



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

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO E ANTIINFLAMATÓRIO DA
ALGA BENTÔNICA *Caulerpa racemosa* (Forssk.) J. Agardh
(CAULERPACEAE)**

Éverton Tenório de Souza

**Maceió – AL
2011**

ÉVERTON TENÓRIO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO E ANTIINFLAMATÓRIO DA
ALGA BENTÔNICA *Caulerpa racemosa* (Forssk.) J. Agardh (CAULERPACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Alagoas – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, como requisito a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde com área de concentração em Terapêutica Experimental pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

**Orientadora: Profa. Dra. Magna Suzana
Alexandre Moreira**

**Maceió – AL
2011**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Helena Cristina Pimentel do Vale

- S729a Souza, Éverton Tenório.
 Avaliação do potencial antinociceptivo e antiinflamatório da alga bentônica
 Caulerpa racemosa (Forssk.) J. Agardh (Caulerpaceae) / Éverton Tenório Souza.
 – 2011.
 113 f. : il.
- Orientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.
 Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de
 Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2011
- Bibliografia: f. 91-113.
1. *Caulerpa racemosa*. 2. Grampo-do-mar. 3. Caulerpina. 4. Algas marinhas.
 5. Antinociceptiva. 6. Antiinflamatória. 7. COX. I. Título.

CDU: 615.32

“Fazer a DISSERTAÇÃO significa não apenas dominar parte do conteúdo relacionado ao assunto, mas também ter humildade e disponibilidade para tentar, expor-se, reconhecer seus erros, poder recomeçar, saber modificar, experimentar e observar. Significa aprender a valorizar as nossas conquistas e os apoios diversos que recebemos. Quando estamos realmente abertos ao maior autoconhecimento, podemos aproveitar as lições recebidas, pois elas são muito reveladoras. Serão parciais, é verdade, mas descobriremos que somos capazes de suportar conhecer as nossas limitações, conviver com elas ou procurar reduzi-las.”

DEDICO ...

Aos meus PAIS, Gleice e Valter, e aos meus irmãos, Emmerson e Hermanne, que sempre me amaram, incentivaram e proporcionaram, mesmo na ausência do dia-a-dia, tranquilidade e equilíbrio emocional para que eu pudesse lutar pelos meus ideais com dignidade.

Não existem palavras para expressar todo o meu amor e minha admiração, que muitas vezes fizeram de suas vidas a minha vida! A eles o meu eterno AMOR e gratidão!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus familiares

Agradeço de maneira especial a minha madrinha Cida por sempre acreditar em mim, por cada gesto, palavra de carinho, amor, apoio, confiança, otimismo, cuidado que foram importantes para fazer de cada obstáculo um aprendizado, dos desafios, a vontade de vencer.

A minha orientadora

Agradeço a Professora Magna Suzana Alexandre Moreira, que na sua generosidade concedeu-me a oportunidade de fazer ciência. Será sempre um exemplo de dedicação à atividade profissional! Pela atenção e pelos ensinamentos no meu dia-a-dia que conduziram o trabalho de maneira sensata e responsável, tornando-se muito gratificante. Deixo o laboratório com a certeza que todas as oportunidades a mim concedidas jamais serão esquecidas. E ainda, o aprendizado colhido destas, será utilizado por toda minha vida.

Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por me dar forças para seguir sempre em frente.

As minhas cunhadas Ligia Maria Teixeira e Gilmaria Souza por todo apoio e torcida em todas as etapas da minha vida... Sei que sempre torceram por mim... e claro, ao meu sobrinho e minha sobrinha/afilhada, Gabriel Tenório e Letícia Tenório, por todos os momentos de alegria e descontração. AMO TODOS VOCÊS!!!

Aos membros do Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI), pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos e pelo acolhimento: Aline Queiroz, Thays Matos, Luiz Henrique Agra, Carol Britto, Gabriella Muniz, Anne Priscilla Porfírio, Mariana, Yolanda Karla Cupertino, Eliane Mella, Morgana, Débora, Angélica, Walfrido Bispo e Amuzza;

A todos os meus queridos amigos, que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento desse trabalho, em especial: Aline Queiroz, Carol Britto, Luiz Henrique Agra e Yolanda Karla Cupertino;

À minha amiga Ana Rosa por toda força e atenção! Muito Obrigado por todos os momentos que passamos juntos e ainda vamos passar;

À minha amiga Olga por sempre acreditar em mim e torcer pelas minhas conquistas;

Aos meus queridos amigos Evandro Lira (irmão que Deus me permitiu escolher) e João Carlos, pelas “brigas”, ajudas, paciência, dedicação... Vocês são DEMAIS!

Às minhas amigas do coração: Sofia, amiga e colega do mestrado. Agradeço a ti amiga pelo teu companheirismo, pelos momentos de felicidade, descontração e até mesmo pelas lágrimas compartilhadas durante este período. Obrigado por estar sempre presente e por fazer com que a saudade de casa não seja tão grande! Não sei como seria se tu não estivesses aqui comigo...

Andrea, amiga que conheci através de Sofia. Muito obrigada pela amizade, lealdade e companheirismo em todos os momentos desta etapa. Não foi por acaso que tu te tornaste esta pessoa tão especial em minha vida. Ainda temos muito que nos divertir, chorar de tanto rir e

até mesmo quando estivermos tristes. Obrigada pela tua amizade verdadeira e por tornar meus dias mais felizes!

À Ana Clara, Alda Line e Carol, por estar sempre me apoiando, pelas palavras de incentivo e conforto em todos os momentos. Vocês são pessoas iluminadas. Agradeço a Deus por vocês fazerem parte da minha vida, por serem ESSENCIAIS. Muito obrigado!

As minhas primas que amo tanto: Rayssa Tenório, Rafaella Tenório, Ranyella Tenório e Emanuella Tenório, vocês são presentes de Deus na minha vida... Amo vocês!!!

A minha tia e madrinha Cristine Márcia, a minha tia Karinne Tenório e a minha avó Andreza Tenório que sempre torceram por mim e estiveram presente na minha vida;

A uma pessoa muito especial que fez parte da minha vida e que me deu forças para seguir em frente, apesar de muitas vezes não entender certas situações. Murilo Augusto muito obrigado pelo teu apoio, compreensão e todo carinho durante grande parte desta jornada.

Ao meu amigo Jairo Kleber que também sempre me apoiou e ouviu... nos meus estresses... nas chatices... nas brigas... estive ao meu lado nessa jornada... ajudando da sua forma... Obrigado por tudo!

À professora Dra. Bárbara Viviana dos Santos, ao professor Dr. José Maria Barbosa Filho, a professora Dra. Maria Célia Chaves e ao seu aluno Vitor Lorenzo (todos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros), ao professor Dr. George Emmanuel C. de Miranda (Laboratório de Algas Marinhas – LAM, Departamento de Sistemática e Ecologia), todos da Universidade Federal da Paraíba – UFPB.

A todos os professores da Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pela grandiosa contribuição na minha formação acadêmica.

A todos os colegas da turma de mestrado, pela união, companherismo, desafios e alegrias compartilhadas, especialmente, a Sofia Kelly, Cheila, Danielma, Larissa, Rodrigo, Luana;

A todos os meus amigos de Igaci-AL que sempre torceram pelo meu sucesso... em especial ao meu amigo-irmão Jefferson... Muito obrigado por cada palavra...

As minhas amigas Ivone e Iolanda que sempre acreditaram em mim;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para este trabalho e também a todos que passaram de alguma forma por minha vida durante este período.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

SOUZA, E.T. **Avaliação do potencial antinociceptivo e antiinflamatório da alga bentônica *Caulerpa racemosa* (Forssk.) J. Agardh (Caulerpaceae).** 2011. 125 f. (Mestrado em Ciências da Saúde) Universidade Federal de Alagoas, 2011.

RESUMO

Caulerpa racemosa pertence à família Caulerpaceae, conhecida no Nordeste brasileiro como grampo-do-mar ou caviar-verde e é amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais. Neste trabalho, buscou-se investigar a atividade antinociceptiva e antiinflamatória do extrato metanólico bruto (EMB), das fases clorofórmica, acetato de etila, n-butanólica e de um alcaloide isolado (caulerpina) da alga *Caulerpa racemosa*. Os experimentos foram realizados em camundongos Swiss (n=6) usando modelos de nocicepção e inflamação. Para caracterizar o mecanismo de ação da caulerpina responsável por sua ação antinociceptiva e antiinflamatória foi utilizado o ensaio de inibição de COX *in vitro*. O EMB, as fases clorofórmica, acetato de etila, n-butanólica (100 mg/kg, v.o) e o alcaloide caulerpina (100 µmol/kg, v.o) reduziram a nocicepção produzida por ácido acético em 76,9%, 70,5%, 76,1%, 47,4% e 78%, respectivamente. Os dados mostram que, no teste de contorção a DI₅₀ calculada da caulerpina foi de 0,24 µmol/kg, e da dipirona, fármaco padrão, 0,12 µmol/kg. A caulerpina e a dipirona apresentaram potência e eficácia equivalentes, visto que atingiram eficácia máxima e DI₅₀ na mesma ordem de grandeza (µmol/kg). Na fase neurogênica do teste de formalina, o tratamento com o EMB, com a fase clorofórmica, fase n-butanólica e caulerpina reduziram a nocicepção gerada pela aplicação de formalina com uma porcentagem de inibição de 51,8%, 31,5%, 36,1% e 31,8%, respectivamente. Apenas a fase de acetato não promoveu inibição da resposta nesta fase. Por outro lado, quando avaliamos a fase inflamatória, a fase acetato mostrou-se a mais ativa, com inibição de 74,9%, seguido da indometacina e caulerpina com 49,7% e 45,4% de inibição, respectivamente. No teste de placa quente o tratamento com as fases clorofórmica, acetato de etila e caulerpina aumentaram de forma estatisticamente significativa o tempo de latência do animal sobre a placa nos tempos de 150, 90-120 e 90-150, respectivamente. Estes resultados sugerem que essas fases e a caulerpina apresentam uma atividade antinociceptiva central, sem alterar a atividade motora, observado no teste de “rota rod”. Além disso, a caulerpina foi capaz de inibir significativamente o edema de orelha induzido por capsaicina em 55,8%, apresentando uma atividade antiinflamatória no teste de peritonite induzida por carragenina, inibindo significativamente o recrutamento celular em 48,3%. Na contagem diferencial de leucócitos para confirmar a atividade da caulerpina no recrutamento celular observou-se uma inibição de forma efetiva da mobilização celular de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) e um aumento de monócitos quando comparados ao controle tratado apenas com carragenina. Além disso, a caulerpina foi capaz de inibir, significativamente COX-1, com um perfil de inibição parecido com o observado para indometacina na concentração de 0,2 µM. Estes resultados inferem que o EMB, as fases e a caulerpina apresentam atividade antinociceptiva, a caulerpina apresenta atividade antiinflamatória como demonstrado nos ensaios de peritonite e edema de orelha e seu mecanismo de ação é via inibição de COX-1.

Palavras-chave: *Caulerpa racemosa*. Caulerpina. Algas marinhas. Antinociceptiva. Antiinflamatória. COX.

SOUZA, E.T. Evaluation of the potential antinociceptive and antiinflammatory of the benthic alga *Caulerpa racemosa* (Forssk.) J. Agardh (Caulerpacaeae). 2011. 125 f. (Mestrado em Ciências da Saúde) Universidade Federal de Alagoas, 2011.

ABSTRACT

Caulerpa racemosa Caulerpacaeae belongs to the family, known as the Brazilian Northeast as grampo-do-mar or caviar-verde and is widely distributed in tropical and subtropical regions. In this study, we attempted to investigate the antinociceptive and anti-inflammatory actions of crude methanol extract (CME), phases chloroform, ethyl acetate, n-butanol and an alkaloid isolated from *Caulerpa racemosa*. The experiments were conducted on Swiss mice (n = 6) using models of nociception and inflammation. To characterize the mechanism responsible for these antinociceptive and antiinflammatory actions of caulerpin, COX inhibitor screening assay kit *in vitro*. The CME, the phases chloroform, ethyl acetate, n-butanol (100 mg/kg, p.o.) and alkaloid caulerpin (100 µmol/kg, p.o.) reduced the nociception produced by acetic acid in 76.9%, 70.5%, 76.1 %, 47.4% and 78%, respectively. The data show that in the writhing test caulerpin calculated ID₅₀ was 0.24 µmol/kg, and dipyrone, drug standard, 0.12 µmol/kg. The caulerpin and dipyrone showed equivalent potency and efficacy, given that reached maximum efficiency and ID₅₀ in the same order of magnitude (µmol/kg). In the neurogenic phase of the formalin test, treatment with CME, with the phase of chloroform, n-butanol phase and caulerpin reduced nociception generated by the application of formalin, with an inhibition percentage of 51.8%, 31.5% 36.1% and 31.8% respectively. Just a phase acetate didn't promote inhibition of response at this phase. On the other hand, when we evaluate the inflammatory phase, the phase acetate proved to be the most active, with inhibition of 74.9%, followed by indomethacin and caulerpin with 49.7% and 45.4% inhibition, respectively. In the hot plate test the treatment with phases chloroform, ethyl acetate and caulerpin has significantly increased the latency of the animal on the plate in times of 150, 90-120 and 90-150, respectively. This results suggests that these phases and caulerpin exhibits a central antinociceptive activity, without changing the motor activity (seen in the rotarod test). In addition, caulerpin was able to significantly inhibit capsaicin-induced ear edema in 55.8%, an anti-inflammatory activity in the test of carrageenan-induced peritonitis, significantly inhibiting the number of recruit cells in 48.3%. In the leukocyte count to confirm the activity of caulerpin cell recruitment observed an inhibition effectively mobilizing cellular polymorphonuclear leukocytes (neutrophils) and an increase in monocytes compared to control treated only with carrageenan. In addition, caulerpin was able to inhibit COX-1 significantly, with an inhibition profile similar to that observed for indomethacin at a concentration of 0.2 µM. These results infer that the CME, the phases and caulerpin have antinociceptive activity, the caulerpin features antiinflammatory activity as demonstrated in the experimental peritonitis and ear edema and its mechanism of action is via inhibition of COX-1.

Keywords: *Caulerpa racemosa*. Caulerpin. Antinociceptive. Antiinflammatory. Seaweeds. COX.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama esquemático do mecanismo de transmissão e percepção da dor.....	10
Figura 2: Ilustração das etapas do recrutamento leucocitário no processo inflamatório, mostrando participação de quimiocinas e moléculas de adesão.....	12
Figura 3: Biossíntese dos produtos do ácido araquidônico.....	16
Figura 4: Distribuição do gênero <i>Caulerpa</i> no mundo.....	32
Figura 5: Imagens das espécies de <i>C. cupressoides</i> (A), <i>C. mexicana</i> (B), <i>C. sertularioides</i> (C) e <i>C. racemosa</i> (D).....	33
Figura 6: <i>Caulerpa racemosa</i> em hábitat.....	37
Figura 7: <i>Caulerpa racemosa</i> inteira.....	37
Figura 8: Râmulo de <i>Caulerpa racemosa</i>	38
Figura 9: Estrutura química do alcaloide caulerpina.....	40
Figura 10: Esquematização da etapa de biossíntese de PG do ensaio de avaliação da atividade inibitória de COX.....	65
Figura 11: Esquematização da placa de imunoensaio utilizada para realização do ensaio de avaliação da inibição de COX.....	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Fármacos de origem marinha atualmente comercializados.....	24
Quadro 2: Organismos marinhos com atividades antitumorais, citotóxicas, antivirais e promotoras de tumor.....	28
Quadro 3: Distribuição dos pigmentos e produto de reserva nas diferentes divisões de algas.....	30
Quadro 4: Classificação Taxonômica do gênero <i>Caulerpa</i>	32
Quadro 5: Estruturas químicas de compostos isolados de espécies do gênero <i>Caulerpa</i>	35
Quadro 6: Compostos identificados na espécie <i>Caulerpa racemosa</i>	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade antinociceptiva do EMB, das fases clorofórmica, acetato de etila, n-butanólica (todos na dose de 100 mg/kg, v.o.), caulerpina e indometacina (ambos na dose de 100 µmol/kg, i.p.) no teste de formalina (fase neurogênica e fase inflamatória).....	53
Tabela 2: Efeito das fases clorofórmica, n-butanólica, acetato de etila (todos na dose de 100 mg/kg, v.o.), caulerpina (100 µmol/kg, v.o) e morfina (15 µmol/kg, s.c.) no ensaio da placa quente.....	54
Tabela 3: Efeito da caulerpina (100 µmol/kg, v.o) e diazepam (35,1 µmol/kg, i.p) no teste de “rota rod”	56
Tabela 4: Efeito do tratamento da caulerpina e indometacina (ambos na dose de 100 µmol/kg, v.o) no recrutamento de células.....	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Distribuição dos táxons de algas no litoral brasileiro.....	31
Gráfico 2: Compostos químicos identificados no gênero <i>Caulerpa</i> agrupados por classe.....	37
Gráfico 3: Efeito antinociceptivo do EMB, das fases clorofórmica, acetato de etila, n-butanólica (todos na dose de 100 mg/kg, v.o), caulerpina e dipirona (ambos na dose de 100 µmol/kg, v.o) no ensaio de contorções abdominais induzido por ácido acético.....	49
Gráfico 4: Curva dose-resposta da dipirona e caulerpina em ensaio de nocicepção induzida por ácido acético (0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 µmol/kg, v.o) em camundongos.....	50
Gráfico 5: Perfil antiinflamatório da caulerpina e indometacina (ambos na dose de 100 µmol/kg, v.o) no ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina.....	56
Gráfico 6: Atividade antiinflamatória da caulerpina e indometacina (ambos na dose de 100 µmol/kg, i.p) no ensaio de peritonite induzida por carragenina.....	58
Gráfico 7: Inibição <i>in vitro</i> das enzimas COX-1/COX-2 ovinas por Caulerpina e Indometacina, ambas na concentração de 0,2 µM.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HPETE	Ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico
5-LOX	5-lipoxigenase
5-HT _{1A}	Receptor 5-HT _{1A} de serotonina
5-HT ₂	Receptor 5-HT ₂ de serotonina
5-HT ₃	Receptor 5-HT ₃ de serotonina
AcOEt	Acetato
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AINEs	Antiinflamatórios não esteroidais
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ASICs	Canais iônicos sensíveis à ácido
CB	Receptor canabinoide
CCK	Colecistocinina
CGRP	Peptídeo relacionado ao gen da calcitonina
CME	Componentes da matriz extracelular
COX	Cicloxigenase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EM	Espectrofotômetro de Massa
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERG	Resposta de glicocorticoides
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Fr	Fração
GABA	Ácido gama aminobutírico
H	Receptor de histamina
H ₂ O	Água
Hex	Hexano
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Sintase do Óxido Nítrico induzível

LaFI	Laboratório de Farmacologia e Imunidade
LPS	Lipopolissacaridio
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
MeOH	Metanol
NADPH	<i>Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato</i> reduzida
NAPRALERT	Natural Products Alert
NF-κB	Fator Nuclear de Transcrição Kappa B
NGF	Fator de crescimento do nervo
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NO	Óxido nítrico
PAF	Fator de agregação das plaquetas
PG	Prostaglandina
PGHS	Prostaglandina H sintase
PKC	Proteína cinase C
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
RG	Receptor de glicocorticóide
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SARCA	Laboratório Silva Araújo Roussel S. A.
SNC	Sistema nervoso central
STX	Saxitoxina
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TX	Tramboxano
TRP	Potencial receptor transiente
TRPV1	Potencial receptor transiente vaniloide 1
TTX	Tetrodotoxina
UV	Ultravioleta
v.i.	Via de administração intravenosa
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
VR1	Receptor vaniloide 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 JUSTIFICATIVA.....	22
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Geral	24
3.2 Objetivos Específicos.....	24
4 REVISÃO DA LITERATURA.....	25
4.1 Considerações sobre dor e nocicepção	25
4.2 Aspectos da inflamação e da dor	28
4.3 Considerações sobre fármacos analgésicos e antiinflamatórios	35
4.4 Considerações sobre a importância dos produtos naturais marinhos	40
4.4.1 Considerações Gerais Sobre Algas.....	47
4.5 Considerações sobre a Família Caulerpáceae o gênero <i>Caulerpa</i> (J. V. Lamour)	49
4.6 Levantamento químico e farmacológico do gênero <i>Caulerpa</i> J.V. Lamour.	52
4.7 Considerações Sobre a Espécie <i>Caulerpa racemosa</i> (Forssk.) J. Agardh.....	55
4.8 Caulerpina.....	57
5 MATERIAL E MÉTODOS	59
5.1 Coleta e processamento do material botânico.....	59
5.1.1 Obtenção do Extrato Metanólico Bruto (EMB), das fases e caulerpina	59
5.2 Triagem farmacológica	60
5.3 Ensaios farmacológicos	61
5.3.1 Animais	61
5.3.2 Reagentes, soluções e fármacos utilizados	61
5.3.3 Ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	61
5.3.4 Ensaio de nocicepção induzida por Formalina	62
5.3.5 Ensaio da Placa Quente	62
5.3.6 Teste de “Rota rod”	63
5.3.7 Edema de orelha induzido por capsaicina.....	63
5.3.8 Ensaio de peritonite induzida por carragenina.....	64
5.3.9 Ensaio de inibição de COX in vitro.....	64
5.3.9.1 Biossíntese de prostaglandina.....	65
5.3.9.2 Ensaio imunoenzimático	66
5.4 Análise Estatística.....	66

6 RESULTADOS	67
6.1 Efeito antinociceptivo do EMB, das fases clorofórmica, acetato de etila, n-butanólica, caulerpina e dipirona no ensaio de contorções abdominais induzido por ácido acético	67
6.2 Atividade antinociceptiva do EMB, das fases clorofórmica, acetato de etila, n-butanólica, caulerpina e indometacina no teste de formalina	70
6.3 Efeito das fases clorofórmica, n-butanólica, acetato de etila, caulerpina e morfina no ensaio da placa quente	70
6.4 Efeito da caulerpina e do diazepam no teste de “rota rod”	74
6.5 Perfil antiinflamatório da caulerpina e da indometacina no ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina	74
6.6 Atividade antiinflamatória da caulerpina e indometacina no ensaio de peritonite induzida por carragenina	76
6.7 Inibição <i>in vitro</i> das enzimas COX-1/COX ovinas por caulerpina e Indometacina.....	76
7 DISCUSSÃO	79
8 CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS	91

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização. A grande investigação por produtos naturais oriundos do reino vegetal resultou em grande evolução na aplicação destes insumos, contribuindo com a melhoria da saúde humana (Newman e Cragg, 2007). No entanto, apesar da infinita diversidade vegetal e de todo seu potencial biológico agregado, novas fontes de produtos naturais vêm ganhando destaque nas últimas décadas (Clardy e Walsh, 2004). Neste contexto, o oceano – um macro ambiente equilibrado, auto-suficiente e relativamente pouco explorado – causou efeito profundo na química de produtos naturais. Este ambiente tornou-se alvo de pesquisas visando à descoberta de substâncias potencialmente bioativas para fins terapêuticos, dentre outros (Kossuga et al., 2007). Ainda, deve ser ressaltada a utilização de metabólitos marinhos nas indústrias alimentícia, inseticida e cosmética, o que justifica os esforços contínuos de profissionais nesta nova linha de pesquisa (Cardozo et al., 2007).

Sendo assim, os organismos marinhos representam uma valiosa fonte de novos compostos. A associação da biodiversidade do ambiente marinho e a diversidade química constituem um recurso praticamente ilimitado de novas substâncias ativas no domínio do desenvolvimento de produtos bioativos.

A farmacologia de produtos marinhos apresenta atualmente mais de 35.000 derivados marinhos provenientes de amostras biológicas, com cerca de 150 compostos tóxicos contra células tumorais (Arif et al., 2004). Também foi observado um grande aumento nos estudos sobre a farmacologia antiinflamatória dos compostos marinhos, como a astaxantina, bolina, quinona, cacospongionolida B, clatriol B, conicamina, cicloanfilecteno 2, elisabetadiona, placo hipaforina, ácido pirúvico A, B metilpiruvato, cadenolida C, petrocortina A, petrosespongiolida MR, pseudopterosina N, pseudopterosina R, seco-pseudopterosina E (Mayer et al., 2007).

