



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

MARIA ALICE PIMENTEL FALCÃO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA
DOS EXTRATOS DA ALGA *Caulerpa kempfii* (CAULERPACEAE)**

Maceió
2014

MARIA ALICE PIMENTEL FALCÃO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA
DOS EXTRATOS DA ALGA *Caulerpa kempfii* (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

2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Maria Auxiliadora G. da Cunha

F178a Falcão, Maria Alice Pimentel.
Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória dos extratos da alga *Caulerpa kempfii* (CAULERPACEAE) / Maria Alice Pimentel Falcão. – 2014.
55 f.

Orientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2014.

Bibliografia: f. 46-55.

1. *Caulerpa kempfii*. 2. Antinocicepção. 3. Anti-inflamatório. 4. Algas verdes.
I. Título.

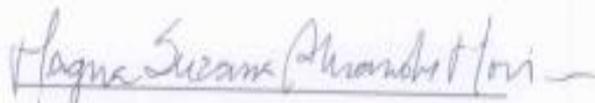
CDU: 615.276

Folha de Aprovação

Maria Alice Fimentel Falcão

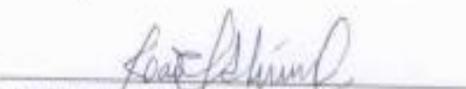
Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória dos extratos da alga *Caulerpa kempfi* (Caulerpaceae)

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 14 de abril de 2014.



Prof.ª Dr.ª Magna Suzana Alexandre Noreira (Orientador)

Banca Examinadora


Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti - (UFAL)
Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior - (UFAL)
Prof.ª Dr.ª Eliane Aparecida Camposatto - (UFAL)

Dedico este trabalho aos
meus pais, Francisco e
Aurinete, e a minha tia
Aurelita, por sempre me
apoiarem, principalmente
nestes dois anos, e me
amarem
incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado a força que eu necessitava durante toda esta jornada e que sempre esteve ao meu lado para me mostrar que Ele sempre honrará a fé dos justos. Sem a minha fé Nele, nada disso seria possível!

Aos meus pais, Francisco e Aurinete, e a minha tia Aurelita, por serem meus maiores exemplos de amor e honestidade. Eu só tenho a agradecer por todo carinho, paciência, amor e apoio que vocês me deram!! Amo vocês!

Aos meus irmãos, Aninha (principalmente pelas suas loucuras que me distraíram inúmeras vezes), Débora e Pedro, pelo carinho e compreensão! Amo vocês!

À profa. Dra. Eliane Campesatto, por ter acreditado em mim desde o PIBIC e desde sempre me apoiado e confiado em mim.

Ao seu Raílson, pela paciência e cuidado com os animais que seriam utilizados em minha pesquisa.

Aos animais, que foram extremamente importantes para a realização deste trabalho.

As minhas amigas, Samara, Lari Lessa, Mari Lima e Dani Cursino por me apoiarem, entenderem meu desespero, meus choros e comemorarem junto comigo as minhas conquistas ao longo do mestrado. Vocês foram essenciais para a conclusão deste trabalho. Muito obrigada.

A toda a minha família EJC! Vocês me ensinaram bastante e cada coisa e detalhe que aprendi com vocês, fizeram-me enxergar e compreender a vida com outros olhos. E essa compreensão foi essencial para não me fazer desistir e cada dia mais ver que Deus tem um plano muito maior para mim, mais até do

que eu possa imaginar! Carregarei sempre cada um de vocês em meu coração!! Vocês, realmente, mudaram a minha vida!! Amo vocês!

À Luiz, Carol e Max, meus grandes amigos do Bio+18, pelo enorme apoio, ajuda e paciência durante os experimentos. Sem vocês eu acredito que, por diversos fatores, essa jornada teria sido praticamente impossível! Que Deus guie e ilumine sempre os seus caminhos! MUITÍSSIMO obrigada.

A todos que fazem parte do LaFI, de uma forma ou de outra, vocês me ensinaram bastante. E para onde eu for, lembrarei-me de todo e qualquer “ensinamento” aqui aprendido. Que Deus preencha o coração de vocês com o amor Dele!

A todos do PMAQ-ALAGOAS, que mesmo com tão pouco tempo de convivência, sei que estão torcendo muito por mim!!! Um beijo em especial para a minha dupla (Maria Helena) e para Clécia e Gabi!!! Saudades!

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

A CAPES, pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos que de uma forma ou de outra me ajudaram na realização deste trabalho. Obrigada!

RESUMO

Os organismos marinhos são uma fonte rica de substância com atividade biológica. Entre eles, as algas que apresentam uma diversidade metabólica, morfológica e estrutural. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória dos extratos hexânico (EH), acetato de etila (EA) e metanólico (EM) de *Caulerpa kempffii*. Foram realizados ensaios de contorção induzida por ácido acético, teste da placa quente e teste de nocicepção induzida por formalina. O ensaio de peritonite induzida por carragenina foi utilizado para avaliar a atividade anti-inflamatória. No ensaio de contorção, os extratos EH, EA e EM e a dipirona induziram uma inibição de 76,7; 77,9; 90,8 e 89,3%, em relação ao controle. No teste da placa quente, os extratos de *C. kempffii* não aumentaram o tempo de latência dos animais. Na fase neurogênica do ensaio da formalina a inibição foi de 28% (EH), 37,4% (EA) e 35,9% (EM). Na fase inflamatória a redução foi de 55,1% (EH); 44,5% (EA) e 54,9% (EM), enquanto que a indometacina inibiu 62,6%. E no ensaio de peritonite, houve redução na migração celular de todos os extratos testados 27% (EH); 54,1% (EA); 26,0% (EM); 67,1% (indometacina). O presente estudo pode concluir que os extratos da macroalga *C. kempffii* possuem atividade antinociceptiva e anti-inflamatória e possuem potencial para o desenvolvimento de novos fármacos, fitofármacos ou fitoterápicos.

Palavras-chaves: *Caulerpa kempffii*. Antinocicepção. Anti-inflamatório. Algas verdes.

ABSTRACT

Marine organisms are a rich source of new prototype drugs. Among them, the seaweeds show different morphological, structural and metabolic features. The aim of this study was to investigate antinociceptive and anti-inflammatory activities of the hexanic (HE), acetate of ethil (AE) and methanolic (ME) extracts of *Caulerpa kempfii*. The acetic acid-induced writhing test, hot plate test and formalin-induced nociception were carried out to evaluate the antinociceptive potential of these extracts, while the carrageenan-induced peritonitis was applied to investigate an anti-inflammatory activity of *C. kempfii* extracts. In the acetic acid-induced writhing, HE, AE, ME and dipyrone induced writhing inhibition of 76,7; 77,9; 90,8 and 89,3%, respectively. In the hot plate test, *C. kempfii* extracts did not increase the latency time of the animals in the time evaluated. In the neurogenic phase the extracts induced significant inhibition of 28% (HE), 37,4% (AE) e 35,9% (ME). In the inflammatory phase was reduced significantly 55,1% (HE); 44,5% (AE) and 54,9% (ME) respectively, while indomethacin inhibited 62,6%. Moreover, in the carrageenan-induced peritonitis, a reduction of cell migration was seen in all extracts evaluated 27% (HE); 54,1% (AE); 26,0% (ME); 67,1% (indomethacin). Thus, the present results allow concluding that the HE, AE and ME from macro alga *C. kempfii* have anti-inflammatory and antinociceptive properties and may be used as prototypes of drugs, natural medicines or herbal remedies.

Keywords: *Caulerpa kempfii*. Antinociceptive. Anti-inflammatory. Green algae

Sumário

<u>1 INTRODUÇÃO</u>	10
<u>1.1 Dor</u>	10
<u>1.2 Inflamação</u>	15
<u>1.2.1 Mediadores inflamatórios</u>	17
<u>1.3 Produtos naturais de origem marinha</u>	21
<u>1.3.1 Macroalgas Marinhas</u>	23
<u>1.3.2 Considerações sobre o Gênero <i>Caulerpa</i></u>	25
<u>2 OBJETIVOS</u>	28
<u>2.1 Objetivo Geral</u>	28
<u>2.2 Objetivos Específicos</u>	28
<u>3 METODOLOGIA</u>	29
<u>3.1 Obtenção do extrato</u>	29
<u>3.2 Ensaios Farmacológicos</u>	29
<u>3.2.1 Aprovação do Comitê de Ética</u>	29
<u>3.2.2 Animais</u>	30
<u>3.2.3 Reagentes, soluções e fármacos utilizados</u>	30
<u>3.3 Ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético</u>	30
<u>3.4 Ensaio de nocicepção induzida por formalina</u>	31
<u>3.5 Ensaio da Placa Quente</u>	32
<u>3.6 Ensaio de Peritonite induzido por carragenina</u>	34
<u>3.4 Análise estatística</u>	35
<u>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	36
<u>4.1 Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório dos extratos de <i>C. kempfii</i></u>	36
<u>4.1.1 Ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético</u>	36
<u>4.1.2 Ensaio da placa quente</u>	39
<u>4.1.3 Ensaio de nocicepção induzida por formalina</u>	40
<u>4.1.4 Ensaio de Peritonite induzida por carragenina</u>	44
<u>6 CONCLUSÃO</u>	46
<u>REFERENCIAS</u>	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor

De acordo com a definição da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) a dor é definida como “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão” (JULIUS; BASBAUM, 2001). Em meio aos desconfortos causados pela dor, notam-se algumas respostas hipersensíveis como a hiperalgesia (resposta a estímulos nocivos de maneira nociceptiva) e a alodínia (quando estímulos não nocivos ocasionam respostas nociceptiva aumentada) (MILLAN, 1999).

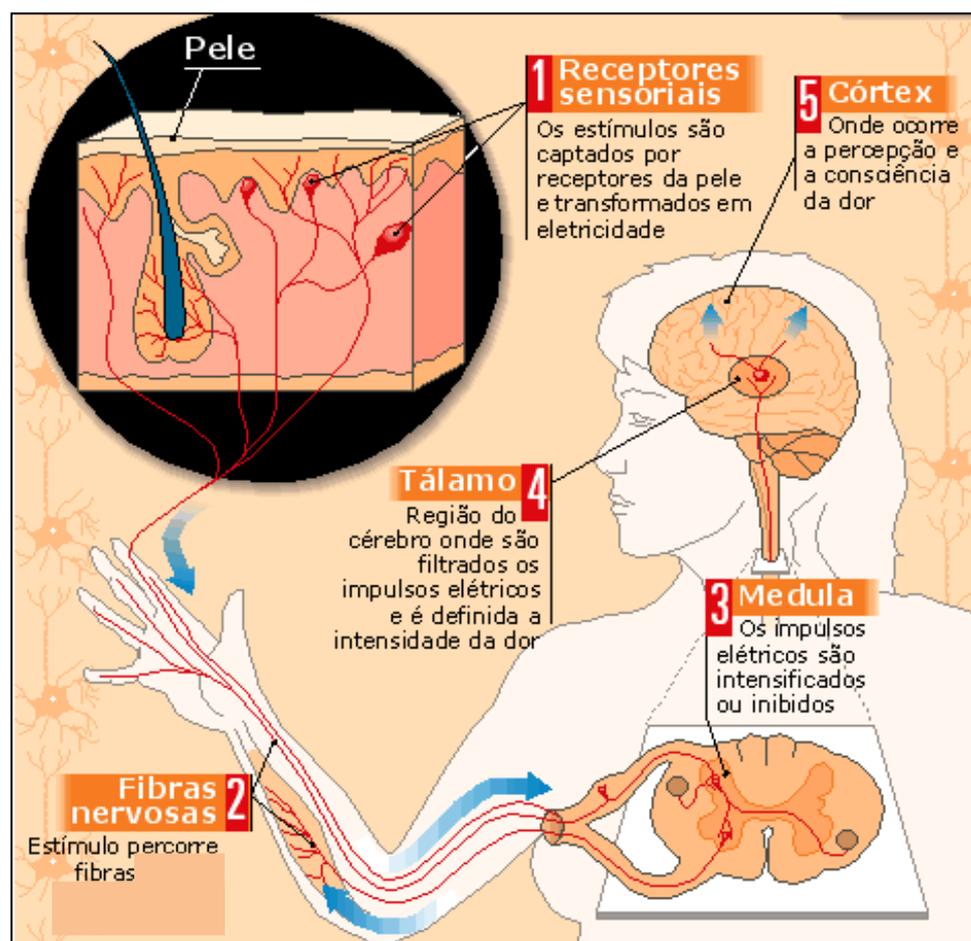
A dor é um dos sintomas clínicos que atua como sinal de alerta e/ou ameaça à integridade do organismo (CHAPMAN; GAVRIN, 1999). Isso faz com que a dor seja preventiva e limitadora de possíveis danos (MILLAN, 1999; WOOLF, 2000; ALMEIDA; ROINZEBLATT; TUFIK, 2004).

