

1978), o diterpeno trifarina e os esteróides 24-metil-colesterol e colesterol (HANDLEY; BLACKMAN, 2001; LORENZO, 2009; PAUL; FENICAL, 1985).

Apesar da diversidade de trabalhos descrevendo atividades encontradas em diferentes espécies de *Caulerpa*, a pesquisa sobre o potencial farmacológico de algas verdes, mais precisamente do gênero *Caulerpa*, é algo novo, que vem se desenvolvendo apenas nas últimas décadas (SULLIVAN et al., 2010). Estudos recentes, publicados por nosso grupo, demonstraram efeito antinociceptivo e anti-inflamatório induzidos por extratos de algas do gênero *Caulerpa*, bem como de um de seus constituintes, o alcaloide bisindólico caulerpina, em camundongos (SOUZA et al., 2009a, 2009b).

### 1.3.3 Considerações sobre as espécies *C. mexicana* e *C. sertularioides*

A *C. mexicana* Sond. ex Kuet é uma das espécies de algas mais comuns no litoral brasileiro, principalmente na região nordeste (SZÉ, 1997), sendo facilmente encontrada no médio-litoral, faixa de terra sob ação direta das marés, crescendo sobre rochas ou associadas a outras algas. Essa espécie apresenta morfologia complexa, apresentando grande variação ao longo do litoral, que leva a problemas graves em sua identificação. Devido a isso, segundo Barata (2008), há uma grande confusão na diferenciação entre *C. taxifolia* e *C. mexicana*, devendo a maior parte do que se tem identificado no Brasil como *C. taxifolia* ser corrigida para *C. mexicana*. Apesar disso, esse problema pode ser contornado por meio de estudos filogenéticos e taxonômicos detalhados, bem como por análises moleculares (BARATA, 2008). Sendo assim, é importante conhecer as características próprias da *C. mexicana*, que incluem: talo verde claro flácido, râmulos em forma de foice, com constricção na base e com constantes sobreposições (Figura 7) (COPPEJANS et al., 2004).

**Figura 7 - *C. mexicana* Sond. ex Kuet.**



Fonte: BARATA, 2008.

A *C. sertularioides* foi inicialmente identificada por Samuel Gottlieb Gmelin, em 1768 nas Índias Orientais, como *Fucus sertularioides* S.G. Gmel. No entanto, em 1905 foi transferida para o gênero *Caulerpa* e passou a ser denominada como *C. sertularioides* (S.G. Gmel.) Howe. Algumas espécies de *Caulerpa* possuem grande semelhança morfológica entre si como, por exemplo, a *C. sertularioides* que pode ser confundida com *C. taxifolia*, embora, esta última seja uma espécie altamente invasiva, ou seja, estabelece-se em abundância geográfica interferindo na capacidade de sobrevivência de outras espécies ao seu redor, o que não ocorre com a *C. sertularioides* (ELLIOTT, 2003). No entanto, *C. sertularioides* possui folhas eretas, ocasionalmente ramificadas parecidas com uma pena de cor verde (Figura 8, p. 36) (LITTLER, D.; LITTLER, M. 2000). Essa espécie é comumente utilizada na alimentação em algumas localidades nas Filipinas, em saladas, retiradas diretamente do ambiente. Além disso, esta alga também é utilizada por seus produtos naturais no tratamento da hipertensão e também como fontes de vitaminas e sais minerais (TRONO, 1999).

**Figura 8 - *C. sertularioides* (S.G. Gmel.) Howe**



Fonte: BARATA, 2008.

Essas espécies, *C. mexicana* e *C. sertularioides*, foram selecionadas para o presente estudo tendo em vista a ocorrência de atividade antinociceptiva e anti-inflamatória em outras espécies do mesmo gênero, tais como *C. racemosa* (SOUZA et al., 2009a) e *C. kempfi* (MATTA et al., 2010). Além disso, essas atividades foram identificadas em metabólitos secundários do gênero *Caulerpa* como caulerpenina, caulerpina e em uma lectina isolada da espécie *C. cupressoides* (CENGIZ et al., 2010; SOUZA et al., 2009b; VANDERLEI et al., 2010).

Dessa forma, em função do crescente interesse pelo estudo farmacológico de produtos oriundos de macroalgas marinhas, que possam ser utilizados como protótipos de fármacos, fitofármaco ou fitoterápico, este trabalho vem contribuir para o conhecimento do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório das macroalgas verdes *C. mexicana* e *C. sertulari*

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Investigar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório dos extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico obtidos das espécies de macroalgas *C. mexicana* e *C. sertularioides* e contribuir para o estudo científico de macroalgas bentônicas oriundas do nordeste brasileiro.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a atividade antinociceptiva desses extratos nos modelos de contorção abdominal induzida por ácido acético e nocicepção induzida por formalina;
- Investigar uma possível ação central desses extratos no modelo de placa quente;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória no modelo de peritonite induzida por carragenina

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material Botânico

##### 3.1.1 Coleta e Classificação Botânica

Os extratos obtidos das macroalgas verdes *C. mexicana* e *C. sertularioides* foram cedidos pela profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos (DCF/CCS-UFPB) e pelo prof. Dr. José Maria Barbosa Filho (DCF/CCS-UFPB), coordenador do projeto: Rede Interinstitucional de Algas Bentônicas, Edital: MCT-CNPq/MS-SCTIE-DECIT/CT- Saúde – Nº 10/2006).

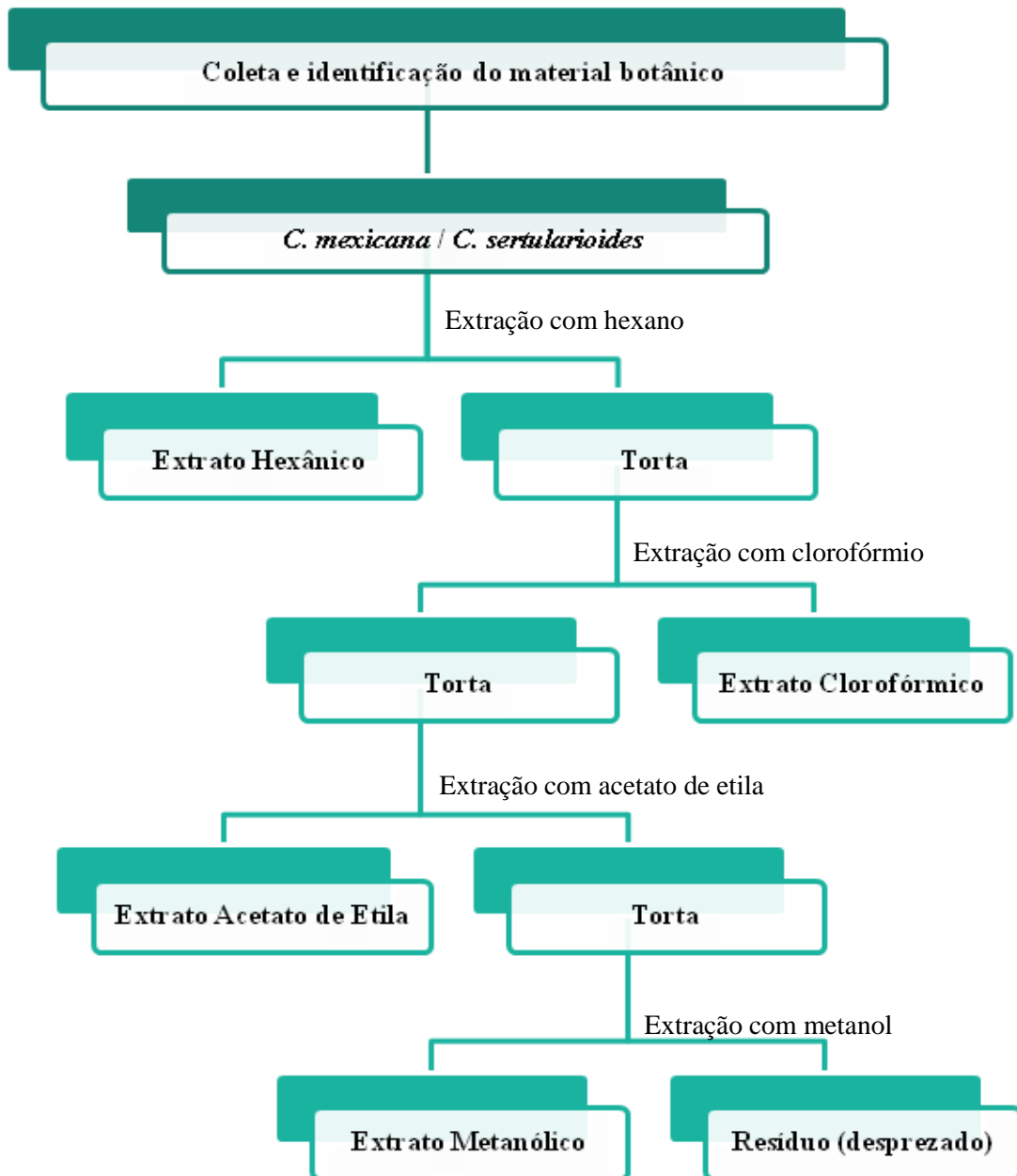
As macroalgas foram coletadas no litoral da Paraíba (região da praia do Bessa), durante marés de sizígia (-0,2 a 2,0 m) no ano de 2009 e identificadas pelo Prof. Dr. George Emmanuel C. de Miranda do Laboratório de Algas Marinhas - LAM, Departamento de Sistemática e Ecologia da UFPB, João Pessoa - PB, Brasil. Após a identificação as espécies de *C. mexicana* (JPB 13985) e *C. sertularioides* (JPB 13983) foram depositadas no Herbário Lauro Pires Xavier da UFPB.

##### 3.1.2 Preparação e Obtenção dos Extratos de *C. mexicana* e *C. sertularioides*

Após coleta e identificação, as macroalgas foram lavadas com água destilada e separadas de outras espécies. Em seguida, foram pesadas e secas à temperatura ambiente (~25 °C). Foi utilizado cerca de 4-5 kg de material fresco, uma vez que essas algas apresentam uma elevada porcentagem (~ 90%) de água.

Para a obtenção dos extratos foi realizada uma extração à quente, em aparelho de Soxhlet, utilizando solventes de polaridade crescente como hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol (Figura 9, p. 41). Nesse processo, o material remanescente de cada extração, denominado de torta, foi extraído pelo solvente seguinte formando as sucessivas soluções extrativas, que passaram por um processo de evaporação do solvente em evaporador rotativo, à pressão reduzida, com temperatura não superior a 50 °C. Estes procedimentos de preparação e obtenção dos extratos foram realizados no Departamento de Ciências Farmacêuticas, do Centro de Ciências da Saúde (UFPB) pelo grupo do prof. José Maria Barbosa Filho.

Figura 9 - Esquema do processo de obtenção dos extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico das macroalgas *C. mexicana* e *C. sertularioides* em aparelho de Soxhlet.



Fonte: Autora, 2012.

## 3.2 Ensaios Farmacológicos

### 3.2.1 Aprovação pelo Comitê de Ética

Todos os experimentos realizados neste trabalho foram aprovados previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas, nº: 23065.002260/2011-21



(ANEXO), e conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética Internacional para manuseio de animais em modelos de inflamação (ZIMMERMAN, 1983).

### 3.2.2 Animais

Nesse trabalho utilizou-se camundongos da linhagem Swiss de ambos os sexos, pesando entre 25-30 g, com 6 a 8 semanas de idade, cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas. Após o período de desmame, os animais foram transferidos para o Biotério do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - ICBS, onde foram mantidos em gaiolas plásticas com livre acesso a água e ração especial para roedores em ambiente com temperatura e luminosidade controladas, obedecendo a um ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro. Os animais foram mantidos no laboratório para aclimatação durante no mínimo 1 dia antes da realização dos experimentos. Para cada experimento utilizou-se 6 animais por grupo, os quais foram deixados em jejum por 8 h antes do início dos experimentos com livre acesso à água. Logo após os ensaios os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

### 3.2.3 Reagentes, Soluções e Fármacos Utilizados

Foram utilizados nos diferentes ensaios os seguintes reagentes e soluções: Ácido acético P.A. e Formaldeído P.A. (Vetec); Azul de Tripán, Cloreto de Sódio – NaCl, Carboximetilcelulose – CMC, Carragenina, Tween 80<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich); Panótico rápido (Laborclin).

Além disso, os seguintes fármacos foram utilizados como padrão: Dipirona (Sigma-Aldrich), Indometacina (Merck) e Morfina (Cristália, BR).

### 3.2.4 Extratos

Para os ensaios farmacológicos, foram utilizados os extratos hexânico (EH), clorofórmico (EC), acetato de etila (EA) e metanólico (EM) obtidos das espécies *C. mexicana* e *C. sertularioides* que foram suspensos em CMC 5% com auxílio de 20  $\mu$ L de Tween 80<sup>®</sup> (tensoativo). Em todos os ensaios, os extratos foram administrados por via oral (v.o.) na dose de 100 mg/kg, que é a dose máxima preconizada por revistas como a *Journal of Ethnopharmacology* em estudos de *screening* farmacológico.

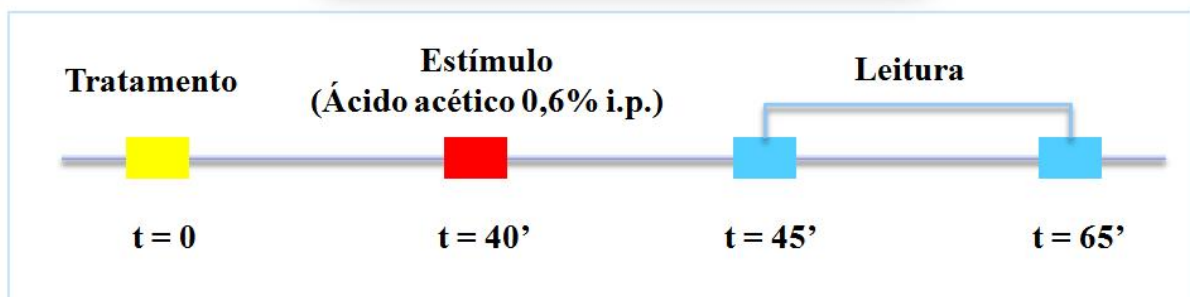
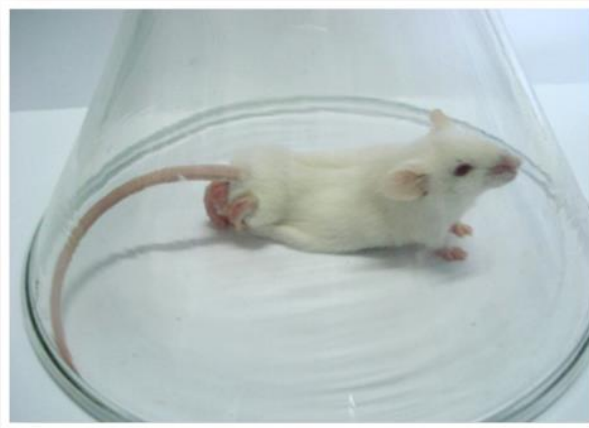
### 3.3 Avaliação da Atividade Antinociceptiva e Anti-Inflamatória

#### 3.3.1 Ensaio de Contorção Abdominal Induzida por Ácido Acético

O protocolo experimental utilizado nesse ensaio foi semelhante ao proposto originalmente por Collier e colaboradores (1968), com pequenas modificações. Nesse método, a nocicepção é induzida por ácido acético 0,6%, que atua como um estímulo álgico quando injetado na cavidade peritoneal do camundongo. A resposta do animal ao estímulo é representada por uma sequência de contrações da musculatura abdominal juntamente com a extensão dos membros inferiores (Figura 10).