No Brasil, a pesquisa de produtos naturais marinhos iniciou por volta de 1962, no Instituto de Pesquisa Agrícola do Rio de Janeiro. Posteriormente, órgãos federais como a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ começaram a desenvolver investigações científicas nesta área. Em 1976, após uma década de pesquisa em produtos naturais marinhos, os laboratórios farmacêuticos Silva Araújo Roussel S.A (SARSA) do Rio de Janeiro, formaram uma equipe multidisciplinar com químicos, biólogos e farmacologistas que durante 5 anos realizaram uma triagem de mais de

500 extratos de esponjas, anêmonas do mar, estrelas do mar e várias algas. Estudos brasileiros concentraram-se principalmente em invertebrados (Equinodermos, Celenterados, Poríferas, Tunicados e Moluscos) e em algas pardas, verdes e vermelhas. O estudo de 60 organismos diferentes levou ao isolamento de mais de 110 metabólitos identificados, como esteroides, diterpenos e sesquiterpenos, além de terpenos superiores, lipídios, derivados da dibromotirosina, etc (Kelecom, 1997).

Reconhecendo a importância destes produtos como fonte inigualável de diversidade estrutural de constituintes químicos das mais variadas classes, capaz de construir moléculas de alta complexidade estrutural, com absoluta quimio, regio e estereosseletividade como a riqueza da nossa flora marinha, o Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Professor Delby Fernandes de Medeiros da Universidade Federal da Paraíba através do projeto “Rede Interinstitucional de Algas Bentônicas” aprovado pelo Edital: MCT-CNPq/MS-SCTIE-DECIT/CT- Saúde – Nº 10/2006 juntamente com o Laboratório de Farmacologia e Imunidade/UFAL optou por buscar também nas algas, a possibilidade de descoberta de protótipos que poderão servir como candidatos a novos fármacos.

No Nordeste especialmente, são poucos os estudos efetuados com este propósito. Tendo em vista a disponibilidade e a diversidade da nossa biomassa, torna-se imperativo que estudos prospectivos sejam realizados, objetivando a identificação de potenciais compostos oriundos de macroalgas marinhas com atividade farmacológica. Mais de 2.400 produtos naturais têm sido isolados de algas, especialmente as rodofíceas (algas vermelhas), feofíceas (algas marrons ou marrom) e clorofíceas (algas verdes), onde a maioria delas, a partir de populações tropicais e subtropicais (Lee, 1989).

São reconhecidas várias divisões de algas destacando-se as Cyanobacteria, Glaucophyta, Euglenophyta, Cryptophyta, Haptophyta, Dinophyta (dinoflagelados), Ochrophyta (englobando as diatomáceas, algas pardas e outras), Rhodophyta (algas vermelhas) e Chlorophyta (algas verdes), as quais são classificadas segundo critérios químicos citológicos e morfológicos, de acordo com os tipos e as combinações de pigmentos fotossensibilizantes presentes, a natureza química das substâncias de reserva e das paredes celulares, a ausência ou a presença de flagelos, o padrão e o curso da mitose e da citocinese, a presença ou a ausência de membrana no retículo endoplasmático e o tipo e a complexidade de ciclo de vida (Lee, 1989; Hoeck, et al.,1997).

As algas verdes estão inseridas no filo Chlorophyta constituindo o maior e mais diversificado grupo de algas, tanto em nível de espécie, como também de padrões morfológicos, estruturais e reprodutivos (Oliveira-Carvalho et al., 2003). O filo encontra-se

representado por 17.000 espécies (Oliveira-Carvalho, 2008). Estas algas são extremamente abundantes nos ambientes aquáticos, onde é um dos mais importantes componentes do plâncton sendo responsáveis pela maior parte da produção de oxigênio molecular disponível no planeta a partir da fotossíntese. Habitando águas doces ou salgadas, solos úmidos ou troncos, estes organismos podem também estabelecer relações de mutualismo com outros seres vivos, como os fungos, formando os líquens (Vidotti; Rollemberg, 2004). As clorofíceas marinhas ocorrem, em sua maioria, em águas pouco profundas. No entanto, nos mares tropicais e subtropicais alguns de seus representantes são encontrados a profundidades em torno de 100 m. Algumas ordens são predominantemente marinhas, como Bryopsidales, dentre as quais se destacam o gênero *Caulerpa* que é característico da flora dos mares tropicais (Pereira et al., 2002).

As algas são importantes fontes biológicas de produtos naturais biologicamente ativos e estruturalmente incomuns, mas são poucos os estudos realizados com essa finalidade, principalmente no Brasil, então, a intenção deste estudo foi avaliar as propriedades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato metanólico bruto (EMB), das fases clorofórmica, acetato de etila, n-butanólica e um alcaloide isolado de *Caulerpa racemosa* (caulerpina) em modelos animais. Devido ao fato da fase clorofórmica ter apresentado maior rendimento, esta foi selecionada para fracionamento, utilizando coluna em sephadex LH-20, que levou ao isolamento e identificação do alcaloide de núcleo indólico, caulerpina. Testes farmacológicos também foram utilizados para verificar se este alcaloide apresenta atividade antinociceptiva e antiinflamatória, bem como para pesquisar seus prováveis mecanismos de ação.

2 JUSTIFICATIVA

Reconhecendo a importância das algas no que diz respeito à fonte de constituintes químicos das mais variadas classes, o potencial terapêutico de diversos compostos marinhos e a riqueza da nossa flora marinha, optou por buscar também nas algas, a possibilidade da descoberta de novo fármaco, ou protótipo, através da extração, isolamento e caracterização estrutural dos seus constituintes químicos, empregando para tanto, métodos extrativos, cromatográficos e espectrométricos respectivamente.

As algas macroscópicas (bentônicas) marinhas vêm despertando a atenção da comunidade científica pela grande potencialidade como produtoras de substâncias químicas de interesse médico-farmacológico (Mayer et al., 2005; Mayer et al., 2007). No entanto, no Brasil, em especial no nordeste, são poucos os estudos efetuados com este propósito. Tendo em vista a disponibilidade e a diversidade da nossa biomassa, torna-se imperativo que estudos prospectivos sejam realizados, objetivando a identificação de potenciais compostos oriundos de macroalgas marinhas com atividade farmacológica.

Dessa forma, em função do crescente interesse pelo estudo das algas, somados à relevância de um estudo que investigue de forma mais ampla seus efeitos sobre a resposta nociceptiva e inflamatória induzidas por diferentes estímulos, esta proposta vem contribuir para o conhecimento do potencial terapêutico de algas do gênero *Caulerpa*, podendo sugerir uma aplicabilidade biotecnológica para as mesmas como protótipo de fármaco alternativo com propriedades antiinflamatórias, analgésicas e imunomoduladoras para várias condições fisiológicas e patológicas.

Sendo assim, a realização desta dissertação, na utilização racional e científica de recursos da flora marinha, especialmente de espécies de *Caulerpa* do litoral paraibano através de trabalhos em colaboração com outras áreas científicas correlatas que possibilitem o estudo de espécies farmacologicamente ativas, justifica-se:

- para expandir os conhecimentos da flora marinha da região onde as coletas foram realizadas;
- pela obtenção de novos protótipos de fármacos oriundos de produtos naturais, fortalecendo dessa forma a infra-estrutura da instituição de pesquisa e dos grupos envolvidos na proposta;

- pelo fato de outras espécies do mesmo gênero apresentar atividade antinociceptiva e antiinflamatória, tais como: *Caulerpa cupressoides*, *Caulerpa mexicana*, *Caulerpa sertularioides*.
- pela espécie *Caulerpa racemosa* não apresentar estudos com a atividade antinociceptiva e antiinflamatória.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antinociceptivo e antiinflamatório do extrato metanólico bruto (EMB), das fases clorofórmica, acetato de etila, n-butanólica e do alcaloide isolado de *Caulerpa racemosa* (caulerpina) em camundongos contribuindo para o estudo desta alga.

3.2 Objetivos Específicos

- * Avaliar a atividade antinociceptiva do EMB, fases e caulerpina, obtidos a partir da alga marinha *C. racemosa* (Caulerpaceae) nos modelos de contorção abdominal induzida por ácido acético e nocicepção induzida por formalina;
- * Investigar uma possível ação antinociceptiva central no modelo de placa quente e “rota-rod”;
- * Investigar a atividade antiinflamatória, pelos métodos de edema de orelha induzido por capsaicina e migração celular induzida por carragenina da caulerpina;
- * Avaliar a atividade inibitória de COX-1/COX-2 *in vitro* da caulerpina.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Considerações sobre dor e nocicepção

Até meados da década de 60, no século passado, dor era considerada uma resposta sensorial inevitável à lesão tecidual. As outras dimensões da experiência dolorosa, como componente afetivo, cognitivo, diferenças genéticas e ansiedade, eram pouco estudadas (Gozzani, 2003).

O comitê de taxionomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 1986) conceitua a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, que é decorrente ou descrita em termos de lesões teciduais” (Tracey; Mantyh, 2007). A dor fisiológica é um reflexo protetor do organismo, para evitar uma injúria ou dano tecidual. Frente à lesão tecidual a dor patológica providenciará condições para a cicatrização. Uma vez instalada a injúria pode se introduzir o conceito de dor patológica que, segundo sua origem, pode ser classificada como nociceptiva (somática ou visceral) ou neuropática. A nocicepção é o componente fisiológico da dor e compreende os processos de transdução, transmissão e modulação do estímulo nociceptivo. Uma vez instalado o estímulo nociceptivo, diversas alterações neuroendócrinas acontecem, promovendo um estado de hiperexcitabilidade do sistema nervoso central (SNC) e periférico (Klaumann et al., 2008).

Entretanto, muitas vezes a dor manifesta-se mesmo na ausência de agressões teciduais vigentes, tal como ocorre em doentes com neuropatia periférica ou central e em certas afecções psicopatológicas (Mosso; Krugr, 1972). Em doentes com dor intensa ou prolongada ocorrem modificações anatômicas, eletrofisiológicas e neuroquímicas significativas das vias nervosas periféricas e dos núcleos e tratos implicados no processamento sensitivo. Há evidências de que estas modificações morfofuncionais estejam correlacionadas com a dor persistente (Waisbrod et. al., 1984). A dor é dividida em duas categorias principais: a dor aguda e a crônica, mas existe ainda a dor neuropática.

A dor aguda ou nociceptiva é um tipo de alerta rápido instruindo os neurônios motores do sistema nervoso central para minimizar detectados danos físicos. É mediada por nociceptores, em fibras A δ e C, facilitando a transmissão dolorosa e as alterações inflamatórias periféricas e, conseqüentemente, o quadro de hiperalgesia (Ribeiro et al., 2002; Kraychete et al., 2006). Estes nociceptores são terminações nervosas livres que finalizam logo abaixo da pele, nos tendões, articulações e nos órgãos do corpo. Eles servem para detectar a dor cutânea, dor somática e visceral. A nocicepção pode ser associada a danos nos nervos

causados pelo trauma, doenças como a diabetes, síndrome do intestino irritável, câncer em estágio tardio, ou os efeitos tóxicos da quimioterapia. Ela geralmente responde bem ao tratamento com opioides e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (Lamont; Tranquilli, 2000; Muir III et al., 2001).

A dor crônica, no entanto, não apresenta nenhuma função biológica, pois não é um sintoma de um processo de doença, mas é um processo da doença em si. Existem dois tipos de dor crônica: dor nociceptiva inflamatória e dor neuropática. Dor nociceptiva inflamatória está associada ao dano tecidual e ao processo inflamatório. É adaptativa na medida em que provoca reações fisiológicas que promovem cura (Lamont; Tranquilli, 2000; Muir III et al., 2001).

A dor neuropática é produzida por uma lesão dos neurônios do sistema nervoso periférico e central e envolve a sensibilização desses sistemas. Na sensibilização periférica, há um aumento na estimulação dos nociceptores periféricos que amplifica os sinais de dor no sistema nervoso central. Na sensibilização central, os neurônios que se originam no corno dorsal da medula espinhal se hiperestimulam, aumentando os sinais de dor ao cérebro, melhorando assim a sensação de dor. É mais comumente associado com alodinia e hiperalgesia crônica (Pisera, 2005; Schaible, 2006).

O componente fisiológico da dor é chamado nocicepção, que consiste dos processos de transdução, transmissão e modulação de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo externo. De forma simplificada, pode ser considerado como uma cadeia de três neurônios, com o neurônio de primeira ordem originado na periferia e projetando-se para a medula espinhal, o neurônio de segunda ordem ascende pela medula espinhal e o neurônio de terceira ordem projeta-se para o córtex cerebral (Messlinger, 1997; Tranquilli, 2004).

Os dois sistemas de modulação nociceptiva mais importantes são mediados por receptores NMDA (N-Metil-D-Aspartato) e opioides, distribuídos por toda extensão do SNC. O N-metil-D-aspartato é um receptor ionotrópico bastante complexo e depende da ação do glutamato. Representam um subgrupo de receptores opiáceos do tipo sigma que bloqueiam os reflexos nociceptivos espinais. Os receptores NMDA possuem um sítio alostérico de ligação para a glicina que deve ser ocupado para a abertura eficiente do canal e um sítio dentro do próprio canal ao qual se liga o íon magnésio de maneira dependente de voltagem. A dependência de voltagem positiva da condutância do canal e a alta permeabilidade de condutância ao íons cálcio são importantes na excitotoxicidade e plasticidade neuronal (Cochila; Alford, 1999; Liu et. al., 1997).

Entre os três principais subtipos de receptores opioides, os receptores μ e δ podem inibir ou potencializar eventos mediados pelos receptores NMDA, enquanto o receptor κ antagoniza a atividade mediada por receptores NMDA. (Riedel; Neeck, 2001). Ultimamente muitas moléculas de transdução da nocicepção tem sido identificadas e o maior grupo de detectores de estímulos nocivos é a família dos potenciais receptores transientes (TRPs) (Cheng; Ji, 2008, Patapoutian et. al., 2009). Esses canais participam na geração de sensações dolorosas evocadas por estímulos químicos, térmicos e mecânicos (Levine; Alessandri-Haber, 2007). O receptor de potencial transitório vaniloide 1 (TRPV1), originalmente chamado de receptor vaniloide 1 (VR1) e comumente referido como receptor da capsaicina, foi o primeiro descrito como receptor polimodal ativado por três estímulos dolorosos; compostos vaniloides (capsaicina, resiniferatoxina), calor nocivo ($> 43^{\circ}\text{C}$) e pH baixo ($< 5,9$) (Caterina; Julius, 2001, Tominaga, 2007).

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

Como mostrado na Figura 1, a lesão tecidual e liberação de mediadores químicos locais como substância P, histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas desencadeiam um processo de transmissão do estímulo doloroso até níveis centrais. Estes mediadores interagem com receptores específicos, levando a sensibilização ou ativação direta dos nociceptores periféricos, gerando assim potenciais de ação que culminam na liberação de neurotransmissores como substância P, L-glutamato, ácido gama aminobutírico (GABA), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), colecistocinina (CCK-8), somatostatina e peptídeo relacionado ao gen da calcitonina (CGRP), no corno dorsal da medula espinhal (Marcon, 2009).

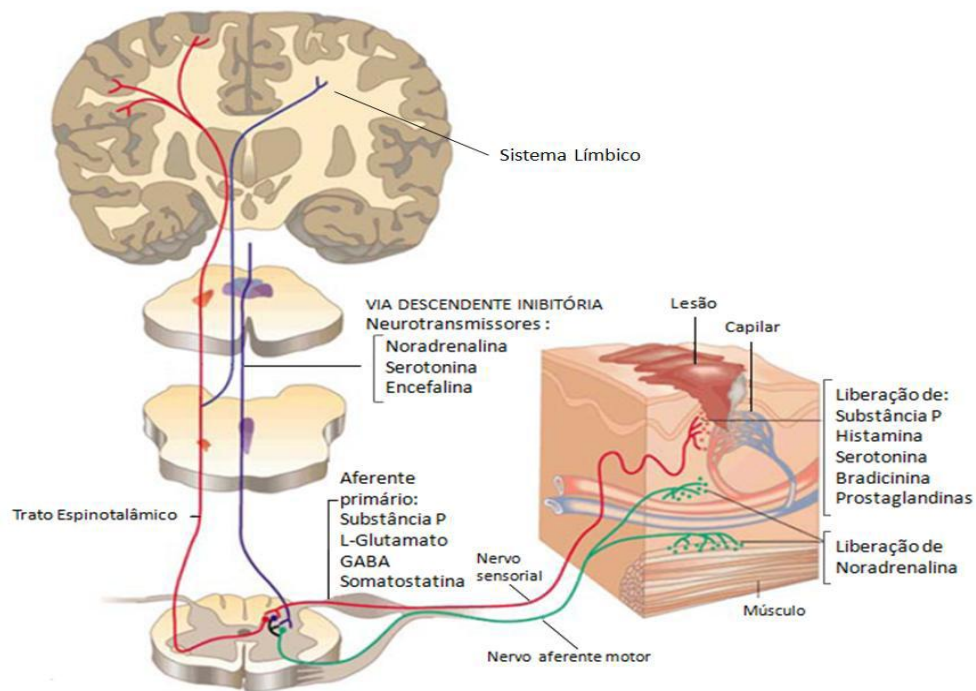


Figura 1: Diagrama esquemático do mecanismo de transmissão e percepção da dor. Adaptado de Marcon, 2009.

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

Um dos desafios para os pesquisadores e clínicos é que a dor crônica possa envolver uma mistura de ambos os componentes inflamatórios e neuropáticos, pois em dor nociceptiva inflamatória, a inflamação pode danificar os neurônios e produzir dor neuropática. Da mesma forma, a lesão neuronal pode causar uma reação inflamatória (inflamação neurogênica), que contribui para a dor inflamatória.

4.2 Aspectos da inflamação e da dor

A palavra inflamação é derivada do “estado de se estar inflamado”. Inflamar significa “colocar fogo” o que implica na cor vermelha, na possibilidade de aquecimento e na geração

de dor (Trowbridge; EmLing, 1996). Tal resposta inflamatória é um mecanismo benéfico e fisiológico pelo qual o organismo se defende contra infecções e tenta reparar danos teciduais ou perda de função (Lawrence et al., 2002). Dessa forma, o processo inflamatório agudo pode ser definido como um conjunto de alterações bioquímicas e celulares que ocorrem em resposta a estímulos inespecíficos, tais como infecções ou danos teciduais (Hansson, 2005). As reações inflamatórias locais caracterizam-se por aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, seguida de dilatação venular e acúmulo de células do processo inflamatório, caracterizando os quatro sinais típicos da presença de inflamação: rubor (hiperemia), tumor (edema), calor (aumento da temperatura local) e dor, como descritas por Cornelius Celsus, no início da era Cristã (Gilroy et al., 2004). O quinto sinal da inflamação, que é a perda da função do tecido ou órgão lesado, associado com reações crônicas foi descrito posteriormente por Virchow no século XIX (citado em Kalisch, 1975).

O calor e o rubor originam-se da abertura de novos capilares normalmente hipofuncionantes e aumento do fluxo sanguíneo para a região. O edema é gerado pelo aumento da permeabilidade vascular e pela infiltração leucocitária. A perda de função é a consequência do somatório de vários fatores, especialmente edema e dor. A dor inflamatória depende do acúmulo local de substâncias biológicas que atuam sobre as terminações nervosas (Montenegro; Fecchio, 2010).

As causas que levam à inflamação são inúmeras e de natureza variável. São reconhecidos os seguintes tipos de agentes que causam inflamação: agentes biológicos (como vírus, bactérias, protozoários); agentes químicos (como ácidos, terebentina, álcalis, formaldeído, carragenina); agentes físicos (como calor excessivo, radiação ultravioleta e ionizante, eletricidade, frio exagerado, traumatismos, fraturas, incisões) e agentes imunes (exposição a antígenos provocando ativação da resposta imunológica do hospedeiro) (Montenegro; Fecchio, 2010).

Os componentes básicos de um processo inflamatório envolvem eventos vasculares e celulares, mediadores derivados de células e da ativação plasmática, que produzem os sinais clássicos da inflamação descritos anteriormente. As alterações vasculares iniciam-se imediatamente e desenvolvem-se durante as primeiras horas após o estímulo inflamatório. Elas consistem em vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e exsudação de plasma (Williams et al., 1983). Em condições normais a microcirculação apresenta baixíssima permeabilidade a macromoléculas. As proteínas plasmáticas circulam muito lentamente entre sangue e tecidos e retornam ao sangue através dos vasos linfáticos. Esta situação muda dramaticamente durante o processo inflamatório. A

microcirculação torna-se permeável a macromoléculas e fluídos vindos do sangue, causando edema tecidual (Gilroy et al., 2004).

Os eventos celulares são marcados pela saída das células circulantes da luz do vaso e a migração de leucócitos para o sítio inflamatório. Esse fenômeno segue algumas fases como captura, rolamento dos leucócitos pelo endotélio, adesão firme e transmigração (Figura 2) (Munro, 1993; Springer, 1994; Wahl et al., 1996). Todas estas etapas do processo de migração leucocitária são dependentes da expressão pelos leucócitos e pelas células endoteliais de moléculas denominadas moléculas de adesão e de mediadores quimiotáticos (Springer, 1994; Weber, 2003). A mobilização adequada dos leucócitos circulantes para o sítio inflamado é fundamental para a defesa do organismo, já que estas células podem desenvolver suas ações de fagocitose e destruição de agentes patogênicos levando à resolução do processo. Os leucócitos circulantes migram seletivamente e em número significativo para o tecido inflamado no decorrer do processo. Em uma resposta inflamatória aguda, e logo nos estágios iniciais, há acúmulo predominante de neutrófilos, enquanto que as células mononucleares são observadas mais tardiamente durante a fase aguda, bem como nos processos crônicos. A migração de eosinófilos também pode ocorrer em processos inflamatórios, estando principalmente associada a processos alérgicos e infecções parasitárias. Algumas das células envolvidas já estão presentes no tecido afetado tais como: células endoteliais, células mesoteliais, mastócitos, eosinófilos, macrófagos e alguns linfócitos (Sibille; Reynolds, 1990; Sampson 2000; Broche; Tellado, 2001; Boyton; Openshaw, 2002).