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 sistema nervoso periférico-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 geralmente 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 expressivo, ao passo que a dor somática apresenta excelente resposta aos tratamentos existentes (DISTRUTTI et. al., 2010).

Enquanto na dor inflamatória, a ocorrência de uma lesão tecidual leva à liberação de mediadores inflamatórios que sensibilizam/ativam os neurônios periféricos, induzindo, assim, uma resposta nociceptiva que desencadeará a dor. Esses mediadores são liberados tanto por uma lesão tecidual, quanto pela presença de algum corpo estranho no organismo (Figura 1) (CUNHA, 2009).

No momento em que são ativados, os nociceptores transformam o estímulo doloroso em impulsos elétricos, que são transportados para a medula. Já na medula, a transmissão do estímulo doloroso de um neurônio para o outro é modulada por internuerônios, chegando até o tálamo onde é determinada a intensidade da sensação da dor e, assim, posteriormente chegando até ao cérebro onde ocorrerá a consciência e percepção da dor.

Figura 1 – Transmissão da dor nociceptiva



Outra classificação da dor é quanto duração da sensação dolorosa, podendo 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). Na dor transitória e na 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 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 co-morbidades como distúrbios de sono e depressão (TRACEY; DICKENSON, 2012).

Em relação a percepção dolorosa, os neurônios primários possuem sua classificação de acordo com critérios funcionais e anatômicos. As fibras A β são caracterizadas por possuírem fibras mielinizadas, com um diâmetro maior (10 μ m) e apresentam uma maior velocidade de condução (30-100 m/s). No

entanto a maior parte dos nociceptores se encontra nas fibras de pequeno (0,4-1,2 μm) e médio diâmetro (2-6 μm) que constituem respectivamente as fibras C, não mielinizadas, e as fibras A δ , pouco mielinizadas (PLEUVRY e LAURETTI, 1996; MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001). Por serem responsáveis pelas respostas a estímulos térmicos, químicos e físicos, as fibras C são denominadas nociceptores polimodais. A maioria das fibras C responde a estímulos (HUNT; MANTYH, 2001; SAWYNOK; LIU, 2003). Já as fibras A δ são conhecidas como nociceptores mecanotérmicos e respondem aos estímulos nociceptivos mecânicos e térmicos (JULIUS; BASBAUM, 2001).

As fibras A β são encontradas nos neurônios aferentes sensoriais da pele, articulações, tendões e músculos. Geralmente, respondem aos estímulos de baixa e alta intensidade e raramente constituem nociceptores em condições normais numa proporção substancial nos neurônios aferentes (JULIUS; BASBAUM, 2001; DJOUHRI; LAWSON, 2004).

No corno dorsal da medula espinhal, encontram-se vários neurotransmissores como a substância P, aminoácidos excitatórios e inibitórios, óxido nítrico, opioides, serotonina, monoaminas e outros. Devido a essa complexidade de neurotransmissores, os potenciais mecanismos pelos quais a dor poderia ser inibida sem causar efeitos colaterais, é uma dificuldade a ser descoberta (MILLAN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório entre todos os nociceptores, no entanto as fibras também podem ser sensibilizadas por outras substâncias químicas endógenas liberadas, em condições anormais, no ambiente. Dentre elas, destacam-se a acetilcolina, a bradicinina, a histamina, a serotonina, os leucotrienos, a substância P, as purinas, as prostaglandinas, o tromboxano, as citocinas (interleucinas e o fator de necrose tumoral alfa). A maior parte da ativação das fibras nociceptivas é dada por receptores específicos acoplados à cascata de segundos mensageiros intracelulares e canais iônicos. Dentre estes receptores, pode-se citar o receptor vaniloide, conhecido como Receptor de Potencial Transitório Vaniloide do tipo 1 (TRPV1), o qual é expresso por um subgrupo de neurônios periféricos, tornando-os

sensíveis a vários estímulos dolorosos incluindo prótons, calor, mediadores lipídeos e compostos vaniloides como a capsaicina (CATERINA et. al., 1997).

A informação nociceptiva é processada pelas vias descendentes originadas no tronco cerebral e em outras estruturas como córtex, tálamo, hipotálamo (MILLAN, 1999; MILLAN, 2002; VANEGAS e SCHAIBLE, 2004). A resposta nociceptiva é modulada pelos mecanismos descendentes, os quais atuam em nociceptores presentes nas fibras aferentes primárias, assim como no corno dorsal, interneurônios excitatórios e inibitórios (MILLAN, 1999; MILLAN, 2002). A modulação descendente da informação nociceptiva além de envolver várias estruturas cerebrais, também envolve sistemas de neurotransmissores como o sistema serotoninérgico, GABAérgico glutamatérgico, opioides, entre outros (MILLAN, 2002).

Um mediador nociceptivo é o óxido nítrico (NO), um importante mensageiro biológico. Depois de sintetizado, o NO ativa a enzima guanilato ciclase (GC), a qual é seu receptor fisiológico, convertendo a guanosina-5'-trifosfato em guanosina-3'-5'-monofosfato cíclico (GMPc). O GMPc, sendo o segundo mensageiro, pode ativar proteínas quinases da classe G, canais iônicos e diminuir a ativação das fosfodiesterases (MOORE et. al., 1991). Existem três isoformas da síntese de óxido nítrico (NOS): a forma neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzida (iNOS). A enzima iNOS tem sua expressão induzida por vários estímulos, enquanto as enzimas nNOS e eNOS são constitutivas (GARTHWAITE, 1991; OZEK, et. al., 2003).

Diferente das NOS constitutivas, que dependem do Ca^{2+} , a atividade da iNOS independem do influxo de cálcio na célula e é induzida por estímulos inflamatórios. Tem sido observado que o NO é produzido pós-sinápticamente em resposta à ativação de aminoácidos excitatórios, e que inibidores da NOS podem inibir indiretamente os receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDA), (o glutamato possui uma grande importância na transmissão excitatória de informações a partir dos neurônios sensoriais aferentes primários para os neurônios do corno dorsal). A excitação dos neurônios sensoriais nociceptivos, provocada por lesão tecidual ou injúria, causa uma contínua liberação de glutamato, o qual age sobre receptores pós-sinápticos, como o NMDA, levando

a uma sensibilização central, (GARTHWAITE, 1991; OZEK , RESIN, GUNGOR; 2003). A produção de NO a partir da L-arginina, que é catalisada pela nNOS, tem sua estimulação devido a ativação de receptores NMDA que permitem o influxo de Ca^{2+} (GARTHWAITE, BOULTON; 1995). Além disso, tem sido encontrada uma regulação recíproca entre glutamato e NO, sendo assim, o NO e glutamato podem influenciar mutuamente suas taxas de produção e liberação (LIN et. al., 2000; OZEK , RESIN, GUNGOR 2003).

O ácido gama-amino-butírico (GABA) e a glicina agem como neurotransmissores inibitórios na modulação da transmissão do estímulo nociceptivo. O GABA exerce sua ação em dois tipos de receptores o $GABA_A$ e o $GABA_B$, ambos amplamente distribuídos no corno dorsal da medula espinhal, especialmente nas lâminas superficiais. Os receptores para glicina, geralmente, encontram-se codistribuídos com receptores $GABA_A$ (MILLAN, 2002).

A serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina) é uma monoamina envolvida na estimulação das vias descendentes do controle da dor. Alguns estudos já demonstraram que a estimulação de áreas ligadas a analgesia está associada a elevação nos níveis serotoninérgicos. A serotonina interage com, pelo menos, 14 tipos de receptores os quais estão amplamente distribuídos por vários tecidos. O receptor 5-HT₃, presente nos gânglios da raiz dorsal e periféricamente, demonstra efeito antinociceptivo, enquanto a administração intratecal de antagonistas do receptor 5-HT₃ bloqueia a analgesia induzida pela 5-HT e produz uma moderada resposta hiperalgésica (TABER,.; LATRANYI, 1981; GIORDANO; GERSTMANN, 2004; OKUSE, 2007).

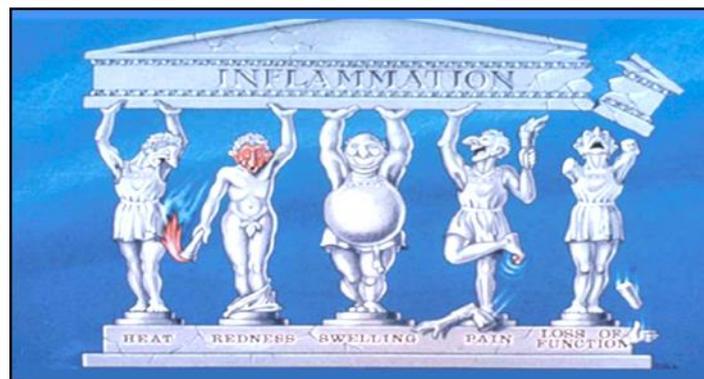
1.2 Inflamação

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 inflamação é um processo fisiológico o qual é basicamente uma resposta ocasionada por uma lesão no tecido ou um processo infeccioso, no qual ocorre uma resposta do sistema (COTRAN *et al.*, 2005). Este processo é compreendido como uma defesa do organismo, fazendo com que haja, posteriormente, mecanismos de reparação, bem como a cicatrização e a regeneração do tecido afetado (TIZZARD, 2002). Apesar de o processo inflamatório possuir uma importância vital ao organismo, às vezes essa resposta pode ser exagerada e ocasionar efeitos indesejáveis (BRUNTON *et al.*, 2010).

Na parte clínica, podemos observar cinco sinais que caracterizam uma inflamação: dor, calor, rubor, edema e podendo ocasionar a perda da função (Figura 2).