Quarenta minutos antes da injeção do ácido acético i.p, os animais foram tratados com os extratos de *C. mexicana*, *C. sertularioides* ou dipirona (40 mg/kg, i.p.), fármaco padrão. O grupo controle recebeu o mesmo veículo (CMC e Tween 80<sup>®</sup>) utilizado na suspensão dos extratos. Cinco minutos após a administração do agente álgico foi registrado o número de contorções abdominais produzidas pelo animal durante 20 min.

**Figura 10 - Contorção abdominal induzida por ácido acético.**



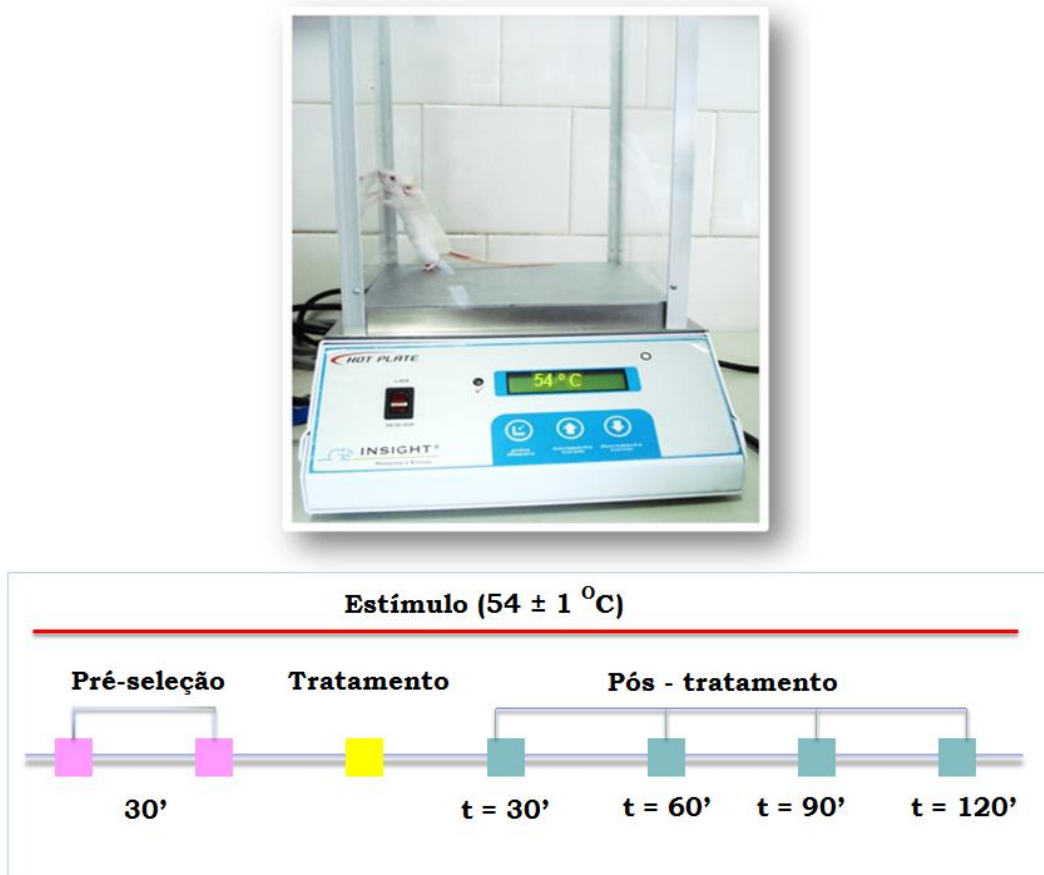
Fonte: MATTA, 2010.

Nota: Esquema do ensaio contorção abdominal induzida por ácido acético.

### 3.3.2 Ensaio de Placa Quente

A atividade antinociceptiva central dos extratos de *C. mexicana* e *C. sertularioides* foi avaliada utilizando o modelo da placa quente, descrito por Kuraishi e colaboradores (1983). Os camundongos foram colocados em uma placa aquecida à  $54 \pm 1,0$  °C (Figura 11) e sua resposta ao estímulo térmico, tempo em segundos que o animal levou para lambe, levantar ou morder uma de suas patas dianteiras ou traseiras (tempo de latência) foi cronometrada. Foram feitas duas medidas controle num intervalo de 30 minutos (pré-seleção), a primeira leitura foi realizada para adaptar o animal à placa aquecida e eliminar os animais com maior e menor tempo de latência na placa, estabelecendo-se o tempo máximo de permanência do animal na placa de 15 s. Já a segunda leitura serviu como controle. Em seguida, os animais foram tratados com os extratos, veículo ou morfina (4,3 mg/kg, via s.c.), que foi utilizada como fármaco padrão, e após um intervalo de 30 minutos novas medidas do tempo de latência foram registradas em intervalos de 30 minutos até 2 h após o tratamento.

**Figura 11 - Ensaio de placa quente.**



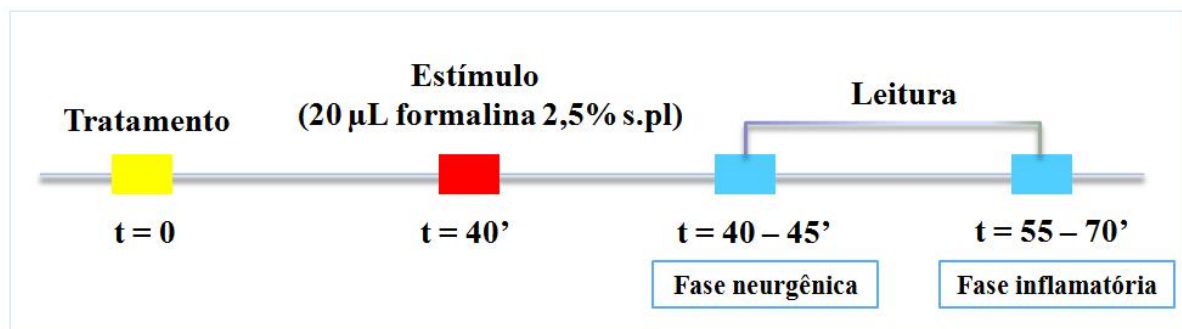
Fonte: MATTA, 2010.

Nota: Esquema do ensaio de placa quente.

### 3.3.3 Ensaio de Nocicepção Induzida por Formalina

O procedimento utilizado para realização desse ensaio foi similar ao descrito por Hunskaar e Hole (1987). Esse ensaio é caracterizado por duas fases distintas: uma fase neurogênica (1ª fase) e outra inflamatória (2ª fase). Para isso, os camundongos receberam uma injeção subplantar (s.pl.) de 20 µl de formalina - formaldeído diluído em solução salina (2,5%) - na face dorsal da pata traseira, quarenta minutos após o tratamento com os extratos de *C. mexicana* ou *C. sertularioides*, o fármaco padrão indometacina (35,7 mg/kg, v.o.), ou o veículo (CMC e Tween 80®). Após a administração da formalina os animais foram imediatamente colocados, individualmente, em um béquer e cronometrou-se o tempo que o animal permaneceu lambendo, mordendo ou batendo a pata, sendo esse tempo considerado como indicativo de nocicepção (Figura 12). Os primeiros 5 minutos cronometrados representam a fase neurogênica do ensaio e os últimos 15 minutos representam a fase inflamatória, totalizando 30 minutos.

**Figura 12 - Ensaio de nocicepção induzida por formalina.**



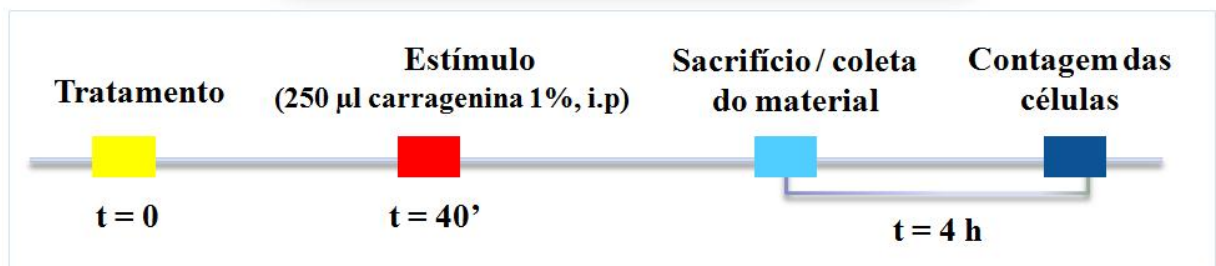
Fonte: MATTA, 2010.

Nota: Esquema do ensaio de nocicepção induzida por formalina.

### 3.3.4 Ensaio de Peritonite Induzida por Carragenina

Seguindo a metodologia descrita por Ferrándiz e Alcaraz (1991) os camundongos foram tratados com os extratos de *C. mexicana* ou *C. sertularioides*, indometacina (35,7 mg/kg, v.o.) ou veículo e após 40 minutos foram submetidos ao ensaio de peritonite, por administração de 250 µl/cavidade i.p. de uma solução de carragenina 1% dissolvida em salina estéril. Após 4 h da injeção de carragenina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e a cavidade peritoneal foi lavada com de 3 mL tampão fosfato salina pH 7,4 (PBS). Após a massagem do abdômem, o fluido peritoneal foi coletado (cerca de 2 mL) e a contagem total das células foi realizada (Figura 13).

**Figura 13 - Ensaio de peritonite induzida por carragenina.**



Fonte: MATTA, 2010

Nota: Esquema do ensaio de peritonite induzida por carragenina.

Para a contagem do número total de células, 10 µl do fluido peritoneal de cada animal foi coletado, diluído e homogeneizado em 190 µl de azul de Tripán, obtendo uma diluição de 1:20. Dessa solução, 10 µl foram transferidos para a câmara de Neubauer onde foi realizada a

contagem (2 quadrantes) com auxílio de microscópio óptico em objetiva de 40x. O número de células recrutadas foi obtido utilizando o cálculo abaixo:

$$\text{n}^\circ \text{ de células/mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células}}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$

### 3.3.5 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, conforme indicado nas legendas das tabelas e figuras e as diferenças estatísticas entre os grupos experimentais e controle foram verificadas por Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnet. Os valores foram considerados significativos quando  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$ . As análises foram realizadas no tutorial GraphPad Prisma® versão 5.1.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Efeito Antinociceptivo e Anti-Inflamatório dos Extratos de *C. mexicana* e *C. sertularioides*

#### 4.1.1 Ensaio de Contorção Abdominal Induzida por Ácido Acético

No modelo de nocicepção induzida por ácido acético (ensaio de contorção abdominal), todos os extratos estudados de *C. mexicana* e *C. sertularioides*, administrados na dose de 100 mg/kg, v.o., induziram redução no número de contorções abdominais ( $p < 0,001$ ). O grupo controle, tratado apenas com o veículo, apresentou  $35,5 \pm 1,6$  contorções abdominais, enquanto os grupos tratados com os extratos de *C. mexicana* apresentaram  $6,0 \pm 1,4$  (EH),  $8,2 \pm 2,3$  (EC),  $9,5 \pm 1,4$  (EA) e  $7,7 \pm 0,7$  (EM) contorções abdominais, com as respectivas porcentagens de inibição: 83,1%, 77,0%, 73,2% e 78,4%. A dipirona, fármaco padrão utilizado, reduziu o número de contorções para  $8,0 \pm 2,3$  com porcentagem de inibição de 77,5%, quando comparada ao controle. A Tabela 1 mostra as porcentagens de inibição e a média  $\pm$  E.P.M das contorções abdominais dos camundongos, enquanto a Figura 14 (p. 46) expõe esses valores na forma de gráfico.

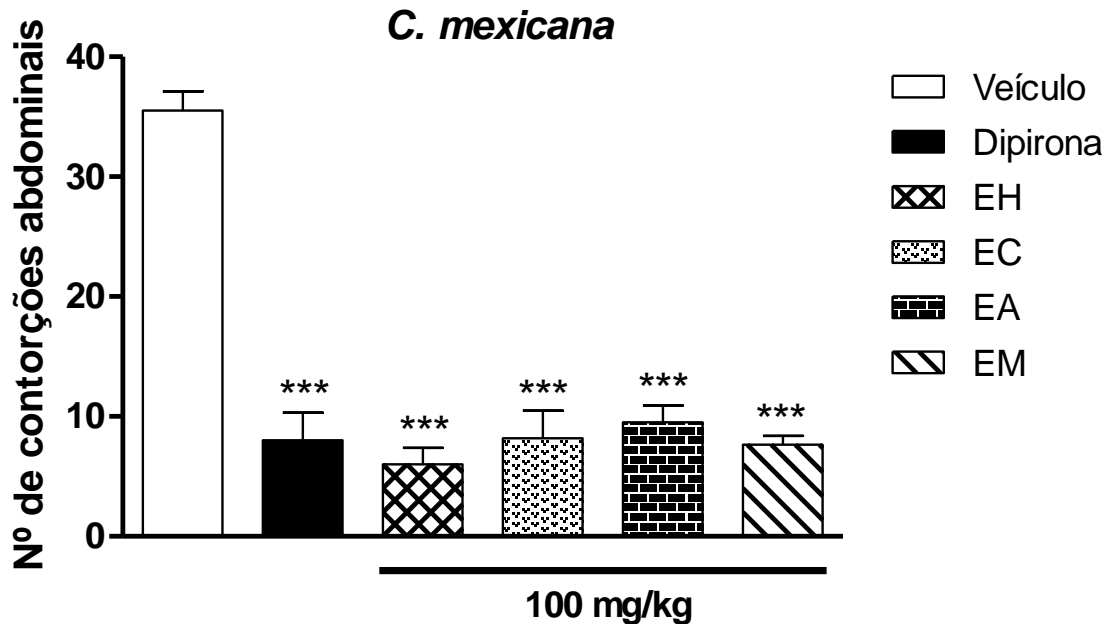
**Tabela 1 - Efeito dos extratos de *C. mexicana* (100 mg/kg, v.o) em camundongos no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético.**

Tratamento	Nº de contorções (média $\pm$ E.P.M)	% de inibição
<b>Veículo</b>	$35,5 \pm 1,6$	-----
<b>Dipirona</b>	$8,0 \pm 2,3$ ***	77,5%
<b>EH</b>	$6,0 \pm 1,4$ ***	83,1%
<b>EC</b>	$8,2 \pm 2,3$ ***	77,0%
<b>EA</b>	$9,5 \pm 1,4$ ***	73,2%
<b>EM</b>	$7,7 \pm 0,7$ ***	78,4%

Fonte: Autora, 2012.

Nota: \*\*\* $p < 0,001$ : difere significativamente do controle (veículo). Análise por ANOVA One Way seguida do teste de Dunnet.

Figura 14 - Efeito dos extratos de *C. mexicana* (100 mg/kg, v.o) no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético.



Fonte: Autora, 2012.

Notas: \*\*\* $p < 0,001$ : difere significativamente do controle (veículo) quando analisados por ANOVA One Way seguida do teste de Dunnet. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=6) do número de contorções abdominais.