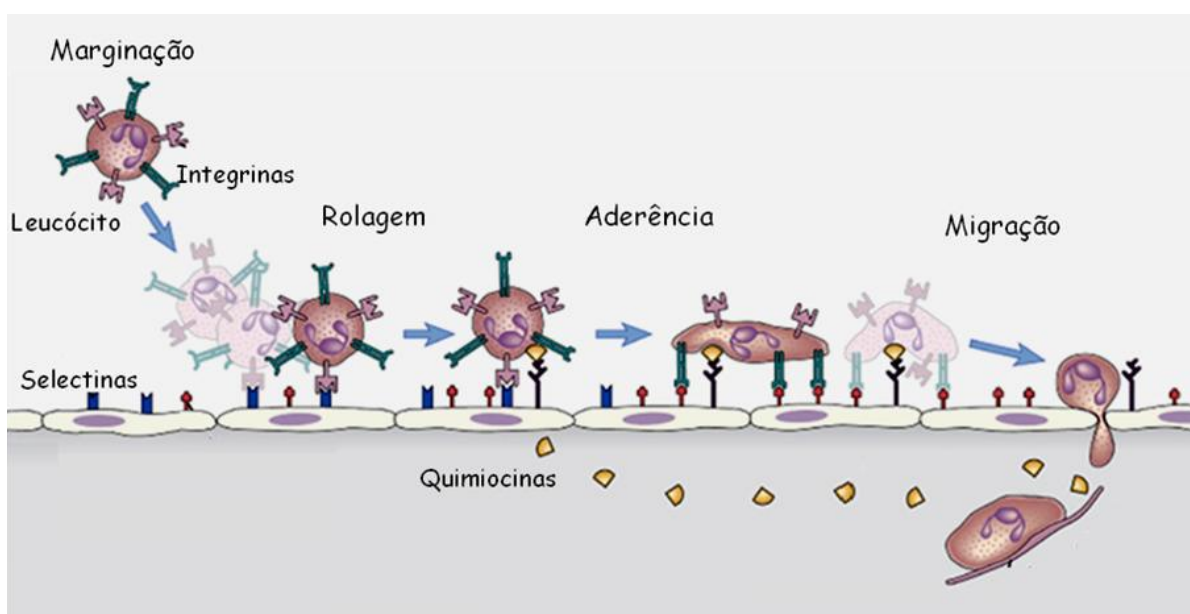


Figura 2: Ilustração das etapas do recrutamento leucocitário no processo inflamatório, mostrando participação de quimiocinas e moléculas de adesão (Adaptado de Abbas; Lichtman; Pillai, 2008)

A inflamação compreende três fases: a inflamação aguda, a resposta imune e a inflamação crônica. A inflamação aguda compreende a resposta inicial à lesão tecidual; mediada pela liberação de substâncias como histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos, e, em geral, precede o desenvolvimento da resposta imune. Elas se caracterizam pelo predomínio de fenômenos exsudativos consequentes das alterações da permeabilidade vascular, permitindo a formação do edema localizado, bem como o acúmulo de fibrina e leucócitos (Montenegro; Fecchio, 2010).

A resposta imune aparece quando as células imunologicamente competentes são ativadas em resposta a organismos estranhos ou substâncias antigênicas, as quais são liberadas durante a resposta inflamatória aguda ou crônica (Montenegro; Fecchio, 2010). Essa resposta exige imunidade inata e, em alguns casos, uma resposta imune adaptativa, que são os dois principais componentes integrantes do sistema de defesa do hospedeiro. A imunidade inata não só atua como primeira linha de defesa contra injúria, mas após o reconhecimento de um estímulo adequado, fornece os sinais necessários para instruir o sistema imune adaptativo para desenvolver uma resposta que tende a limitar os efeitos da agressão (Lawrence et al., 2002).

A resposta inflamatória aguda termina quando a homeostase é restabelecida, após eliminação do estímulo nocivo. No entanto, quando o fator de risco continua a existir, a inflamação aguda deixa de ser um evento benéfico e evolui para inflamação crônica (Lawrence et al., 2002; Schmid-Schönbein, 2006; Wu e Wu, 2007; Kielland; Carlsen, 2010).

A inflamação crônica envolve a liberação de diversos mediadores que não são proeminentes na resposta imune, e podemos citar o interferon e interleucinas. Nas inflamações crônicas, além dos fenômenos exsudativos, estão presentes os fenômenos produtivos, que consistem na proliferação de vasos e fibroblastos, como também na migração e proliferação de monócitos e linfócitos (Silva et al., 2002).

Além da dor derivada do processo inflamatório, podemos citar outros tipos de dor como nociceptiva, neurogênica e a neuropática (Millan, 1999). Além disso, outras manifestações dolorosas como a hiperalgesia (sensibilidade exacerbada à um estímulo doloroso) ou a alodínia (dor em resposta à um estímulo não doloroso), são frequentes em pacientes acometidos de dor. Em termos de duração, a dor pode ser aguda ou crônica. A dor aguda está associada com uma lesão tecidual recente, ativação de nociceptores e pode desaparecer até mesmo antes da cura do dano tecidual (Carr; Goudas, 1999; Park; Vasko, 2005). Por outro lado, a dor crônica pode se perpetuar por meses ou anos, se caracteriza em relação à persistência e alterações adaptativas, o que muitas vezes dificulta o tratamento (Iadarola; Caudle, 1997; Besson, 1999).

A percepção dolorosa a um determinado estímulo nocivo tem como propósito biológico alertar o organismo sobre algum perigo no ambiente, incluindo a resposta comportamental de proteger o organismo contra uma possível lesão (Cheng et al., 2008). A transmissão da dor envolve uma interação complexa de estruturas centrais e periféricas desde a pele, vísceras ou outros tecidos até o córtex cerebral (Furst, 1999). Os estímulos nocivos tais como calor, frio, compressão intensa ou substâncias químicas endógenas ou exógenas potencialmente nocivas, ativam as terminações nervosas livres e periféricas de fibras aferentes sensoriais delgadas do tipo C e A δ , chamadas de nociceptores. Estas fibras são formadas por neurônios cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios da raiz dorsal (DRG) e trigeminal, e são responsáveis pela condução das informações nociceptivas até o corno dorsal da medula espinhal e o núcleo trigeminal pars caudalis na ponte, respectivamente (Dray; Perkins, 1997; Russo; Brose, 1998; Besson, 1999, Park; Vasko, 2005). Imediatamente, um reflexo mediado pela medula espinhal é desencadeado no intuito de remover a região do corpo ameaçada (Watkins; Maier, 2002). Nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal, as terminações dos nociceptores liberam vários neurotransmissores que estimulam neurônios de segunda ordem. Estes neurônios formam vias que irão distribuir informações para circuitos cerebrais responsáveis pela produção das sensações dolorosas (Craig, 2003; Hunt; Mantyh, 2001; Park; Vasko, 2005).

Embora diversos mecanismos moleculares envolvidos na sensibilização central tenham sido estabelecidos recentemente, aqueles responsáveis pela sensibilização periférica ainda não foram completamente elucidados. Entretanto, o conhecimento da biologia molecular acerca dos diversos receptores e vias transduccionais envolvidos na gênese da nocicepção permitiram um extraordinário progresso no entendimento do mecanismo de ação de diversos neurotransmissores e, conseqüentemente, de fármacos que atuam na modulação central e periférica da nocicepção. Os mecanismos envolvidos na transdução neuroquímica da dor geralmente envolvem a interação dos mediadores inflamatórios e/ou nociceptivos com canais iônicos operados por receptor, receptores associados à tirosina quinase, ou com receptores acoplados a proteínas G (Rang et al., 1994; Levine; Taiwo, 1994; Wood; Docherty, 1997; Millan, 1999; Park; Vasko, 2005).

Esses mediadores são substâncias formadas e liberadas, concomitante ou sequencialmente após o estímulo desencadeador do processo inflamatório, ocorrendo à liberação dos mesmos, que podem originar-se do plasma, das células ou dos tecidos lesionados. Essas substâncias estão envolvidas na geração e manutenção dos eventos característicos da reação inflamatória e interagem com receptores específicos nas células-

alvos podendo, inclusive, estimular a liberação de outros mediadores (Zhou et al., 2007, Medzhitov, 2010). Quando liberados por macrófagos, mastócitos, células endoteliais ou nervos traumatizados, ativam as fibras nervosas tipos A δ e C, facilitando a transmissão dolorosa e as alterações inflamatórias periféricas (Kraychete et. al., 2006). Dentre os mediadores da inflamação (também denominados algogênicos), encontram-se as aminas vasoativas (histamina e serotonina); proteases plasmáticas (sistema de cinina – bradicinina, sistema do complemento); eicosanoides; proteases lisossômicas; fatores ativadores das plaquetas (PAF); quimiocinas, citocinas, óxido nítrico dentre muitos outros (Kumar et al., 2005; Albertine et al., 2004). Cada mediador com seu papel específico, atuando em estágios definidos da reação inflamatória (De Paola, 1988).

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

Através de estímulos mecânicos, químicos, físicos ou através de outros mediadores, como a bradicinina, os fosfolipídios de membranas liberam o ácido araquidônico, a partir da ativação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂). O ácido araquidônico (AA) livre pode ser metabolizado por duas vias enzimáticas diferentes: (1) a via da ciclooxigenase, na qual produz as prostaglandinas (PG) e os tromboxanos (TX) e (2) a via da lipoxigenase, que dá início à síntese de leucotrienos e outros compostos. A ciclooxigenase é uma enzima bifuncional, com atividades distintas: a ação principal catalisa a ciclização oxidativa do ácido araquidônico, produzindo a PGG₂ e a ação da prostaglandina G/H sintase converte PGG₂ em PGH₂. A PGH₂ é então metabolizada por isomerases específicas, originando PGE₂, prostaciclina (PGI₂), TXA₂, PGD₂ e PGF₂. Porém, essas etapas subsequentes do metabolismo do ácido araquidônico diferem entre as células. Nas plaquetas, induzem a síntese do TXA₂, no endotélio vascular, à síntese da PGI₂, nos macrófagos, principalmente à síntese da PGE₂ e nos mastócitos a síntese de PGD₂ (Figura 3) (Safayhi, 1997; Fitzgerald, 2003).

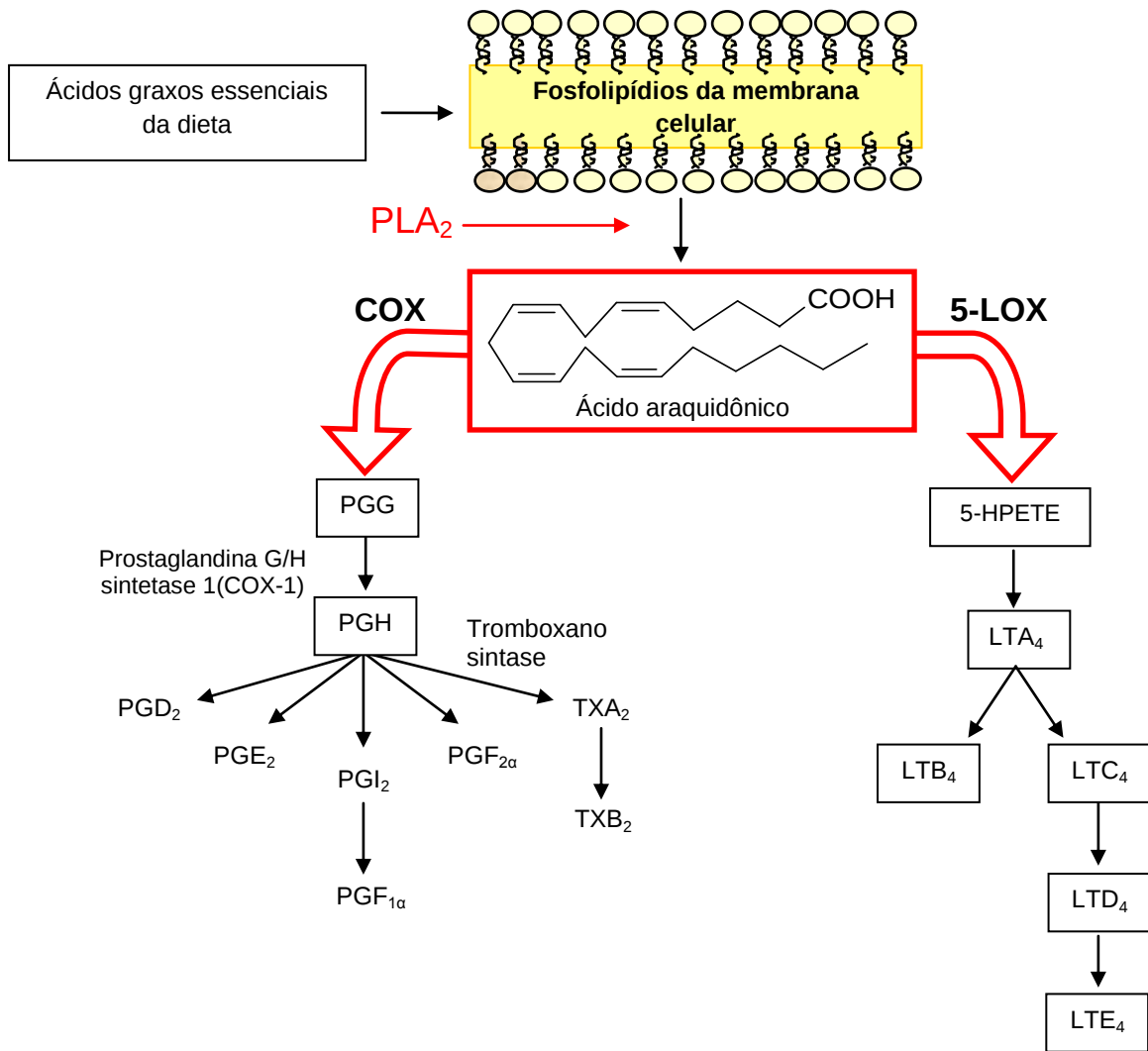


Figura 3. Biossíntese dos produtos do ácido araquidônico. Adaptado de Biningham *et al.*, 2006; Werz e Steinhilber, 2006.

A resposta inflamatória é acompanhada da liberação de eicosanoides que estão presentes nesses locais, destacando-se a PGE₂ e PGI₂. Em áreas de inflamação aguda, a PGE₂ e PGI₂ são geradas pelos tecidos e vasos sanguíneos locais, e a PGD₂ pelos mastócitos. Em inflamações crônicas, as células da série monócito-macrófago também liberam PGE₂ (Simmons *et al.*, 2004; Botting, 2006).

Os eicosanoides estimulam algumas respostas da seguinte maneira: as PGE₂, PGI₂ e PDG₂, são potentes vasodilatadores, e agem sinergicamente com outras substâncias vasoativas como a bradicinina e a histamina. Essa ação contribui para a formação do eritema e aumento do fluxo sanguíneo em áreas de inflamação aguda. As prostaglandinas da série E também são responsáveis pela indução de febre, sendo encontradas concentrações elevadas

em infecções, com evidências de que o aumento na temperatura induzido por agentes endógenos seja mediado pela PGE2 (Simmons et al., 2004).

4.3 Considerações sobre fármacos analgésicos e antiinflamatórios

Inúmeros analgésicos periféricos podem apresentar, além da atividade analgésica, propriedades antiinflamatória, antipirética e antiagregante plaquetária, sendo denominados como agentes antiinflamatórios, pois agem no processo de redução da reação inflamatória por inibirem a liberação de prostaglandinas, atuando em etapas pré-estabelecidas na via do ácido araquidônico (Rang et al., 2007; Goodman; Gilman, 2007). Os principais agentes antiinflamatórios são representados pelos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) e glicocorticoides (Rang et al., 2007).

Atualmente, vários medicamentos encontram-se disponíveis para uso clínico como analgésicos e/ou antiinflamatórios, como os corticosteroides, os *opioides* e os AINEs. Os glicocorticoides possuem grande amplitude de ações farmacológicas, dentre elas, seus efeitos antiinflamatórios e imunossupressores, inibindo tanto as manifestações iniciais quanto as tardias do processo inflamatório (Adcock et al., 2005). Apesar destas classes de substâncias apresentarem excelentes propriedades antiinflamatórias (com exceção dos opioides) e serem utilizadas na terapêutica clínica, seu uso produz importantes efeitos colaterais. Tal fato encoraja a busca por substâncias com menos efeitos indesejáveis e com maior seletividade de ação antiinflamatória e/ou analgésica.

Os corticosteroides constituem a terapia antiinflamatória mais eficaz para muitas doenças inflamatórias crônicas, como asma. Os corticoides têm sido considerados como agentes inibidores da produção de prostaglandinas, pela ação inibitória que exercem sobre a PLA₂, por meio da liberação de lipocortina-1, que é um mediador protéico antiinflamatório. O resultado final da ação destes antiinflamatórios é a parcial ou total redução da liberação dos mediadores pró-inflamatórios. A lipocortina-1 atua sequestrando o substrato fosfolipídico, além de inibir diretamente a PLA₂. Os glicocorticoides exógenos inibem também a expressão da COX-2, reduzindo a geração de prostanoídes nas células inflamatórias, porém exercem pouco ou nenhum efeito sobre a enzima constitutiva COX-1 (Barnes, 1993; Ong et al., 2007).

No mecanismo clássico de ação, os glicocorticoides se ligam a um receptor localizado no citoplasma das células-alvo, através de sua porção carboxi-terminal. O receptor de glicocorticoide (RG) inativado está ligado a um complexo protéico que inclui duas proteínas termolábeis de 90 kDa (hsp 90), uma imunofilina de 59 kDa e várias outras proteínas. Após a

ligação entre o RG e o glicocorticoide, ocorre a dissociação das hsp90, expondo dois sinais de localização nuclear, e permitindo que o complexo ativado se mova rapidamente para dentro do núcleo e se liga ao DNA. Dentro do núcleo, o complexo RG-glicocorticoide se liga a sítios de ligação no DNA chamados elementos de resposta de glicocorticoides (ERG) (Damiani et al., 2001).

Em relação aos AINEs, sua principal molécula-alvo é a enzima COX. A inibição da atividade das COXs (COX-1 constitutiva, COX-2 induzida, ou ambas) é um dos principais mecanismos de ação de diversos fármacos, analgésicos e antiinflamatórios, especialmente os AINEs como o ácido acetilsalicílico (aspirina®) e a indometacina. Desta forma, seu efeito antiinflamatório deve-se principalmente à inibição da produção de prostaglandinas como a prostaglandina E2 (PGE2), PGD2 e PGI2, bem como dos tromboxanos (TXs) (Safayhi, 1997; Fitzgerald, 2003).

Como a COX-2 é uma enzima expressa por células envolvidas em processos inflamatórios, foi correlacionada como sendo a maior responsável pela produção de prostanoídes nos processos inflamatórios e dolorosos. Assim, foram desenvolvidos inibidores seletivos da COX-2 de primeira geração, incluindo o celecoxib (Celebrex®; Pharmacia), e o rofecoxib (Vioxx®; Merck) que foram aprovados pela “Food and Drug Administration” (FDA) para o tratamento da artrite (Fitzgerald, 2003). Foram desenvolvidos também os inibidores seletivos para COX-2 de segunda geração como o valdecoxib® (Bextra; Pfizer), etoricoxib® (Arcoxia; Merck) e o lumiracoxib® (Prexige; Novartis) (Fitzgerald, 2003).

Entretanto, um estudo demonstrava que o Vioxx® pode causar sérios eventos cardiovasculares como ataque cardíaco e infarto (Bombardier et al., 2002). Apesar disto, a comercialização do Vioxx® continuou e após 18 meses de uso contínuo, vários indivíduos experimentaram os eventos cardiovasculares descritos anteriormente. Fitzgerald (2003) demonstrou que rofecoxib e o celecoxib reduziam além dos níveis de PGE2, os níveis de prostaciclina (PGI2).

Anteriormente, a produção da PGI2 parecia ser realizada somente pela COX-1, entretanto esta proposição estava completamente errada, uma vez que foi demonstrado que a COX-2 é a principal produtora de PGI2 (Fitzgerald, 2004). A PGI2 pode causar inibição da agregação plaquetária, indução da vasodilatação e prevenção à proliferação cardiovascular em células musculares lisas *in vitro*. Os inibidores não seletivos de COX inibem tanto síntese de PGI2 como também de tromboxano A2, enquanto que os inibidores seletivos da COX-2 inibem somente a produção da PGI2. A produção de tromboxano A2 fica intacta podendo induzir a agregação plaquetária, vasoconstrição e proliferação vascular. Em longo prazo a

redução da PGI₂ e o aumento da tromboxano devem predispor os pacientes ao risco de infarto do miocárdio e outros problemas cardiovasculares. Assim, a Merck anunciou a retirada voluntária do mercado, em todo o mundo, do medicamento Vioxx®, indicado para o tratamento da artrite e dor aguda.

Por outro lado, o mecanismo pelo qual atuam os fármacos antiinflamatórios esteroidais, como a dexametasona e a hidrocortisona, está relacionado principalmente à inibição da migração celular para a área afetada, através da supressão da expressão de moléculas de adesão, ou da indução da síntese de uma proteína inibidora de fosfolipase A₂ (enzima responsável pela liberação de ácido araquidônico e consequentemente da ativação da produção de PGs, tromboxano e leucotrienos) a anexina-1 (também conhecida como lipocortina). Um outro mecanismo de ação dos corticosteroides ocorre através da ativação de receptores nucleares para glicocorticoides que regulam a transcrição de alguns genes de resposta primária, incluindo os que expressam a COX-2 e o sintase óxido nítrico. O complexo esteroide-receptor também é capaz de promover inibição da transcrição de um grande número de citocinas envolvidas na inflamação crônica, destacando-se principalmente a interleucina- 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF-α). Além disso, os corticosteroides podem ainda promover uma repressão da síntese dos receptores das citocinas, como dos receptores da IL-2 (Barnes; Adcok, 1993; Flower; Rothwell, 1994; Vane; Botting, 1998; Millan, 1999).

Assim, outros mecanismos de ação podem ser evidenciados para fármacos analgésicos e antiinflamatórios como: 1) atuação como falsos substratos: análogos de precursores naturais dos ácidos graxos podem servir de inibidores competitivos da formação de PGs e produtos da ação das lipoxigenases; 2) Atuação em receptores de mediadores inflamatórios; 3) bloqueio de canais de cálcio ou inibindo a calmodulina, diminuindo, assim, a liberação de ácido araquidônico e sua consequente metabolização; 4) inibição de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e a peroxidação lipídica; 5) atuação também por imunossupressão ou por imunoestimulação, estimulando a fagocitose e assim, promovendo aumento da remoção de moléculas que provocam danos ao tecido afetado (Barnes; Adcok, 1993; Flower; Rothwell, 1994; Vane; Botting, 1998; Millan, 1999).

4.3.1 Antiinflamatórios não-esteroidais

Estima-se que, somente nos Estados Unidos, aproximadamente 50 milhões de pessoas aplicam em torno de 5 a 10 bilhões de dólares por ano no consumo de antiinflamatórios não esteroides (Dubois et al.,1998).

Os fármacos antiinflamatórios não-esteroides (AINEs) inibem as enzimas ciclooxigenase e são usados para gerenciar uma variedade de condições agudas e crônicas associadas à dor e/ou inflamação. Todos os AINEs inibem as enzimas COX 1 e 2, mas a maioria dos AINEs, que têm sido desenvolvidos nos últimos anos mostram uma maior atividade como inibidores da COX 2. Estes AINEs mais recentes são frequentemente referidos como inibidores seletivos COX-2 ou simplesmente como "coxibes" (Vane; Botting, 1995).

Todos os AINEs, incluindo os fármacos tradicionais não-seletivos da subclasse dos inibidores seletivos da ciclooxigenase-2 (COX-2), são antiinflamatórios, analgésicos e antipiréticos. Os AINEs constituem um grupo quimicamente heterogêneo de ácidos orgânicos que compartilham de determinadas ações terapêuticas e efeitos adversos. A aspirina® também inibe a enzima COX, mas de uma forma molecularmente distinta da competitiva, reversível, inibidores de sítio ativo e muitas vezes são distinguidas dos AINEs. Da mesma forma, o paracetamol, que é antipirético e analgésico, mas desprovido de atividade antiinflamatória, também se convencionou segregado do grupo apesar da sua partilha na atividade de AINE com outras ações pertinentes para a sua ação clínica *in vivo* (Vane; Botting, 1995).

As prostaglandinas são liberadas sempre que as células são danificadas, e aspirina® e tNSAIDs inibem sua síntese em todos os tipos de células. No entanto, a aspirina® e o tNSAIDs geralmente não inibem a formação de outros mediadores inflamatórios, incluindo eicosanoides, tais como os LTs. Embora os efeitos clínicos desses fármacos são explicáveis em termos de inibição da síntese de prostaglandinas, importantes diferenças inter e intra-individual na resposta clínica são conhecidas. Em concentrações mais elevadas, AINEs também são conhecidos por reduzir a produção de radicais superóxido, induzem apoptose, inibe a expressão de moléculas de adesão, diminuição de óxido nítrico sintetase, diminuição de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- α , IL-1), modificam a atividade dos linfócitos, e alteram as funções da membrana celular. No entanto, há opiniões divergentes sobre se essas ações podem contribuir para a atividade antiinflamatória dos AINEs nas concentrações realizadas durante o tratamento (Carvalho et al., 2004). Assim, doses terapêuticas de aspirina® e outros AINEs reduzem a biossíntese de prostaglandinas pelo bloqueio da COX, e não há uma correlação razoavelmente boa entre a potência dos inibidores da COX e atividade antiinflamatória (Carvalho et al., 2004).