Figura 2- Ilustração grega dos cinco sinais da inflamação: calor, rubor, tumor, dor e perda de função. Ilustração médica da faculdade de medicina de St Bartholomeu



Fonte: DUNDER, 2009

A resposta inflamatória inicial à lesão tecidual é uma resposta positiva ao trauma, objetivando eliminar o agente agressor e, assim fazer a proteção do organismo (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). Nos últimos anos, foi aceito que a inflamação é em parte responsável por doenças crônicas que tendem a levar à morte. Outros exemplos de desordens nas quais a presença de estados inflamatórios persistentes provocam uma piora no quadro da doença incluem câncer, doença de Alzheimer e aterosclerose (COUZIN-FRANKEL, 2010)

A inflamação pode ser dividida em fase aguda e fase crônica, que se diferem pelo tempo na resposta inflamatória e particularidades histopatológicas, como mediadores químicos e células inflamatórias envolvidas. Na primeira fase da resposta, inflamação aguda, predominam os eventos vasculares/exsudativos, que fazem parte da 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). Ao mesmo tempo, vários mediadores químicos como histamina, bradicinina, Fator de Agregação Plaquetária-PAF e LTs provocam aumento da permeabilidade das pequenas veias, que permitem a passagem de um fluido rico em proteínas plasmáticas (exsudato) para o espaço extravascular, ocasionando aumento da pressão e retenção hídrica no interstício, ocasionando assim o edema. O exsudato formado facilita a liberação de outros mediadores que amplificam a resposta inflamatória (GILROY et. al., 2004). A dor é outro sinal característico da inflamação, e sua causa pode ser oriunda de diversos fatores que incluem: aumento da pressão sobre tecidos e terminações nervosas, lesão das fibras nervosas, irritação por substâncias produzidas por microrganismos 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).

Os agentes inflamatórios são reconhecidos por anticorpos específicos presentes na superfície celular de células inflamatórias, como os macrófagos. Uma vez estimuladas, ocorre a intensa produção de radicais livres para combater o agente agressor, além da propagação dessa resposta através da liberação de citocinas, responsáveis pela expressão de genes das enzimas envolvidas no processo inflamatório, como a ciclo-oxigenase (COX) (MACMAHON; CAFFERTY; MARCHAND, 2005). Esse processo de recrutamento de macrófagos caracteriza um dos mais importantes mecanismos da resposta inflamatória (HAVSTEEN, 2002).

1.2.1 Mediadores inflamatórios

Os mediadores endógenos são substâncias oriundas da ativação de células inflamatórias podendo ser originados no plasma, sob a forma de precursores a serem ativados (proteínas do sistema complemento, das cininas e da coagulação) ou sintetizados e armazenados por células (serotonina, histamina, prostaglandinas, fator ativador plaquetário (PAF), leucotrienos e citocinas) em grânulos intracelulares. A maioria dos mediadores químicos desempenha sua atividade biológica por meio da ligação específica com receptores presentes em células, entretanto alguns podem atuar diretamente como enzimas (proteases lisossomais) ou mediando lesões oxidativas diretas como ocorre com os metabólitos do oxigênio. Esses mediadores são parte essencial na modulação dos principais eventos relacionados a inflamação, como vasodilatação, obstrução tecidual e quimiotaxia para células inflamatórias (SIQUEIRA & DANTAS, 2000).

Existem inúmeros agentes que promovem a quimiotaxia, sendo os principais os componentes do sistema complemento (C5a), produtos da via da lipoxigenase (leucotrieno B₄ – LTB₄), PAF, quimiocinas e endotoxinas de origem bacteriana (lipopolissacarídeo – LPS) (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Quando os fosfolipídeos de membrana sofrem estímulos mecânicos, químicos ou físicos liberam o ácido araquidônico, a partir da ativação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂). O ácido araquidônico livre pode ser metabolizado pelas COX produzindo os prostanoides (prostaglandinas e tromboxanos) e pelas lipoxigenases (LOX) produzindo leucotrienos (BOTTING, 2006).

São conhecidas três isoformas da COX, ciclo-oxigenase 1, ciclo-oxigenase 2 e ciclo-oxigenase 3 (COX-1, COX-2 e COX-3). 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- α 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 produtos originados pela cisão do AA através da COX-2 levam a formação de PGs que participam de eventos inflamatórios, algésicos e térmicos. A PGE₂ e PGI₂ são mediadores da dor, febre e inflamação. A PGE₂, a PGI₂ e a PGD₂ são poderosos vasodilatadores intrínsecos e atuam de modo sinérgico com outros vasodilatadores inflamatórios, como histamina e bradicinina. O tromboxano A₂ (TXA₂), predominante das plaquetas, causa vasoconstrição, broncoconstrição e agregação plaquetária, sendo esta última seu principal efeito (BALLOU, et. al., 2000; KIDD; URBAN, 2010).

As prostaglandinas envolvidas na inflamação são as prostaciclina: PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ e o TXA₂. A PGI₂ age como vasodilatadora, mas também age potencializando os efeitos quimiotáticos e aumentando a permeabilidade vascular para que outros mediadores desempenhem seus papéis no local da inflamação. As prostaglandinas PGE₂, PGD₂ e PGF_{2α} também possuem ação vasoativa e estão relacionadas ao aumento da permeabilidade vascular e formação do edema. Além disso, as PG também participam dos processos dolorosos e febris durante a inflamação, é o caso da PGE₂, que torna a pele hipersensível a estímulos dolorosos (PECCHI et. al., 2009).

Os leucotrienos (LT) são produtos derivados do ácido araquidônico, a partir do grupo de enzimas chamadas de lipoxigenases, que são enzimas citosólicas, solúveis, encontradas preferencialmente nos pulmões, plaquetas, células endoteliais, monócitos, mastócitos, eosinófilos e linfócitos B (MONTUSHI et. al., 2007). Dentre os LT, o LTB₄ exerce um papel importante no processo que quimiotaxia de várias células (neutrófilos, eosinófilos e monócitos), promovendo a migração das mesmas para o tecido lesionado. Outra função exercida pelos LT é a ativação dos leucócitos e promoção da desgranulação, além de produzirem superóxidos, que contribuem para os danos teciduais característicos da inflamação. Outros LT, como LTC₄, LTD₄ e

LTE₄, atuam aumentando a permeabilidade vascular (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; WIENECKE, 2008).

O óxido nítrico (NO) é um gás solúvel, derivado do metabolismo do aminoácido L-arginina que sofre ação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), produzida pela ativação de leucócitos em condições inflamatórias (VALLANCE; CHAN, 2001). O NO promove o relaxamento vascular, além de inibir o processo de agregação plaquetária e adesão leucocitária, também está envolvido na neurotransmissão e na atividade antimicrobiana e antitumoral dos macrófagos (ZOCCALI, 2007). Participam no processo inflamatório gerando efeitos negativos pela ação citotóxica que alguns de seus metabólitos podem exercer sobre o DNA, lipídeos de microrganismos e células vizinhas saudáveis (SZABÓ, 2003).

Mastócitos e basófilos, células que sofrem degranulação, produzem e liberam outros mediador importante no processo inflamatório, a histamina. Ela provoca vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, sendo os pulmões, a pele e o trato gastrointestinal os locais onde se encontra uma maior concentração (THURMOND; GELFAND; DUNFORD, 2008). A histamina exerce sua ação quando interage com seus receptores específicos (H₁, H₂, H₃ e H₄). A ativação dos receptores H₁ resulta numa vasodilatação de início rápido e de curta duração, além de aumentar a permeabilidade vascular, enquanto a ativação dos receptores H₂ causa uma vasodilatação mais prolongada e de início lento, via do monofosfato cíclico de adenosina/proteína quinase A (AMPc-PKA) (LEURS; WANTANABE; TIMMERMAN, 2001). A interação entre a histamina e os receptores H₁ aumenta a expressão de P-selectina nas células endoteliais (promovem a adesão neutrofílica) (GABOURY et. al., 1995). Os receptores H₃ são autorreceptores em neurônios histaminérgicos, que inibem a liberação de uma variedade de neurotransmissores. Já os receptores H₄ parecem estar envolvidos com quimiotaxia e expressão de moléculas de adesão como ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1) em eosinófilos (LING et. al., 2004). Assim como a histamina, outro mediador que possui ação vasoativa é a bradicinina, um peptídeo que provoca vasodilatação (resultante da produção de PGI₂ e liberação de NO) seguida pelo aumento da permeabilidade vascular, além de representar um modulador de estímulos dolorosos (decorrentes da liberação de PG) (LEEB-LUNDBERG; et. al., 2005).

As citocinas mediadoras da resposta inflamatória liberadas por uma variedade de células (macrófagos, neutrófilos e células endoteliais) e produzem diversos efeitos, como por exemplo, ativação, divisão, apoptose e quimiotaxia celular, além de participarem do processo inflamatório, da imunidade e do reparo de tecidos lesados (PECCHI *et. al.*, 2009; HANADA; YOSHIMURA, 2002). As IL, fatores de crescimento, quimiocinas, interferons e fatores estimuladores de colônia, fazem parte do grande grupo das citocinas. Também é possível classificar as citocinas, de acordo com a sua função no processo inflamatório, em citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-1RA, IL-4 e IL-10) (WONG; FISH, 2003). A IL-8, por exemplo, atua como fator quimiotático, atraindo células polimorfonucleares 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). Outros fatores, tais como, TNF- α e IL-1 β , são capazes de aumentar a excitabilidade dos receptores neuronais, modulando o processo algico, bem como, aumentar o número destes receptores na membrana dos neurônios (STELLWAGEN; MALENKA, 2006).

É crescente o número de pesquisadores interessados em estudar os mediadores e a fisiopatologia da inflamação, pois apesar de já existirem várias alternativas farmacológicas para o tratamento, o arsenal é deficiente porque alguns medicamentos apresentam uma eficácia limitada e outros possuem efeitos adversos que restringem sua utilização (GRIS *et. al.*, 2010). Um exemplo clássico é o mecanismo pelo qual agem os anti-inflamatórios, que ao inibir a síntese de PG podem causar lesões gástricas, já que as prostaglandinas também estão envolvidas na produção de muco que reveste e protege as paredes estomacais. Sendo assim, é necessário que as pesquisas continuem na busca por alternativas mais eficazes no tratamento da inflamação (VERGNOLLE, 2008).

1.3 Produtos naturais de origem marinha

A utilização de produtos com origem marinha vem sendo bastante difundido na indústria farmacêutica, ao longo dos anos (BUTLER, 2008; HARVEY, 2008; NEWMAN; CRAGG, 2007). De todos os fármacos utilizados, em média, 80% possui inspiração ou são produtos naturais. A fim de produzir em grande escala, fármacos para seu benefício, o homem vem copiando e/ou modificando substâncias bioativas produzidas pela natureza (COSTA-LOTUFO; WILKE; JIMENEZ, 2009).

O meio marinho possui componentes bioativos naturais que possuem características químicas e estruturais, que não são encontradas em produtos naturais terrestres (SULLIVAN *et. al.*, 2010). Por conta das condições adversas do ambiente marinho, a maioria das classes de organismos desse ambiente desenvolveram uma variedade de moléculas com potente atividade biológica e características complexas, as quais são capazes de interagir com alvos celulares inusitados (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Apesar dos estudos e investigação dos produtos naturais marinhos e suas propriedades farmacológicas serem recentes, já foi possível descobrir vários agentes potencialmente ativos, que já são utilizados na aplicação clínica (BERGMANN; FEENEY, 1951). O pequeno número de fármacos derivados de produtos marinhos disponíveis no mercado não representa uma escassez de pesquisa neste âmbito da ciência, ao contrário, desde 1960 mais de 20 mil compostos foram isolados de organismos marinhos (BLUNT *et. al.*, 2012). 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).