Os grupos tratados com os extratos de *C. sertularioides* induziram  $11,7 \pm 2,0$  (EH),  $11,5 \pm 0,9$  (EC),  $13,7 \pm 2,8$  (EA) e  $11,5 \pm 1,8$  (EM) contorções abdominais ( $p < 0,001$ ), com inibição de 66,5%, 67,0%, 60,7% e 67,0%, respectivamente, quando comparados com o grupo tratado apenas com o veículo, que apresentou  $34,9 \pm 1,8$  contorções. A dipirona induziu  $5,8 \pm 1,7$  contorções e 83,1% de inibição e não houve diferença significativa entre o grupo tratado com os EH, EC e EM e o tratado com dipirona (Tabela 2 e Figura 15, p. 47).

Tabela 2 - Efeito dos extratos de *C. sertularioides* (100 mg/kg, v.o) em camundongos no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético.

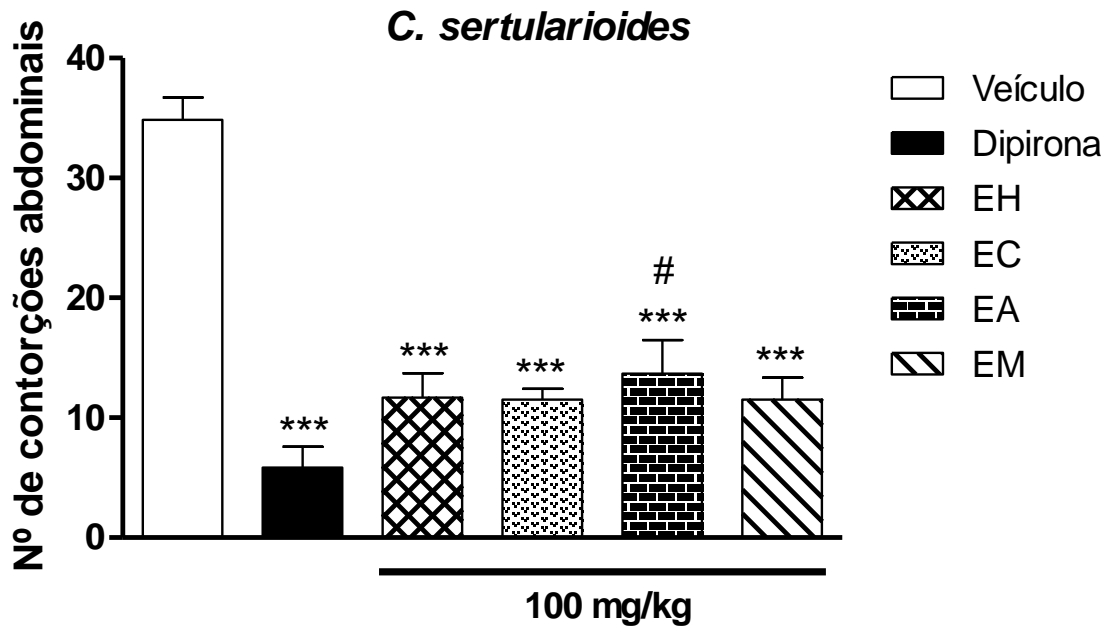
Tratamento	Nº de contorções (média $\pm$ E.P.M)	% de inibição
Veículo	$34,9 \pm 1,8$	-----
Dipirona	$5,8 \pm 1,7$ ***	83,1%
EH	$11,7 \pm 2,0$ ***	66,5%
EC	$11,5 \pm 0,9$ ***	67,0%
EA	$13,7 \pm 2,8$ *** #	60,7%
EM	$11,5 \pm 1,8$ ***	67,0%

Fonte: Autora, 2012.

Nota: \*\*\* $p < 0,001$ : difere significativamente do controle (veículo) e # $p < 0,05$ : difere do grupo tratado com dipirona. Análise por ANOVA One Way seguida do teste de Dunnet.



Figura 15 - Efeito dos extratos de *C. sertularioides* (100 mg/kg, v.o) no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético.



Fonte: Autora, 2012.

Nota: \*\*\* $p < 0,001$ : difere significativamente do controle (veículo) e # $p < 0,05$ : difere do grupo tratado com dipirona quando analisados por ANOVA One Way seguida do teste de Dunnet. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=6) do número de contorções abdominais.

#### 4.1.2 Ensaio de Placa Quente

No ensaio de placa quente ( $54 \pm 1$  °C) o tratamento com os extratos de *C. mexicana*, na dose de 100 mg/kg, aumentou o tempo de permanência do animal sobre a placa quente, quando comparado ao controle, com significância estatística em diferentes tempos. Todos os extratos induziram aumento no tempo de latência ao calor 60 min após a sua administração. Após 90 min de tratamento, apenas os EH e EM aumentaram esse tempo. Enquanto os EA e EM foram capazes de aumentar o tempo de permanências desses animais na placa quente até 120 min após o tratamento (Tabela 3, p. 48). Ainda nesse ensaio, a morfina (4,3 mg/kg, s.c.), utilizada como fármaco padrão, provocou um aumento ( $p < 0,001$ ) no tempo de latência dos animais na placa no período de 30 a 120 minutos. Por outro lado, nenhum extrato oriundo da *C. sertularioides* foi ativo de maneira significativa nesse ensaio (dados não mostrados).

**Tabela 3 - Efeito dos extratos de *C. mexicana* (100 mg/kg, v.o.) e morfina (4,3 mg/kg, s.c.) no ensaio de placa quente.**

Tratamento	Pré-tratamento		Pós-tratamento			
	0 min	30 min	30 min	60 min	90 min	120 min
<b>Veículo</b>	1,4 ± 0,3	2,2 ± 0,6	1,8 ± 0,2	3,2 ± 0,3	2,8 ± 0,3	2,6 ± 0,5
<b>Morfina</b>	6,9 ± 0,4	5,8 ± 0,3	12,8 ± 0,4***	10,3 ± 0,8***	9,7 ± 0,7***	9,7 ± 0,9***
<b>EH</b>	2,7 ± 0,3	2,8 ± 0,6	4,6 ± 0,7	5,8 ± 0,9**	5,9 ± 1,0**	5,1 ± 0,8
<b>EC</b>	2,7 ± 0,2	3,7 ± 0,5	4,4 ± 1,0	5,7 ± 0,7**	3,6 ± 0,6	3,9 ± 1,0
<b>EA</b>	1,7 ± 0,4	3,4 ± 0,3	3,1 ± 0,5	5,3 ± 0,9***	4,1 ± 0,5	5,9 ± 1,3***
<b>EM</b>	3,5 ± 0,5	3,0 ± 0,4	4,5 ± 0,3	5,4 ± 0,6***	5,1 ± 0,8**	5,4 ± 0,4**

Fonte: Autora, 2012.

Nota: \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ : difere significativamente do controle (veículo) quando analisados por ANOVA One Way seguida do teste de Dunnet. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. (n=6) do tempo em segundos que o animal permaneceu sobre a placa quente.

#### 4.1.3 Ensaio de Nocicepção Induzida por Formalina

Na primeira fase desse ensaio, o tempo em segundos que o animal passou lambendo a pata em resposta à injeção de formalina (s.pl.) foi de  $69,4 \pm 1,9$  s no grupo controle. Após o tratamento com os extratos de *C. mexicana* esse tempo foi reduzido de maneira significativa para  $41,2 \pm 3,9$  s (EH),  $47,1 \pm 2,7$  s (EC),  $27,2 \pm 4,3$  s (EA), e  $34,1 \pm 5,5$  s (EM), com inibição de 40,6%, 32,1%, 60,8% e 50,9%, respectivamente. Além disso, houve diferença estatística entre os grupos tratados com os extratos EA e EM e o tratado com indometacina. A Tabela 4 mostra as médias ± E.P.M. dos tempos de lambida dos animais avaliados neste ensaio e a Figura 16 (p. 49) representa esses valores na forma de gráfico.

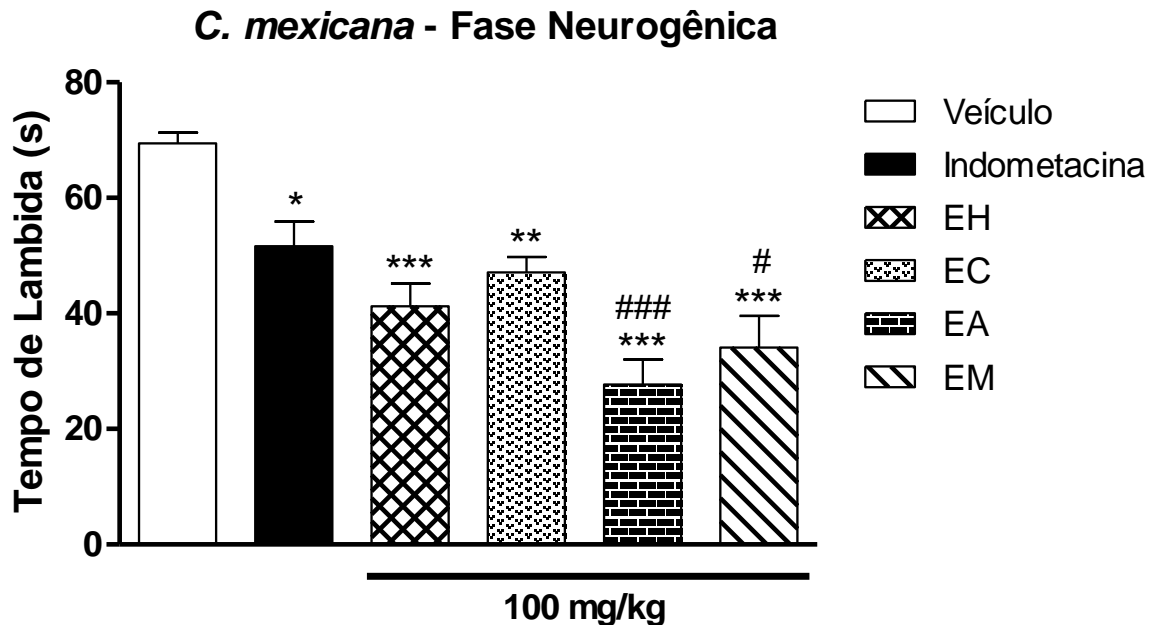
**Tabela 4 – Efeito dos extratos de *C. mexicana* na (100 mg/kg, v.o) fase neurogênica do ensaio de nocicepção induzida por formalina.**

Tratamento	Tempo de lambida (média ± E.P.M)	% de inibição
<b>Veículo</b>	69,4 ± 1,9	-----
<b>Indometacina</b>	51,0 ± 6,6*	26,5%
<b>EH</b>	41,2 ± 3,9***	40,6%
<b>EC</b>	47,1 ± 2,7**	32,1%
<b>EA</b>	27,2 ± 4,3*** ###	60,8%
<b>EM</b>	34,1 ± 5,5*** #	50,9%

Fonte: Autora, 2012.

Nota: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ : difere significativamente do controle (veículo) e # $p < 0,05$  e ### $p < 0,001$ : difere do grupo tratado com indometacina. Análise por ANOVA One Way seguida do teste de Dunnet.

Figura 16 - Efeito dos extratos de *C. mexicana* (100 mg/kg, v.o.) e indometacina (35,7 mg/kg, v.o.) na fase neurogênica do ensaio de nocicepção induzida por formalina.



Fonte: Autora, 2012.

Nota: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ : difere significativamente do controle (veículo) e # $p < 0,05$  e ### $p < 0,001$ : difere do grupo tratado com indometacina quando analisados por ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=6) do tempo (s) que o animal lambeu a pata, durante 5 min.

Ainda na primeira fase desse ensaio, com relação aos extratos de *C. sertularioides* avaliados, apenas o EC e o EA reduziram o tempo de lambida da pata ( $43,6 \pm 5,7$  s e  $41,3 \pm 4,3$  s, respectivamente) com significância estatística quando comparados ao grupo controle ( $69,4 \pm 1,9$  s). A Tabela 5 mostra a média  $\pm$  E.P.M do tempo de lambida de cada grupo avaliado e suas respectivas porcentagens de inibição. Já a Figura 17 (p. 50) mostra um gráfico representando esses valores.

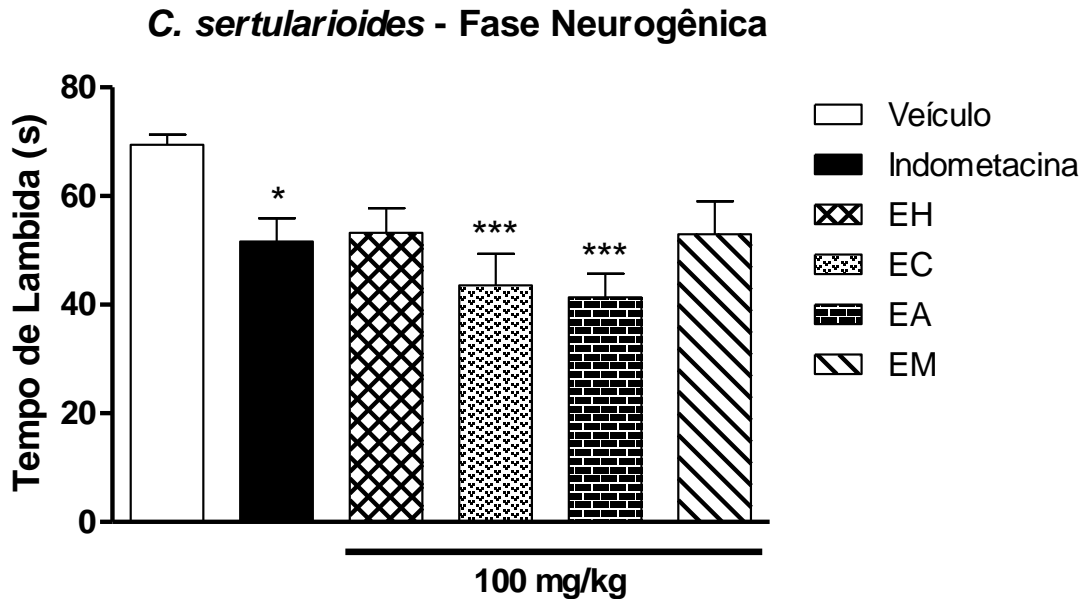
Tabela 5 - Efeito dos extratos de *C. sertularioides* (100 mg/kg, v.o) na fase neurogênica do ensaio de nocicepção induzida por formalina.

Tratamento	Tempo de lambida (média $\pm$ E.P.M)	% de inibição
Veículo	$69,4 \pm 1,9$	-----
Indometacina	$51,7 \pm 4,3^*$	25,5%
EH	$53,2 \pm 4,5$	23,4%
EC	$43,6 \pm 5,7^{***}$	37,2%
EA	$41,3 \pm 4,3^{***}$	40,5%
EM	$52,9 \pm 6,5$	23,8%

Fonte: Autora, 2012.

Nota: \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ : difere significativamente do controle (veículo). Análise por ANOVA One Way seguida do teste de Dunnet.

Figura 17 - Efeito dos extratos de *C. sertularioides* (100 mg/kg, v.o.) e indometacina (35,7 mg/kg, v.o.) na fase neurogênica do ensaio de nocicepção induzida por formalina.



Fonte: Autora, 2012.

Nota: \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ : difere significativamente do controle (veículo) quando analisados por ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=6) do tempo (s) que o animal lambeu a pata, durante 5 min.