Atualmente, sabe-se que existem três isoformas de ciclooxigenase, chamadas de ciclooxigenase-1 (COX-1), ciclooxigenase-2 (COX-2) e a ciclooxigenase-3 (COX-3) (Botting, 2000). A primeira (COX-1) é expressa constitutivamente na maioria das células,

independente de estímulo lesivo, presente em condições fisiológicas principalmente nos vasos sanguíneos, plaquetas, estômago e rins. A COX-2 não é encontrada normalmente, mas pode ser induzida na presença de citocinas (interleucina-1, interleucina-2 e do fator α de necrose tumoral), ésteres do forbol, fatores de crescimento e endotoxinas, sendo expressa caracteristicamente por células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos, monócitos e sinoviócitos. Por outro lado, a expressão da COX-2 pode ser inibida por glicocorticoides, interleucina-4, interleucina-13 e interleucina-10, enquanto que a prostaglandina E2 (PGE2) promove regulação crescente (*up-regulation*) na expressão da COX-2 (Carvalho et al., 2004). A COX-3 possivelmente uma variante da COX-1 (pois é derivada do mesmo gene dessa isorforma), encontra-se distribuída principalmente no córtex cerebral, medula espinhal e coração, sendo mais sensível ao acetaminofeno (paracetamol) do que a COX-1 e COX-2. Postulou-se que a inibição da COX-3 poderia representar o mecanismo central primário pelo qual os fármacos analgésicos e antipiréticos do tipo AINEs desenvolveriam suas atividades de redução da dor e da febre (Chandrasekharan et al., 2002).

A aspirina® e os AINEs inibem as enzimas COX e a produção de prostaglandinas, que não inibem as vias lipoxigenase do metabolismo do AA e, portanto, não suprimem a formação de LT. A aspirina® modifica covalentemente COX-1 e COX-2, inibindo a atividade da COX irreversível. Este é um importante distinção de todos os AINEs, porque a duração dos efeitos da aspirina® está relacionada com a taxa de rotatividade da COX em tecidos diferentes do alvo. A duração do efeito dos AINEs não-aspirina, que inibem competitivamente os sítios ativos das enzimas COX, diz respeito mais diretamente ao curso do tempo de disposição do fármaco. Assim, as consequências da inibição da COX plaquetária (COX-1) passa para a vida da plaqueta. A Inibição da formação de COX-1 plaquetária dependente de TXA₂, portanto, é cumulativo com doses repetidas de aspirina® (pelo menos tão baixo quanto 30 mg/dia) e leva cerca de 8-12 dias (o tempo de giro de plaquetas) para recuperar, uma vez que a terapia for interrompida (Vane; Botting, 1995).

Todos os AINE, incluindo inibidores selectivos seletivos de COX-2, são antitérmicos, analgésicos e antiinflamatórias, a exceção é o paracetamol, que é antipirético e analgésico, mas é desprovido de atividade antiinflamatória (Goodman; Gilman, 2007). Quando utilizados como analgésicos, esses fármacos normalmente só são eficazes contra a dor de intensidade baixa a moderada, tais como dor de dente. Embora a sua eficácia máxima é geralmente muito menor do que os opioides, os AINEs têm a depressão respiratória e do desenvolvimento de dependência física vistos com os opiáceos. Os AINEs não mudam a percepção das modalidades sensoriais além da dor. Dor crônica pós-operatória ou dor decorrente da

inflamação é bem controlada particularmente pelos AINEs, enquanto que a dor decorrente das vísceras ocas geralmente não é aliviada. Uma exceção a isso é a dor menstrual. Os AINEs encontram a sua aplicação clínica como chefe de agentes antiinflamatórios no tratamento de lesões músculo-esqueléticas, como a artrite reumatoide e osteoartrose. Em geral, os AINEs proporcionam apenas alívio sintomático da dor e inflamação associada com a doença (Goodman; Gilman, 2007).

4.4 Considerações sobre a importância dos produtos naturais marinhos

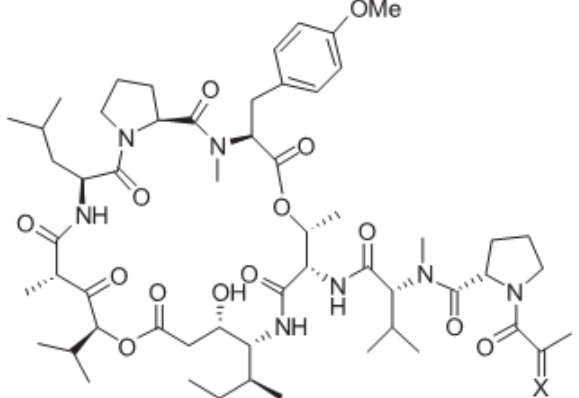
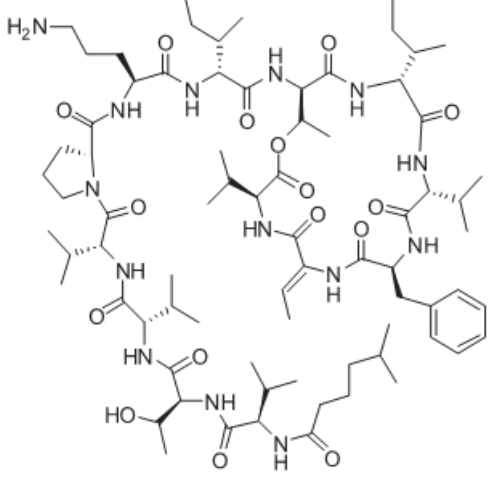
Os produtos naturais têm sido a maior fonte de inspiração para diversas áreas da química e da ciência de um modo geral. Usando, copiando ou modificando as moléculas sintetizadas pelos seres vivos, o homem tem obtido inovações para o seu benefício em diversas áreas e, entre elas, a produção de fármacos. Sabe-se que os organismos terrestres são os responsáveis por quase a totalidade dessas substâncias, porém, apesar da infinita diversidade vegetal e de todo seu potencial biológico agregado, novas fontes de produtos naturais vêm ganhando destaque nas últimas décadas (Kossuga et al., 2007). Neste contexto, o oceano, um macro ambiente equilibrado, auto-suficiente e relativamente pouco explorado, causou efeito profundo na química de produtos naturais. Este ambiente tornou-se alvo de pesquisas visando a descoberta de substâncias potencialmente bioativas para fins terapêuticos (Felicio et al., 2008).

Até os anos 50, este ecossistema escapou do interesse dos cientistas de produtos naturais, entretanto, desde a descoberta dos nucleosídeos com atividade antiviral, espongourina e espongotimidina, isolados da esponja *Tethya crypta* (Bergmann; Feeney, 1951) os produtos naturais de origem marinha vem despertando o interesse de companhias farmacêuticas e instituições de pesquisa acerca das possíveis propriedades farmacológicas dos produtos naturais de origem marinha (Proksch et al., 2003; Barreiro; Fraga, 2008). Esses nucleosídeos tiveram sua participação histórica no desenvolvimento de fármacos de origem marinha visto que ambas inspiraram a síntese de moléculas como a citosina arabinosídeo [ara-C (Citarabina®)] e a adenina arabinosídeo [ara-A (Vidarabina®)], fármacos com ações anticâncer e antiviral, respectivamente, e que serviram como moléculas protótipas na síntese do fármaco anti-HIV, azidotimidina ou AZT (Suckling, 1991).

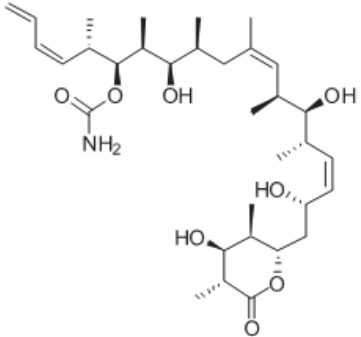
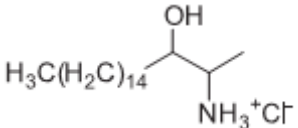
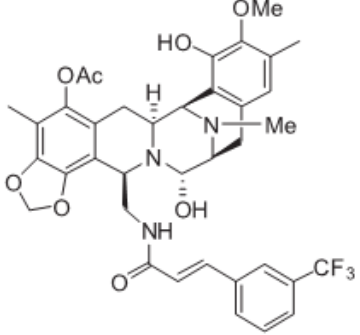
Apesar do reduzido número de fármacos de origem marinha, a diversidade química desses produtos associada à pluralidade dos alvos terapêuticos oferece perspectivas inovadoras na abordagem clínica de várias patologias. Atualmente, existe um número

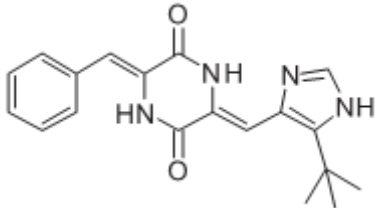
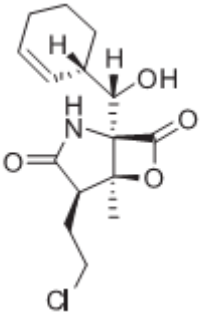
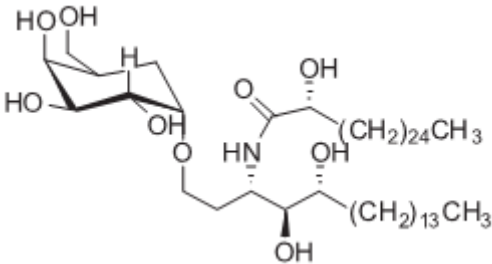
considerável de substâncias candidatas a fármacos em fase de testes pré-clínicos e clínicos que podem reconhecer alguns alvos terapêuticos como canais iônicos, enzimas, microtúbulos, DNA, lisossomos, calmodulina, proteossomos, além de indução de estresse oxidativo e modulação do sistema imunológico, o que ressalta o potencial destas moléculas na cura de doenças (Quadro 1). Desta forma, as conquistas e o progresso da pesquisa de produtos naturais marinhos já fazem honrado o seu lugar na indústria farmacêutica, e a promessa de fármacos de origem marinha tornou-se, definitivamente uma realidade (Costa-Lotufo et al., 2009).

Quadro 1. Fármacos de origem marinha atualmente comercializados (**Fonte:** Costa-Lotufo *et al.*, 2009)

Fármaco	Organismo marinho	Mecanismo de ação	Utilizado
 Aplidina	Isolado da ascídia mediterrânea <i>Amplidium albicans</i>.	Inibição da síntese de DNA e proteínas, levando ao bloqueio da divisão celular, e enfraquecimento da angiogênese tumoral pela diminuição da secreção de VEGF e da expressão do receptor VEGF-r1 e à inibição da enzima ornitina-descarboxilase. Indução de apoptose celular por diversas vias. Comentários: desenvolvido pela indústria farmacêutica PharmaMar.	- tumor de estômago, pâncreas, bexiga
 Kahalalido F	Isolado do molusco <i>Elysia rufescens</i>.	Alteração da função basal da membrana dos lisossomos, induzindo morte celular por oncoses. Comentários: desenvolvido pela indústria farmacêutica PharmaMar.	- carcinoma hepatocelular, melanoma

Continuação – Quatro 1

 Discodermolide	Isolado da esponja marinha <i>Discordemia dissoluta</i>.	Estabiliza os microtúbulos levando à parada na fase G2 do ciclo celular, seguido de morte celular por apoptose. Comentários: desenvolvido pela indústria farmacêutica Novartis Pharmaceuticals.	- tumores sólidos
 Espisulosina	Isolada do molusco <i>Mactromeris</i>.	Desestabilização dos filamentos de actina, possivelmente devido à interação com receptores de esfingolípídeos e modulação de proteínas Rho. Comentários: desenvolvido pela indústria farmacêutica PharmaMar.	- tumores sólidos
 Zalypsis	Isolada do molusco <i>Jorunna funebris</i>	Liga-se ao DNA e induz acúmulo de células nas fases G1/G0, seguido de morte por apoptose, sem, contudo, ativar o ponto de checagem de “dano em DNA”. Comentários: desenvolvido pela indústria farmacêutica PharmaMar.	- tumores de mama, próstata, estômago e linfoma

 Dicotopiprazina	Isolado da alga <i>Aspergillus</i> SP.	Bloqueio da polimerização da β-tubulina solúvel no citosol com notória seletividade para células endoteliais imaturas em proliferação, responsáveis pela neovascularização tumoral. Comentários: desenvolvido pela indústria farmacêutica Nereus Pharmaceuticals.	- linfomas e tumores sólidos avançados
 β-lactona salinosporamida A	Isolada do actinomiceto marinho <i>Salinospora tropica</i>.	Inibição irreversível da função catalítica das 3 subunidades (CT-L, C-L e T-L) do proteossomo 20S. Comentários: desenvolvido pela indústria farmacêutica Nereus Pharmaceuticals.	- tumores do pâncreas, melanoma e mielomas múltiplos
 KRN7000	Isolado da esponja marinha <i>Agelas mauritanus</i>.	Modula a resposta imune ativando e estimulando o crescimento de células natural killer. Comentários: desenvolvido pela indústria farmacêutica Kirin Brewery Pharmaceuticals.	- mieloma e tumores sólidos

A história do estudo de produtos naturais marinhos demonstra que por volta de 1960 houve um grande investimento por parte das indústrias farmacêuticas na busca de substâncias bioativas a partir dos organismos que vivem nos oceanos. Além da popularização do mergulho autônomo e do desenvolvimento de equipamentos para coleta em maiores profundidades, a descoberta de grandes quantidades de prostaglandinas em um octocoral (*Plexaura homomalla*) despertou o interesse nas pesquisas em produtos naturais marinhos (Weinheimer; Spraggins, 1969; Valmsen et al., 2001; Schneider et al., 2002).

Pode-se dizer que a química de produtos naturais marinhos era incipiente na década de 1970, que se desenvolveu rapidamente nos anos 80 e amadureceu na década passada. Em 1975 já existiam três linhas paralelas de pesquisa: estudo de toxinas marinhas, de substâncias com potencial medicinal e de química na ecologia marinha (Faulkner, 2000).

No início desses estudos houve grandes interesses por toxinas marinhas, devido à alta toxicidade por organismos marinhos encontrada pelas tropas americanas no Pacífico durante a Segunda Guerra Mundial. Mas, após três décadas de pesquisa, observam-se substâncias com atividade cardiovascular, antiviral, antitumoral, antimitótica, antifúngica, citotóxica, neurotóxica, antiinflamatória e antibiótica (Kelecom, 1991).

Em relação às toxinas, poucas são usadas com fins medicinais, mas principalmente como ferramentas em estudos neurofisiológicos e em pesquisas moleculares de neuroreceptores. A tetrodotoxina (TTX), isolada primeiramente do ovário de um peixe, *Fugus rubipes* (Yokoo, 1950), mas caracterizada como de origem bacteriana (Yasumoto et al., 1989) e a saxitoxina (STX), obtida do mexilhão *Saxidomus giganteus* (Schuett; Rapoport, 1962), mas proveniente da dieta com um dinoflagelado *Gonyaulax* spp. (Hashimoto, 1979) são exemplos de neurotoxinas marinhas não proteicas que bloqueiam canais de sódio especificamente, promovendo paralisia do sistema nervoso periférico (Shimizu, 1978).

Outras potentes toxinas são as palitoxinas poli-hidroxiladas com ação bloqueadora de canais iônicos (Kaul, 1981) isoladas do zoantídeos do gênero *Palythoa* (Moore; Scheuer, 1971); as latrunculinas, macrolídeos citotóxicos isolados de esponjas (Kashman et al., 1985); a lofotoxina, diterpeno com efeito paralisante proveniente de um celenterado; o glicosídeo esteroide com atividade ictiotóxica e repelente de tubarão isolado do peixe *Pardachirus pavoninus* (Tashibana et al., 1984); os alcaloides indólicos neurotóxicos do tipo surugatoxina isolados do molusco *Babylonia japônica* (Kosuge et al., 1982), mas de origem bacteriana (Kosuge et al., 1985) e uma série de saponinas neurotóxicas produzidas por estrelas-do-mar e pepinos-do-mar (Burnell; Apsimon, 1983).

Já em relação às substâncias com atividades cardiovasculares, as esponjas marinhas são as maiores fontes destes metabólitos. A atividade vasodilatadora é associada a uma série de alcaloides 1-oxo-quinolizidina, as xestoessponginas (Endo et al., 1986) e aos nucleosídeos doridosina, isoguanisina e espongosina (Kaul, 1982). Ainda com relação à atividade anti-hipertensiva temos o 12-epi-escalaradial, um sesterpeno isolado da *Hyrtios erecta* (Quinn et al., 1980). Outros celenterados produzem compostos cardiotoxícos como as palitoxinas (Kaul, 1981) e o ácido subergórgico (sesquiterpeno) da gorgônia *Subergorgia suberosa* (Groveiss et al., 1985). Utilizando os extratos de *Ulva lactuca*, *Caulerpa peltata*, *C. racemosa*, *Chaetomorpha linum*, entre outras espécies descobriu a atividade inseticida sobre o controle da malária, filariose, dengue e febre amarela (Thangam; Kathiresan, 1991), destaca-se a fucoídina proveniente de *Macrocystes pyrifera*, com atividade antitumoral (Mayer; Hamann, 2005; Yamamoto et al., 1974), glicosídeos esteroidais isolados da alga verde *Codium iyengarrii Borges* com atividade antibacteriana (Ali et al., 2002) e extratos de *Amansia multifida* também com atividade antibacteriana (Lima-Filho et al., 2002).

O aumento das fundações para a pesquisa do câncer e os desafios para um tratamento eficiente para infecções por herpes e para a AIDS levaram à descoberta de grande número de substâncias de origem marinha com atividades antitumorais, citotóxicas, antivirais e promotoras de tumores. Atualmente esta é a área que mais vem crescendo na química de produtos marinhos (Mayer; Lehmann, 2001). Entre muitas substâncias já descobertas, temos alguns exemplos clássicos apresentados no quadro 2.

Quadro 2: Organismos marinhos com atividades antitumorais, citotóxicas, antivirais e promotoras de tumor.

	Organismos	Substâncias ativas	Referências
Antitumoral	Esponja	espongotimidina espongogouridina ara A	Cohen, 1963
	Octocoral Telesto riisei Clavularia inflata	punaglandinas clavulonas bromo-indovulonas	Baker; Erspamer, 1963 Iguchi et al., 1986
	Briozoa Bugula neritina	briostatina-1	Pettit et al., 1982
	Tunicado <i>Trididemnum solidum</i>	didemnima-B	Rinehart et al., 1981
	Tunicado	eudistominas	Munro et al., 1989
	Esponja <i>Mycale</i> SP	micalamida-A	Perry et al., 1988
Antiviral	Tunicado	eudistomina-C	Rinehart, 1989
	Esponja <i>Mycale</i> SP	micalamida-A	Munro et al., 1989
	Esponja <i>Dysidea avara</i>	avarol	Minale et al., 1974
Citotóxica	Tunicado <i>Trididemnum solidum</i>	didemnima-B	Rinehart et al., 1981

	Esponja <i>Dysdea avara</i>	avarol	Minale et al., 1974
Promotora de tumor	Dinoflagelado	ácido ocadaico	Suganuma et al., 1988
	Alga verde-azulada <i>Lyngbya majuscula</i>	lingbitatoxina-A	Cardinella et al., 1979

Muitas substâncias de origem marinha possuem mais de uma atividade. Os derivados prolina do ácido cáinico e do ácido domóico, ambos isolados primeiramente de uma alga vermelha (Murakami et al., 1953; Takemoto et al., 1966) possuem atividade anti-helmíntica. O ácido cáinico é utilizado como modelo experimental para doença de Huntington (Scheuer, 1989). Já o ácido domóico é um potente agonista glutamatérgico induzindo sintomas neurológicos, como a amnésia (Hockin, 1989).

Em relação a substâncias com atividade antiinflamatória, novos compostos têm sido descobertos. O sesterpeno manoalido, da esponja *Luffariella variabilis* (De Silva; Scheuer, 1980), inibiu a síndrome induzida por fenilquinona (Jacobs et al., 1985) e mostrou-se mais potente que a indometacina, mas menos que a hidrocortisona e atua inibindo irreversivelmente a enzima fosfolipase A. Similarmente, as pseudopterosinas, uma série de diterpenos glicosilados da gorgônia *Pseudopterogorgia elisabethae* (Look et al., 1986), exibiram atividades antiinflamatórias e analgésicas (Fenical, 1987).

O estudo de substâncias químicas produzidas pelas espécies marinhas é uma ferramenta fundamental para a compreensão da evolução e da manutenção das comunidades marinhas nos diferentes oceanos (Hay; Fenical, 1997). Apesar de haver estudos em ecologia química terrestre, somente no início dos anos 80 é que o papel ecológico de substâncias orgânicas do ambiente marinho começou a ser desvendado (Paul, 1992; Pawlik, 1993; Hay, 1996; Millar; Haynes, 1998). Este caminho antevê que as maiores contribuições para o futuro vão resultar dos estudos associados entre microorganismos marinhos e biotecnologia, levando para a comunidade científica o potencial dos oceanos (Kelecom, 1991).

4.4.1 Considerações Gerais Sobre Algas

O termo algas, *lato sensu*, compreende um agrupamento artificial de organismos que têm muito pouca coisa em comum a não ser o fato de serem predominantemente aquáticos. Por esta razão são grupos polifiléticos e não constituem uma categoria taxonômica definida, mas sim um amontoado de categorias díspares, tão diversas que chegam a ser classificadas em 2 ou 3 reinos diferentes, tradicionalmente conhecidos como monera, protista e plantae, ou

ainda com diferentes denominações em outros sistemas apoiados em dados de biologia molecular (Sogin et al., 1989; Bhattacharya; Medlin, 1998).

Neste ambiente aquático, as algas podem fazer parte dos bentos (indivíduos fixos no substrato) ou plâncton (indivíduos suspensos na água). A faixa litorânea que as algas bêmicas habitam pode estar dividida em: supralitoral, mesolitoral e infralitoral. O supralitoral corresponde à faixa mais alta do litoral, nunca ficando submerso. O mesolitoral pode estar temporariamente descoberto nas marés-baixas. Já o infralitoral corresponde à faixa que nunca fica exposta ao ar (Horta, 2000).

As algas seriam os organismos mais antigos do planeta, havendo evidências de sua existência no período pré-cambriano (3,5 bilhões de anos, aproximadamente). As algas possivelmente foram as responsáveis pela produção e acúmulo de oxigênio na atmosfera primitiva e hoje se sabe que são organismos que deram origem a todos os outros vegetais existentes atualmente (Horta, 2000).

Harvey (1836) classificou as algas baseando-se na sua composição pigmentar e esta persiste até hoje. Dentre as principais linhagens eucarióticas podemos citar: Chlorophyta (algas verdes), Euglenofita (alga flagelada), Rhodophyta (algas vermelhas) e Phaeophyta (algas pardas), Bacillariofita (diatomáceas) e Dinofita (dinoflagelados). Além da classificação proposta por Harvey, temos o sistema de classificação baseado na distribuição dos pigmentos e os produtos de reserva (quadro 3) (Lee, 1989).

Quadro 3: Distribuição dos pigmentos e produto de reserva nas diferentes divisões de algas.

DIVISÃO	CLOROFILA	PIGMENTO	PRODUTOS DE RESERVA
<i>Chlorophyta</i> (verdes)	<i>a, b</i>	carotenoides e xantofilas	amido
<i>Rhodophyta</i> (vermelhas)	<i>a, d</i>	carotenoides	amido das florídeas
<i>Phaeophyta</i> (pardas)	<i>a, c</i>	fucoxantina	óleos e polissacarídeo

Fonte: Lee, 1989

O gráfico 1 demonstra o número de espécies encontradas nos estados do litoral brasileiro, acrescido de Atol das Rocas (RO), Arquipélago de Fernando de Noronha (FN) e Ilha Trindade (TR). As espécies foram agrupadas conforme a classificação proposta por Harvey (1836).