Atualmente, os produtos de origem marinha tem sido fonte de compostos que demonstram, em ensaios pré-clínicos, atividade antibacteriana (HORIE *et. al.*, 2008), anti-inflamatória (CHAO *et. al.*, 2008), antifúngica (D'AURIA *et. al.*, 2007), anticoagulante (JUNG *et. al.*, 2007), imunomoduladora (COURTOIS *et. al.*, 2008; YAMADA *et. al.*, 2007), antiviral (ARTAN *et. al.*, 2008) dentre outras. Além disso, vários compostos já estão em fase de teste clínicos.

Vale destacar que a grande maioria dos estudos é mais relevante no tratamento de neoplasias e é exatamente na terapêutica dessas doenças que se tem o maior impacto das substâncias de origem marinha (MAYER *et. al.*,

2010). Entre os produtos com tais propriedades, encontra-se a briostatina 1, isolado do brizoário *Bugula neritina*, com a qual já foram realizados mais de 80 estudos clínicos, sendo as melhores respostas em associação com outros quimioterápicos (AL-KATIB et. al., 1998; DOWLATI et. al., 2003; PETTIT et. al., 1970; RUAN; ZHU, 2012); o mesilato de eribulina, um macrolídeo derivado da halichondrina B isolada da esponja *Halichondria okadai*, que se encontra em estudos clínicos de fase 3 para o tratamento do câncer de mama (NEWMAN; CRAGG, 2007); e o discodermolido, o mais potente agente estabilizante de microtúbulos já descrito, isolado da esponja *Discoderma dissoluta*, que está em estudos de fase 1 para tratamento de tumores sólidos (SINGH et. al., 2008; ter HAAR et. al., 1996).

O primeiro fármaco de origem marinha que foi autorizado pelo *Food And Drugs*, em 2004, (FDA) foi o peptídeo conotoxina MVIIA (Ziconotide[®]), isolado do caracol marinho *Conus magus*, 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). Outros produtos naturais de origem marinha são também promissores, como o sesquiterpeno manoalido, isolado da *Luffariella variabilis*, uma esponja do Pacífico, essa substância é um inibidor irreversível da PLA₂, e foi estudada 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*[®]. Essa substância é um potente inibidor da enzima transcriptase reversa, tornando-se um dos poucos recursos quimioterápicos contra este tipo de retrovírus existente (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 podem-se citar as macroalgas, que são recursos biologicamente ativos da natureza (SULLIVAN et. al., 2010).

1.3.1 Macroalgas Marinhas

Os organismos denominados “alga” podem ser encontrados nos mais diversos ambientes aquáticos e terrestres úmidos. Eles constituem um grupo bastante diferenciado quanto as suas características morfológicas, estruturais e metabólicas (REVIERS, 2006). A distribuição das algas está relacionada com a temperatura e salinidade da água, corrente dos oceanos, luminosidade solar e condições físico químicas (RAVEN, EVERT, EITCHOM, 1996).

Alguns autores distribuem as algas em três reinos: 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 micro-organismos 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). Apesar de as algas marinhas possuírem metabólitos secundários, parcialmente, parecidos com os encontrados em plantas 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 (Cl^- , 19.000 mg/L; Br^- , 65 mg/L e I^-/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). 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).

1.3.2 Considerações sobre o Gênero *Caulerpa*

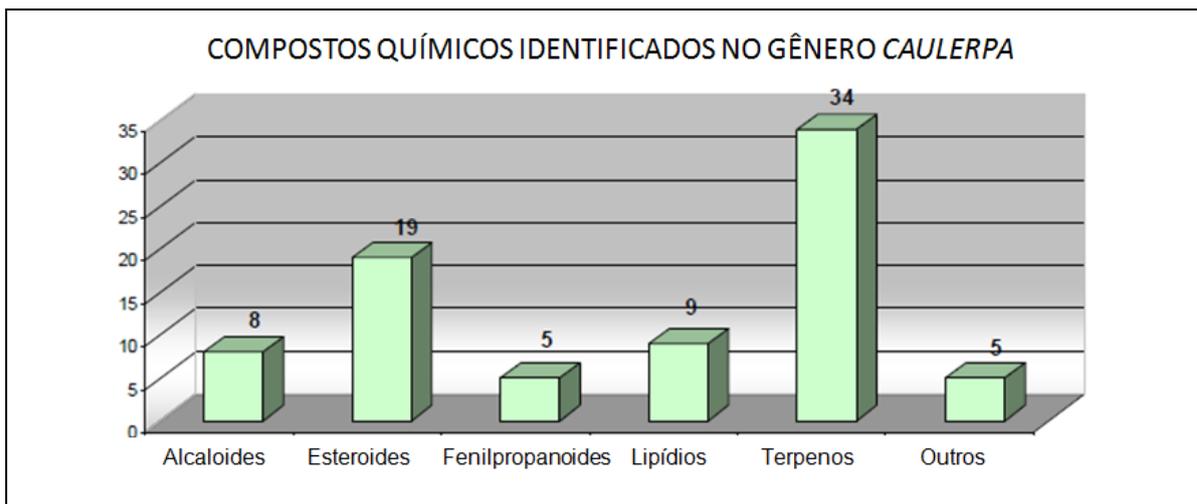
Dentre as Clorophytas estão as algas do gênero *Caulerpa* (Caulerpaceae), distribuídas mundialmente em regiões tropicais e subtropicais, reconhecidas por Lamouroux em 1809 (FAMA et. al., 2002). Embora o número de espécies de *Caulerpa* seja um dado variável na literatura, Dumay e colaboradores (2002) 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 3 mostra alguns dos compostos químicos encontrados no gênero *Caulerpa*.

Figura 3 - 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% da massa seca 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). 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).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Investigar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório dos extratos hexânico, acetato de etila e metanólico, obtidos da espécie de macroalgas *Caulerpa kempfii*.

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 METODOLOGIA

3.1 Obtenção do extrato

A *C. kempfii* foi coletada na parte costeira de Pitimbu, Paraíba-Brasil, em 2009. A amostra foi classificada pelo Dr. George Emmanuel C. de Miranda, do departamento de Sistemática e Ecologia, da Universidade Federal da Paraíba. E a alga foi depositada no Herbário Lauro Pires Xavier da Universidade Federal da Paraíba. O material foi lavado com água destilada, pesado (1 kg) e seco em sala a temperatura ambiente (~25°C).

Para obter os extratos foi realizada extração à quente, no Soxhlet, com solventes de polaridades crescentes, como hexano, acetato de etila e metanol. A solução obtida da extração foi submetida à evaporação do solvente, no evaporador rotativo a pressão reduzida, com temperatura até 50°C.

3.2 Ensaio Farmacológicos

3.2.1 Aprovação do Comitê de Ética

O uso de animal neste trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Alagoas, nº 23065.002260/2011-21.

3.2.2 Animais

Para a realização deste trabalho, foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss*, de ambos os sexos, com o peso entre 25-30 g, com 6 a 8 semanas de idade, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (BIOCEN). Os animais foram transferidos para o Biotério do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - ICBS, onde foram mantidos em gaiolas plásticas com grades de alumínio e possuíam livre acesso à água e a ração. O local possuía temperatura e luminosidade controladas, com o ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro. Os animais foram mantidos no laboratório para aclimação por pelo menos 1 dia antes da realização dos experimentos, com a finalidade de adaptação ao ambiente. Para cada experimento, utilizou-se 6 animais por grupo, os quais foram deixados em jejum por 8 h antes do início dos experimentos, porém com livre acesso à água. Logo após os ensaios, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e encaminhados para incineração.

3.2.3 Reagentes, soluções e fármacos utilizados

Foram utilizados no ensaio os seguintes reagentes e soluções: Ácido acético P.A. (Vetec), Azul de Tripán (Sigma), Formaldeído P.A. (Vetec), Tween 80® (Sigma-Aldrich), Carboximetilcelulose-CMC, Carragenina (Sigma), Dipirona (Sigma-Aldrich), Indometacina (Merck) e Sulfato de Morfina (Cristália, BR). Os extratos hexânico, acetato de etila e metanólico obtidos da *C. kempfii* foram suspensos em Tween 80® e CMC.

3.2.4 Extratos

Para os ensaios farmacológicos, foram utilizados os extratos hexânico (EH), acetato de etila (EA) e metanólico (EM) obtidos da espécie *C. kempfii* que foram suspensos em CMC 5% com auxílio de 20 μ L de Tween 80® (tensoativo). Em todos os ensaios, os extratos foram administrados por via oral (v.o.) na dose de 100 mg/kg.

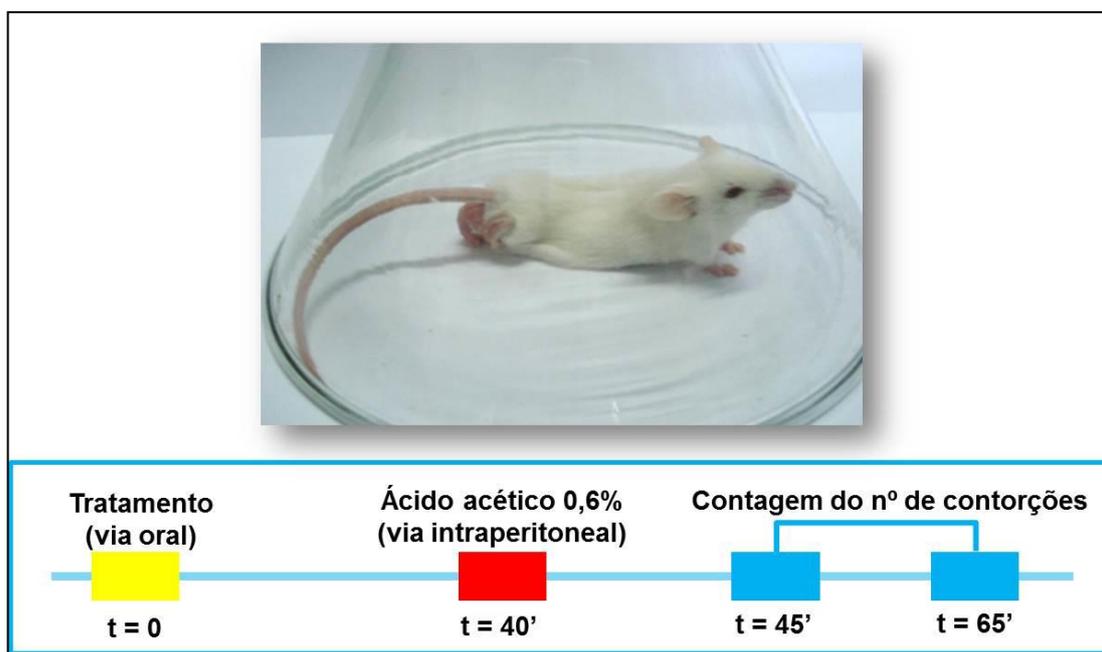
3.3 Ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético

O protocolo experimental utilizado nesse ensaio foi semelhante ao proposto originalmente por Collier (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 podendo ou não haver a extensão dos membros inferiores (Figura 4).