Na segunda fase do ensaio de nocicepção induzida por formalina no grupo tratado apenas com o veículo, os animais passaram  $232,6 \pm 25,4$  s lambendo a pata em resposta ao estímulo nocivo, enquanto o tratamento com os extratos de *C. mexicana* reduziu esse tempo, de maneira significativa, para  $126,1 \pm 12,1$  s (EH),  $144,4 \pm 5,3$  s (EC),  $57,5 \pm 11,8$  s (EA) e  $97,2 \pm 10,8$  s (EM), com inibição de 45,8%, 37,9%, 75,3% e 58,2%, respectivamente, enquanto o grupo controle (veículo) passou  $232,6 \pm 25,4$  s lambendo a pata inflamada e o grupo tratado com indometacina  $109,5 \pm 14,2$  s com inibição de 52,9% (Tabela 6 e Figura 18, p. 51).

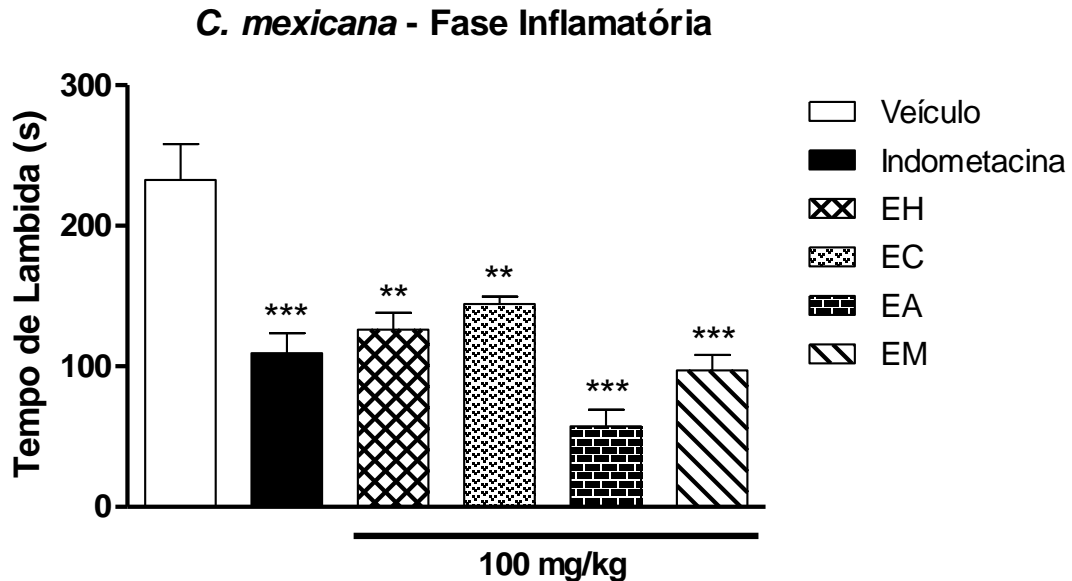
Tabela 6 - Efeito dos extratos de *C. mexicana* (100 mg/kg, v.o) na fase inflamatória do ensaio de nocicepção induzida por formalina.

Tratamento	Tempo de lambida (média $\pm$ E.P.M)	% de inibição
Veículo	$232,6 \pm 25,4$	-----
Indometacina	$109,5 \pm 14,2$ ***	52,9%
EH	$126,1 \pm 12,1$ **	45,8%
EC	$144,4 \pm 5,3$ **	37,9%
EA	$57,5 \pm 11,8$ ***	75,3%
EM	$97,2 \pm 10,8$ ***	58,2%

Fonte: Autora, 2012.

Nota: \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ : difere significativamente do controle (veículo). Análise por ANOVA One Way seguida do teste de Dunnet.

Figura 18 - Efeito antinociceptivo dos extratos de *C. mexicana* (100 mg/kg, v.o.) e indometacina (35,7 mg/kg, v.o.) na fase inflamatória do ensaio de nociceção induzida por formalina.



Fonte: Autora, 2012.

Nota: \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ : difere significativamente do controle (veículo) quando analisados por ANOVA One Way seguido do teste de Dunnett. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=6) do tempo (s) que o animal lambeu a pata, durante 15 min.

Com relação aos extratos de *C. sertularioides*, avaliados na segunda fase do ensaio de formalina, o EC não foi ativo, enquanto o EH, EA e EM reduziram o tempo que os animais passaram lambendo a pata estimulada ( $p < 0,001$ ). Enquanto o grupo tratado com o veículo passou 232,6  $\pm$  25,4 s lambendo a pata, os grupos tratados passaram: 122,1  $\pm$  8,9 s (EH); 83,8  $\pm$  19,1 s (EA) e 102,7  $\pm$  18,0 s (EM) com inibição de 47,5%, 64,0%, 55,8%, respectivamente. O fármaco padrão indometacina reduziu esse tempo para 109,5  $\pm$  14,2 s, inibindo 52,9% da resposta quando comparada ao grupo controle. A Tabela 7 e a Figura 19 (p. 52) representam esses valores.

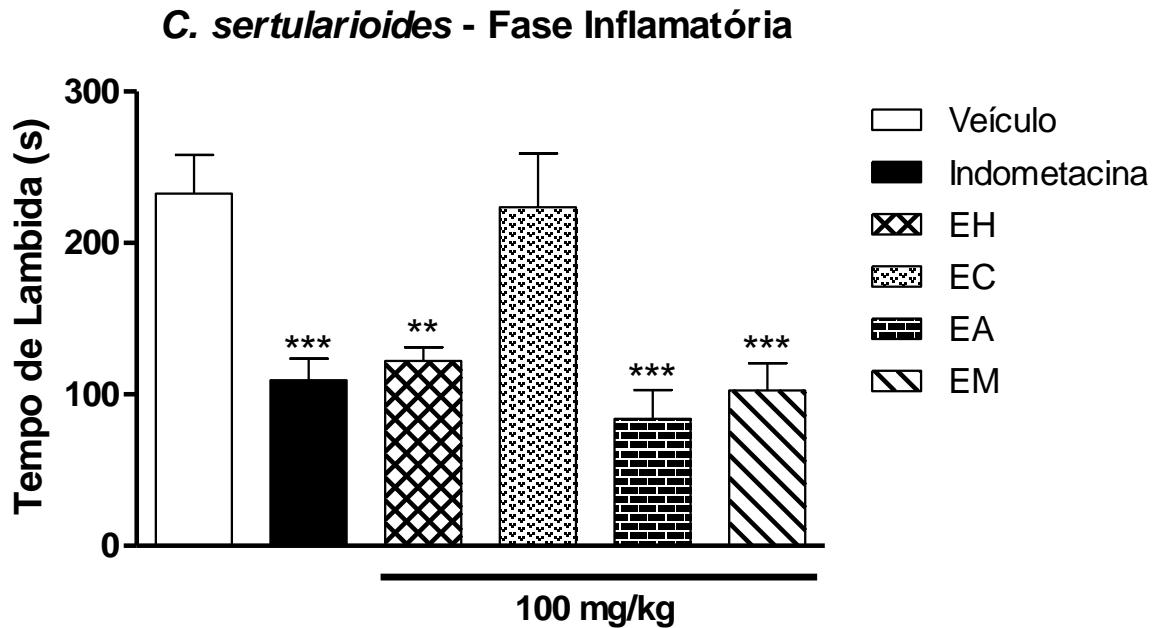
Tabela 7 - Efeito dos extratos de *C. sertularioides* (100 mg/kg, v.o) na fase inflamatória do ensaio de nociceção induzida por formalina.

Tratamento	Tempo de lambida (média $\pm$ E.P.M)	% de inibição
Veículo	232,6 $\pm$ 25,4	-----
Indometacina	109,5 $\pm$ 14,2***	52,9%
EH	122,1 $\pm$ 8,9**	47,5%
EC	223,6 $\pm$ 35,5	3,9%
EA	83,8 $\pm$ 19,1***	64,0%
EM	102,7 $\pm$ 18,0***	55,8%

Fonte: Autora, 2012.

Nota: \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ : difere significativamente do controle (veículo). Análise por ANOVA One Way seguida do teste de Dunnett.

Figura 19 - Efeito antinociceptivo dos extratos de *C. sertularioides* (100 mg/kg, v.o.) e indometacina (35,7 mg/kg, v.o.) na fase inflamatória do ensaio de nociceção induzida por formalina.



Fonte: Autora, 2012.

Nota: \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ : difere significativamente do controle (veículo) quando analisados por ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=6) do tempo (s) que o animal lambeu a pata, durante 15 min.

#### 4.1.4 Ensaio de Peritonite Induzida por Carragenina

No ensaio de peritonite todos os extratos de *C. mexicana* reduziram a migração celular induzida por carragenina ( $p < 0,001$ ). O grupo estimulado apenas com o agente flogístico apresentou migração leucocitária para a cavidade peritoneal de  $17,4 \pm 0,6 \times 10^6/\text{mL}$ , enquanto os grupos tratados com os extratos reduziram esse número para:  $12,1 \pm 0,5 \times 10^6/\text{mL}$  (EH),  $10,6 \pm 0,1 \times 10^6/\text{mL}$  (EC),  $13,3 \pm 0,9 \times 10^6/\text{mL}$  (EA),  $10,7 \pm 0,4 \times 10^6/\text{mL}$  (EM) com inibição de 30,5%, 39,1%, 23,6% e 38,5%, respectivamente. Nesse ensaio, a indometacina inibiu 65,5% da migração leucocitária para a cavidade peritoneal. A Tabela 8 e a Figura 20 (p. 53) mostram esses valores.

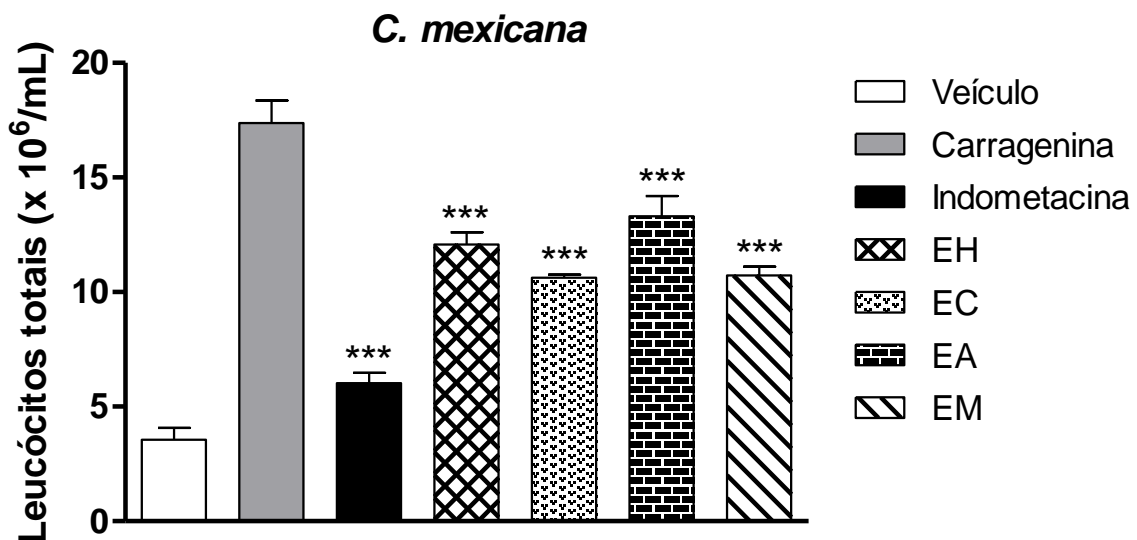
**Tabela 8 - Efeito dos extratos de *C. mexicana* (100 mg/kg, v.o) no número de leucócitos recrutados em camundongos no ensaio de peritonite induzida por carragenina.**

Tratamento	Nº de leucócitos x 10 <sup>6</sup> /mL (média ± E.P.M)	% de inibição
<b>Veículo</b>	3,6 ± 0,5	-----
<b>Carragenina</b>	17,4 ± 0,6	-----
<b>Indometacina</b>	6,0 ± 0,4***	65,5%
<b>EH</b>	12,1 ± 0,5***	30,5%
<b>EC</b>	10,6 ± 0,1***	39,1%
<b>EA</b>	13,3 ± 0,9***	23,6%
<b>EM</b>	10,7 ± 0,4***	38,5%

Fonte: Autora, 2012.

Nota: \*\*\* $p < 0,001$ : difere significativamente do controle (veículo). Análise por ANOVA One Way seguida do teste de Dunnet.

**Figura 20 - Efeito dos extratos de *C. mexicana* (100 mg/kg, v.o.) e da indometacina (35,7 mg/kg, v.o.) no ensaio de peritonite induzida por carragenina em camundongos.**



Nota: \*\*\* $p < 0,001$ : difere significativamente do controle (veículo) quando analisados por ANOVA One Way seguida do teste de Dunnet. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. (n=6) do número de leucócitos (x 10<sup>6</sup>/mL).

Ainda nesse ensaio, os extratos de *C. sertularioides* avaliados reduziram o número de leucócitos que migraram para a cavidade peritoneal de forma estatisticamente significativa. No grupo tratado apenas com carragenina o número de células que migraram foi de  $17,4 \pm 0,6 \times 10^6$  células/mL, já nos grupos tratados esse número foi reduzido para  $6,6 \pm 0,8 \times 10^6$ /mL (EH),  $11,0 \pm 0,7 \times 10^6$ /mL (EC),  $4,9 \pm 0,4 \times 10^6$ /mL (EA) e  $8,8 \pm 1,7 \times 10^6$ /mL (EM) com inibição de 62,1%, 36,8%, 71,8% e 49,4% respectivamente, quando comparados ao grupo que recebeu apenas a carragenina. A indometacina induziu migração de  $6,0 \pm 0,4 \times 10^6$  células/mL

com inibição de 65,5% e houve diferença significativa entre esse grupo e o tratado com o EA (Tabela 9 e Figura 21).

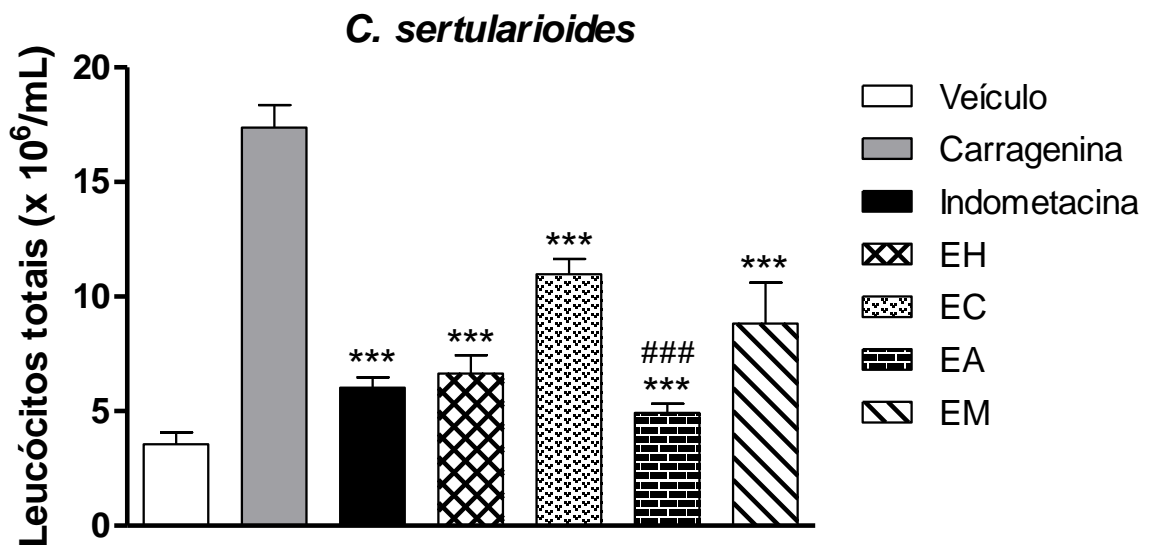
**Tabela 9 - Efeito dos extratos de *C. sertularioides* (100 mg/kg, v.o) no número de leucócitos recrutados em camundongos no ensaio de peritonite induzida por carragenina.**

Tratamento	Nº de leucócitos x 10 <sup>6</sup> /mL (média ± E.P.M)	% de inibição
Veículo	3,6 ± 0,5	-----
Carragenina	17,4 ± 0,6	-----
Indometacina	6,0 ± 0,4***	65,5%
EH	6,6 ± 0,8***	62,1%
EC	11,0 ± 0,7***	36,8%
EA	4,9 ± 0,4*** ###	71,8%
EM	8,8 ± 1,7***	49,4%

Fonte: Autora, 2012.