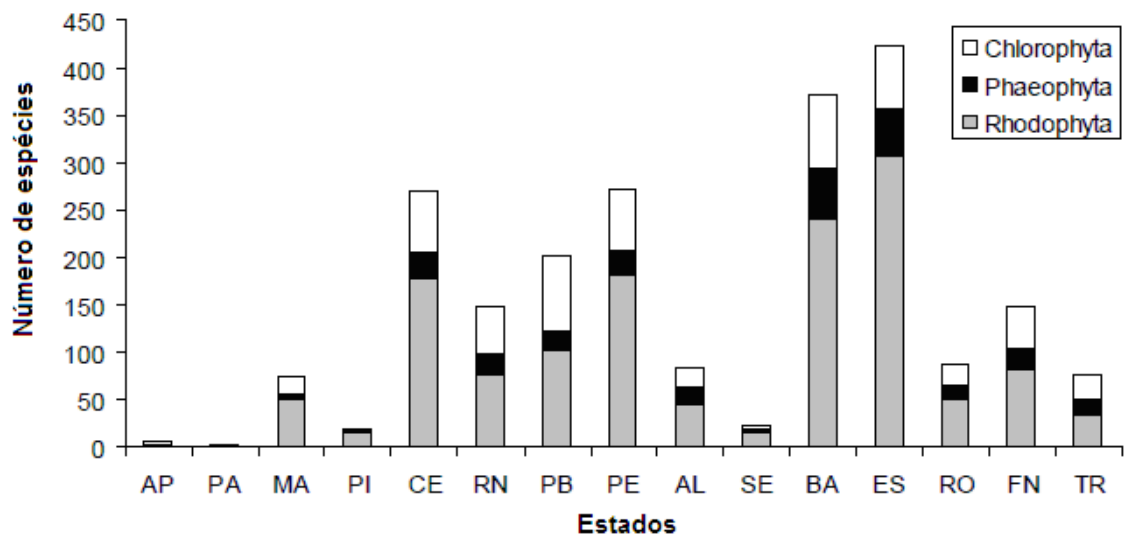


Gráfico 1: Distribuição dos táxons de algas no litoral brasileiro.

Fonte: Figueiredo et al., 2008

4.5 Considerações sobre a Família Caulerpaceae o gênero *Caulerpa* (J. V. Lamour)

Durante muitos anos a família Caulerpaceae foi incluída na ordem Siphonales até que Feldmam (1946), baseando-se na morfologia das plantas e da parede celular, divide as Siphonales em Caulerpales e Eusiphonales (Brayner et. al., 2008). Os trabalhos mais recentes consideram Caulerpaceae como membro de Bryopsidales (Oliveira et al. 2005; De Clerk et al. 2005; Wynne 2005).

A família Caulerpaceae abriga, atualmente, os gêneros *Caulerpa* e *Caulerpella* (Brayner et. al., 2008). Por apresentar apenas uma espécie, o gênero *Caulerpella* tem pouca contribuição nos estudos da família Caulerpaceae, sendo o gênero *Caulerpa* amplamente estudado e responsável pelos dados da família. O gênero *Caulerpa* foi proposto por J.V. Lamouroux em 1809 permaneceu, por quase dois séculos, desde a sua validação por Kutzing (1843), como o único gênero da família Caulerpaceae, porém Prud'homme e Lokhorst (Wynne, 2005) propuseram um novo gênero para esta família, nomeado *Caulerpella*. Este novo gênero se diferencia de *Caulerpa*, segundo os autores, por apresentar reprodução não holocárpica, pois apresentava ramos especiais para a produção de células reprodutivas que eram separados do restante do talo por uma parede celular (Brayner et. al., 2008).

O gênero *Caulerpa* compreende espécies morfologicamente complexas, cujos limites de separação têm sido bastante confusos, como podem ser expressos no quadro 4. Espécies de *Caulerpa* distribuem-se em regiões tropicais à subtropicais do mundo, mas algumas espécies

se estendem no mar mediterrâneo e em regiões temperadas da Austrália (Figura 4) (Kevekordes et al., 2006).

Quadro 4: Classificação Taxonômica da espécie *Caulerpa racemosa*L.

Domínio	Eucariota
Reino	Plantae
Subreino	Viridaeplantae
Filo (Divisão)	Chlorophyta
Classe	Bryopsidophyceae
Ordem	Bryopsidales
Família	Caulerpaceae (86 espécies)
Gênero	<i>Caulerpa</i>
Espécie	<i>Caulerpa racemosa</i> (Forsskal) J. Agardh

Fonte: www.algaebase.org

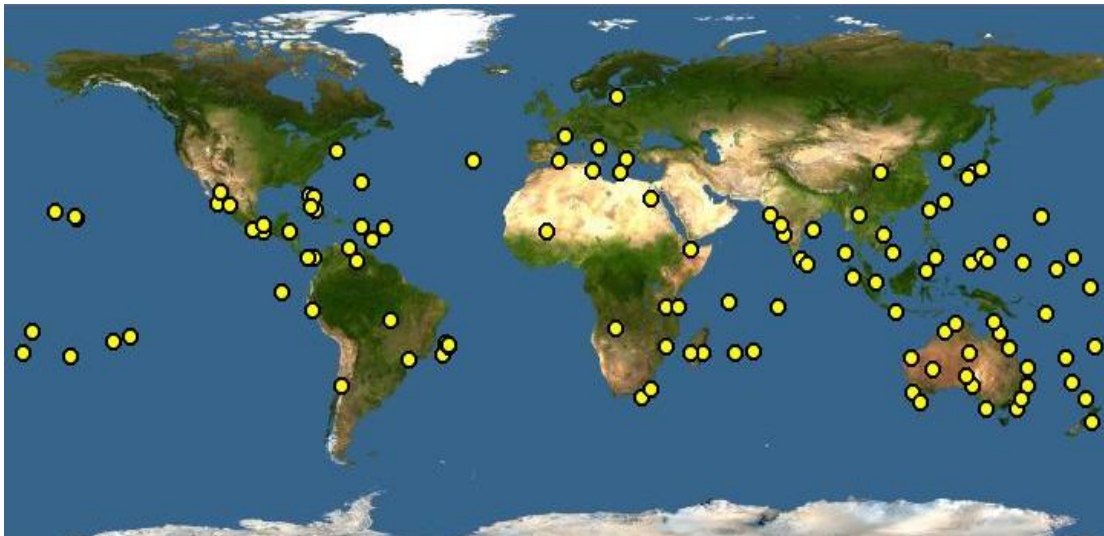


Figura 4: Distribuição do gênero *Caulerpa* no mundo.

Fonte: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Caulerpa> (acessado 18/10/2010)

No Brasil, o gênero *Caulerpa* está representado por 38 táxons. Um estudo feito no litoral pernambucano na costa de Pernambuco e Arquipélago de Fernando de Noronha observou que esse gênero apresenta uma grande diversidade taxonômica. Este fato se justifica porque a costa do referido Estado, se encontra inserida na região tropical, considerada uma das mais representativas em diversidade específica do litoral brasileiro (Brayner et al., 2008).

As algas do gênero *Caulerpa* foram definidas como sendo formadas por tronco cilíndrico, horizontal, que originava rizoides para baixo e estruturas semelhantes a folhas para

cima. O nome vem do grego e significa *Caulus* “tronco” e *erpos* “crescer ao longo do solo”. A primeira espécie foi descrita por Samuel Gottlieb Gmelin em 1768 nas Índias Orientais e identificada como *Fucus sertularioides* S.G. Gmel., hoje *Caulerpa sertularioides* (S.G. Gmel.) M. Howe” (Barata, 2008). O gênero *Caulerpa* é caracterizado por possuir espécies que apresentam talo com crescimento através de porções rizomatosas ou estoloníferas, das quais partem, em direção oposta ao substrato, ramos eretos ou assimiladores de formas variadas e, em direção ao substrato, filamentos rizoidais (Barata, 2008).

O número de espécies de *Caulerpa* é um dado controverso e varia bastante na literatura. Dumay e colaboradores em 2002 considerou 100 espécies espalhadas pelo mundo, sendo as espécies *Caulerpa cupressoides*, *Caulerpa mexicana*, *Caulerpa racemosa* e *Caulerpa sertularioides* (Figura 5) as mais comuns no litoral brasileiro formando extensas áreas verdes na zona entre marés (Joly; 1965; Sze, 1997). Todas as espécies são marinhas, ocorrendo no médio e infralitoral, geralmente em regiões tropicais e subtropicais” (Barata, 2008).



Figura 5: Imagens das espécies de *C. cupressoides* (A), *C. mexicana* (B), *C. sertularioides* (C) e *C. racemosa* (D) (Adaptado de Barata, 2008)

Para o Brasil são citadas 19 espécies de *Caulerpa*, além de 26 variedades e formas, num total de 45 táxons infraespecíficos conhecidos. Baseados em levantamentos florísticos realizados em vários locais da costa do Brasil, é possível observar que as espécies do gênero *Caulerpa* parecem preferir as águas quentes da região tropical do país, sendo que a maioria das espécies se encontra concentrada nos estados da região nordeste (Barata, 2008).

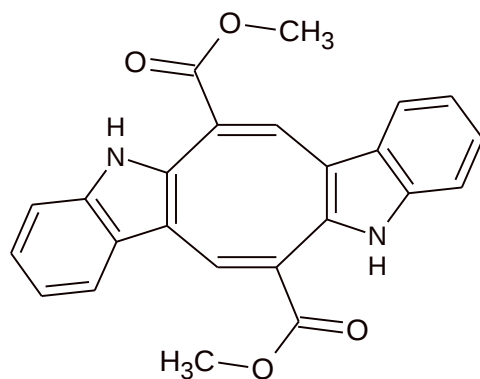
4.6 Levantamento químico e farmacológico do gênero *Caulerpa* J.V. Lamour.

Segundo levantamento realizado no banco de dados NATural PRoducts ALERT (NAPRALERT), em abril de 2009, não são encontrados relatos, na literatura, do uso na medicina popular de espécies de *Caulerpa*. O gênero *Caulerpa* é composto por diferentes classes de substâncias, entretanto, as que apresentam maior prevalência são os alcaloides, terpenoides e esteroides (Quadro 5). O composto majoritário deste gênero é o alcaloide indólico caulerpina (**1**), este por sua vez está presente em vinte espécies, podendo citar *C. Ashmeadii*, *C. Lamourouxii*, *C. Lentillifera*, *C. Mexicana* (Schwede et al., 1987), *C. peltata* (Capon, et al., 1983.), *C. racemosa* (Ayyad; Badria, 1994.), *C. sertulariodes* (Raub et al., 1987.; Xu et al., 1998). Estudos com as espécies *C. ashmeadii*, *C. paspaloides*, *C. lentillifera*, *C. racemosa* var. *Uvifera*, *C. sertulariodes*, levaram ao isolamento de hidroxí-amidas, cuja mistura é denominada caulerpircina (**3**) (Vest et al., 1983; Nielsen et al., 1982). Outros compostos que apresentam relevância no gênero, são os sesquiterpenos caulerpenina (**4**), metabólito majoritário da *Caulerpa taxifolia* (Amico et al., 1978) e flexilina (**10**) (Blackman; Wells, 1978), o esteroide colesterol (**6**) (Xu et al., 1997), o esteroide β -sitosterol (**7**) (Anjaneyulu et al., 1991), o colesteno (**8**), o diterpeno trifarina (**5**) (Paul; Fenical, 1985; Handley; Blackman, 2001), o ácido caulerpínico (**2**) e o 24-metil-colesterol (**9**).

Vários estudos têm demonstrado o potencial terapêutico de diversas espécies de *Caulerpa*, isto é confirmado através de levantamento bibliográfico, que mostra que os extratos testados de muitas espécies apresentam um amplo espectro de atividades, incluindo atividade antibacteriana (Albuquerque et al., 1983; Sridhar et al., 1984; Usmanghani et al., 1984; Perez et al., 1990), atividade antifúngica (Albuquerque et al., 1983; Usmanghani et al., 1984; Perez et al., 1990), antiviral (Premanthan et al., 1994 ; Premanthan et al., 1995), atividade antitumoral (Nakamura et al., 1997), atividade repelente (Thangam et al., 1993), atividade anticrutáceo (Ara et al., 1999).

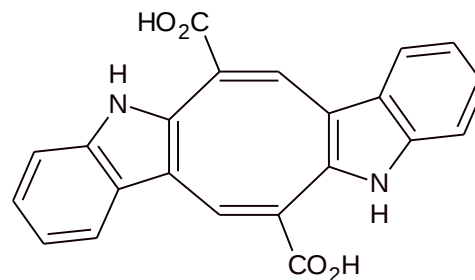
Os dados fitoquímicos foram compilados em um gráfico demonstrando os relatos de compostos isolados identificados no gênero *Caulerpa* e agrupados por classes (Gráfico 2).

Quadro 5: Estruturas químicas de compostos isolados de espécies do gênero *Caulerpa*



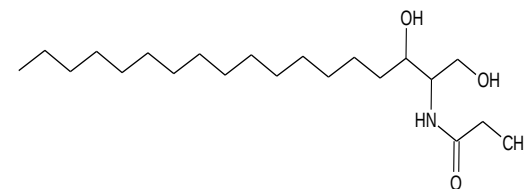
(1) caulerpina

C. Ashmeadii
C. Lamourouxii
C. Lentillifera
C. Mexicana
C. peltata
C. racemosa
C. sertularioides



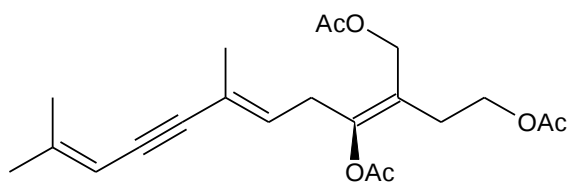
(2) ácido caulerpínico

C. racemosa
C. sertularioides



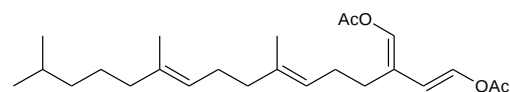
(3) caulerpicina

C. ashmeadii
C. paspaloides
C. lentillifera
C. racemosa



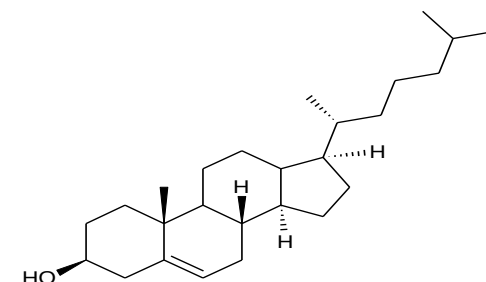
(4) Caulerpenina

C. prolifera
C. taxifolia
C. trifaria



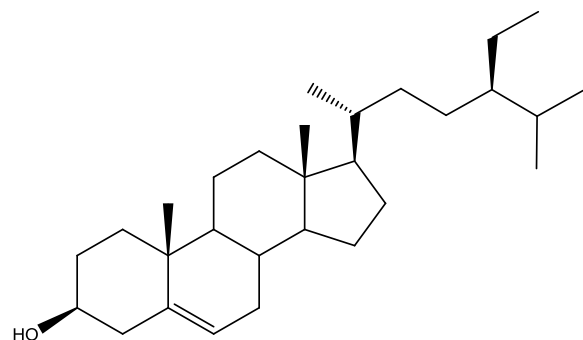
(5) trifarina

C. brownii
C. trifaria.

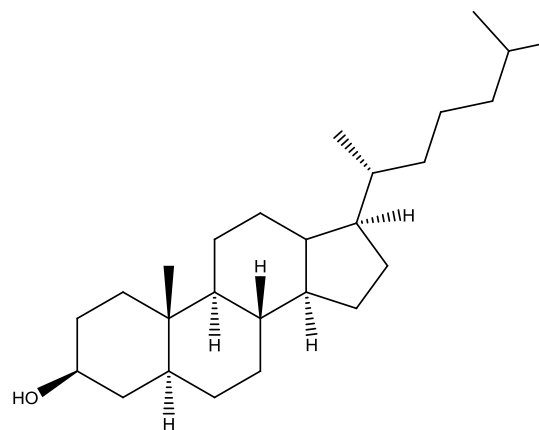


(6) colesterol

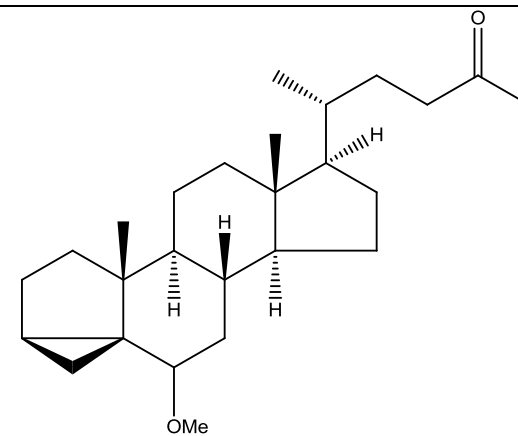
C. racemosa
C. taxifolia



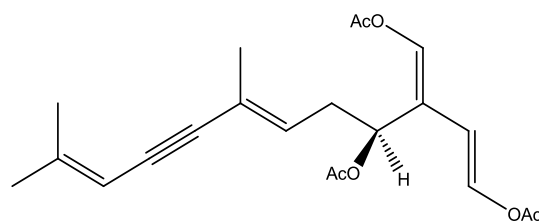
(7) β -sitosterol
C. racemosa



(8) colestanol
C. sertularioides



(9) 24-metil, colesterol
C. sertularioides



(10) flexilina

COMPOSTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS NO GÊNERO CALUERPA

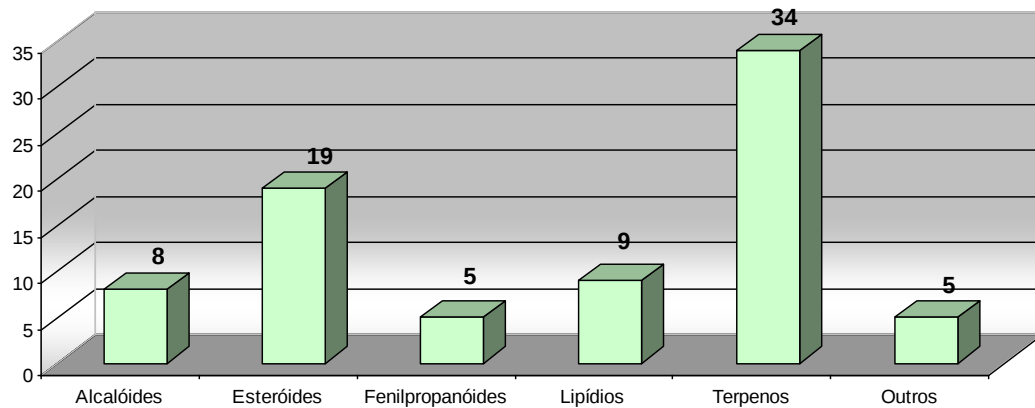


Gráfico 2 – Compostos químicos identificados no gênero *Caulerpa* agrupados por classe.

4.7 Considerações Sobre a Espécie *Caulerpa racemosa* (Forssk.) J. Agardh

A espécie *Caulerpa racemosa* é encontrada no médio litoral, crescendo sobre a rocha ou associadas a outras algas, apresentam talo verde claro, de consistência firme; ramos assimiladores longos, cobertos, total ou espaçadamente, por râmulos pedunculados, com ápice dilatado e globoide, ou podem ser curtíssimos, apresentando râmulos raros, algumas vezes sésseis (Barata, 2008).

Segundo levantamento realizado por Barata (2008) esta macroalga *Caulerpa racemosa* (Figura 6,7 e 8) é encontrada representada nos estados nordestinos do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Bahia. Em nível mundial relata-se a sua existência no Oceano Pacífico Ocidental, Ilhas do Pacífico, Oceano Atlântico Ocidental, Ilhas do Atlântico, Oceano Índico, e Mar Mediterrâneo.



Figura 6. *Caulerpa racemosa* em seu habitat
Foto: George Emmanuel Cavalcanti de Miranda



Figura 7. *Caulerpa racemosa* inteira
Fonte: <http://www.algaebase.org/webpictures/Fig.88.jpg>



Figura 8. Râmulo de *Caulerpa racemosa*

Fonte: http://www.algaebase.org/search/images/detail/?img_id=36804esk=0

Na literatura são encontrados ensaios farmacológicos que incluem testes antibacterianos, antifúngicos (Perez, 1990; Albuquerque, 1983; Usmanghani, 1984), antileveduriformes (Perez, 1990; Albuquerque, 1983) e antiviral (Premanthan, 1995).

Thangam e Kathiresan (1993) relataram a atividade repelente contra o mosquito *Aedes aegypti* do extrato acetato e fraca atividade citotóxica do extrato metanólico. Em estudo realizado por Ara e colaboradores (1999) foi demonstrado que em testes para medir a DL_{50} contra o microcrustáceo *Artemia salina* não apresentou atividade estatisticamente significativa.

A literatura relata o isolamento de diversos compostos de *C. racemosa*, os quais estão relacionados no quadro 6.

Quadro 6. Compostos identificados na espécie *Caulepa racemosa*

CLASSE	NOME DO COMPOSTO
Ácido sulfônico	Ácido 3,3-dimetil propiônicosulfônio
Alcaloides	Ácido caulerpínico Caulerpicina Caulerpina Ácido monometil éster caulerpínico Glicina-betaína Taurobetaína
Benzenoide	1,5-difenil-penta-1,4-dieno
Esteroides	Brassicasterol Diidro Brassicasterol Colesterol 24-metileno-colasterol Trans-22-deidro-colesterol Clerosterol Clionasterol Fucosterol Poriferasterol β -sitosterol

Fenilpropanoides	Trans cinamil-1-fenil-2-propenil eter Cinamil-3-fenil-1-propenil eter Diidrocinnamato de cinamil Éter cinamílico
Proteína	beta-alanina
Terpenos	Ácido 10-ceto-3,7,11-trimetil dodecanóico Cis-Fitol Trans-Fitol

4.8 Caulerpina

A caulerpina (Figura 9), composto majoritário isolado de espécies de *Caulerpa*, é um alcaloide bisindólico que apresenta um anel cíclico extra de oito carbonos com dois grupos carboxila entre os dois anéis indólicos que são incorporados, diretamente, dois grupamentos ésteres, que sinteticamente podem ser convertidos através de reações bastante eficientes tanto do ponto de vista sintético quanto da viabilidade na obtenção de uma série de derivados potencialmente ativos.

A estrutura da caulerpina foi primeiramente proposta (Aguilar-Santos, 1968, 1970), e posteriormente revista por Maiti e colaboradores, 1978. Sua estrutura cristalina foi estudada por Lu e colaboradores. O conteúdo da caulerpina em *Caulerpa* sp. é de 15% para *C. lentilifera*, de 5% para *C. racemosa*, 2% para *C. microphysa* e 8% para *C. sertulorioides* (Vairappan, 2004).

Existem opiniões diferentes sobre a toxicidade da caulerpina. Os sintomas foram observados após a ingestão do gênero *Caulerpa* (Aguilar-Santos e Doty, 1968). A caulerpina apresentou baixa toxicidade no trabalho de Vidal e colaboradores (1984), onde os animais foram monitorados durante 15 dias após administração oral na dose máxima de 2g/kg em estudo de toxicidade aguda gástrica, onde não houve diferença significativa na variância do peso ou temperatura corporal entre os animais tratados e o controle, portanto a DL_{50} deve ser superior a essa dose. Apresentou uma moderada atividade antitumoral *in vitro* contra tumor da coroa biliar (Ayyad e Badria, 1994), demonstrou atividade antibacteriana moderada contra 8 espécies de bactérias isoladas da superfície das algas (Vairappan, 2004) e o extrato acetato bruto de *C. racemosa* apresentou citotoxicidade em células de melanoma humano, mas a caulerpina isolada desse extrato não apresentou qualquer atividade tóxica (Rocha et al., 2007). A caulerpina isolada da alga *Laurencia majuscula* apresentou atividade antifúngica (Xu et al., 2006) e também demonstrou ser reguladora do crescimento (Xu et al., 2006; Raub et al., 1987; Huang, 2001).