Quarenta minutos antes da injeção do ácido acético, os animais foram tratados com os extratos da *C. kempfii* ou dipirona (40mg/Kg, v.o.). O grupo controle recebeu apenas o veículo 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 4 – Esquema do ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético



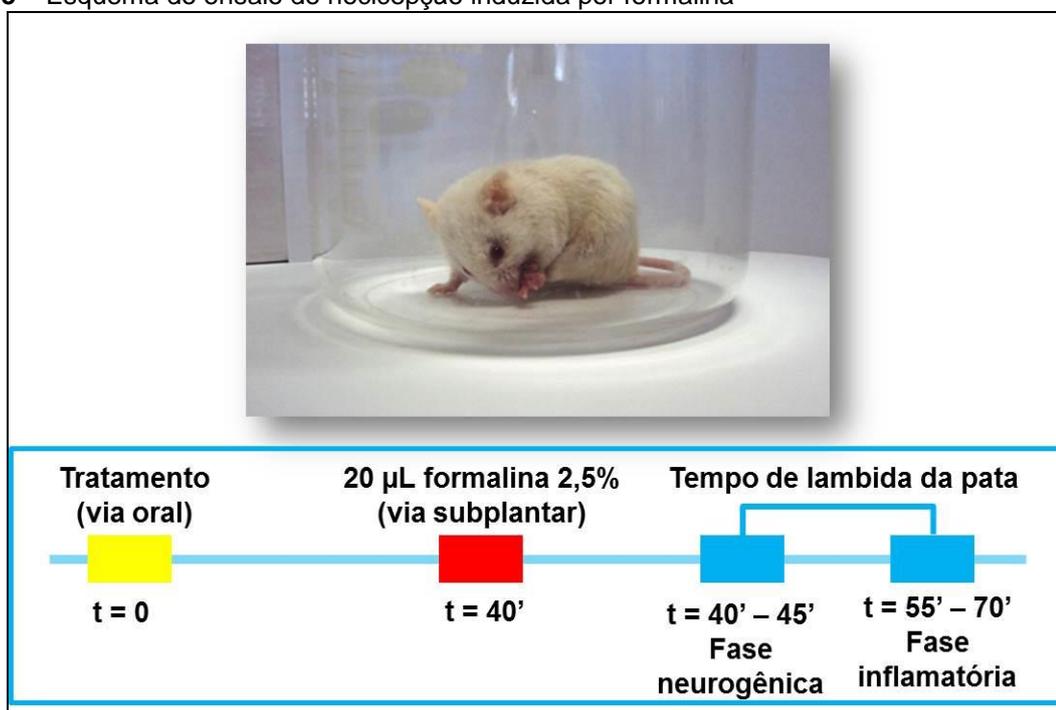
Fonte: Adaptado por DA MATTA, 2012

3.4 Ensaio de nocicepção induzida por formalina

O procedimento utilizado para a realização desse ensaio foi similar ao descrito por Hunskaar e Hole (1987). Para isso, os camundongos receberam

uma injeção subplantar (s.pl.) de 20 μ L de formalina - formaldeído diluído em solução salina (2,5%) - na face dorsal da pata traseira, quarenta minutos após o tratamento com os extratos da *C. kemfpii*, indometacina (35,7 mg/kg, v.o.) ou o veículo. 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 5). Os primeiros 5 minutos cronometrados representam a fase neurogênica do ensaio e, após 10 min de intervalo, cronometraram-se os últimos 15 minutos representam a fase inflamatória, totalizando 30 minutos.

Figura 5 – Esquema do ensaio de nocicepção induzida por formalina

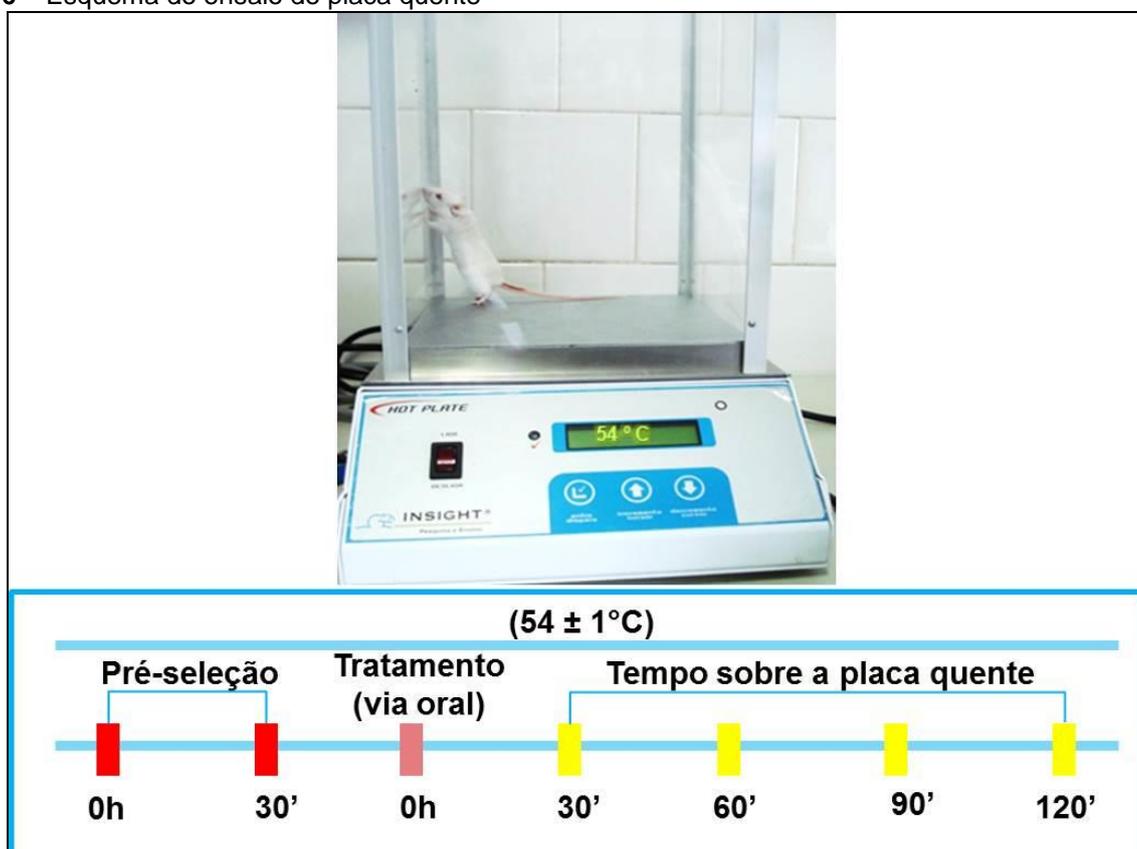


Fonte: Adaptado por DA MATTA, 2012

3.5 Ensaio da Placa Quente

A atividade antinociceptiva central das frações da *C. kempfii* foi avaliada utilizando o modelo da placa quente, descrito por Kuraishi (1983). Os camundongos foram colocados em uma placa aquecida a $54 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ (Figura 6) e sua resposta ao estímulo térmico (tempo em segundos que o animal levou para lamber, levantar ou morder uma de suas patas dianteiras ou traseiras ‘tempo de latência’) foi cronometrada. Foram feitas duas medidas controle em um 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 EH, EA, EM veículo ou morfina (4,3 mg/kg, i.p.), 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 6 – Esquema do ensaio de placa quente

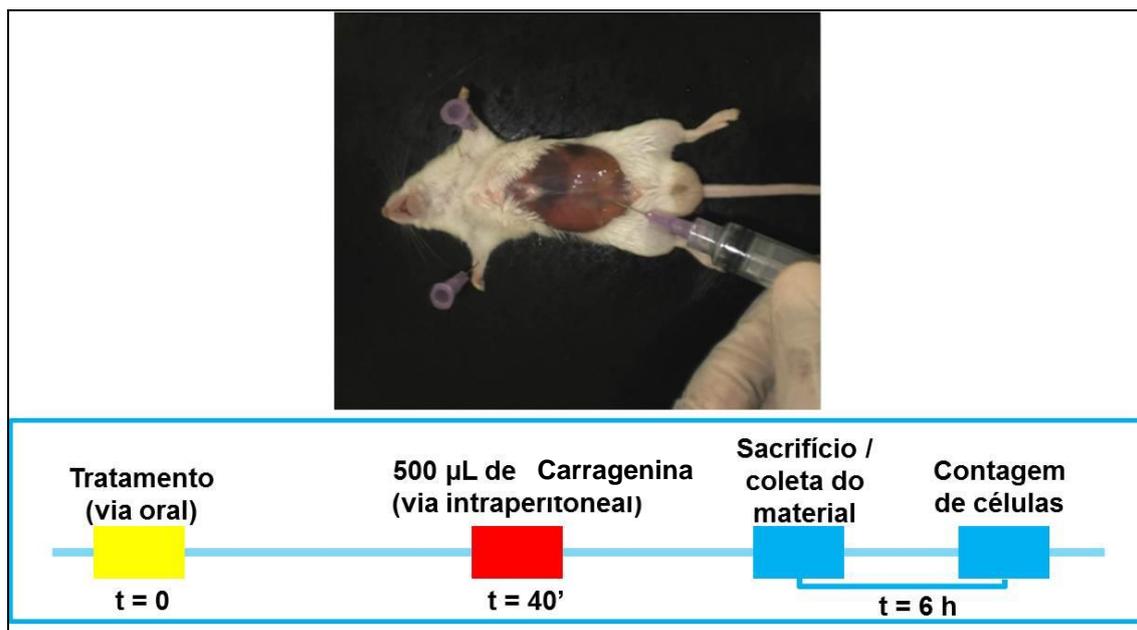


Fonte: Adaptado por DA MATTA, 2012

3.6 Ensaio de Peritonite induzido por carragenina

Seguindo a metodologia descrita por Ferrándiz e Alcaraz (1991) os camundongos foram tratados com os extratos de *C. kempfii*, 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 7).

Figura 7 – Esquema do ensaio de peritonite induzida por Carragenina



Fonte: Adaptado de DA MATTA, 2012

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:

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

3.4 Análise estatística

A comparação dos grupos experimentais e o controle foram feitos utilizando-se ANOVA seguido do pós Teste de Dunnett. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$, e expressos como média \pm erro padrão da média.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

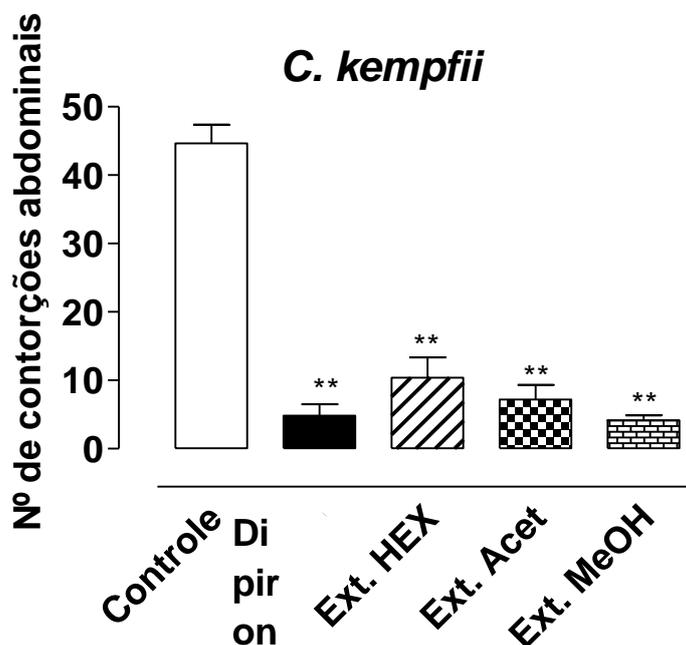
4.1 Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório dos extratos de *C. kempfii*

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. kempfii* administrados na dose de 100 mg/kg, v.o., reduziram o número de contorções abdominais ($p < 0,01$). O grupo controle, tratado apenas com o veículo, apresentou $44,7 \pm 2,6$ contorções abdominais, enquanto dipirona, fármaco padrão utilizado, reduziu o número de contorções para $4,8 \pm 1,6$ com porcentagem de inibição de 89,3%, quando comparada ao controle, como demonstrado na figura 8.