Nota: \*\*\* $p < 0,001$ : difere significativamente do controle (veículo) e ### $p < 0,001$ : difere do grupo tratado com indometacina. Análise por ANOVA One Way seguida do teste de Dunnet.

**Figura 21 – Efeito dos extratos de *C. sertularioides* (100 mg/kg, v.o.) e da indometacina (35,7 mg/kg, v.o.) no ensaio de peritonite induzida por carragenina em camundongos.**



Fonte: Autora, 2012.

Nota: \*\*\* $p < 0,001$ : difere significativamente do controle (veículo) e ### $p < 0,001$ : difere do grupo tratado com indometacina quando analisados por ANOVA One Way seguida do teste de Dunnet. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. (n=6) do número de leucócitos (x 10<sup>6</sup>/mL).



## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação da Atividade Antinociceptiva e Anti-Inflamatória dos Extratos de *C. mexicana* e *C. sertularioides*

Diversos modelos de nociceção e inflamação em animais de laboratórios podem ser utilizados para avaliar a atividade analgésica e anti-inflamatória de extratos e compostos obtidos de produtos naturais (BASBAUM; JULIUS, 2006). Embora mensurar o nível de dor em animais não seja fácil, quando submetidos a um estímulo nociceptivo, os animais são capazes de exibir respostas comportamentais, motoras e fisiológicas semelhantes às observadas em humanos. Essas respostas são estudadas e comparadas na presença de fármacos reconhecidamente analgésicos que interferem no processo fisiológico da dor, o que permite inferir que um animal está experimentando uma resposta álgica (LAPA et al., 2003; PERAZA et al., 2007).

Segundo Le Bars, Gozarium, e Cadden (2001) os testes denominados algesimétricos apresentam uma série de limitações mostrando uma variabilidade de respostas oferecidas pelos animais ao experimentador, que podem ser decorrentes da influência ambiental, do estresse devido à manipulação e/ou a alterações da temperatura local e da idade dos animais, dentre outros fatores. Para evitar tais variações os grupos de animais foram selecionados dentro de uma mesma faixa etária e nas mesmas condições ambientais. É importante destacar que os modelos de nociceção e inflamação devem apresentar características próprias que devem ser consideradas tais como reprodutibilidade, simplicidade, validade dos resultados obtidos e principalmente, sua correlação com estudos clínicos (PIETROVSKI, 2004).

Embora nos últimos anos o interesse para o uso clínico de novas substâncias com atividade anti-inflamatória e analgésica tenha aumentado significativamente, poucos estudos científicos sobre as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória em derivados de macroalgas marinhas foram descritos. No entanto, a evidenciação científica destes efeitos em uma espécie do gênero *Caulerpa* e em um de seus metabólitos determinou a escolha das espécies *C. mexicana* e *C. sertularioides* para o presente estudo (SOUZA et al., 2009a, 2009b).

Assim, o efeito antinociceptivo dos EH, EC, EA e EM obtidos dessas espécies de *C. mexicana* e *C. sertularioides* foi investigado utilizando modelos clássicos de nociceção, induzidos por estímulos químicos como o de contorções abdominais induzidas por ácido acético (COLLIER et al, 1968) e nociceção induzida por formalina (HUNSKAAR; HOLE, 1987), bem como por estímulo térmico como o teste da placa quente (KURAIISHI et al.,

1983). Além disso, foi utilizado o ensaio de peritonite induzida por carragenina (FERRÁNDIZ; ALCARAZ, 1991), que é um modelo de migração celular, para investigar também a atividade anti-inflamatória desses extratos.

#### 5.1.1 Ensaio de Contorção Abdominal Induzida por Ácido Acético

O ensaio de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético é descrito como um típico modelo de nocicepção simples, pouco específico, mas com boa sensibilidade, permitindo avaliar a atividade de várias substâncias que atuam tanto a nível central como periférico, sendo uma ferramenta de *screening* farmacológico para detecção e avaliação de novos agentes com atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (IKEDA et al., 2001; PARVEEN et al., 2007). Além disso, os resultados obtidos com diversas classes de substâncias analgésicas neste modelo mostram uma boa correlação com a ação analgésica encontrada em outros modelos pré-clínicos, bem como em estudos clínicos (LE BARS; GOZARIUM; CADDEN, 2001).

Nesse modelo, a administração de um agente irritante para a membrana serosa, como o ácido acético, quando injetado por via intraperitoneal induz nocicepção característica e um movimento estereotípico caracterizado por contrações abdominais, redução e incoordenação da atividade motora. Estes movimentos são considerados reflexos e evidenciam a dor inflamatória visceral (LE BARS; GOZARIUM; CADDEN, 2001). Isso ocorre porque o ácido acético atua de forma indireta causando a liberação de mediadores endógenos que estimulam neurônios nociceptivos sensíveis tanto a anti-inflamatórios como a analgésicos opioides (FISCHER et al., 2008). A sensibilização de nociceptores ocorre por liberação e/ou produção de mediadores como histamina, serotonina, bradicinina, citocinas, NO e, principalmente, prostaglandinas. Nesse modelo há também indução da liberação de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8, por macrófagos e basófilos residentes na cavidade peritoneal. Outro componente importante da dor produzida nesse modelo são as quimiocinas, que medeiam a participação do sistema simpático na algesia (VERRI et al., 2006).

Além de ser influenciada por esses mediadores inflamatórios, a nocicepção promovida pelo ácido acético também pode ser mediada pela dissociação dos prótons presentes nesse agente, que estimulam os canais TRPV1 e ASICs localizados nos neurônios aferentes primários (COUTAUX et al., 2005; JULIUS; BASBAUM, 2001).

Entretanto, as PGs são os principais mediadores inflamatórios causadores da algesia, por tornar as fibras aferentes nociceptivas potencialmente sensível aos diversos mediadores,

resultando em contorções abdominais nos animais (SANTOS; VEDANA; FREITAS, 1998). Dessa forma esse modelo está associado à liberação de prostanoídes de maneira geral, ao aumento dos níveis de  $PGE_2$  e  $PGF_{2\alpha}$  nos fluidos peritoneais, assim como, produtos da via das lipoxigenases (PARVEEN et al., 2007), podendo relacionar a atividade nesse modelo a uma maior inibição da COX periférica, como demonstrado por diversos autores (BALLOU et al., 2000, ZAKARIA et al., 2006, 2007).

Nesse sentido, a dor abdominal induzida por ácido acético pode ser prevenida por diversos agentes terapêuticos cuja ação é inibir a liberação de mediadores do processo doloroso, como é o caso dos AINEs, que exercem seus efeitos analgésicos e anti-inflamatórios, pelo menos em parte, devido à inibição da COX, impedindo a produção de PGs. É possível que haja outros mecanismos que gerem o efeito antinociceptivo observado nesses fármacos (FENG; CUI; WILLIS, 2003; VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998). Além disso, outros agentes como bloqueadores neuromusculares e sedativos também podem atuar nesse modelo, o que poderia resultar em uma interpretação equivocada dos resultados (MIRANDA et al., 2008).

Os resultados obtidos nesse ensaio mostram que os EH, EC, EA e EM tanto de *C. mexicana* como de *C. sertularioides* (100 mg/kg, v.o.), apresentam atividade antinociceptiva no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos, com efeito semelhante ao do fármaco padrão dipirona na dose de 40 mg/kg (Figura 14, p. 46 e Figura 15, p. 47). Além disso, o tratamento por via oral e seu consequente efeito indicam que os componentes ativos presentes nesses extratos são bem absorvidos pelo trato gastrointestinal.

Esses resultados podem ser comparados com os encontrados por Vanderlei e colaboradores (2010) que identificaram atividade antinociceptiva e anti-inflamatória em uma lectina isolada da *C. cupressoides*, a qual inibiu as contorções abdominais de forma significativa e dose dependente em 37,2 %, 53,5% e 89,0%, nas doses de 3, 9 e 27 mg/kg (v.o.), respectivamente. Utilizando esse mesmo modelo, outro estudo identificou atividade antinociceptiva no extrato metanólico e nas fases n-butanol, acetato de etila e clorofórmica da *C. racemosa* (100 mg/kg – v.o.), com inibição de 72,24%, 47,39%, 76,11% e 70,51%, respectivamente (SOUZA et al., 2009a). Além disso, essa atividade também foi encontrada em outra espécie de *Caulerpa*, *C. kempfii*, da qual os extratos hexânico, acetato de etila e metanólico inibiram 76,7%, 83,9% e 90,8% da resposta nociceptiva no ensaio de contorção abdominal (MATTA et al., 2010).

Isso indica a presença de componentes, tais como metabólitos secundários, com atividade antinociceptiva ou também anti-inflamatória em macroalgas do gênero *Caulerpa*,

dada a atividade de outras espécies nesse ensaio. Além disso, sugere-se que o provável efeito antinociceptivo causado pelo tratamento com os extratos de *C. mexicana* e *C. sertularioides* pode ser decorrente da inibição direta da liberação de mediadores induzidos pelo ácido acético; pela inibição da migração de células que exacerbariam o processo doloroso; por inibição direta de COX; ou mesmo modulando centralmente a transmissão nociceptiva por inibição dos canais TRPV1 e ASIC.

### 5.1.2 Ensaio de Placa Quente

Em estudos de *screening* farmacológico de compostos com propriedades analgésicas, é comum investigar o envolvimento do sistema opioide. Um dos principais motivos para essa busca é o objetivo de se chegar a um fármaco com propriedades terapêuticas semelhantes as da morfina, mas desprovido de efeitos adversos indesejáveis que limitam seu uso na terapêutica, principalmente no que diz respeito à tolerância e à dependência (GRIS et al., 2010; WILLIAMS et al., 2004).

Para avaliar o perfil antinociceptivo central dos extratos de *C. mexicana* e *C. sertularioides* foi utilizado o modelo de placa quente. Nesse ensaio, apenas os EH, EC, EA e EM de *C. mexicana* foram ativos por via oral em diferentes tempos (Tabela 3, p. 48). De maneira que o EM foi o único que aumentou a latência do animal na placa até 120 min, da mesma forma que a morfina, enquanto o EH perdeu seu efeito 90 min após o tratamento. O fato do EA ter apresentado seus efeitos em tempos alternados sugere que interferentes da própria constituição desse extrato poderão estar ocultando um melhor desempenho do mesmo.

Ainda nesse ensaio, o fármaco padrão morfina, que é um analgésico opioide, causou um aumento significativo no tempo de latência do animal na placa em todos os intervalos de tempo avaliados após sua administração. Embora os extratos de *C. mexicana* só tenham iniciado seus efeitos 60 min após o tratamento, vale lembrar que se trata de vias de administração distintas. Sendo assim, é de se esperar que a morfina, administrada por via subcutânea, inicie seus efeitos antes de substâncias administradas por via oral.

Utilizando esse mesmo modelo de nocicepção térmica, Souza e colaboradores (2009a) avaliaram a atividade dos extratos de *C. racemosa*, dos quais os extratos clorofórmico e acetato de etila foram ativos. Além disso, o metabólito secundário caulerpina também foi ativo nesse ensaio, aumentando o tempo de latência dos animais na placa 60, 90 e 120 min após o tratamento (SOUZA et al., 2009b). Comparando esses resultados, sugere-se que a

caulerpina pode ser um dos constituintes responsáveis pelo efeito central dos extratos de *C. mexicana* nesse ensaio.

No ensaio de placa quente, o estímulo térmico induz dois tipos de comportamento no camundongo: retirada ou lambida da pata. Ambos são resultantes da ativação direta dos nociceptores pelo calor, que irão conduzir o estímulo doloroso ao corno dorsal da medula espinal e posteriormente aos centros corticais (LE BARS; GOZARIUM; CADDEN, 2001). O calor é capaz ativar receptores vaniloides, especificamente os receptores TRPV-1 (limiar de ativação em torno de 43 °C) e TRPV-2 (limiar de ativação em torno de 52 °C) (JULIUS; BASBAUM, 2001). Esses receptores são canais iônicos que, quando ativados, promovem o influxo de  $Ca^{2+}$ , despolarizando a fibra nervosa e ativando a abertura de canais de  $Na^{+}$  dependentes de voltagem, que disparam os potenciais de ação (ZIEGLGANSBERGER; BERTHELE; TOLLE, 2005). Fármacos analgésicos opioides e anestésicos gerais aumentam o tempo de permanência dos animais na placa quente, resultado que é avaliado como antinocicepção central (LE BARS; GOZARIUM; CADDEN, 2001).

A antinocicepção central pode ser resultante não apenas da inibição das vias opioides, mas também da inibição da COX-3, uma isoforma de COX encontrada no cérebro que compartilha características estruturais e catalíticas com a COX-1 e 2 (CHANDRASEKHARAN; DAI; ROOS, 2002). Estudos mostram que o paracetamol e a dipirona, fármacos analgésicos, causam antinocicepção por inibirem preferencialmente COX-3, diminuindo, assim, a síntese de  $PGE_2$  (BOTTING; AYOUB, 2005; SCHWAB et al., 2003). Confirmando essa hipótese, Bisson (1991) demonstrou a eficácia do paracetamol (105 e 315 mg/kg) no ensaio de placa quente, que aumentou o tempo de latência dos animais na placa de maneira dependente de dose.

Diante do exposto, os resultados obtidos nesse experimento sugerem que os extratos de *C. mexicana*, aqui estudados, provavelmente apresentam atividade analgésica central, podendo estar atuando pela via opioide e/ou inibindo potenciais de ação gerados a partir da abertura de receptores vaniloides. É possível sugerir, também, que a possível atividade analgésica central desses extratos pode ocorrer por uma inibição de COX-3, já que estudos recentes realizados em nosso laboratório indicam que o alcalóide bisindólico caulerpina, metabólito secundário de espécies de *Caulerpa*, possui atividade inibidora de COX (dados não publicados).