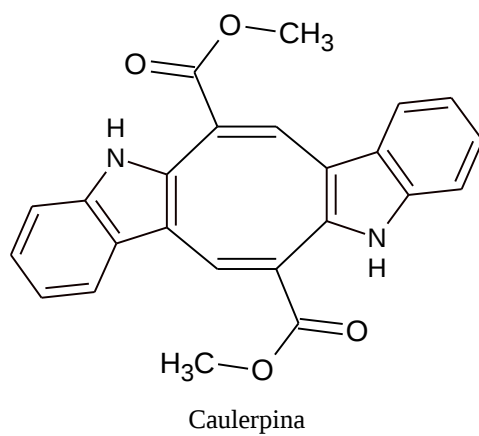


Figura 9. Estrutura química do alcaloide caulerpinaa

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta e processamento do material botânico

A alga verde *C. racemosa* (Forsskal) J. Agardh foi coletada na região costeira do Bessa (7°03'52"S / 34°49'51"W), João Pessoa, Paraíba-Brasil, em Abril de 2008. A alga do gênero *Caulerpa* foi cedida pela Professora Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos e pelo Professor Dr. José Maria Barbosa Filho (ambos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Professor Delby Fernandes de Medeiros – UFPB), coordenador do projeto: Rede Interinstitucional de Algas Bentônicas, Edital: nº do CEP -006443/2005-78 MCT-CNPq/MS-SCTIE-DECIT/CT- Saúde – Nº 10/2006. Foi identificada pelo biólogo Dr. George Emmanuel Cavalcanti de Miranda (Laboratório de Algas Marinhas – LAM, Departamento de Sistemática e Ecologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB).

A exsicata da espécie (JPB13999) encontra-se depositada no Herbário Lauro Pires Xavier na Universidade Federal da Paraíba, Brasil. O extrato metanólico bruto (EMB), as fases clorofórmica, acetato de etila e n-butanólica, bem como o alcaloide caulerpina foram extraídos no Laboratório da Professora Dra. Maria Célia de Oliveira Chaves do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Professor Delby Fernandes de Medeiros – UFPB. Os ensaios farmacológicos foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Imunidade do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas.

5.1.1 Obtenção do Extrato Metanólico Bruto (EMB), das fases e caulerpina

A obtenção do EMB e seu fracionamento, assim como o isolamento do alcaloide indolico caulerpina foi realizado no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Professor Delby Fernandes de Medeiros – UFPB. Inicialmente, o material botânico de *Caulerpa racemosa* foi desidratado à temperatura ambiente durante 72h, sendo então submetido à extração ao abrigo da luz, sem sofrer trituração por moinho mecânico. O material desidratado (2.700g) foi submetido à maceração a frio com metanol, que consiste em deixar a amostra em contato com o metanol durante certo tempo (3 dias), após esse período o solvente foi removido por filtração e concentrado por rotaevaporação, onde obteve o EMB (17g). Este foi submetido à filtração a vácuo (partição sólido-líquido), utilizando solventes orgânicos de polaridades crescentes como hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol, respectivamente. As soluções extrativas foram concentradas em rotaevaporador, obtendo-se 0,13g da fase

hexânica, 7,6g da fase clorofórmica, 3,2g da fase acetato e 2,4g da fase n-butanólica. Em seguida, parte da fase clorofórmica (3g) foi submetida à coluna de Sephadex LH-20, utilizando-se sistema binário clorofórmio:metanol 1:1 como eluente, obtendo-se 36 frações as quais foram reunidas após cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), de acordo com a semelhança de seus fatores de retenção (R_fs). A fração 16/23 apresentou-se como cristais de cor vermelho-alaranjado, sendo codificados como caulerpina (150mg).

O composto quando foi isolado, o passo sequencial foi a sua elucidação estrutural, através de informações espectrométricas, processos que exigem uma variabilidade muito grande de técnicas sofisticadas. A avaliação espectral foi feita através de Infravermelho (IV), Ultravioleta (UV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ¹H, ¹³C, Espectrofotômetro de Massa (EM), RMN (NOE, COSY, DEPT, HMBC, HMQC, etc), permitindo assim propor a estrutura molecular da substância isolada, conhecida como caulerpina. Além disso, o uso de cristalografia de raio X, quando possível, foi realizado para avaliar a estereoquímica real do composto bem como, o índice de refração e rotação ótica que possibilitou propor com segurança a estrutura molecular (Lorenzo, 2010).

5.2 Triagem farmacológica

A triagem foi feita em modelos experimentais com o EMB, as fases clorofórmica, acetato de etila, n-butanólica e a caulerpina (contorção induzida por ácido acético, nocicepção induzida por formalina, ensaio de placa quente), mas devido ao baixo rendimento tanto do EMB quanto das fases acetato de etila e n-butanólica não foi possível realizar todos os experimentos, pois a espécie *C. racemosa* encontrava-se em extinção no litoral Paraibano, então, alguns experimentos foram realizados apenas com a caulerpina (teste de “rota rod”, edema de orelha induzido por capsaicina, ensaio de peritonite induzido por carragenina e ensaio de inibição de COX *in vitro*) já que a mesma foi isolada da fração clorofórmio e esta apresentou um bom rendimento. Após a seleção da substância pura ativa foi realizado uma análise do mecanismo de ação farmacológico.

5.3 Ensaios farmacológicos

5.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas da linhagem Swiss (25-30 g), adultos, com 6 a 8 semanas de idade. Os animais foram mantidos na sala de experimentos, na temperatura de 24 °C, com ciclo claro 12 h -escuro 12 h com acesso contínuo (*ad libitum*) a ração comercial e água. Oito horas antes de cada experimento os animais receberam apenas água, a fim de evitar interferência com a absorção de alimentos. Os cuidados animais e os protocolos de pesquisa estavam em conformidade com os princípios e orientações para o cuidado dos animais de laboratório e as normas éticas para investigações de dor experimental em animais conscientes (Zimmermann, 1983). Foram utilizados 6 animais por cada grupo e estes receberam o EMB, as fases e a caulerpina, administrados por via oral e dissolvidos em goma arábica (*in vivo*) ou dimetilsulfóxido (DMSO) (para estudos *in vitro*), dependendo de sua lipossolubilidade. As mesmas foram administradas 45 minutos antes dos testes *in vivo*. Após os experimentos foi feito deslocamento cervical dos animais. **(Aprovação no CEP N°. 006443/2005-78).**

5.3.2 Reagentes, soluções e fármacos utilizados

Para realização dos experimentos foram utilizados: ácido acético P.A. glacial (Vetec); Azul de Tripán (Sigma); Formaldeído P.A. (Vetec); Carragenina (Sigma); Panótico rápido (Laborclin); goma arábica (Sigma Chemical) e Tween 80® (Sigma-Aldrich). Além disso, os seguintes fármacos foram utilizados: dipirona sódica (100 µmol/kg, v.o) (Sigma-Aldrich), indometacina (100 µmol/kg, v.o) (Merck), sulfato de morfina (15 µmol/kg, s.c.) (Cristália, BR) e diazepam (35,1 µmol/kg, i.p) (Sigma-Aldrich). O EMB, as fases, a caulerpina, bem como os padrões, foram suspensos em goma arábica 5% com auxílio de q.s do tensoativo Tween 80® (*in vivo*) e DMSO (*in vitro*).

5.3.3 Ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético

O perfil da antinocicepção periférica foi avaliado por meio do ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. O EMB, fases clorofórmio, acetato de etila e n-butanólico, bem como caulerpina foram administradas por via oral, tendo como

respectivos veículos a goma arábica 0,5% e tween:água (1:99, V/V). Quarenta minutos após o tratamento com o EMB, as fases (todos na dose de 100 mg/kg, v.o), a caulerpina e o fármaco padrão dipirona (ambos na dose de 100 μ mol/kg, v.o), foi realizada a administração de ácido acético 0,1N (0,1mL/10g de peso) na cavidade peritoneal dos animais. Dez minutos após a injeção, as contorções foram contadas durante 20 minutos. Foram feitos também controles do ácido acético (controle positivo) (Koster et al., 1959, Coolier et al., 1968). Para a construção da curva dose-resposta no ensaio de contorção a caulerpina e a dipirona foram utilizadas nas seguintes concentrações: 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 e 100 μ mol/kg, v.o.

5.3.4 Ensaio de nocicepção induzida por Formalina

Neste modelo os animais receberam uma injeção de 20 μ L de uma solução de formalina 2,5% (v/v) (formaldeído diluído em salina) na face dorsal da pata traseira, quarenta minutos após o tratamento com o EMB, fases (todos na dose de 100 mg/kg, v.o), a caulerpina e o fármaco padrão indometacina (ambos na dose de 100 μ mol/kg, v.o). Registrou-se o tempo (segundos) que o animal permaneceu lambendo a pata (resposta ao estímulo doloroso). Com base no padrão de respostas foi possível estabelecer dois períodos: fase neurogênica – primeiros cinco minutos e fase inflamatória – 15-30 minutos após a injeção. A porcentagem de inibição da resposta foi calculada pela comparação com os animais controles e as fases respectivamente correlacionadas à dor neurogênica e a dor inflamatória (Hunskar et al., 1987, Tjolsen et al., 1992).

5.3.5 Ensaio da Placa Quente

A atividade antinociceptiva central foi avaliada através do teste da placa quente. Os animais foram colocados sobre a placa aquecida ($55 \pm 0,1$ °C) e suas respostas ao estímulo térmico (retirada e lambida das patas traseiras ou dianteiras) foram cronometradas. Foram feitas duas medidas controle em intervalos de 30 minutos, estabelecendo-se o tempo de “cut-off” (máximo de permanência do animal na placa) de 10 segundos. Posteriormente, as fases (100 mg/kg, v.o), a caulerpina (100 μ mol/kg, v.o) e o fármaco padrão morfina (15 μ mol/kg, s.c) foram administrados e a relação entre volume da suspensão e o peso do animal foi 0,1mL/20g. Após um intervalo de 30 minutos, novas medidas do tempo de resposta foram registradas em intervalos de 30 minutos durante 2 horas (Kuraishi et al., 1983).

5.3.6 Teste de “Rota rod”

Este método consiste em colocar camundongos sobre uma barra que gira a uma velocidade constante e verificar a capacidade do animal equilibrar-se sobre a mesma. Vinte e quatro horas antes do experimento, os animais eram treinados na barra giratória (3,7 cm de diâmetro, 16 rpm) até que eles permanecessem no aparelho por 60 segundos sem cair. No dia do experimento, os camundongos foram tratados com caulerpina (100 µmol/kg, v.o) e diazepam (35,1 µmol/kg, i.p), sendo avaliados na barra giratória 30 e 60 minutos após a administração. Eram analisados, neste ensaio, o número de quedas e o tempo de permanência na barra giratória. A latência para queda e do número de quedas do aparelho eram registrados até 240 segundos. Este teste permite avaliar se as substâncias testadas promovem a incoordenação motora dos animais, por sedação e/ou relaxamento muscular (Godoy et al., 2004).

5.3.7 Edema de orelha induzido por capsaicina

O modelo de edema de orelha induzido por capsaicina foi realizada de acordo com a metodologia de (Sanchez; Moreno, 1999). Quarenta minutos após a injeção de caulerpina e indometacina (ambos na dose de 100 µmol/kg, v.o), 20 µL de uma solução de capsaicina diluída em acetona foram aplicados na superfície dorsal e ventral da orelha direita dos camundongos. O grupo controle recebeu apenas veículo (10 mL/kg, v.o). A orelha esquerda recebeu acetona, administrado da mesma maneira. Trinta minutos após a aplicação da capsaicina, os camundongos foram sacrificados e as duas orelhas removidas. O ensaio foi caracterizado por uma resposta inflamatória aguda da orelha, com desenvolvimento de edema. Foram feitas seções circulares usando um cortador de orelha de 6 mm de diâmetro, e pesados. O aumento de peso das orelhas causado pela irritação foi medido e feita a subtração do peso da orelha esquerda (não tratada) com a direita (tratada). O edema de orelha foi medido como a diferença de peso entre as orelhas tratadas e não tratadas. A porcentagem de inibição foi calculado usando $(C-T)/C \times 100 (\%)$, onde C e T indica o edema não tratado (veículo) e edema tratado com fármaco, respectivamente.

5.3.8 Ensaio de peritonite induzida por carragenina

Seguindo a metodologia descrita por Ferrandiz e Alcaraz (1991) os camundongos foram tratados com caulerpina e indometacina (ambos na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$, v.o) e após 40 minutos foram submetidos ao ensaio de peritonite, por administração intraperitoneal de uma solução de carragenina (1% em salina; 250 $\mu\text{L/animal}$). Após 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL de tampão fosfato salina pH 7,4 (PBS) e depois de uma suave massagem o fluido peritoneal foi coletado (cerca de 2 mL) e a contagem total das células foi realizada. Para a contagem do número total de células, 10 μL do fluido peritoneal era coletado de cada animal, diluídos e homogeneizados em 190 μL de azul de Tripan, obtendo uma diluição de 1:20. Em seguida, 10 μL dessa solução eram transferidos para a câmara de Neubauer, onde era realizada a contagem (2 quadrantes) com auxílio de microscópio óptico na objetiva de 40x. O número de células recrutadas era obtido utilizando o cálculo abaixo:

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

Após a contagem de células totais, era realizada a contagem diferencial de leucócitos. Para tanto, alíquotas de 100 μL (suspensão celular + PBS) eram utilizadas para o preparo do citoesfregaço em centrífuga. A coloração era realizada por corante tipo panótico rápido e a contagem diferencial das células era realizada com auxílio de um microscópio óptico com objetiva de 100x e auxílio de óleo de imersão. Eram contadas 100 células em cada lâmina, diferenciando-as. O número de células diferenciadas era calculado pelo percentual encontrado em relação ao número total de células.

5.3.9 Ensaio de inibição de COX in vitro

O alcaloide indólico, caulerpina, foi avaliado ainda quanto à sua capacidade de inibir COX de acordo com o método descrito por Uddin e colaboradores (2004), utilizando o kit de determinação da inibição de COX-1/COX-2 ovina (Cayman Chemicals, MI, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

5.3.9.1 Biossíntese de prostaglandina

COX catalisa a primeira etapa da biossíntese do ácido araquidônico para PGH_2 . $\text{PGF}_{2\alpha}$, produzida a partir de PGH_2 por redução com cloreto de estanho, é medido por ensaio imunoenzimático. A solução de caulerpina foi preparada utilizando como solvente DMSO e tampão de reação (fornecido no kit) a uma concentração de $0,2 \mu\text{M}$. A Figura 10 esquematiza essa etapa do ensaio. Resumidamente, uma série de soluções tampão de reação fornecida (960IL, $0,1 \text{ M}$ Tris-HCl pH8.0 contendo 5mM EDTA e 2mM fenol) foi aliqotada em tubos eppendorf, onde eram adicionadas as enzimas COX-1 ou COX-2 ($10 \mu\text{L}$) na presença de heme ($10 \mu\text{L}$). Posteriormente, foram adicionados $10 \mu\text{L}$ de soluções de caulerpina ou indometacina ($0,2 \mu\text{M}$ em um volume final de $100 \mu\text{L}$). Estas soluções foram incubadas por um período de 5min a 37°C . Posteriormente, $10 \mu\text{L}$ de uma solução de ácido araquidônico ($100 \mu\text{M}$) foi adicionada e a reação de COX foi interrompida pela adição $50 \mu\text{L}$ de HCl (1M) após 2min do início da reação. $\text{PGF}_{2\alpha}$, produzido de PGH_2 por redução com cloreto de estanho foi medido por ensaio imunoenzimático.

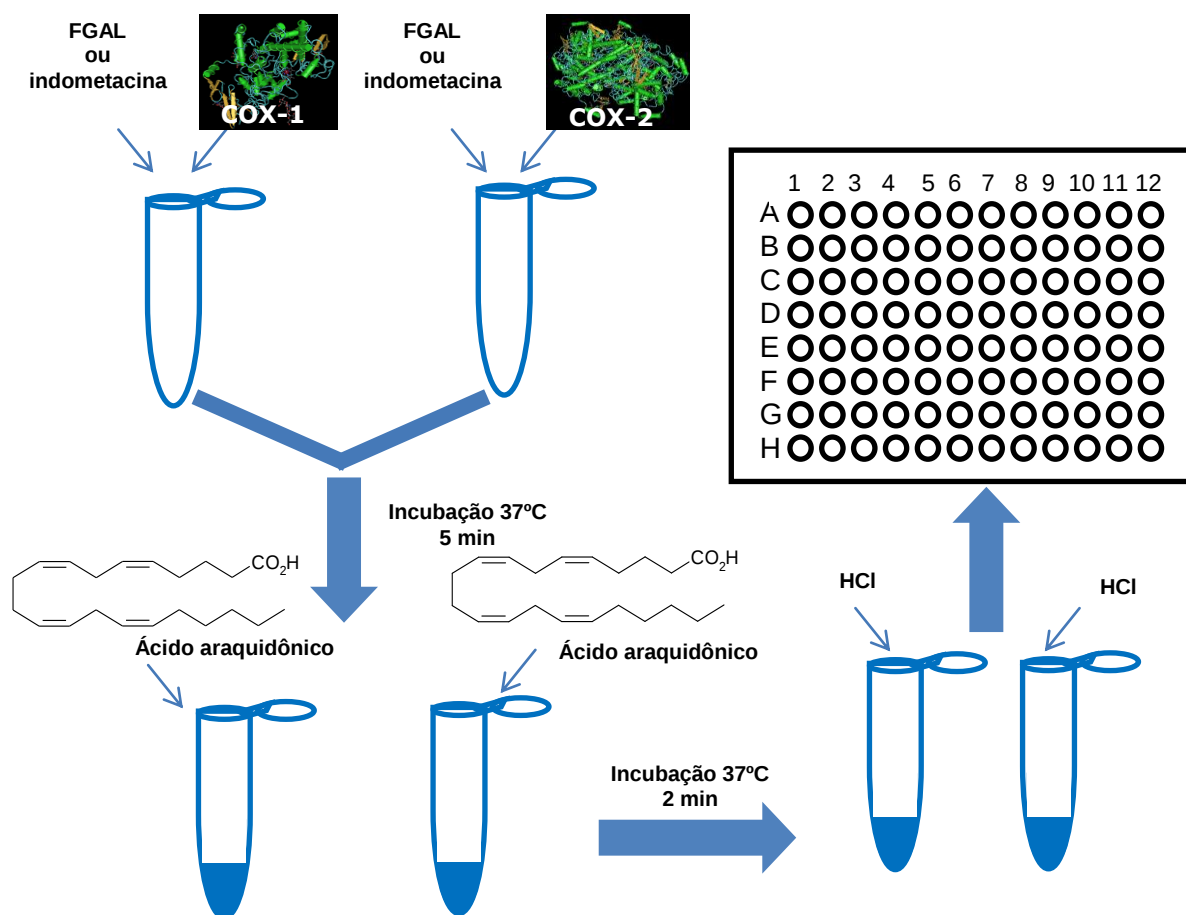


Figura 10: Esquematização da etapa de biossíntese de PG do ensaio de avaliação da atividade inibitória de COX.

5.3.9.2 Ensaio imunoenzimático

Como exposto na Figura 11, este teste baseia-se na concorrência entre PGs e o conjugado PG-acetilcolinesterase para uma quantidade limitada de anti-soro de PG. A quantidade PG capaz para ligar ao anti-soro PG é inversamente proporcional inibição da COX, pois a concentração do conjugado PG-acetilcolinesterase é mantida constante, enquanto que a concentração de PGs varia. Este complexo PG-acetilcolinesterase se liga a um anti-anticorpo monoclonal (anticorpo específico para PG) previamente colocado nos poços da placa. A placa é lavada para remover os reagentes e, em seguida é adicionado o reagente de Ellman, que contém o substrato da acetilcolinaesterase. O produto da esta reação enzimática produz uma cor distinta amarela, que absorve em 412 nm. A intensidade desta cor é determinada espectrofotometricamente, e é proporcional à quantidade de conjugado PG-acetilcolinesterase que se ligou ao anti-soro PG, que é inversamente proporcional à quantidade de PGs presentes no poço durante o período de incubação.

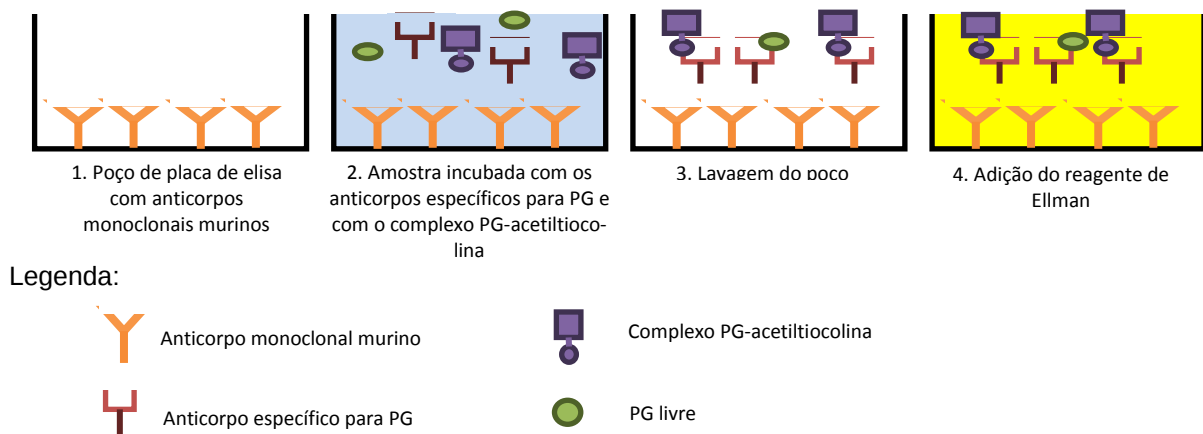


Figura 11: Esquematização da placa de imunensaio utilizada para realização do ensaio de avaliação da inibição de COX.

5.4 Análise Estatística

Os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle foram realizados utilizando o ANOVA “One Way” seguido de pós-teste de Dunnet e/ou Newman-Keuls quando necessário. Os valores foram considerados significantes quando $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média, conforme indicado nas legendas das tabelas e gráficos. A DI_{50} (dose de uma substância capaz inibir 50% do efeito máximo) foi calculado por regressão não linear. As análises foram realizadas no GraphPad Prism® versão 3.0.

6 RESULTADOS

6.1 Efeito antinociceptivo do EMB, das fases clorofórmica, acetato de etila, n-butanólica, caulerpina e dipirona no ensaio de contorções abdominais induzido por ácido acético

Inicialmente para avaliar as propriedades antinociceptivas do EMB, das fases clorofórmica, acetato de etila e n-butanólica, bem como da caulerpina, alcaloide isolado da espécie *C. racemosa*, utilizou-se o modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, cujos resultados estão expressos no gráfico 3. Realizou-se a avaliação farmacológica do EMB, fases e caulerpina por via oral, por ser a rota mais frequentemente utilizada para administração de medicamento em seres humanos, e também por não ser invasiva.

Como mostrado no gráfico 3, à administração intraperitoneal de ácido acético dos grupos tratados com EMB, fase clorofórmica, acetato de etila, n-butanólica e caulerpina induziram $12,4 \pm 5,2$, $13,2 \pm 4,4$, $10,7 \pm 4,2$, $23,5 \pm 4,2$ e $9,8 \pm 1,3$ contorções abdominais, inibindo 76,9 ($71,4 \pm 11,1$), 70,5 ($70,9 \pm 9,9$), 76,1 ($73,4 \pm 11,9$), 47,4 ($47,3 \pm 9,5$) e 78% ($77,3 \pm 3,8$), respectivamente, enquanto que o grupo controle durante os 20 minutos de observação induziu $10,8 \pm 6,6$ contorções abdominais, inibindo 75,7% ($78,5 \pm 11,9$). De acordo com os resultados obtidos, o EMB, as fases e a caulerpina, nas referidas doses administradas, apresentaram-se efetivas em diminuir o número de contorções abdominais, uma vez que houve uma redução significativa da resposta nociceptiva com $P < 0,01$, quando comparados ao grupo controle.