Os grupos tratados com os extratos de *C. kempfii* apresentaram uma inibição de contorção significativa de: 76,7% - EH ($10,4 \pm 2,4$), 77,9% - EA ($7,2 \pm 2,1$) e 90,8% - EM ($4,1 \pm 0,7$).

Figura 8- Efeito dos extratos de *C. kempfii* (100 mg/kg, v.o) no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético



Notas: $**p < 0,01$: difere significativamente do controle (veículo) quando analisados por ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnet. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (n=6) do número de contorções abdominais.

O teste de contorção é um modelo básico de nocicepção, porém pouco específico, que permite avaliar a atividade de substâncias que atuam tanto em nível periférico, como central. Funciona como um *screening* farmacológico capaz de detectar e avaliar novas substâncias com potencial antinociceptivo (IKEDA et. al., 2001; PARVEEN et. al., 2007).

Para esse modelo, é administrado um agente irritante, o ácido acético, na membrana serosa, que tem a função de provocar um estímulo doloroso que é caracterizado por um movimento de contrações abdominais (podendo ou não haver extensão dos membros inferiores) 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).

Sendo assim, a dor abdominal induzida pelo 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).

De posse dos resultados desse ensaio com os extratos hexânico, acetato de etila e metanólico da *C. kempfii* apresentaram atividade antinociceptiva e demonstram resultados satisfatório quando comparados ao fármaco padrão, dipirona, na dose de 40 mg/kg (figura 8). Considerando que o tratamento foi realizado por via oral, seu efeito indica que os componentes ativos presentes nos extratos são bem absorvidos pelo trato gastrointestinal.

Os resultados obtidos nesse ensaio 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 de forma 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. sertularioides* (100 mg/kg – v.o.) com extratos hexânico, clorofórmico, acetato e metanólico com inibição de 66,5%, 67,0%, 60,7% e 67,0%, respectivamente.

Além dessa espécie, a *C. mexicana* com os mesmos extratos da *C. sertularioides*, realizou uma porcentagem de inibição de: 83,1%, 77,0%, 73,2% e 78,4% (MATTA, 2012). Isso pode ser um indicativo da presença de componentes com atividade antinociceptiva ou também anti-inflamatória em macroalgas do gênero *Caulerpa*, dada à atividade de outras espécies nesse ensaio. Além disso, sugere-se que o provável efeito antinociceptivo causado pelo tratamento com o extrato de *C. kempfii* pode ser decorrente da inibição direta da liberação de mediadores induzidos pelo ácido acético; pela inibição da migração de células que poderiam aumentar o processo doloroso ou por inibição direta de COX ou por uma modulação central nociceptivo.

4.1.2 Ensaio da placa quente

No ensaio de placa quente ($54 \pm 1^\circ\text{C}$), nenhum extrato de *C. kempfii*, na dose de 100 mg/kg, foi significativamente ativo em relação ao controle, como pode ser observado na tabela 2. Apenas a morfina teve efeito no aumento no tempo de latência.

Tabela 2- Efeito dos extratos metanólico e acetato de etila de *C. kempfii* (100 mg/kg, v.o.)

Grupo	Dose mg/kg	Leitura controle		Pós-tratamento			
		0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min
Controle	---	1,4 ± 0,3	2,2 ± 0,6	1,8 ± 0,12	3,23 ± 0,27	2,79 ± 0,27	2,60 ± 0,46
Morfina	10	6,9 ± 0,4	5,87 ± 0,2	12,8 ± 0,4**	10,30 ± 0,80**	9,70 ± 0,70**	9,70 ± 0,95**
Extrato metanólico	100	3,7 ± 0,40	4,19 ± 0,51	3,80 ± 0,71	6,17 ± 1,39	6,24 ± 1,84	4,59 ± 1,10
Extrato acetato	100	2,04 ± 0,08	1,39 ± 0,19	1,54 ± 0,14	2,49 ± 0,47	2,54 ± 0,64	2,11 ± 0,33

Os dados representam a média e o erro padrão da média (** $p < 0,01$ no teste de ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett)

Visando à descoberta de um fármaco com propriedades terapêuticas semelhantes as da morfina, mas com menos efeitos adversos (que limitam seu uso clínico), é comum em estudos farmacológicos investigar o envolvimento do sistema opioide (GRIS et. al., 2010; WILLIAMS et. al., 2004).

Para avaliar o perfil antinociceptivo central dos extratos de *C. kempfii* foi utilizado o modelo de placa quente. Nesse ensaio, nenhum extrato estudado foi capaz de aumentar o tempo de latência do camundongo na placa quente. Já a morfina, causou um aumento significativo no tempo de latência do animal sobre a placa quente nos tempos de 30, 60 e 90 minutos após a administração.

Quando os nociceptores são ativados diretamente pelo estímulo térmico, o camundongo tende a retirar ou lambear a pata. O estímulo doloroso é conduzido ao corno dorsal da medula espinhal e posteriormente aos centros corticais (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Os receptores envolvidos na sensação térmica são os vaniloides TRPV-1 (com limiar de ativação em torno de 43°C) e TRPV-2 (com limiar de ativação em torno de 52°C) (JULIUS; BASBAUM, 2001). Quando ativados, ocorre um influxo de Ca^{2+} , despolarização da fibra nervosa e ativação de canais de Na^+ dependente de voltagem, que disparam potenciais de ação (ZIEGLGANSBERGER; BERTHELE; TOLLE,

2005). Os fármacos que aumentam o tempo de latência do animal sobre a placa são os analgésicos opioides e os anestésicos gerais, resultado avaliado como antinocicepção a nível central (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

O ensaio da placa quente é utilizado para a avaliação de propriedades analgésicas de agonistas opiáceos. Na temperatura utilizada, o efeito analgésico do fármaco e outros agonistas narcóticos são facilmente identificados e quantificados usando este método. Por outro lado, a uma temperatura de 55°C, substâncias analgésicas não narcóticas não apresentam nenhuma ou pouca atividade antinociceptiva (JANICKI; LIBICH, 1978; KURAISHI et. al., 1983; HUNSKAAR; BERGE; HOLE, 1986; LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

Além das vias dos opioides, a inibição da isoforma da enzima COX-3 (encontrada no cérebro) que possui características estruturais e catalíticas semelhantes a COX-1 e COX-2 pode resultar em uma nocicepção central (CHANDRASEKHARAN et. al., 2002). Estudos mostram que fármacos analgésicos e antipiréticos como dipirona e paracetamol inibem preferencialmente a COX-1, resultando na diminuição da síntese de PGE₂ e conseqüentemente um efeito antinociceptivo (CHANDRASEKHARAN et. al., 2002; BOTTING; AYOUB, 2005).

De acordo com os resultados obtidos neste ensaio, sugere-se que os extratos da *C. kempfii* estudados, não atuam nos mecanismos centrais, seja pela inibição da enzima COX-3 ou pela inibição dos potenciais de ação gerados pelos receptores vaniloides TRPV-1 e TRPV-2.

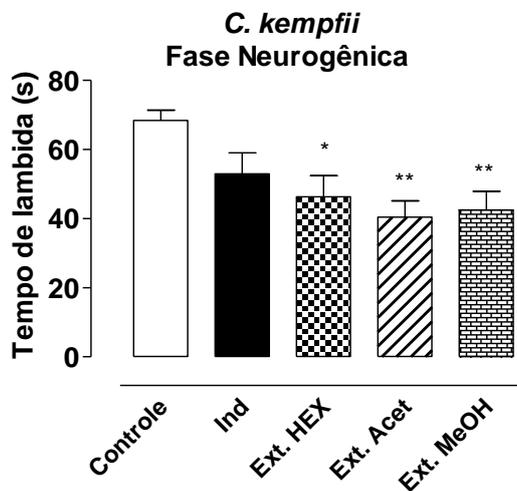
Uma hipótese que podemos levar em consideração é que fatores intrínsecos da alga como: sazonalidade, local da coleta, entre outros fatores não favoreceram a produção suficiente de componentes ativos para a ação antinociceptiva central.

4.1.3 Ensaio de nocicepção induzida por formalina

A figura 9A mostra a primeira fase do ensaio. Observa-se que o tempo que o animal passou lambendo a pata em resposta à injeção de formalina (s.pl.) foi de 70,6 ± 2,3 s para o grupo controle. Após o tratamento com os extratos de *C. kempfii* esse tempo foi reduzido de maneira significativa para 28,0% - EH (50,8 ± 5,0 s; $p < 0,05$), 37,4% - EA (44,2 ± 3,5 s; $p < 0,01$), e 35,9%

- EM ($45,2 \pm 5,7$ s; $p < 0,01$). Enquanto o fármaco padrão, indometacina (v.o.) inibiu 24,9% ($53,0 \pm 6,1$; $p < 0,05$).

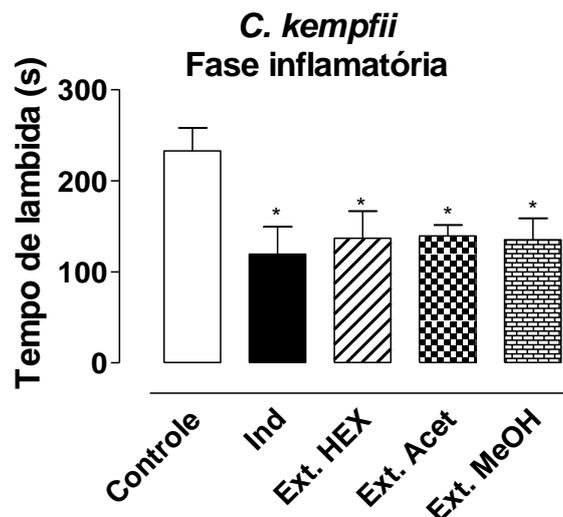
Figura 9A - Efeito dos extratos de *C. kempfii* (100 mg/kg, v.o.) e indometacina (35,7 mg/kg, v.o.) na fase neurogênica do ensaio de nociceção induzida por formalina



Nota: $*p < 0,05$, $**p < 0,01$. Os dados foram 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

Já na segunda fase do ensaio, o tempo de lambida do camundongo com a administração do veículo foi de $250,9 \pm 21,6$ s, em resposta a formalina. Enquanto o pré-tratamento com os extratos EH, EA e EM de *C. kempfii* reduziu significativamente com uma inibição de 55,4% ($112,8 \pm 21,1$ s; $p < 0,01$), 44,5% ($139,2 \pm 12,0$ s, $p < 0,01$) e 55,6% ($113,1 \pm 12,4$ s; $p < 0,01$). Já a indometacina inibiu 62,6% ($93,8 \pm 19,1$; $p < 0,01$), conforme mostra a figura 9B.

Figura 9B - Efeito dos extratos de *C. kempfii* (100 mg/kg, v.o.) e indometacina (35,7 mg/kg, v.o.) na fase inflamatória do ensaio de nociceção induzida por formalina



Nota: * $p < 0,05$. Os dados foram 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

Para confirmar e ter um melhor entendimento da atividade antinociceptiva dos extratos de *C. kempfii* foi realizado o ensaio de nociceção induzida por formalina, que tanto permite uma avaliação da nociceção de origem neurogênica, quando inflamatória. Este ensaio é um modelo químico, 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).