### 5.1.3 Ensaio de Nociceção Induzida por Formalina

Com o objetivo de confirmar e melhor compreender a atividade antinociceptiva desses extratos foi realizado o ensaio de nociceção induzida por formalina, que permite avaliar a nociceção de origem neurogênica e de origem inflamatória. O ensaio de nociceção induzida por formalina é um modelo químico de nociceção que fornece uma resposta mais específica quando comparado ao modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético (SHIBATA, 1989). Além de ser considerado um modelo que se aproxima bastante da dor clínica, já que avalia como o animal responde à dor moderada e contínua após injúria de um tecido (TJØLSEN et al., 1992). A formalina administrada pela via s.pl. produz dor intensa, revelada por respostas motoras bem caracterizadas (vigorosas lambidas, mordidas e batidas na pata), cuja quantificação permite que se avalie a intensidade da resposta nociceptiva (DUBUISSON; DENNIS, 1997; TJØLSEN et al. 1992).

A principal característica desse teste é o fato de que o animal apresenta duas fases diferentes de nociceção frente ao mesmo estímulo, o que permite avaliar dois tipos distintos de dor, central e periférica (TJØLSEN et al., 1992). As duas fases do teste são chamadas respectivamente de fase neurogênica e de fase inflamatória. A nociceção neurogênica (fase inicial) inicia-se imediatamente após a injeção de formalina, dura cerca de 5 min e, provavelmente, resulta do efeito irritante direto sobre os nociceptores ativando as fibras aferentes primárias (C e A $\delta$ ), acarretando na liberação de neuropeptídeos como SP e CGRP em terminais centrais e mediadores periféricos como a bradicinina em terminações periféricas (GONCALVES et al. 2008, MURNO, 2009). Além disso, foi demonstrado por McNamara e colaboradores (2007), o envolvimento dos TRPV1 na resposta nociceptiva à formalina.

Na medula, a mediação ocorre principalmente através da liberação de SP e aminoácidos excitatórios, como glutamato, que produzem respostas denominadas em conjunto de dor neurogênica (MAMET; LAZDUNSKI; VOILLEY, 2003). Após a primeira fase, há um período de 5 a 10 min no qual os animais apresentam um reduzido comportamento sugestivo de nociceção, devido a ativação da via inibitória descendente (SWEITZER et al., 2004).

Nesse ensaio, todos os extratos de *C. mexicana* foram ativos na fase neurogênica, destacando-se os EA e EM, que apresentaram inibição superior a 50%, quando comparados ao controle. Por outro lado, apenas os EC e EA de *C. sertularioides* foram ativos nessa fase com significância estatística (Figuras 16, p. 49 e 17, p. 50). Esses valores podem ser comparados com os encontrados por Vanderlei e colaboradores (2010) ao testar a atividade de uma lectina

obtida de *C. cupressoides* (27 mg/kg, v.o.), que inibiu 45% da resposta do animal nesse mesmo ensaio. Podemos também comparar esses dados com os obtidos por nosso grupo ao avaliar o extrato metanólico e as fases n-butanólica e clorofórmica da *C. racemosa*, com inibição de 51,8%, 35,1% e 32,7%, respectivamente (SOUZA et al., 2009a). Esses resultados somados aos obtidos anteriormente indicam que mecanismos centrais podem estar envolvidos na atividade antinociceptiva dos extratos de *C. mexicana*.

Fármacos que atuam primariamente como analgésicos de ação central, como opioides e agonistas das vias descendentes, inibem a dor em ambas as fases do ensaio de nocicepção induzida por formalina (SULAIMAN et al., 2008). Em 1997, Simonine colaboradores demonstraram que animais “knock-out” para o receptor opioide  $\kappa$  não são capazes de alterar a nocicepção induzida por formalina na primeira fase desse teste. Assim, a atividade apresentada pelos EH, EC, EA e EM da *C. mexicana* na fase neurogênica desse ensaio, somada ao efeito dos mesmos no teste de placa quente, indica que pode estar ocorrendo antagonismo de receptores opioides de TRPV-1 localizados nas fibras aferentes. Sugere-se também uma ação direta sobre as fibras aferentes nociceptivas, que venha a reduzir o limiar de estimulação dos neurônios do corno dorsal (CUI et al., 2006; SMIDERLE et al., 2008).

A segunda fase da resposta nociceptiva do ensaio de formalina é iniciada aproximadamente 10 min após a injeção de formalina e dura cerca de 15 min. Nessa fase tardia, mediadores inflamatórios são formados nos tecidos periféricos, tais como citocinas, bradicinina, prostaglandinas, substância P, NO, serotonina e histamina, induzindo mudanças funcionais nos neurônios do corno dorsal que, ao longo do tempo, promovem sensibilização da transmissão em nível espinal. Isso indica que o processo de inflamação periférica está envolvido na segunda fase do ensaio de formalina (OLIVEIRA; SOUZA; ALMEIRA, 2008).

Nessa fase do teste todos os extratos de *C. mexicana* foram ativos com diferentes perfis de inibição (Figura 18, p. 51). Esses resultados mostram que tais extratos contêm diferentes substâncias que parecem estar atuando sobre o processo nociceptivo sob mecanismos distintos, podendo estar agindo além da via central por mecanismos periféricos. Com relação aos extratos de *C. sertularioides*, todos, com exceção do EC, foram ativos com efeito semelhante ao do fármaco padrão nesse ensaio (Figura 19, p. 52). Vale destacar ainda que o EA de ambas as espécies induziu elevada inibição da resposta antinociceptiva em ambas as fases, se destacando mais que a indometacina na fase inflamatória, na qual AINEs apresentam uma boa resposta. Essa maior inibição da fase inflamatória pelo EA é comparável com os dados obtidos por Souza e colaboradores (2009a), que testaram diferentes extratos de *C. racemosa* e também encontraram atividade significativa para o extrato acetato de etila, com

inibição de 75,4%. Esses resultados indicam que o EA obtido de diferentes espécies de *Caulerpa* pode conter uma ou mais substâncias com atividade antinociceptiva associada à inflamação.

Dessa forma, é possível sugerir que o efeito dos extratos de *C. mexicana* e *C. sertularioides* na fase inflamatória do ensaio de nocicepção induzida por formalina pode estar relacionado à inibição de COX e/ou da produção de serotonina, de citocinas inflamatórias ou outros mediadores inflamatórios (CALIXTO et al., 2000; CHICHORRO; LORENZETTI; ZAMPRONIO, 2004).

#### 5.1.4 Ensaio de Peritonite Induzida por Carragenina

Uma vez que os extratos de *C. mexicana* e *C. sertularioides* apresentaram atividade significativa na fase inflamatória do modelo de nocicepção induzida por formalina foi investigada também a atividade anti-inflamatória dos mesmos utilizando o ensaio de peritonite induzida por carragenina. Esse, é um modelo experimental de inflamação aguda, bem caracterizado, empregado largamente para testar novas terapias anti-inflamatórias por permitir a quantificar a migração celular e sua correlação com diferentes mediadores inflamatórios (MONTANHER ET al., 2007).

A carragenina é uma mistura de polissacarídeos extraída de algas marinhas do gênero *Rhodophyceae* que quando aplicada na cavidade peritoneal induz uma resposta inflamatória caracterizada por intensa exsudação plasmática e migração de células, particularmente de neutrófilos. Essa migração é decorrente da grande estimulação da liberação de mediadores inflamatórios como as prostaglandinas, principalmente, histamina, bradicinina, neuropeptídeos e NO (DI ROSA, 1972; PAULINO ET al., 2008).

A utilização do fluido peritoneal de camundongos se deve ao fato desse material ser excelente para o estudo de leucócitos extravasculares. Um dos motivos, é que o número de células livres do fluido peritoneal é praticamente constante em camundongos não estimulados, embora mudanças rápidas e dramáticas na população celular possam ocorrer em motivo da manipulação experimental, o sistema se reequilibra e a população celular tende a retornar as medidas normais, assim, o fluido peritoneal do camundongo parece estar sob controle de mecanismos homeostáticos. Além disso, o fluido peritoneal do camundongo não estimulado contém poucos neutrófilos, fato que facilita detectar e medir o influxo de qualquer número de células (MARTINS, 1989).



Já está bem fundamentado que a inflamação induzida por carragenina pode ser bloqueada por um pré-tratamento com AINEs, que são inibidores da COX e consequentemente reduzem a biossíntese de prostaglandinas (FARSAM ET al., 2000). Nesse ensaio, os tratamentos com os EH, EC, EA e EM de *C. mexicana* e *C. sertularioides* reduziram de maneira significativa a migração leucocitária 4 h após a administração de carragenina (Figura 20, p. 53 e Figura 21, p. 54). Vale destacar ainda que o EA de *C. sertularioides* apresentou inibição superior a do fármaco padrão indometacina.

Esses resultados corroboram com os anteriores obtidos na fase inflamatória do ensaio de formalina, indicando que componentes presentes nos extratos de *C. mexicana* e *C. sertularioides* parecem possuir atividade anti-inflamatória. Complementando esses resultados, em um trabalho realizado por Bitencourt e colaboradores (2011), os extratos metanólico e aquoso de *C. mexicana* foram incapazes de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$  *in vitro* e inibiram a formação de citocinas induzidas por LPS *in vivo*, apresentando atividade anti-inflamatória em diferentes modelos de inflamação. Isso indica que a inibição da migração leucocitária pelos extratos de *C. mexicana* encontrada no presente estudo pode ocorrer por inibição de citocinas inflamatórias.

Além disso, a inibição da migração leucocitária também pode ser atribuída à presença de caulerpina, que inibiu o recrutamento leucocitário induzido por carragenina com 48% de inibição (SOUZA et al., 2009b) e pode estar atuando reduzindo a formação de prostaglandinas via inibição de COX (dados não publicados). Por outro lado, foi também descrita a atividade inibidora de PLA<sub>2</sub> no gênero *Caulerpa* (OKUDA et al., 1999), o que pode ser responsável por inibir toda a cascata de produção de PGs e outros mediadores inflamatórios.

Outro metabólito que pode estar atuando nesse processo é a caulerpenina, um sesquiterpeno encontrado em espécies de *Caulerpa*, já isolado de *C. sertularioides* e *C. mexicana* (MEYER; PAUL, 1992; PAUL; FENICAL, 1985), que apresentou atividade inibidora de LOX em um trabalho realizado por Cengiz e colaboradores (2010). A inibição dessa enzima impede, pelo menos em parte, a migração leucocitária, já que a LOX catalisa a conversão de ácido araquidônico em LTB<sub>4</sub>, que é um potente quimiotático para leucócitos, levando à aderência dessas células às paredes dos vasos, degranulação e liberação de superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (WERZ; STEINHILBER, 2006). Dessa forma, é possível atribuir parte do efeito na migração leucocitária desses extratos à presença de caulerpenina.

Com base nesses dados e nos resultados encontrados neste estudo, as espécies *C. mexicana* e *C. sertularioides*, parecem possuir atividade anti-inflamatória, embora não se conheça exatamente seus mecanismos. No entanto, eles podem estar agindo via inibição direta

de COX; inibindo a produção de PGs e outros mediadores inflamatórios via inibição de PLA<sub>2</sub>; inibindo a migração leucocitária via inibição de LOX e/ou inibindo diretamente a formação de citocinas inflamatórias.

Além disso, sabe-se que espécies reativas de oxigênio (ROS) incluindo moléculas tais como peróxido de hidrogênio, superóxido, radicais hidroxila e NO têm sido implicados na lesão tecidual e no desenvolvimento da resposta inflamatória e dolorosa. Alguns estudos têm demonstrado propriedades antioxidantes em algas verdes, sendo as do gênero *Caulerpa*, como a *C. sertularioides*, as que apresentam altos níveis de inibição de ROS (SANTOSO et al., 2004; ZUBIA; ROBLEDO; FREILE-PELEGRIN, 2007).

ROS são moléculas altamente reativas envolvidas em várias funções biológicas e são produzidas em condições inflamatórias por leucócitos ativados (KIM et al., 2009). Além de seu papel defensivo como microbicida, os ROS estão entre os mais potentes estímulos responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular, estimulação de agentes quimiotáticos (LTB<sub>4</sub>) e oxidação do DNA. Dessa forma, ROS desregulam a função celular e induzem o dano tecidual, que, por sua vez, aumentam o estado inflamatório (ROOME et al., 2008). Assim, dado que compostos antioxidantes podem atenuar a resposta inflamatória e nociceptiva, o efeito anti-inflamatório dos extratos de *C. sertularioides* pode ser atribuído, pelo menos em parte, a uma ação antioxidante.

Para sustentar essa hipótese, foi identificada atividade antioxidante no sesquiterpeno caulerpenina (CENTENO, 2008). Além disso, a presença de alcaloides indólicos como a caulerpina, em espécies de *Caulerpa*, indica que o efeito anti-inflamatório dessas algas decorra de uma ação antioxidante, pois, tem sido sugerido que a atividade inibidora de COX 1 e 2 dos AINES, como a indometacina e o etodolaco (derivados indólicos), se deva parcialmente a habilidade de sequestrar ROS e espécies reativas de nitrogênio. Este efeito antioxidante também foi observado em vários outros derivados indólicos (FERNANDES et al., 2004).

Em resumo, os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que extratos de *C. mexicana* apresentam atividade antinociceptiva central e periférica com perfil anti-inflamatório. Tais atividades podem ser mediadas por inibição de COX periférica e central e/ou inibição direta de mediadores inflamatórios. Os extratos de *C. sertularioides* apresentaram propriedades antinociceptiva periférica e anti-inflamatória, que provavelmente se deve à inibição de COX, LOX ou de ROS. É possível atribuir essas atividades à presença de metabólitos secundários presentes nesses extratos, que possivelmente estão atuando de

forma sinérgica. Alguns desses metabólitos já foram identificados e algumas de suas atividades biológicas já foram descritas, como visto anteriormente.

Além dos metabólitos secundários caulepina e caulerpenina, certamente, outras substâncias também podem ser responsáveis pelos efeitos encontrados nesses extratos. Os terpenos constituem uma das classes de metabólitos mais abundante no gênero *Caulerpa* e possuem atividade anti-inflamatória e analgésica já identificada em outras espécies de plantas (LUKHOBBA; SIMMONDS; PATON, 2006; MACHADO et al., 2011; MARQUES et al., 2011). Outros metabólitos como os alcaloides também devem ser responsáveis pelos efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos de *C. mexicana* e *C. sertularioides*, já que diversos trabalhos mostram a atividade analgésica e anti-inflamatória de alcaloides (BARBOSA-FILHO ET al., 2006)

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que os EH, EC, EA e EM da macroalga *C. mexicana*, apresentaram atividade antinociceptiva central e periférica, nos modelos de contorção abdominal induzida por ácido acético e teste de placa quente, confirmada pelo ensaio de nocicepção induzida por formalina e os extratos de *C. sertularioides* apresentaram propriedade antinociceptiva periférica nesses mesmos ensaios. Ambas as espécies apresentaram perfil anti-inflamatório na fase inflamatória da nocicepção induzida por formalina e essa atividade, por sua vez, foi comprovada pelo ensaio de peritonite induzida por carragenina, no qual os extratos de *C. mexicana* e *C. sertularioides* inibiram a migração celular. No entanto, outros estudos são necessários para identificar os mecanismos de ação desses extratos.

Dessa forma, este trabalho contribui para o conhecimento do potencial terapêutico dessas espécies, podendo sugerir uma aplicabilidade como produto natural marinho para preparação de fitoterápico e/ou como fonte de compostos biologicamente ativos que possam servir como protótipo de fármacos ou fitofármacos.