Avaliou-se a potência e eficácia da caulerpina em relação ao fármaco padrão dipirona, comprovando a antinocicepção no ensaio de contorção abdominal através da curva dose-resposta, cujos resultados estão expressos no gráfico 4. Os dados mostram que, por via oral, no ensaio de contorção abdominal (0,0001, 0,001, 0,01, 1, 10, 100 $\mu\text{mol/kg}$, v.o.), a DI_{50} calculada da caulerpina foi de 0,24 $\mu\text{mol/kg}$ (0,02-2,17) ($33,0 \pm 12,8$) ($n = 6$), e da dipirona, fármaco padrão, 0,12 $\mu\text{mol/kg}$ (0,02-0,59) ($37,8 \pm 12,6$) ($n = 6$). A caulerpina e a dipirona apresentaram potência e eficácia equivalentes, visto que atingiram Eficácia máxima e DI_{50} na mesma ordem de grandeza ($\mu\text{mol/kg}$).

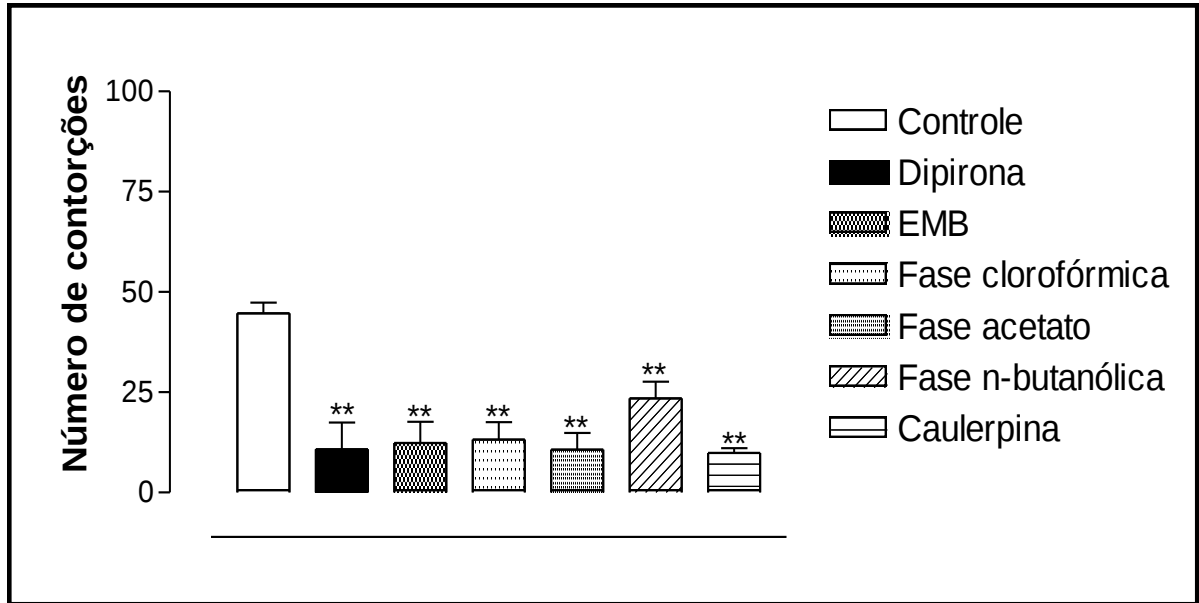


Gráfico 3. Efeito antinociceptivo do EMB, das fases clorofórmica, acetato de etila, n-butanólica (todos na dose de 100 mg/kg, v.o), caulerpina e dipirona (ambos na dose de 100 µmol/kg, v.o) no ensaio de contorções abdominais induzido por ácido acético. Os dados representam a média e o erro padrão da média de 6 animais (**P<0,01 foi considerado significativo no teste de ANOVA One Way seguido do teste de Dunnett).

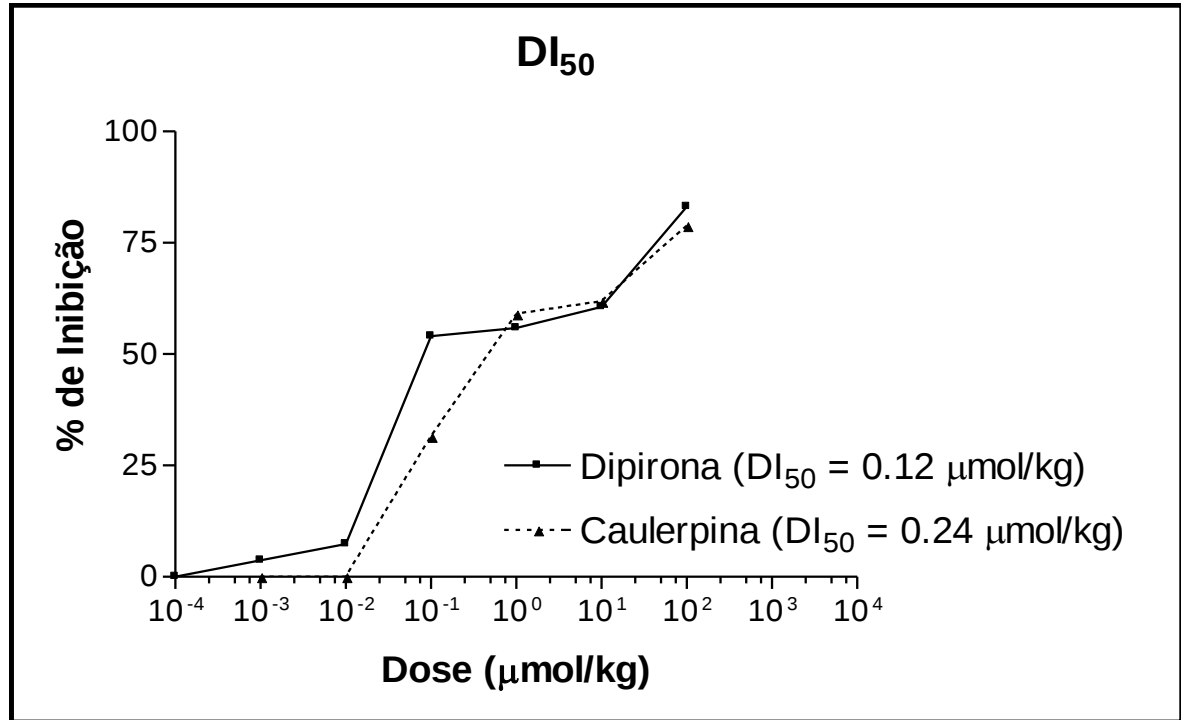


Gráfico 4. Curva dose-resposta da dipirona e caulerpina em ensaio de nocicepção induzida por ácido acético (0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 $\mu\text{mol/kg}$, v.o) em camundongos. Os dados representam a média e o erro padrão da média de 6 animais (* $P < 0,05$ foi considerado significativo no teste de ANOVA).

6.2 Atividade antinociceptiva do EMB, das fases clorofórmica, acetato de etila, n-butanólica, caulerpina e indometacina no teste de formalina

Com o objetivo de confirmar e melhor compreender a atividade antinociceptiva do EMB, das fases clorofórmica, acetato de etila, n-butanólica e da caulerpina foram submetidas ao ensaio de nocicepção induzida por formalina. Na fase neurogênica, o tempo que o animal passou lambendo a pata, em resposta à formalina (s.pl.), no grupo controle foi de $69,6 \pm 2,2$ s, sendo esse tempo reduzido após o tratamento com o EMB, com a fase clorofórmica, fase n-butanólica, caulerpina e indometacina, fármaco padrão, de forma estatisticamente significativa para $33,5 \pm 1,7$, $47,6 \pm 1,5$, $44,4 \pm 3,4$, $47,4 \pm 3,4$ e $47,3 \pm 4,6$ s, com inibição de 59,8 (50,6 $\pm$ 3,1); 42,9 (30,0 $\pm$ 3,5); 46,7 (35,2 $\pm$ 4,5); 31,8 (31,4 $\pm$ 5,4) e 32% (31,7 $\pm$ 6,9), respectivamente (tabela 1). Apenas a fase acetato não promoveu inibição da resposta nesta fase. Por outro lado, quando avaliamos a fase inflamatória (tabela 1) a fase acetato mostrou-se a mais ativa com inibição de 872,4% (74,8 $\pm$ 2,0), lambendo a pata num tempo de $59,6 \pm 9,7$ s, seguido da indometacina com 57,7% de inibição (50,9 $\pm$ 12,2) com uma redução no tempo de lambida de $119,4 \pm 30,0$ s e caulerpina com 54,1% (44,0 $\pm$ 12,0) com uma diminuição no tempo de lambida de $129,6 \pm 28,0$ s.

6.3 Efeito das fases clorofórmica, n-butanólica, acetato de etila, caulerpina e morfina no ensaio da placa quente

Para avaliar uma possível ação central, as fases clorofórmica, acetato de etila, n-butanólica e a caulerpina foram submetidas ao ensaio de placa quente. Vale ressaltar que o EMB não foi submetido a este ensaio devido à quantidade insuficiente do mesmo. Os resultados estão expressos na tabela 2.

Neste ensaio, as fases clorofórmica, acetato de etila e caulerpina aumentaram de forma significativa o tempo de permanência do animal sobre a placa quando comparado ao grupo controle (tratado apenas com o veículo), em diferentes tempos. No tempo de 90-120 apenas a fase acetato (8,0 $\pm$ 2,3 s e 9,5 $\pm$ 2,7 s) e a caulerpina (4,6 $\pm$ 0,6 s e 3,8 $\pm$ 0,5 s) aumentaram o tempo de latência, enquanto que no tempo de 150 apenas a fase clorofórmica (8,2 $\pm$ 1,7s) e a caulerpina (4,0 $\pm$ 0,5 s). Nesse ensaio, a morfina (12,8 $\pm$ 0,4, 10,3 $\pm$ 0,8, 9,7 $\pm$ 0,7 e 9,7 $\pm$ 0,9 s), um analgésico opioide utilizado como fármaco padrão, causou um aumento significativo no tempo de latência do animal na placa em todos os tempos de leitura após o tratamento, como era esperado. De posse desses resultados pode-se sugerir que a fase clorofórmica,

acetato de etila e caulerpina apresentam atividade antinociceptiva central, enquanto que a fase n-butanólica parece não ter efeito antinociceptivo central no modelo de placa quente.

Devido ao baixo rendimento e a extinção da espécie estudada de *C. racemosa*, não foi possível realizar todos os ensaios com o EMB e as fases clorofórmica, acetato de etila e n-butanólica, então, alguns ensaios, tais como: teste de “rota rod”, edema de orelha induzido por capsaicina, peritonite induzida por carragenina e ensaio da avaliação de inibição de COX *in vitro*, foram realizados apenas com a caulerpina, a fim de verificar se a mesma apresentava atividade antiinflamatória, bem como pesquisar seu provável mecanismo de ação.

Tabela 1: Atividade antinociceptiva do EMB, das fases clorofórmica, acetato de etila, n-butanólica (todos na dose de 100 mg/kg, v.o.), caulerpina e indometacina (ambos na dose de 100 μ mol/kg, i.p.) no teste de formalina (fase neurogênica e fase inflamatória)

Grupos	Dose (mg/kg) ou μ mol/Kg#	n ^a	1 ^a fase neurogênica ^b Tempo (s)	1 ^a fase Inibição (%)	2 ^a fase inflamatória ^b Tempo (s)	2 ^a fase Inibição (%)
Controle (veículo)	---	6	69,6 $\pm$ 2,2	---	237,4 $\pm$ 23,0	---
Indometacina [#]	100	6	47,3 $\pm$ 4,6*	32,0	119,4 $\pm$ 30,0*	57,7
EMB	100	6	33,5 $\pm$ 1,7*	59,8	154,7 $\pm$ 10,8	45,2
Fase clorofórmica	100	6	47,6 $\pm$ 1,5*	42,9	159,3 $\pm$ 17,3	53,0
Fase acetato de etila	100	6	58,9 $\pm$ 4,4	15,2	59,6 $\pm$ 9,7**	82,4
Fase n-butanólica	100	6	44,4 $\pm$ 3,4*	46,7	184,8 $\pm$ 54,8	45,5
Caulerpina [#]	100	6	47,4 $\pm$ 3,4*	31,8	129,6 $\pm$ 28,0*	54,1

Os dados representam a média e o erro padrão da média de 6 animais (*P < 0,05, **P < 0,01 no teste de ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet).

Tabela 2: Efeito das fases clorofórmica, n-butanólica, acetato de etila (todos na dose de 100 mg/kg, v.o.), caulerpina (100 μ mol/kg, v.o) e morfina (15 μ mol/kg, s.c.) no ensaio da placa quente.

Grupos	Pre-tratamento (min)		Pós-tratamento (min)			
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min
Controle	1.4 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.6	1.8 $\pm$ 0.2	3.2 $\pm$ 0.3	2.8 $\pm$ 0.3	2.6 $\pm$ 0.5
Morfina	6.9 $\pm$ 0.4	5.8 $\pm$ 0.3	12.8 $\pm$ 0.4**	10.3 $\pm$ 0.8**	9.7 $\pm$ 0.7**	9.7 $\pm$ 0.9**
Fase Clorofórmica	2,3 $\pm$ 0,2	4,5 $\pm$ 0,9	3,5 $\pm$ 0,6	4,2 $\pm$ 0,9	6,6 $\pm$ 1,5	8,1 $\pm$ 1,7**
Fase Acetato de etila	3,6 $\pm$ 0,4	2,9 $\pm$ 0,8	3,6 $\pm$ 0,5	8,0 $\pm$ 2,3**	9,5 $\pm$ 2,7*	8,3 $\pm$ 0,4
Fase n-butanólica	2.7 $\pm$ 0.2	1,7 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 0,5	2,5 $\pm$ 0,2
Caulerpina	1,88 $\pm$ 0.2	2,3 $\pm$ 0,6	3,3 $\pm$ 0,5	4,6 $\pm$ 0,6**	3,8 $\pm$ 0,5*	4,0 $\pm$ 0,5*

Os dados representam a média e o erro padrão da média de 6 animais (*P<0,05, **P<0,01 no teste de ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet).

6.4 Efeito da caulerpina e do diazepam no teste de “rota rod”

Para investigar se o tratamento com caulerpina estaria causando incoordenação motora ou algum efeito neuroléptico, foi realizado o ensaio de “rota rod”. Este ensaio vem confirmar ou não os dados da caulerpina no ensaio de placa quente e de contorção abdominal, já que estes estão relacionados também com a resposta motora dos animais. A Tabela 3 mostra os efeitos da caulerpina (100 $\mu\text{mol/kg}$, v.o) e do diazepam (35,1 $\mu\text{mol/kg}$, i.p) no teste “rota rod” 0,5-1 h. Neste ensaio, a caulerpina não promoveu incoordenação motora ou relaxamento muscular que pudessem comprometer a permanência dos camundongos na barra giratória, ou seja, não alterou a latência e o número de quedas dos animais quando comparado com o grupo controle, ao contrário do diazepam, fármaco padrão, que reduziu de forma significativa (** $p < 0,01$) o tempo na barra giratória, indicando uma deficiência motora, diminuição da latência e um aumento do número de quedas dos animais, como esperado para fármacos da classe dos ansiolíticos e hipnóticos.

6.5 Perfil antiinflamatório da caulerpina e da indometacina no ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina

Para investigar a atividade antiinflamatória foi realizado o ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina em camundongos. A aplicação tópica de capsaicina causou um aumento significativo de extravasamento de plasma em relação à orelha controle no mesmo animal tratado com veículo. Os resultados do ensaio citado estão expostos no gráfico 5, onde observa-se que o tratamento prévio com caulerpina inibiu significativamente 55,8% o extravasamento de plasma, quando comparado com o grupo controle. A indometacina, fármaco padrão, apresentou 44,1% de inibição.

Tabela 3: Efeito da caulerpina (100 $\mu\text{mol/kg}$, v.o) e diazepam (35,1 $\mu\text{mol/kg}$, i.p) no teste de “rota rod”.

Tratamento $\mu\text{mol/kg}$	Latência de quedas (s)		Número de quedas (s)	
	0,5h	1h	0,5h	1h
Salina	198,0 $\pm$ 28,1	221,0 $\pm$ 19,0	0,4 $\pm$ 0,3	0,2 $\pm$ 0,2
Caulerpina	182,3 $\pm$ 37,3	240,0 $\pm$ 0	0,9 $\pm$ 0,4	0 $\pm$ 0
Diazepam	2,7 $\pm$ 0,6**	109,9 $\pm$ 36,7**	9,2 $\pm$ 2,2**	3,9 $\pm$ 1,4**

Os valores representam a média $\pm$ S.E.M. de 6 animais em cada grupo. ** $p < 0.01$ quando comparado com ambos os controles. ANOVA One way seguido de Newman-Keuls como pós-teste.

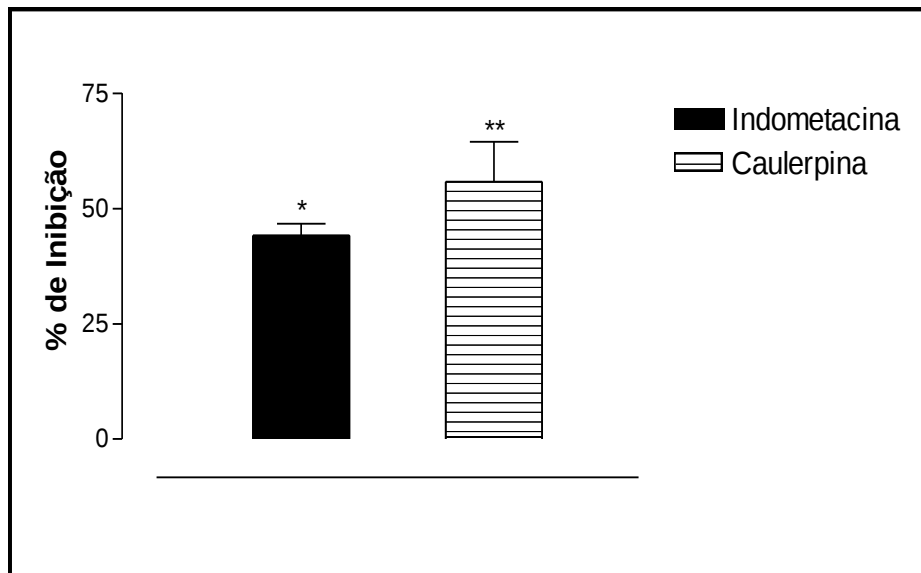


Gráfico 5: Perfil antiinflamatório da caulerpina e indometacina (ambos na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$, v.o) no ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina. Os dados representam a média e o erro padrão da média de 6 animais (** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ no teste de ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet).

6.6 Atividade antiinflamatória da caulerpina e indometacina no ensaio de peritonite induzida por carragenina

Para avaliar a atividade antiinflamatória da caulerpina sobre a mobilização de células foi realizado o ensaio de peritonite induzida por carragenina, que também é um modelo experimental de inflamação bem caracterizado. Os resultados deste ensaio estão expressos no gráfico 6.

Observa-se que a caulerpina apresentou efeito antiinflamatório significativo quando comparada ao grupo controle, apresentando porcentagem de inibição de migração celular de 48,3% ($48,2 \pm 7,8$) e a indometacina apresentou 72,1% ($72,7 \pm 2,3$) de migração celular. Tal fato corrobora o provável efeito antiinflamatório da caulerpina, evidenciado na fase inflamatória do teste de formalina e no ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina.

Para melhor compreender o efeito da caulerpina na migração celular foi realizada a contagem diferencial de leucócitos em citocentrifugado de células do exsudato peritoneal (tabela 4). No resultado de contagem diferencial de leucócitos observou-se que a caulerpina causou uma inibição de forma efetiva da mobilização celular de leucócitos polimorfonucleares, um aumento de monócitos e uma inibição de forma efetiva na mobilização de linfócitos no ensaio de peritonite induzida por carragenina. A indometacina, fármaco padrão, inibiu o recrutamento de células polimorfonucleares e mononucleares (linfócitos) de forma significativa.

6.7 Inibição *in vitro* das enzimas COX-1/COX ovinas por caulerpina e Indometacina

Como a COX é uma enzima expressa por células envolvidas em processos inflamatórios e foi correlacionada como sendo a maior responsável pela produção de prostanoídes nos processos inflamatórios e dolorosos, este ensaio *in vitro* de inibição de COX 1/COX 2 vem possibilitar a verificação do mecanismo de ação da caulerpina.

Observa-se que caulerpina foi capaz de inibir, significativamente apenas COX-1, com um perfil de inibição parecido com o observado para indometacina na concentração de 0,2 μ M (gráfico 7)

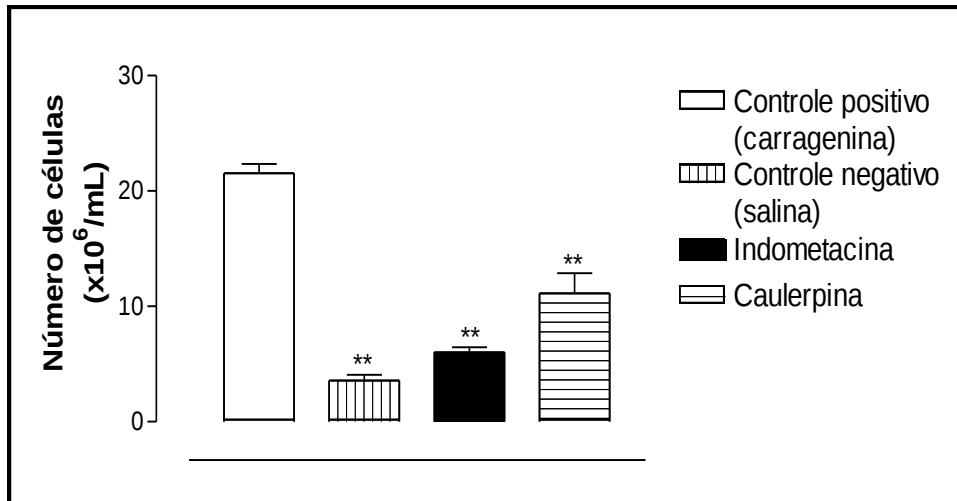


Gráfico 6: Atividade antiinflamatória da caulerpina e indometacina (ambos na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$, i.p) no ensaio de peritonite induzida por carragenina. Os dados representam a média e o erro padrão da média de 6 animais (** $P < 0,01$ no teste de ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet).

Tabela 4: Efeito do tratamento da caulerpina e indometacina (ambos na dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$, v.o) no recrutamento de células.

Tratamento	Porcentagem de células (%)		
	Polimorfonucleares	Linfócitos	Monócitos
Salina	15,5	80,0	1,5
Carragenina	34,5	44,0	20,5
Indometacina + Carragenina	7,0*	68,0*	21,0
Caulerpina + Carragenina	6,0*	63,0*	31,0*

Os dados representam a média e o erro padrão da média de 6 animais (*P < 0,05) no teste de ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet).