Nesse ensaio, a injeção de formalina desencadeia um processo nociceptivo intenso, caracterizado pela lambida ou batido da pata irritada contra a superfície sob a qual os animais permanecem durante o experimento. A fase neurogênica é iniciada logo após o estímulo com o agente irritante e prolonga-se por cinco minutos. Essa fase é caracterizada pela estimulação predominantemente das fibras C (HUNSKAAR, HOLE, 1987). Após os cinco minutos iniciais, há um período de repouso, de aproximadamente 10 minutos, onde há ausência de resposta nociceptiva. Após o período, é iniciada a fase inflamatória, com duração de aproximadamente quinze minutos e está relacionada com a liberação de mediadores inflamatórios como histamina,

serotonina, prostaglandinas, bradicinina. Há também participação de citocinas como TNF- α e IL-1 β nessa fase tardia (GRANADOS-SOTO et. al., 2001).

Nesse ensaio, na fase neurogênica, os extratos de *C. kempfii* reduziram significativamente o tempo de lambida, após a injeção de formalina subplantar, conforme mostra a figura 9. Os extratos EH, EA e EM mostraram uma inibição de 28%, 37,4% e 35,9%, respectivamente. Enquanto o fármaco padrão, indometacina, mostrou uma inibição de 24,9%. Em ensaios realizados por Vanderlei e colaboradores (2010), ao testar a atividade de uma lectina obtida de *C. cupressoides* (27 mg/kg, v.o.), notou-se uma inibição 45% da resposta do animal nesse mesmo ensaio.

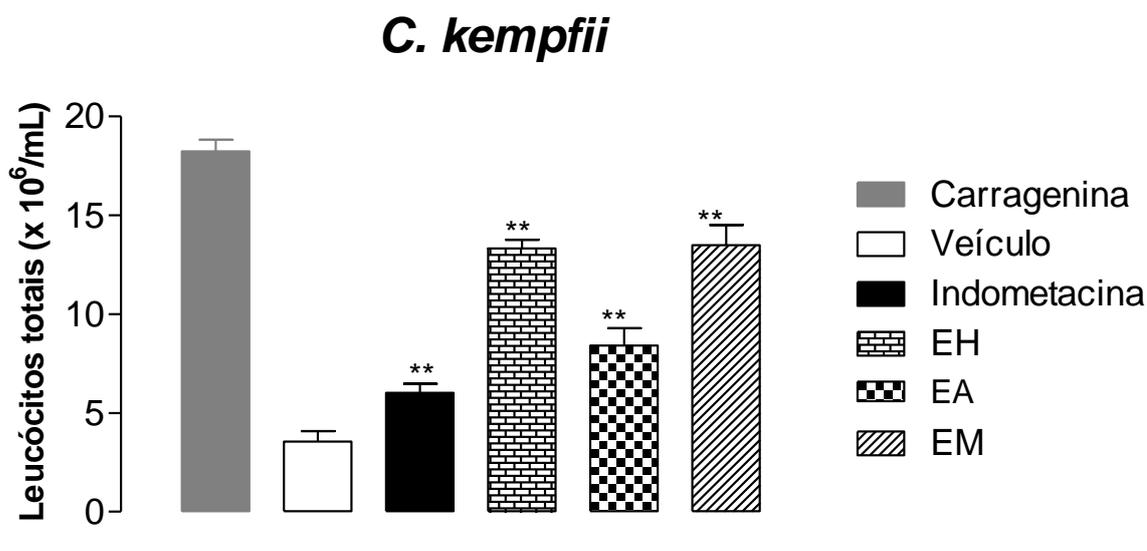
Na fase inflamatória deste teste, os extratos EH, EA e EM de *C. kempfii* reduziram significativamente com uma inibição de 55,4%, 44,5% e 55,6%. Já a indometacina apresentou uma inibição de 62,6%. Esses dados corroboram com os achados por Da Matta et al. (2012), no qual os extratos de *C. mexicana* induziu uma inibição significativa na fase inflamatória de 45,8% (EH), 44,5% (EA) e 55,6% (EM). E no mesmo estudo os extratos EH, EA e EM da *C. sertularioides* foram capazes de diminuir o tempo de lambida da pata em 47,5%, 64% e 55,8%, respectivamente.

Os extratos de *C. kempfii* mostraram um perfil inibitório nas duas fases do teste. Esses dados mostram que os extratos contêm substâncias as quais podem estar agindo no processo inflamatório e mecanismos periféricos, como a inibição da COX (CALIXTO, 2008; CHICHORRO, LORENZETTI, ZAMPRONIO, 2004).

4.1.4 Ensaio de Peritonite induzida por carragenina

No ensaio de peritonite todos os extratos de *C. kempfii* foram capazes de reduzir 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 $18,2 \pm 0,6 \times 10^6/\text{mL}$, enquanto os grupos tratados com os extratos reduziram esse número para: $13,3 \pm 0,4 \times 10^6/\text{mL}$ (EH); $8,4 \pm 0,9 \times 10^6/\text{mL}$ (EA) e $13,5 \pm 1,0 \times 10^6/\text{mL}$ (EM), exibindo uma significativa inibição de 27,0% ($p < 0,01$); 54,1% ($p < 0,01$) e 26,0% ($p < 0,01$), respectivamente, quando comparadas ao grupo da carragenina ($18,2 \pm 0,6 \times 10^6/\text{mL}$). O efeito foi similar a indometacina que inibiu 67,1% ($6,0 \pm 0,4 \times 10^6/\text{mL}$, $p < 0,01$), como mostrado abaixo na figura 10, mostrada abaixo, mostra os resultados acima citados.

Figura 10 - Efeito dos extratos de *C. kempfii* (100 mg/kg, v.o.) e da indometacina (35,7 mg/kg, v.o.) no ensaio de peritonite induzida por carragenina em camundongos



Nota: ** $p < 0,01$: 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 leucócitos ($\times 10^6/\text{mL}$)

Para avaliar a capacidade dos extratos de *C. kempfii* de inibir o processo inflamatório, que é a migração celular, foi realizado o ensaio de peritonite.

A carragenina é extraída de algas marinhas do gênero *Rhodophyceae*, que ao ser aplicada na cavidade peritoneal, induz uma resposta inflamatória

caracterizada por intensa exsudação plasmática e migração de células, principalmente os neutrófilos. Essa migração ocorre devido a grande estimulação da liberação de mediadores inflamatórios como as prostaglandinas, NO, histamina e neuropeptídeos (DI ROSA, 1972; PAULINO et. al., 2008).

Utiliza-se o fluido peritoneal porque esse é o melhor material, devido a quantidade de células livres do fluido peritoneal ser praticamente constante em camundongos não estimulados, embora mudanças bruscas na população celular possam ocorrer decorrentes da manipulação experimental. Porém rapidamente o sistema se reequilibra e a população celular tende a retornar as medidas normais. 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).

Nesse ensaio, os tratamentos com os extratos EH, EA e EM foram capazes de reduzir a migração celular em 27%, 54,1% e 26%. Enquanto o fármaco padrão, indometacina, inibiu 67,1%, conforme apresentado na figura 10.

Esse ensaio comprovou que provavelmente, algum componente ativo nos extratos de *C. kempfii* é capaz de provocar uma resposta anti-inflamatória. Um estudo realizado por Bitencourt (2011) demonstrou que extratos aquoso e metanólico de *C. mexicana* são capazes de reduzir a migração celular de uma maneira tempo dependente.

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que os EH, EA e EM da alga *C. kempfii*, apresentaram atividade antinociceptiva por ensaios de contorção abdominal induzida por ácido acético, a qual foi confirmada pelo ensaio de nocicepção induzida por formalina. Os extratos também apresentaram atividade anti-inflamatória, de acordo com os resultados obtidos no ensaio de peritonite. 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 dessa espécie de alga, podendo sugerir um desenvolvimento futuro de medicamento fitoterápico ou isolamento do componente ativo derivado desta alga.

REFERENCIAS

- AL-KATIB, A. M. et al. Bryostatin 1 down-regulates mdr1 and potentiates vincristine cytotoxicity in diffuse large cell lymphoma xenografts. **Clin. Cancer Research**, v. 4, p. 1305-1314, 1998.
- 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.
- ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res.**, 1000: 40-56, 2004.
- ARA, J. *et al.* Hypolipidaemic activity of seaweed from Karachi coast. **Phytother. Res.**, v. 16, p. 479-483, 2002.
- ARTAN, M. et al.. Anti-HIV-1 activity of phloroglucinol derivative, 6, 6'-bieckol, from *Ecklonia cava*. **Bioorg. & Med. Chem.**, v. 16, p. 7921-7926, 2008.
- BALLOU, L. R. *et al.* Nociception in cyclooxygenase iso-enzyme-deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.97, n.18, p.10272-10276, 2000.
- BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. Novos alvos contra a dor. **Sci. American. Bras.**, v.50, p.76-83, 2006.
- 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.
- 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.
- BITENCOURT, M.A.; *et al.* Aqueous and Methanolic Extracts of *Caulerpa mexicana* Suppress Cell Migration and Ear Edema Induced by Inflammatory Agents. **Mar Drugs**. **2011**, 9, 1332–1345.
- 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.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 29, p.144-222, 2012.

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

BOTTING, R.; AYOUB, S. S. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 72, p. 85–87, 2005.

BRUNTON, L., PARKER, K., BLUMENTHAL, D. & BUXTON, L. **Goodman & Gilman: manual de farmacologia e terapêutica**. Porto Alegre: ARTMED, 2010.

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

BYERS, M.R.; BONICA, J.J. Peripheral pain mechanisms and nociceptor plasticity. **Bonica's m. of Pain**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001.

CALIXTO, J.B.; *et.al.* Kinins in pains and inflammations. **Pain**. 87, 1–5, 2008.

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., SCHUMACHER, M.A., TOMINAGA, M., ROSEN, T.A., LEVINE, J.D., JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel

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.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; *et.al.* COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc.of the N. Academy of Sciences**, v. 99, p. 13926-13931, 2002.

CHAO, C. H. *et al.* Cytotoxic and anti-inflammatory cembranoids from the soft coral *Lobophytum crassum*. **J. of Nat. Prod.**, v. 71, p. 1819-1824, 2008.

CHAPMAN, C.R.; GRAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **Lancet**, 353: 2233-2237, 1999.

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**. 141, 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.

- CONTRAN; R. S.; ROBBINS, S. L. **Patologia Estrutural e Funcional**. Guanabara, 6° ed., 2005.
- 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.
- 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.
- COURTOIS, A. et al. Floridoside extracted from the red alga *Mastocarpus stellatus* is a potent activator of the classical complement pathway. **Mar. Drugs**, v. 6, p. 407-417, 2008.
- COUZIN-FRANKEL, J. Inflammation: bares a dark side. **Science** v. 330, p. 1621. 2010.
- CUNHA, F. Q. Dor Inflamatória. In: ALVES NETO, O. (Org.). *Dor: princípios e prática*. Porto Alegre: **Artmed.**, p. 212-147, 2009.
- DA MATTA, C. B. B. **Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória das macroalgas *Caulerpa mexicana* e *Caulerpa sertularioides* (*Caulerpaceae*)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, 2012.
- D'AURIA, M. V. et al. Isolation and structural elucidation of callipeltins J-M: antifungal peptides from the marine sponge *Latrunculia* sp. **Tetrahedron**, v. 63, p. 131-140, 2007.
- DI ROSA, M. Review. Biological proprieties of Carragenan. **J. Pharmacol. Pharmac.**, v. 24, p. 89-102, 1972.
- DISTRUTTI, E. et al. Hydrogen sulphide induces μ opioid receptor- dependent analgesia in a rodent model of visceral pain. **Mol. Pain.**, v., 6, n. 36, p. 1-16, 2010.
- DJOUHRI, L., LAWSON, S.N. A beta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. **Brain Res Brain Res Rev.**, 46: 131-145, 2004.
- D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **Br. J. Anaesth.** v. 101, n. 1, p. 8-16, 2008.
- DOWLATI, A. et al. Phase I and correlative study of combination bryostatin 1 and vincristine in relapsed B-cell malignancies. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 5929-5935, 2003.