## REFERÊNCIAS

- ALLER, M. A. et al. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Med. Hypotheses.**, v. 68, p. 202 – 209, 2007.
- ARA, J. et al. Hypolipidaemic activity of seaweed from Karachi coast. **Phytother. Res.**, v. 16, p. 479-483, 2002.
- BALLOU, L. R. et al. Noiception in cyclooxygenase iso-enzyme-deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.97, n.18, p.10272-10276, 2000.
- BARATA, D. **Taxonomia e filogenia do gênero *Caulerpa* J.V. Lamour. (Bryopsidales, Chlorophyta) no Brasil.** 2008. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Programa de pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, SP, 2008.
- BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Anti-inflammatoy activity of alkaloids: A twenty- century review. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, n.1, p. 109-139, 2006.
- BARON, R. Peripheral neuropathic pain: from mechanisms to symptoms. **Clin. J. Pain.**, v. 16, p. s12-s20, 2000.
- BARROS, I. M. C. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Pluchea quitoc* ethanolic extract. **J. Ethnopharmacol.**, v. 106, n. 3, p. 317-320, 2006.
- BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. Novos alvos contra a dor. **Sci. American. Bras.**, v.50, p.76-83, 2006.
- \_\_\_\_\_. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.
- BENEVIDES, N. M. B. et al. Purification and partial characterization of the lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh. **Bot. Mar.**, v. 44, p. 17–22, 2001.
- BERGMANN, W.; FEENEY, R. F. J. Contribution to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges.I. **J. Org. Chem.**, v. 16, n. 6, p. 981-987, 1951.
- BISSON, M. P. **Estudo dos efeitos analgésicos do paracetamol em diferentes modelos experimentais.** 1991. Dissertação (Mestrado em Ciências – Farmacologia) – Programa de pós-graduação em Ciências, Universidade Estadual de Campinas, SP, 1991.
- BHANDARI, P. et al. Mucosal expression of cyclooxygenase isoforms 1 and 2 is increased with worsening damage to the gastric mucosa. **Histopathol.**, v. 46, p. 280-6, 2005.
- BLACKHALL, F. H. et al. A phase II trial of bryostatin 1 in patients with non-Hodgkin's lymphoma. **Br. J. Cancer.**, v. 84, n. 4, p. 465–469, 2001.

BLACKMAN, A.J.; WELLS, R. J. Flexin and triatarin, terpene 1,4-diacetoxy 1,3-dienes from two *Caulerpa* species. **Tetrahedron. Lett.**, v. 33, p. 3063-3064, 1978.

BOTTING, R. M. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927–2004). **J. Thermal. Biol.**, v. 21, p. 208, 2006.

\_\_\_\_\_; AYOUB, S. S. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. **Prostag. Leuk. Essent. Fatty. Acids.**, v. 72, p.85–87, 2005.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Nat. Prod. Rep.**, v. 25, p. 475-516, 2008.

CAFFREY, D. R.; FITZGERALD, K. A. Select Inflammasome Assembly. **Science**, v. 336, p. 420-421, 2012.

CALIXTO, J. B. et al. Kinins in pains and inflammations. **Pain**, n. 87, p. 1-5, 2000.

CASTRO, N. G. et al. CNS-selective noncompetitive cholinesterase inhibitors derived from the natural piperidine alkaloid (-)-spectaline. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 580, p. 339-349, 2008.

CATERINA, M. J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 24, p. 487-517, 2001.

CAVAS, L.; POHNERT, G. The Potential of *Caulerpa* spp. for Biotechnological and Pharmacological Applications. Cellular Origin, life in extreme habitats and astrobiology. In: ISRAEL, A.; EINAV, R.; SECKBACH, J. (eds) Seaweeds and their role in globally changing environments. **Springer**, v. 15, p. 385–397, 2010.

CENGIZ, S. et al. The Sesquiterpene Caulerpenyne from *Caulerpa* spp. is a Lipoxygenase Inhibitor. **Mar. Biotechnol.**, p. 1-6, 2010.

CENTENO, A. B. **Ecología de Caulerpales: Fauna y Biomarcadores**. 2008. Tese (Doctorado Ciencias Marinas) Programa Doctorado Ciencias Marinas de la Universidad de las Islas Baleares, Instituto Mediterráneo de Estudios Avanzados, Palma, Illes Balear, 2008.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, p. 13926-13931, 2002.

CHENG, J. K.; JI, R. R. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. **Neurochem. Res.**, v. 33, n. 10, p. 1970-8, 2008.

CHICHORRO, J. G.; LORENZETTI, B. B.; ZAMPRONIO, A. R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 141, n. 7, p. 1175-1184, 2004.

COLLIER, H. O. et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, v. 32, p. 295-310, 1968.

- COPPEJANS, E. et al. The marine green and brown algae of Rodrigues (Mauritius, Indian Ocean). **J. Nat. History.**, v. 38, p. 2959-3020, 2004.
- COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico & perspectivas. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.
- COUTAUX, A. et al. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **J. Bone. Spine**, v. 72, n. 5, p. 359-71, 2005.
- COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Rev. Virt. Quim.**, v.1, n.3, p. 241-256, 2009.
- COUZIN-FRANKEL, J. Inflammation: bares a dark side. **Science** v. 330, p. 1621. 2010.
- CUELLAR, J. M. et al. Thermal nociceptive properties of trigeminal afferent neurons in rats. **Mol. Pain.**, v. 6, p. 39, 2010.
- CUI, M. et al. TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists. **J. Neurosci.**, v.26, n.37, p.9385-93, 2006.
- CUNHA, F. Q. Dor Inflamatória. In: ALVES NETO, O. (Org.). *Dor: princípios e prática*. Porto Alegre: **Artmed.**, p. 212-147, 2009.
- D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **Br. J. Anaesth.** v. 101, n. 1, p. 8-16, 2008.
- DI ROSA, M. Review. Biological proprieties of Carragenan. **J. Pharmacol. Pharmac.**, v. 24, p. 89-102, 1972.
- DISTRUTTI, E. et al. Hydrogen sulphide induces  $\mu$  opioid receptor- dependent analgesia in a rodent model of visceral pain. **Mol. Pain.**, v., 6, n. 36, p. 1-16, 2010.
- 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. 4, n. 2, p. 161-174, 1997.
- DUMAY, O. et al. Variations in Caulerpenyne contents in *Caulerpa taxifolia* and *Caulerpa racemosa*. **J. Chem. Ecol.**, v. 28, p. 343-352, 2002.
- DUNDER, R. J. **Avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória da fração hexânica *Agave sisalana***. 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Programa de pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2009.
- EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi. Pharmaceutical. J.**, v. 18, p. 1–25, 2010.
- ELIIS, K.M.; FOZARD, J.R. Species differences in bradykinin receptor-mediated responses of the airways. **Auton. Autacoid. Pharmacol.**, v. 22, p. 3- 16, 2002.

- ELLIOTT, M. Biological pollutants and biological pollution - an increasing cause for concern. **Mar. Pollut. Bull.**, n. 46, p. 275–280, 2003.
- ERICKSON, A.A. et al. Palatability of macroalgae that use different types of chemical defenses. **J. Chem. Ecol.**, v. 32, p. 1883–1895, 2006.
- FAMA, P. et al. Molecular phylogeny of the genus *Caulerpa* (Caulerpales Chlorophyta) inferred from chloroplast tuf A gene. **J. Phycol.**, v. 38, p. 1040–1050, 2002.
- FAHMY, H. et al. An Improved Synthesis of 7, 8-Epoxy-1,3,11-cembratriene-15R( $\alpha$ ), 16-diol, a Cembranoid of Marine Origin with a Potent Cancer Chemopreventive Activity. **Mar. Drugs.**, v. 2, p. 1, 2004.
- FARSAM, H. et al. Antiinflammatory and analgesic activity of *Biebersteinia multifida* DC. root extract. **J. Ethnopharmacol.**, v. 71, p. 43-7, 2000.
- FENG, Y.; CUI, M.; WILLIS, W. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. **Anesthesiol.**, v. 98, p. 729-733, 2003.
- FENICAL, W. Natural products chemistry in the marine environment. **Science**, v., 215, p. 923-8, 1982.
- FERNANDES, E. et al. In vitro scavenging activity for reactive oxygen and nitrogen species by nonsteroidal anti-inflammatory indole, pyrrole, and oxazole derivative drugs. **Free. Radic. Biol. Med.**, v. 37, n. 11, p. 1895-1905, 2004.
- FERRÁNDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J. Antiinflammatory activity and inhibition of arachidonic acidmetabolism by flavonoids. **Inflamm. Res.**, v. 32, p. 283–288, 1991.
- FERREIRA, Z. S. et al. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. **J. Pineal. Res.**, v. 38, p. 182-188, 2005.
- FISCHER, L. G. et al. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) Leaves. **Biol. Pharm. Bull.**, v.31, n.2, p. 235-239, 2008.
- FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. Farmacologia Clínica: Fundamentos da terapêutica racional. Rio de Janeiro: **G. Koogan.**, cap. 15, p. 152-153, 2006.
- GARSON, J. Marine natural products. **Nat. Prod.**, v. 6, p.143–170, 1989.
- GILROY, D.W. et al. A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation. **Faseb. J.**, v. 18, p. 489-498, 2004.
- GONCALVES, J. C. R. et al. Antinociceptive activity of (-)-Carvone: Evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, n. 5, p. 1017–1020, 2008.
- GORMSEN, L. et al. Depression, anxiety, health-related quality of life and pain in patients with chronic fibromyalgia and neuropathic pain. **Europ. J. Pain.**, v. 14, p. 127, 2010.



GRIS, P. et al. A novel alternatively spliced isoform of the mu-opioid receptor: functional antagonism. **Mol. Pain.** v. 6, p. 33, 2010.

GÜVEN, K. C.; PERCOT, A.; SEZIK, E. Alkaloids in Marine Algae. **Mar. Drugs.**, v. 8, p. 269-284, 2010.

HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine. Growth. Factor. Rev.**, v. 13, p. 413-421, 2002.

HANDLEY, J. T.; BLACKMAN, A. J. Monocyclic diterpenes from the marine alga *Caulerpa triafaria* (Chlorophyta). **Aust. J. Chem.**, v. 53, p. 67-71, 2001.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug. Discov. Today.**, v.13, n.19-20, p. 894-901, 2008.

HENAO-MEJIA, J. et al. Inflammasomes: far beyond inflammation. **Nat. Immunol.**, v. 13, n. 4, p. 321-324, 2012.

HIKIJ, H. et al. The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. **Prog. Lipid. Res.**, v. 47, p. 107–126, 2008.

HUA, S.; CABOT, P. J. Mechanisms of peripheral immunecell-mediated analgesia in inflammation: clinical and therapeutic implications. **Cell**, v. 31, p. 427–433, 2010

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p.103-14, 1987.

HUTTI, J. E. et al. IκB Kinase β Phosphorylates the K63 Deubiquitinase A20 To Cause Feedback Inhibition of the NF-κB Pathway. **Mol. Cell. Biol.**, p.7451– 7461, 2007.

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

JASWIR, I.; MONSUR, H. A. Anti-inflammatory compounds of macro algae origin: A review. **J. Med. Plant. Res.** v. 5, n. 33, p. 7146-7154, 2011.

JOLY, A. B. **Flora marinha do litoral norte do Estado de São Paulo e regiões circunvizinhas.** 1965. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, SP, 1965.

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

KANAZAWA, N. Rare hereditary autoinflammatory disorders: Towards an understanding of critical in vivo inflammatory pathways. **J. Dermatol. Sci.**, v. 66, p. 183–189, 2012.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A.; VALENTE, C. M. L. Citocinas Próinflatórias e Dor. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 46, n. 3, p. 199-206, 2006.

KURAIISHI, Y. Involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests. **Brain. Res.**, v. 273, p. 245-252, 1983.

LAMANO, T. **Inflamação: Patologia Geral**, 2008. Faculdade e Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Disponível em: <[http://www.forp.usp.br/mef/digipato/Microsoft\\_Word\\_-\\_INFLA.2008.pdf](http://www.forp.usp.br/mef/digipato/Microsoft_Word_-_INFLA.2008.pdf)>. Acesso em: 24 jun. 2012.

LAPA, A. J. et al. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. **Soc. Bras. Plant. Med.** p. 99-117. Porto Alegre. 2003.

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

LEEB-LUNDBERG, L. M. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. International union of pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 57, p. 27-77, 2005.

LEES, P. et al. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. **J. Vet. Pharmacol. Therap.**, v.27, p.479-490, 2004.

LEVINE, J. D.; ALESSANDRI-HABER, N. TRP channels: targets for the relief of pain. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1772, n. 8, p. 989-1003, 2007.

LIN, H-C. et al. The effects of *Caulerpa microphysa* enzyme-digested extracts on ACE-inhibitory activity and in vitro anti-tumour properties. **Food. Chemistry.**, v. 134, p. 2235–2241, 2012.

LITTLER, D.; LITTLER, M. **Caribbean reef plants**. Offshore Graphics, Washington. p. 541, 2000.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: na overview. **Lancet**, v. 353, p. 1607-1609, 1999.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, p. 473-477, 2008.

LORENZO, V. P. **Estudo fitoquímico com fins farmacológicos da alga bentônica *Caulerpa racemosa***. 2009. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Farmacoquímica) – Programa de pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2009.

LUKHOBBA, C.W.; SIMMONDS, M.S.J.; PATON, A.J. Plectranthus: A review of ethnobotanical uses. **J. Ethnopharmacol.**, v. 103, p. 1-24, 2006.

MACEDO, N. R. P. V. et al. Caulerpin as a potential antiviral drug against herpes simplex virus type 1. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 2012.

MACHADO, F. L. S. et al. Avaliação do potencial antiinflamatório e antimicobactéria de terpenos halogenados de algas *Laurencia dendroidea*. In: 34ª REUNIÃO ANUAL DA

SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2011, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis: Sociedade Brasileira de Química Florianópolis, 2011. ref. QPN-045.

MAMET, J. et al. Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels. **J. Neurosci.**, v. 22, n. 24, p. 10662-70, 2002.

MAMET, J.; LAZDUNSKI, M.; VOILLEY, N. How nerve growth factor drives physiological and inflammatory expressions of acid-sensing into channel 3 in sensory neurons. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 49, p. 48907-48913, 2003.

MARCON, R. **Avaliação do efeito antinociceptivo e antiinflamatório dos triterpenos semi-sintéticos: octanoato de alfa e beta-amirina.** 2009. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Programa de pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2009.

MARQUES, L. F. et al. Atividade anti-inflamatória e analgésica do óleo essencial de mil-folhas (*Achillea millefolium*). In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR, **Anais Eletrônicos...** Maringá: VII EPCC, 2011. Disponível em: <[http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/epcc2011/anais/leandro\\_felipe\\_marques2.pdf](http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/epcc2011/anais/leandro_felipe_marques2.pdf)>. Acesso em 02 ago. 2012.

MARSHALL, B. T. et al. Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. **Nature**, v. 423, n. 6936, p. 190-3, 2003.

MARTINS, D. A. A. S. **Efeitos do paracetamol na permeabilidade capilar e migração leucocitária. Estudo experimental em camundongos (M. Muscularis).** 1989. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Faculdade de Odontologia de Campinas – Universidade Estadual de Campinas, SP, 1989.

MAYER, A. M. et al. Marine pharmacology in 2007-8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. **Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.**, v. 153, p. 191–222, 2011.