DRAY, A. Peripheral Mediators of Pain. In: Dickenson, A., Besson, J., - M., editors. **The Pharmacology of Pain**. Vol.130/l., Springer: Verlag, Berlin. 21-41, 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 anti-inflamatória 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.

ERICKSON, A.A. et. al. Palatability of macroalgae that use different types of chemical defenses. **J. Chem. Ecol.**, v. 32, p. 1883–1895, 2006.

FAHMY, H. et. al. An Improved Synthesis of 7, 8-Epoxy-1,3,11-cembratriene-15R(α), 16-diol, a Cembranoid of Marine Origin with a Potent Cancer Chemopreventive Activity. **Mar. Drugs.**, v. 2, p. 1, 2004.

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.

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, J. H. M. **Semiologia ortopédica**. 2012. 1 ilustração, color. Disponível em <http://www.semiologiaortopedica.com.br/2012_10_01_archive.html>. Acesso em: 03 dez. 2013.

FERRÁNDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J. Antiinflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Inflamm. Res.**, v. 32, p. 283–288, 1991.

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.

GABOURY, J. P.; JONHSTON, B.; NIV, X. F.; KUBES, P. Mechanisms underlying acute mast cell-induced leukocyte rolling and adhesion *in vivo*. **J. of Immunology**, v. 154, p. 804-81. 1995.

GARSON, J. Marine natural products. **Nat. Prod.**, v. 6, p.143–170, 1989.

GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. **Trends Neurosci.**, 14: 60–67, 1991.

GARTHWAITE, J., BOULTON, C.L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Annual Review of Physiology**, 57: 683-706, 1995.

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.

GIORDANO, J.; GERSTMANN, H. Patterns of serotonin- and 2-methylserotonin-induced pain may reflect 5-HT₃ receptor sensitization. **Euro. J. of Pharmacology**, v. 483, p. 267. 269, 2004.

GRANADOS-SOTO, V.; *et al.* Participation of COX, IL-1 β and TNF- α in formalin-induced inflammatory pain. **Procee. of the W. Pharmac. Society**, v. 44, p. 15-17. 2001.

GRIS, P.; *et al.* A novel alternatively spliced isoform of the mu-opioid receptor: functional antagonism. **Mol. Pain**, v. 6, p. 1-10, 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. **Cytok. & Growth Fact. Reviews**, v. 13, p. 413-421, 2002.

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

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharm. & Ther.**, v. 26, p. 67-202, 2002.

HIKIJI, H.; TAKATO, T.; SHIMIZU, T.; ISHII, S. The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. **Prog. in L. Research**, v. 47, p. 107-126, 2008.

HORIE, S. *et al.* Antibacterial quinone metabolite from the brown alga, *Sargassum sagamianum*. **Bulletin of the C. Soci. of Jap.**, v. 81, p. 1125-1130, 2008.

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

HUNT, S.P., MANTYH, P.W. The molecular dynamics of pain control. **Neuroscience**. 2: 83-91, 2001.

IKEDA, Y. *et al.* Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sci**. v. 69, p. 2911-2919, 2001. in the pain pathway. **Nature**, 389: 816-24, 1997.

JANICKI, P. LIBICH, J. Detection of antagonist activity for narcotic analgesics in mouse hot-plate test. **Pharm. Bioch. & Beh.**, v. 10, p. 623-626, 1978.

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**, 413: 203-210, 2001.

JUNG, V. et al. Comparison of the wound-activated transformation of caulerpenyne by invasive and noninvasive *Caulerpa* species of the Mediterranean. **J. of Chem. Ecology**, v. 28, p. 2091-2105, 2002.

KIDD, L. & URBAN, L. A., 2010. Mechanisms of inflammatory pain. **Brit. J. of Anesthe.**, Volume 7, p. 20, 2010.

KIM, K.S., *et. al.* Adenylyl cyclase type 5 (AC5) is an essential mediator of morphine action. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 103: 3908-3913, 2006.

KURASHI, 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.

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. F.; *et. al.* Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. International union of pharmacology. **Pharm. Reviews**, v. 57, p. 27-77, 2005.

LEURS, R.; WANTANABE, T.; TIMMERMAN, H. Histamine receptors are finally “coming out”. **T. in Phar. Sciences**, v. 22, p. 337-339. 2001.

LIN, H.C., KANG, B.H., WAN, F.D., HUANG, S.T., TSENG, C.J. Reciprocal regulation of nitric oxide and glutamate in the nucleus tractus solitarius of rats. **Eur J Pharmacol.**, 407: 83-9, 2000.

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.

LING, P.; *et. al.* Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 161-171. 2004.

LOESER JD, MELZACK R. PAIN: an overview. **Lancet**. 353: 1607-1609, 1999.

- 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.
- MACEDO, N. R. P. V. *et. al.* Caulerpin as a potential antiviral drug against herpes simplex virus type 1. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 2012.
- MACMAHON, S. B.; CAFFERTY, W. B. J.; MARCHAND, F. Immune and glial cell factoris as pain mediators and modulators. **Experimental Neurology**, v. 192, p. 444-462, 2005.
- 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. S. *et al.* The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, p. 255-265, 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, 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. Descending control of pain. **Prog Neurobiol.**, 66: 355-474, 2002.
- MILLAN; M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol.**, 57: 1-164, 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. **T. in Food Science & Technology**. v. 23, p. 83-96, 2012.
- MONTUSHI, P. *et. al.* Pharmacological modulation of the leukotriene pathway in allergic disease. **Drug. Disc. Today**, p. 404-412, 2007.
- MOORE, P.K., OLUYOMI, A.O., BABBEDGE, R.C., WALLACE, P., HART, S.L. L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br J Pharmacol.**, 102: 198-202, 1991.

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.

OKUSE, K. Pain signalling pathways: From cytokines to ion channels. **The International J. of Bioch. & Cell Biology**, v. 39, p. 490-496, 2007.

OZEK, W., RESIN, Y., GUNGOR, M. Comparison of the effects of specific and nonspecific inhibition of nitric oxide synthase on morphine analgesia, tolerance and dependence in mice. **Life Sci.**, 72: 1943–1951, 2003.

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

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.

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.

PETTIT, G. R. *et al.* Antineoplastic components of marine animals. **Nature**, v. 227, p. 962-963, 1970.

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.

PLEUVRY, B.J., LAURETTI, G.R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. **Pharmacol Ther.**, 71: 313-324, 1996.

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: **G. Koogan**, p. 735, 1996.

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

REVIERS, B. **Bio. e filo. das algas**. Porto Alegre: Artmed, p. 280, 2006.

ROTH, J. *et. al.* Molecular aspects of fever and hyperthermia. **Immunol. Allergy. Clin. N. Am.**, v.29, p.229-245, 2009.

RUAN, B. F.; ZHU, H. L. The chemistry and biology of the bryostatins: potential PKC inhibitors in clinical development. **Cur. Med. Chem.**, v. 19, p. 2652-2664. 2012.

SALTER, M. W. Cellular signaling pathways of pain neuroplasticity as target for analgesic development. **Cur. Top. Med. Chem.**, n. 5, p. 1-11, 2005.

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.

SAWYNOK, J., LIU, X.J. Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain. **Prog Neurobiol.**, 69: 313–340, 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.

SIQUEIRA, J. R.; DANTAS, C. J. S. **Mec. celulares e Mol. da Inflamação**. Rio de Janeiro: Medsi, p. 238, 2000

SOUZA, E. T. *et. al.* Antinociceptive activities of crude methanolic extract and phases, n-butanolic, 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 TNFalpha. **Nature**, v. 440, n. 7087, p. 1054-9, 2006.

- SULLIVAN, L. O. *et. al.* Prebiotics from Marine Macroalgae for Human and Animal Health Applications. **Mar. Drugs.**, v. 8, p. 2038-2064, 2010.
- 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.
- TABER, R.I., LATRANYI, M.B. Antagonism of the analgesic effect of opioid and non-opioid agents by p-chlorophenylalanine (PCPA). **Euro. J. of Pharmacology**, **75**: 215-222, 1981.
- TAIWO, Y.O., LEVINE, J.D. Kappa- and delta-opioids block sympathetically dependent hyperalgesia. **J. Neurosci.**, 11: 928-932, 1991.
- 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.
- TIZZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução.** 6 ed. São Paulo: Roca, 2002.
- TJØLSEN, A. *et al.* The formalin test: in evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.
- TOWNSEND, M. J.; MCKENZIE, A. N. Unravelling the net? Cytokines and diseases. **Jour. of Cell Scie.**, v. 113, p. 3549-3550, 2000.
- TRACEY, I.; DICKENSON, A. SnapShot: Pain Perception. **Cell**, p. 148, 2012.
- 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.

- VANEGAS, H., SCHAIBLE, H.G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res Rev.**, 46: 295-309, 2004.
- VERGNOLLE, N. Postinflammatory visceral sensitivity and pain mechanisms. **Eurogastroenterology and Motility**, v. 20, p. 73–80, 2008.
- 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.
- WIENECKE, T. *et al.* Prostacyclin (epoprostenol) induces headache in healthy subjects. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 106-16, 2008.
- WILLIAMS, D. G. *et al.* Developmental regulation of codeine analgesia in the rat. **Anesthesiol.**, v. 100, n. 1, p. 92-97, 2004.
- WILLIAMS, J. A.; DAY, M.; HEAVNER, J. E. Ziconotide: an update and review. **Expert. Opin Pharmacother.**, v. 9, p. 1575-1583, 2008.
- WONG, M. M.; FISH, E. N. Chemokines: Attractive mediators of the immune response. **Seminars in Immunology**, v. 15, p. 5-14, 2003.
- WOOLF; C.J. **Pain. Neurobiol Dis.**, 7: 504-510, 2000.
- YAMADA, T. *et al.* Cell-adhesion inhibitors produced by sea hare-derived *Periconia* sp. III. Absolute stereostructures of peribysins J and macrosphelide M. **The J. of Antibiotics**, v. 60, p. 370-375, 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.
- ZOCCALI, C. The endothelium as a target in renal diseases. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 20, p. S39-S44, 2007.

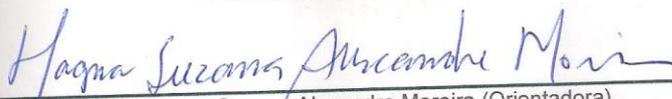
MARIA ALICE PIMENTEL FALCÃO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA
DOS EXTRATOS DA ALGA *Caulerpa kempfii* (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.

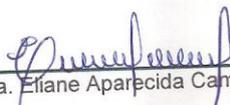
Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA



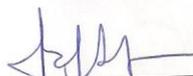
Prof. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira (Orientadora)

Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - UFAL



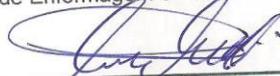
Profa. Dra. Eliane Aparecida Campesatto (Examinadora)

Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - UFAL



Profa. Dr. João Xavier de Araújo Júnior (Examinador)

Escola de Enfermagem e Farmácia - UFAL



Profa. Dr. Mario Roberto Meneghetti (Examinador)

Instituto de Química e Biotecnologia - UFAL