MATTA, C. B. B. **Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de extratos da macroalga bentônica *Caulerpa mexicana* (Caulerpaceae).** 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia), Escola de Enfermagem e Farmácia - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, 2010.

\_\_\_\_\_. et al. Avaliação do perfil antinociceptivo de extratos da espécie de alga bentônica *Caulerpa kempfii* (CAULERPACEAE). In: REUNIÃO REGIONAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADE DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 5, 2010, Aracajú. **Resumos...** Aracajú: Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2010. ref. 28.003.

MEDZHITOV, V. R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-35, 2008.

MEDZHITOV, V. R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**. v. 140, p. 771-776, 2010.

MENZEL, D. How do giant plant cells cope with injury? The wound response in siphonous green alga. **Protoplasma**, v. 144, p. 73–91, 1988.

MEYER, K. D; PAUL, V. J. Intraplant variation in secondary metabolite concentration in three species of *Caulerpa* (Chlorophyta: Caulerpales) and its effects on herbivorous fishes. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 82, p. 249–257, 1992.

MEYER, R.A. et al. **Peripheral mechanisms of cutaneous nociception**. In: Wall and Melzack's Textbook of Pain, S.B. McMahon and M. Koltzenburg, eds. Elsevier, p. 3–34. 2008.

MILLAN, M. J. The induction of pain: na integrative review. **Prog. Neurobiol.** v. 57, n. 1, p. 164, 1999.

MIRANDA, H.F. et al. Isobolographic analysis of multimodal analgesia in an animal model of visceral acute pain. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.88, p.481-486, 2008.

MOHAMED, S.; HASHIM, S. N.; RAHMAN, H. A. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. **Trends in Food Science & Technology**. v. 23, p. 83-96, 2012.

MONTANHER, A. B. et al. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in na inflammation model. **J. Ethnofarmacol.**, v. 109, p. 281-288, 2007.

MONTUSHI, P. et al. Pharmacological modulation of the leukotriene pathway in allergic disease. **Drug. Disc. Today**, p. 404-412, 2007.

MURNO, G. Pharmacological assessment of the rat formalin test utilizing the clinically used analgesic drugs gabapentin, lamotrigin, morphine, duloxetine, tramadol and ibuprofen: influence of low and high formalin concentrations. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 605, p. 95-102, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M., Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NIELSEN, P. G.; CARLE, J. S.; CHRISTOPHERSENC, C. Final structure of caulerpicin, a toxic mixture from the green alga *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**, v. 21, p. 1643-1645, 1982.

NOEL, M. et al. The influence of children's pain memories on subsequent pain experience. **Pain**, p. xxx, 2012.

NOURSHARGH, S.; HORDIJK, P. L.; SIXT, M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 11, n. 5, p. 366-78, 2010.

OLIVEIRA, F. S.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N. Antinociceptive effect of Hydroxydihydrocarvone. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, n. 4, p. 588-591, 2008.

PALERMO, J. A. Productos naturales de origen marina. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: ed. UFRGS /ed. UFSC, 2004. cap. 38, p. 965-1044.

PARVEEN, Z. et al. Antiinflammatory and analgesic activities of *Thesium chinese* Turcz Extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside. **Yakugaku Zasshi.**, v. 127, n. 8, p.1275-1279, 2007.

PASSOS, G. F. et al. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 110, p. 330- 332, 2007.

PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C. J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v. 8, n. 1, p. 55-68, 2009.

PAUL, V. J.; FENICAL, W. Diterpenoid metabolites from pacific marine algae of the order Caulercales (Chlorophyta). **Phytochemistry**, v. 24, n.10, p. 2239-2243, 1985.

PAULINO, N. et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **Eur. J. Pharmacol.**, p. 1- 6, 2008.

PECCHI, E. et al. Prostaglandins and sickness *behavior*: old story, new insights. **Physiol. Behav.**, v.97, p.279–292, 2009.

PERAZA, G. G. et al. O uso de modelos animais para avaliar o potencial antinociceptivo dos produtos de origem natural. **Rio Grand.**, v. 19, n. 1, p. 35-44, 2007.

PEREIRA, R. C. et al. Ecological roles of natural products of the Brazilian red seaweed *Laurencia obtusa*. **Rev. Bras. Bio.**, v. 63, n. 4, p. 665-72, 2003.

PETROFF, E. Y. et al. Acid-sensing ion channels interact with and inhibit BK K<sup>+</sup> channels. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, n. 8, p. 3140-4, 2008.

PIETROVSKI, E. F. **Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato etanólico e de princípios ativos das flores de *Combretum Leprosum* Mart.** Curitiba. (Dissertacao Mestrado) - Departamento de Ciencias Biologicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

PROKSCH, P.; EDRADA, R. A.; EBEL, R. Drugs from the Sea – Opportunities and Obstacles. **Mar. Drugs.**, v. 59, p. 125-134, 2003.

RAUCK, R.L. et al. Intrathecal ziconotide for neuropathic pain: a review. **Pain Pract.**, v.9, p. 327–337, 2009.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHOM, S. E. Biology of plants. 5 ed., Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 735, 1996.

REVIERS, B. **Biologia e filogenia das algas**. Porto Alegre: Artmed, p. 280, 2006.

ROCHA, A. P. C. et al. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilizacao Periferica e Central. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 57, n. 1, p. 94-105, 2007.

- ROTH, J. et al. Molecular aspects of fever and hyperthermia. **Immunol. Allergy. Clin. N. Am.**, v.29, p.229-245, 2009.
- ROY, M. et al. Cerebral and spinal modulation of pain by emotions. **PNAS**. v. 106, n. 49, p. 20900- 20905, 2009.
- SALTER, M. W. Cellular signaling pathways of pain neuroplasticity as target for analgesic development. **Cur. Top. Med. Chem.**, n. 5, p. 1-11, 2005.
- SANTOS, A.R.S.; VEDANA, E.M.A.; FREITAS, G.A.G. Antinociceptive effects of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflamm. Res.**, v.47, p.302-307, 1998.
- SANTOSO, J., YOSHIE-STARK, Y.; SUZUKI, T. Anti-oxidant activity of methanol extracts from Indonesian seaweeds in an oil emulsion model. **Fish. Sci.**, v. 70, p. 183–188, 2004.
- SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 8, p. 93-131, 2006.
- SCHWAB, J.M. et al. COX-3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics? **Prostag. Leuk. Essent. Fatty Acids**, v. 69, p. 339–343, 2003.
- SERHAN, C.N, SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 1191-1197, 2005.
- SHEN, W.Z. et al. Immunomodulatory effects of *Caulerpa racemosa* var. *peltata* polysaccharide and its selenizing product on T lymphocytes and NK cells in mice. **Sci. China Ser**, v. 51, p. 795–801, 2008.
- SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.
- SHIBATA, M. et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347-52, 1989.
- SIMONIN, F. et al. Disruption of the k-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain impairs pharmacological actions of the selective k-agonist U-50, 488H and attenuates morphine withdrawal. **Embo. J.**, v. 17, p. 886-897, 1997.
- SMIDERLE, F. R. et al. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1→3),(1→6)-linked β-glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 30, p. 1-6, 2008.
- SOUZA, E. T. et al. Antinociceptive activities of crude methanolic extract and phases, n-butanol, chloroformic and ethyl acetate from *Caulerpa racemosa* (Caulerpaceae). **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 19, p. 115-120, 2009a.

SOUZA, E. T. et al. The Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Caulerpin, a Bisindole Alkaloid, Isolated from Seaweeds of the Genus *Caulerpa*. **Mar. Drugs.**, v. 7, p. 689-704, 2009b.

STELLWAGEN, D.; MALENKA, R. C. Synaptic scaling mediated by glial TNF $\alpha$ . **Nature**, v. 440, n. 7087, p. 1054-9, 2006.

SULAIMAN, M. R. et al. Evaluation of the antinociceptive activity of *Ficus deltooides* aqueous extract. **Fitoterap.**, p. 5, 2008.

SULLIVAN, L. O. et al. Prebiotics from Marine Macroalgae for Human and Animal Health Applications. **Mar. Drugs.**, v. 8, p. 2038-2064, 2010.

SWEITZER, S. M. et al. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia upon acute opioid withdrawal in the neonatal rat. **Pain**, v.110, n.1-2, p. 269-80, 2004.

SZABÓ, C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. **Toxicol. Lett.**, v. 140, p. 105-112, 2003.

SZÉ, P. Introduction to algal characteristics and diversity. **A Biology Algae**. New York: Ed. McGraw-Hill Science/Engineering. 3. Ed, p. 288, 1997.

TEIXEIRA, M. J. **Dor, Manual para o Clínico**. 1. Ed. São Paulo: Atheneu, v. 1, p. 562, 2006.

TEIXEIRA, V. L. KELECOM, A. GOTTLIEB, O. R. Produtos naturais de algas marinhas. **Quím. Nova**, v. 14, n. 2, p. 83-90. 1991.

THURMOND, R. L.; GELFAND, E. W.; DUNFORD, P. J. The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. **Nat. Rev.**, v. 7, p. 41-53, 2008.

TIERNEY, M.; CROFT, A. K.; HAYES, M. A review of antihypertensive and antioxidant activities in macroalgae. **Bot. Mar.**, v. 53, p. 387-408, 2010.

TJØLSEN, A. et al. The formalin test: in evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.

TOMINAGA, M. Nociception and TRP channels. **Handb. Exp. Pharmacol.**, n. 179, p. 489-505, 2007.

TOWNSEND, M. J.; MCKENZIE, A. N. Unravelling the net? Cytokines and diseases. **J. Cell Sci.**, v 113, p 3549-3550, 2000.

TRACEY, I.; DICKENSON, A. SnapShot: Pain Perception. **Cell**, p. 148, 2012.

TRACEY, I.; MANTYH, P.W. The Cerebral Signature for Pain Perception and Its Modulation. **Neuron.**, v. 55, p. 377-391, 2007.

TREEDE, R. D. et al. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. **Neurology.**, v. 70, p. 1630–5, 2008.

TRINCHIERI, G. Cancer and Inflammation: An Old Intuition with Rapidly Evolving New Concepts. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 30, p. 677-706, 2012.

TRONO-JR, G. C. Diversity of seaweed flora of the Philipines and its utilization. **Hidrobiologia**, v. 1, n. 6, p. 398-399, 1999.

VALLANCE, P.; CHAN, E. N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. **Heart**, v. 85, n.3, p. 342-50, 2001.

VANDERLEI, E.S. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. **Int. Immunopharmacol.**, v. 10, n. 9, p. 1113-8, 2010.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenase 1 and 2. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 38, p. 97-120, 1998.

VERGNOLLE, N. Postinflammatory visceral sensitivity and pain mechanisms. **Eurogastroenterol. Motil.**, v. 20, p. 73–80, 2008.

VERRI, J. R. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacol. Therap.**, v. 112, p. 116-138, 2006.

VEST, S. E.; DAWES, C. J.; ROMEO, J. T. Distribuition of caulerpin and caulerpicin in eight species of the green alga *Caulerpa* (Caulerpales). **Bot. Mar.**, v. 26, p. 313-316, 1983.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. **Quim. Nova**, v. 27, p. 139-145, 2004.

VOILLEY, N. et al. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. **J. Neurosci.**, v. 21, n. 20, p. 8026-33, 2001.

XU, S. H.; CEN, Y. Z.; ZENG, L. M. Isolation and identification of red prisms from *Caulerpa sertularioides*. **Huaxue. Shijie**, v. 20, n. 5, p. 265-266, 1998.

WEINHEIMER, A. J.; SPRAGGINS, R. L. The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA2 and its acetate, methyl ester) in the gorgonian *Plexaura homomalla* chemistry of coelenterates. XV. **Tetrahedron. Lett.**, v. 59, p. 5185–5188, 1969.

WERZ, O.; STEINHILBER, D. Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. **Pharmacol. Therap.**, v. 112, p. 701–718 , 2006.

WETERING, E. J. et al. Cognitive and behavioral interventions for the management of chronic neuropathic pain in adults – A systematic review. **Eur. J. Pain**, v. 4, n. 7, p. 670-81, 2010.



WIENECKE, T. et al. Prostacyclin (epoprostenol) induces headache in healthy subjects. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 106-16, 2008.

WILLIAMS, J. A.; DAY, M.; HEAVNER, J. E. Ziconotide: an update and review. **Expert. Opin Pharmacother.**, v. 9, p. 1575-1583, 2008.

WILLIAMS, D. G. et al. Developmental regulation of codeine analgesia in the rat. **Anesthesiol.**, v. 100, n. 1, p. 92-97, 2004.

WONG, M. M.; FISH, E. M. Chemokines: Attractive mediators of the immune response. **Sem. Immunol.**, v. 15, p. 5-14, 2003.

WOOLF, C. J. Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**, v. 152, p. S2–S15, 2011.

YUAN, Y.V.; WALSH, N.A. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, p. 1144–1150, 2006.

ZAKARIA, Z. A. et al. Antinociceptive and antiinflammatory activities of *Dicranopteris linearis* Leaves chloroform extract in experimental animals. **Yakugaku Zasshi.**, v. 126, n. 11, p. 1197-1203, 2006.

\_\_\_\_\_, et al. Antinociceptive and antiinflammatory. Properties of *Corchorus capsularis* leaves chloroform extract in experimental animals models. **Yakugaku Zasshi.**, v. 127, n. 2, p. 359-365, 2007.

ZEILHOFER, H. U. Prostanoids in nociception and pain. **Biochem. Pharmacol.**, v. 73, p. 165-174, 2007.

ZHOU, H. Y. et al. Anti-inflammatory activity of 21 ( $\alpha$ ,  $\beta$ )-methykmelianodiol, novel compounds from *Poncirus trifoliata* Rafinesque. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 572, p. 239-248, 2007.

ZIEGLGANSBERGER, W.; BERTHELE, A.; TOLLE, T.R. Understanding neuropathic pain. **CNS Spect.**, v. 10, n. 4, p. 289-308, 2005.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **PAIN**, v. 16, p. 109-110, 1983.

\_\_\_\_\_. Pathobiology of neuropathic pain. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 429, p. 23-37, 2001.

ZOCCALI, C. The endothelium as a target in renal diseases. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 20, p. S39-S44, 2007.

ZUBIA, M.; ROBLEDO, D.; FREILE-PELEGRIN, Y. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. **J. Appl. Phycol.**, v. 19, p. 449-458, 2007.

## ANEXO - Folha de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



### UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Maceió – AL, 02/09/2011

Senhor (a) Pesquisador (a), Magna Suzana Alexandre Moreira  
Carolina Barbosa Brito da Matta

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 12/08/2010 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº 002260/2011-21 sob o título **Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de extratos de maroalgas bentônicas *Caulerpa spp.: C. mexicana, C. kempfii e C. sertulariodes***, vem por meio deste instrumento comunicar a aprovação do processo supra citado, com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4).

É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e sua justificativa. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o(a) pesquisador(a) ou patrocinador(a) deve enviá-los à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item IV. 2.e).

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos no Cronograma do Protocolo e na Res. CNS, 196/96.

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra - referidas.

Esta aprovação não é válida para subprojetos oriundos do protocolo de pesquisa acima referido.

(\*) Áreas temáticas especiais

Válido até: Abril de 2013

*Wafra Matias Libero*  
Dr. Wafra Matias Libero  
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa  
ANVISA