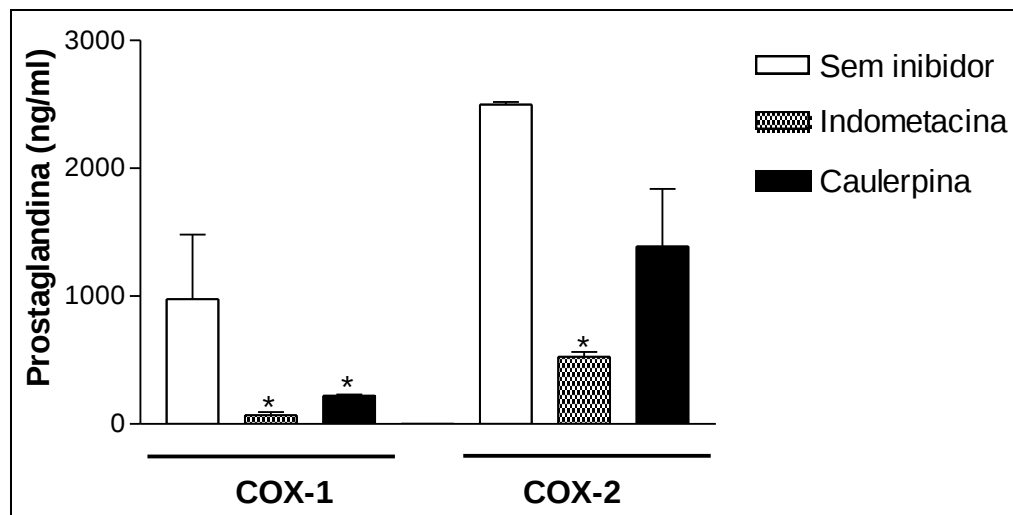


Gráfico 7: Inibição *in vitro* das enzimas COX-1/COX ovina por caulerpina e indometacina, ambas na concentração de 0,2 μM . Os dados representam a média e o erro padrão da média (*P<0,05 no teste de ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet).

7 DISCUSSÃO

O ambiente marinho é responsável pela produção de produtos naturais de uma variedade de classes estruturais que exibem atividade contra numerosas doenças. Dentre esses diversos metabólitos, destacam-se os alcaloides indólicos, que é uma das classes de produtos marinhos promissores no desenvolvimento de novos fármacos por apresentar diversas atividades biológicas como, antiviral, antiparasitária, antiinflamatória e antineoplásica (Gul; Hamann, 2005). Dessa forma, esta dissertação consistiu na avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória do EMB, das fases clorofórmica, acetato de etila, n-butanólica e da caulerpina, um alcaloide bisindolico isolado de *C. racemosa*.

Inúmeros modelos de nocicepção e inflamação com animais de laboratórios podem ser utilizados para verificar a atividade analgésica e antiinflamatória de extratos, compostos obtidos de produtos naturais e/ou sintéticos (Basbaum; Julius, 2006). Embora os animais submetidos a um estímulo nociceptivo não tenham a capacidade de se comunicar verbalmente quando da ocorrência da dor, são capazes de exibir respostas comportamentais, motoras e fisiológicas semelhantes às observadas em humanos que permitem detectar e potencializar estímulos nocivos no seu ambiente. Por isso, utiliza-se o termo “resposta nociceptiva” em vez de dor. Essas respostas comportamentais são estudadas e comparadas na presença de protótipos potencialmente analgésicos que interferem no processo da dor, o que nos permite inferir que um animal está experimentando uma resposta álgica ou inibição da mesma (Lapa et al. 2003, Peraza et al. 2007).

Vale salientar que os modelos de nocicepção e inflamação devem apresentar características próprias que devem ser consideradas tais como: reprodutibilidade, simplicidade, validade dos resultados e principalmente, sua correlação com estudos clínicos (Pietrovski, 2004). Esses modelos são baseados na observação da resposta do animal frente à utilização de estímulos mecânicos, térmicos ou químicos. Foram utilizados nesta dissertação estímulos químicos para os ensaios de contorção abdominal induzida por ácido acético (Collier *et al.*, 1968) e nocicepção induzida por formalina (Hunskar; Hole, 1987), e estímulo térmico no modelo de placa quente (Kuraishi et al., 1983). O ensaio de edema de orelha induzida por capsaicina (Mantione et al., 1990) e o de peritonite induzida por carragenina (Ferrándiz; Alcaraz, 1991) foram utilizados para avaliar a atividade antiinflamatória da caulerpina. Para verificar se a caulerpina estaria causando incoordenação motora, foi realizado o ensaio de “rota-rod” (Godoy et al., 2004). Realizou-se também ensaio *in vitro* de inibição de COX (Uddin et al., 2004), para pesquisar o possível mecanismo de ação da caulerpina.

Desta forma, o primeiro ensaio realizado foi o de contorção abdominal induzida por ácido acético. Os resultados evidenciaram uma diminuição significativa no número de contorções abdominais pelo EMB, pelas fases clorofórmica, acetato de etila, n-butanólica e caulerpina. Esses dados corroboram os resultados citados por Matta et al. (2011), que observaram atividade antinociceptiva de extratos das espécies *Caulerpa mexicana* e *Caulerpa sertularioides* em modelos de nocicepção e inflamação. Além disso, utilizando esse mesmo modelo, Vanderlei et al. (2010) reportam a atividade antinociceptiva de uma lectina purificada de *Caulerpa cupressoides* (v.o.), que apresentou atividade antinociceptiva dose-dependente. Estes resultados mostram que assim como a *C. racemosa* outras espécies de *Caulerpa* também apresentam o mesmo efeito, sugerindo que as mesmas podem possuir metabólitos comuns que promovem tal resposta.

Evidenciou-se também no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético que a eficácia máxima ($E_{máx}$) da caulerpina foi de 83,1%, similar a exibida pelo fármaco de referência dipirona ($E_{máx}$ de 78,9%). Com relação à potência, a caulerpina (CI_{50} de 0,24 μ M/kg) apresentou-se tão potente quanto à dipirona (CI_{50} de 0,12 μ M/kg). Diversos trabalhos reportam a atividade antinociceptiva de substâncias indólicas, como por exemplo, no trabalho de Salam (2006), onde a vimopocetina, um alcaloide indólico utilizado como suplemento para vasodilatação e como agente nootrópico para a melhoria da memória, mostrou-se capaz de diminuir de forma dose-dependente o número de contorções abdominais em camundongos, apresentando atividade antinociceptiva. Outro estudo com uma série de 13 derivados indólicos demonstrou uma alta porcentagem de inibição estatisticamente significativa no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético quando comparados ao controle, com alta potência e eficácia antinociceptiva quando comparados ao fármaco padrão (Radwan et al., 2007).

O teste de contorção abdominal induzido por ácido acético é um modelo de dor visceral e amplamente utilizado para avaliar a atividade antinociceptiva periférica (Du et al., 2007). Embora este seja um modelo de nocicepção simples e pouco específico (por exemplo, anticolinérgicos, antidepressivos tricíclicos e anti-histamínicos e outros agentes mostram a atividade neste ensaio), permite avaliar a atividade antinociceptiva de várias substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico (Ikeda et al., 2001, Parveen et al., 2007). O ácido acético quando administrado causa um comportamento estereotipado em camundongos, caracterizado por contrações abdominais, os movimentos do corpo como um todo e uma redução da atividade motora e de coordenação (Le Bars, Gozariu, Cadden, 2001, Zeashana et al., 2009), promovendo a liberação de diversos mediadores inflamatórios como

prostaglandinas (PGE2 e PGF2 α), bradicinina, substância P, TNF- α , IL-1 β , IL-8, bem como produtos de lipoxigenase entre outros (Ribeiro et al., 2000; Ikeda et al., 2001; Du et al., 2007), podendo ainda ser mediada pela dissociação dos prótons presentes nesse agente, que estimulam os canais TRPV1 (receptor de potencial transitório vaniloide 1) e ASICs (canais iônicos sensíveis a ácido) localizados nos neurônios aferentes primários (Julius; Basbaum, 2001; Coutaux et al., 2005).

A dipirona, utilizada como padrão nesse experimento, por ser um potente analgésico exercem seus efeitos, pelo menos em parte, devido à inibição da via da COX, impedindo a produção de PGs (Feng; Cui; Willis, 2003). É possível que haja outros mecanismos que gerem o efeito antinociceptivo observado para este fármaco. 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).

Diante do exposto, é possível sugerir que o EMB, as fases e a caulerpina de *C. racemosa*, possuem atividade antinociceptiva, uma vez que a dose testada foi efetiva em reduzir a resposta visceral produzida pelo ácido acético. Essa atividade poderia estar relacionada à inibição direta da liberação de mediadores induzidos pelo ácido; por inibição direta de COX; inibindo assim a síntese de prostaglandinas (Ferreira; Nakamura; Castro, 1978) e/ou uma diminuição da atividade dos receptores noniceptivos periféricos (Berkenkopf; Weichman, 1988) ou mesmo modulando centralmente a transmissão nociceptiva por inibição dos canais TRPV1 e ASICs. Entretanto, dados da literatura mostram claramente que vários grupos como anti-histamínicos, hipotensores, estimulantes ou depressores do SNC, além dos antiinflamatórios não-esteroidais e opioides podem inibir essa resposta nociceptiva (Hendershot; Forsaith, 1959; Collier et al., 1968; Santos; Vedana; Freitas, 1998). Nesse sentido, considera-se que embora o teste de contorção abdominal induzida por ácido acético seja sensível para triagem de fármacos com atividade analgésica esse não deve ser assumido como exclusivo para tal classe.

Com o objetivo de confirmar e melhor compreender a atividade antinociceptiva do EMB, das fases clorofórmica, acetato de etila, n-butanólica e da caulerpina foi realizado o ensaio de nocicepção induzido por formalina, este que é sensível a vários tipos de analgésicos e antiinflamatórios (Hunskaar; Hole, 1987). Este ensaio é constituído de duas fases diferentes de nocicepção frente ao mesmo estímulo, o que permite avaliar dois tipos distintos de dor, central e periférica (Tjolsen et al., 1992). A primeira fase (neurogênica) é causada pela ação direta de formalina sobre as fibras sensoriais do tipo C, e a segunda fase (inflamatória) está associada com o desenvolvimento de uma resposta inflamatória e pela liberação de

mediadores nociceptivos (Hunnskaar; Hole, 1987; Shibata et al., 1989). É um método muito útil, não apenas para avaliar os fármacos analgésicos, mas também contribui para a elucidação do mecanismo de ação.

Neste ensaio, nossos resultados mostraram que o tempo de lambida da pata foi significativamente reduzido na fase neurogênica quando os animais foram tratados com o EMB, a fase clorofórmica, n-butanólica e caulerpina. Na fase inflamatória do teste apenas a fase acetato e a caulerpina reduziram de forma significativa o tempo de lambida. Esses dados mostram que a fase acetato e a caulerpina apresentam algum mecanismo que atua sobre o processo inflamatório.

A caulerpina, por apresentar dois anéis indólicos na sua estrutura química, pode exibir seu efeito antinociceptivo no teste de formalina via interação com receptores serotoninérgicos, visto que há inúmeras evidências que a ativação de receptores 5-HT₂ e 5-HT₃ da medula espinhal produzem nocicepção no teste de formalina (Sasaki et al., 2001), bem como em outros testes com receptores 5-HT modulam a transmissão nociceptiva (Bardin et al., 2000). Por exemplo, a ioimbina, um alcalóide indólico antagonista de α_2 -adrenoreceptor, da mesma forma que a caulerpina produz efeitos significativos quando administrado por via intraperitoneal nas duas fases do teste de formalina. Essa atividade antinociceptiva da ioimbina envolve agonismo de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A}, além de agir como antagonista de receptores TRPV-1 e de canais de sódio sensíveis e resistentes a tetrodotoxina (Dessaint et al., 2004).

Fármacos que agem principalmente no SNC, tais como narcóticos, inibem as duas fases igualmente, enquanto fármacos de ação periférica como antiinflamatório não-esferoidais (AINE) e antiinflamatórios esteroidais inibem principalmente a fase final (Zeashana et al., 2009; García et al., 2004). Entretanto, inibidores seletivos de COX-1 (SC-560) inibem ambas as fases da formalina, demonstrando que AINEs não-seletivos são capazes de atuar tanto na fase neurogênica quanto na fase inflamatória do teste de formalina (Tegeder et al., 2001). Santos; Vedana e Freitas (1998) demonstraram que o meloxicam, AINE não-seletivo, é capaz de inibir a fase neurogênica em concentrações superiores às necessárias para inibir a fase inflamatória da formalina.

Diante disso, é possível sugerir que o efeito da fase acetato de etila e da caulerpina na fase inflamatória do ensaio de nocicepção induzida por formalina pode estar relacionada à inibição da COX e/ou da produção de serotonina (Calixto et al., 2000) e de citocinas inflamatórias ou outros mediadores inflamatórios (Chichorro; Lorenzetti; Zampronio, 2004).

Baseando-se no fato de que o ensaio de contorção é sensível a uma diversidade de fármacos com ação central e periférica, foi realizado o ensaio de placa quente para avaliar uma possível atividade antinociceptiva central. Neste ensaio, o tratamento com a fase clorofórmica, a fase acetato de etila e a caulerpina causaram um aumento significativo no tempo de latência dos animais, demonstrando que estas fases e a caulerpina apresentam atividade antinociceptiva central, enquanto que a fase n-butanólica não tem efeito antinociceptivo central neste modelo. A morfina, fármaco padrão, causou um aumento significativo no tempo de latência em toda administração, como era de esperar se tratando de um analgésico opioide.

Da mesma forma que a caulerpina, várias substâncias indólicas exibem atividade antinociceptiva central. Radwan et al. (2007) mostraram que vários derivados indólicos apresentaram potência antinociceptiva central. Outro exemplo é a atividade antinociceptiva central de mitraginina, um alcaloide indólico isolado de *Mitrugyna speciosu* cujo mecanismo de ação envolve as vias descendente adrenérgicas e serotoninérgicas (Matsumoto et al., 1996). Já o alcaloide indólico 7-hidroxitmitraginina, isolado da mesma planta e com semelhança estrutural com a mitraginina, é um potente antinociceptivo opioide oral (Matsumoto et al., 2004). A umbelatina, alcalóide indólico isolado de *Psychotria umbellate*, também apresenta efeito antinociceptivo central via sistema opioide, e devido à inibição de receptores glutamimérgicos do tipo NMDA (Both et al., 2002).

Em estudos de triagem farmacológica de compostos com propriedades analgésicas, a investigação do sistema opioide é uma constante. Um dos principais motivos para essa busca é o objetivo de se chegar a um fármaco com propriedades terapêuticas semelhantes as da morfina, mas desprovido de efeitos adversos indesejáveis que limitam seu uso na terapêutica, principalmente no que diz respeito à tolerância e a dependência (Williams et al., 2004, Gris et al., 2010).

O ensaio de placa quente é um modelo de dor neurogênica de ação central direta que mede o tempo de reação do animal a um estímulo térmico capaz de produzir nocicepção, sendo seletivo para substâncias analgésicas que agem pela via central como a morfina (Woolfe; Mac Donald, 1944, Chu et al., 2008). A antinocicepção central pode ser resultante não apenas da inibição das vias opioides, mas também da inibição da COX-3, uma isoforma de COX encontrada no cérebro que compartilha características estruturais e catalíticas com a COX-1 e 2 (Chandrasekharan et al., 2002). Estudos mostram que o paracetamol e a dipirona, fármacos analgésicos/antipiréticos, são capazes de reduzir a dor por um mecanismo central de inibição da COX-3, uma isoforma que parece ser expressa em altos níveis no sistema nervoso

central (Chandrasekharan et al., 2002; Botting e Ayoub, 2005). Confirmando essa hipótese, Bisson (1991) mostrou a eficácia do paracetamol (105 e 315 mg/kg) no ensaio de placa quente, que aumentou o tempo de latência dos animais na placa de forma dose-dependente (Bisson, 1991).

Diante do exposto, os dados resultantes desse experimento sugerem que as fases clorofórmica, acetato de etila e a caulerpina podem apresentar atividade antinociceptiva com envolvimento de mediadores centrais, podendo estar atuando pela via opioide e/ou por meio de receptores vaniloides (TRPV-1), ou ainda pelo VLR-1 e ASIC. É possível sugerir, também, que possível atividade analgésica central dessas fases e da caulerpina pode ocorrer por um mecanismo de inibição de COX-3. Podemos ainda sugerir que a caulerpina, por apresentar semelhança estrutural com a serotonina, apresente interação com os receptores serotoninérgicos (Clunie et al., 2003). Entretanto, os nossos dados não são conclusivos para afirmar tais fatos, haja vista, não sabemos se estes produtos atravessam a barreira hematoencefálica. Este estudo é objeto de pesquisa de uma dissertação em andamento do nosso grupo.

Para tanto, seria necessário experimentos que avaliassem a nocicepção através de administração intratecal da caulerpina, uma vez que nesta via as substâncias são injetadas no canal raquideano, diretamente no espaço subaracnoide, evitando assim a barreira hematoencefálica. Além disto, o ensaio de retirada de cauda, método utilizado assim como o ensaio de placa quente para avaliar antinocicepção central, também pode ser usado para avaliação da atividade antinociceptiva (Kuraish et al., 1983).

Considerando que o ensaio de contorção abdominal, assim como o ensaio de placa quente, fundamenta-se na mensuração de respostas motoras dos animais, resultados falso-positivos poderiam ser obtidos caso ocorresse incoordenação motora por sedação, depressão do sistema nervoso central e/ou relaxamento muscular. Para investigar se o tratamento com a caulerpina estaria causando incoordenação motora, foi realizado o ensaio de “rota-rod”. Neste ensaio, a caulerpina não promoveu incoordenação motora ou relaxamento muscular que pudessem comprometer a permanência dos camundongos na barra giratória, ao passo que o diazepam, fármaco padrão da classe dos ansiolíticos e hipnóticos, reduziu de forma significativa o tempo de permanência na barra giratória. Este método permite avaliar a especificidade da ação nociceptiva de substâncias, verificando se estas promovem incoordenação motora dos animais, seja por sedação e/ou por relaxamento muscular (Mattei; Franca, 2006). Estes resultados excluem a hipótese da redução das contorções abdominais e

do aumento do tempo de permanência na placa quente produzido pela caulerpina ter sido resultante de ações sedativa ou interferência na capacidade motora dos camundongos.

Uma vez que a os dados obtidos da caulerpina na fase inflamatória do teste de formalina apontaram para uma possível ação sobre a dor inflamatória, foi realizado o modelo de edema de orelha induzido por capsaicina, um modelo de inflamação largamente utilizado e bem caracterizado. No resultado foi observado que a aplicação tópica de capsaicina causa um aumento significativo de extravasamento de plasma em relação ao controle da orelha no mesmo animal tratado com um veículo. O tratamento prévio com caulerpina apresentou uma inibição significativa quando comparada com o fármaco padrão, indometacina. Esse resultado pode sugerir uma possível ação sobre a liberação de mediadores neurogênicos e/ou inflamatórios, bem como um possível envolvimento com o TRPV-1, pois tem sido proposto por estudiosos que a nocicepção induzida pela capsaicina é conseguida através da ativação de um receptor responsivo a capsaicina, também conhecido como receptor vaniloide (TRPV), denominado TRPV1 (Caterina et al., 1997; Rang et al., 2007).

A atividade antinociceptiva/antiinflamatória da caulerpina pode ainda ser resultante da ação sobre receptores canabinoides CB1 e CB2, uma vez que já foi descrito que grupamentos indólicos apresentam afinidade por esses subtipos de receptores em modelos 3D-QSAR de afinidade e seletividade, através de análises comparativas de campo molecular e comparação dos índices de similaridade (Freitas et al., 2009). Os receptores canabinoides, bem como seus ligantes endógenos como a anandamida, estão envolvidos na modulação da dor (Guindon; Hohmann, 2009).

Após a caulerpina apresentar uma possível atividade antiinflamatória demonstrada na fase inflamatória da formalina e no ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina, foi investigado também sua atividade antiinflamatória utilizando o modelo de peritonite induzida por carragenina, que avaliou a sua capacidade de inibir ou não o recrutamento leucocitário, uma das etapas essenciais do processo inflamatório. A migração de neutrófilos durante uma resposta inflamatória resulta principalmente a partir da liberação de mediadores inflamatórios pelas células residentes que induzem o rolamento e adesão destes sobre as células endoteliais seguida da sua transmigração para o espaço extravascular. Com isso, sugere-se que a possível atividade antiinflamatória da caulerpina ocorre na fase inicial da inflamação, durante o rolamento ou aderência dos neutrófilos. Já está bem fundamentado que a inflamação induzida por carragenina pode ser bloqueada por um pré-tratamento com antiinflamatórios não-esteroidais, que inibem a COX, reduzindo a biossíntese de prostaglandinas (Farsam et al., 2000).

A carragenina quando aplicada na cavidade peritoneal induz uma resposta inflamatória caracterizada por intensa exsudação plasmática e migração de células, particularmente de neutrófilos. Essa migração é decorrente da grande estimulação da liberação de mediadores inflamatórios como as prostaglandinas, principalmente, histamina, bradicinina, neuropeptídios e óxido nítrico (Di Rosa, 1972; Paulino et al., 2008; De Melo et al., 2009). A utilização do fluido peritoneal de camundongos se deve ao fato desse material ser excelente para o estudo de leucócitos extravasculares. Um dos motivos, é que o número de células livres do fluido peritoneal é totalmente constante em camundongos não estimulados, embora mudanças rápidas e dramáticas na população celular possam ocorrer em motivo da manipulação experimental, o sistema se reequilibra e a população celular tende a retornar as medidas normais. Assim, o fluido peritoneal do camundongo parece estar sob controle de mecanismos homeostáticos. Além disso, o fluido peritoneal do camundongo não estimulado contém poucos neutrófilos, fato que facilita detectar e medir o influxo de qualquer número de células (Martins, 1989).

Os resultados obtidos neste ensaio mostram que a caulerpina é capaz de inibir a migração celular principalmente de neutrófilos (células polimorfonucleares) de forma significativa quando comparada com o grupo controle que recebeu apenas carragenina. De acordo com Vinegar e Truax (1976), a mobilização de neutrófilos (polimorfonucleares) resultantes da injeção peritoneal de carragenina aumenta entre a 1ª e 3ª horas, sendo que a mobilização de monócitos ocorre duas a três horas após a presença dos polimorfonucleares. Este fato pode ser comparado e observado ao grupo controle carragenina: grupo tratado pela indometacina e caulerpina, onde nota-se um pequeno aumento do número de células mononucleares. Os neutrófilos são responsáveis pela liberação de mediadores pró-inflamatórios com funções bem caracterizadas que incluem liberação de enzimas proteolíticas, geração de radicais livres de oxigênio, síntese de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos (Rocca; Fitzgerald, 2002). Seus domínios intracelulares interagem com várias proteínas desencadeando sinais de transdução que levam a uma grande variedade de respostas. Dessa forma, observa-se que a caulerpina é capaz de suprimir o recrutamento de neutrófilos para os sítios inflamatórios. Esses dados corroboram os resultados anteriores obtidos nos ensaios de contorção e formalina, indicando que a caulerpina pode exercer atividade antiinflamatória, provavelmente, por inibição da migração celular, devido à inibição da COX, principalmente, e/ou outros mediadores inflamatórios.

Dessa forma, para verificar o mecanismo de ação pelo qual caulerpina induz antinocicepção, bem como para comprovar se a mesma apresenta atividade antiinflamatória,

foi realizado ensaio *in vitro* de inibição de cicloxigenase. De acordo com os resultados obtidos, caulerpina foi capaz de inibir, significativamente apenas COX-1, na concentração de 0,2 μ M, sugerindo assim que o mecanismo de ação da caulerpina envolva a inibição de prostaglandinas produzidas por COX-1. O fármaco de referência utilizado como padrão neste ensaio, a indometacina, foi capaz de inibir tanto COX-1 como COX-2, na mesma concentração.

Além da caulerpina, outro metabólito dominante no gênero *Caulerpa*, sesquiterpeno caulerpenina, mostrou-se ativo em inibir lipooxigenase (Cengiz et al., 2010). No trabalho realizado por Hamburger (2002), o alcaloide indólico triptantrina consegue inibe as enzimas COX-1 e LOX-5 e a síntese de NO, impedindo, assim, a formação de substâncias espasmogênicas e o recrutamento de células inflamatórias (Hamburger, 2002).

Recentemente, um grande número de diferentes tipos de alcaloides naturais com atividade antinociceptiva foram relatados, tais como pronuciferina, glaucina, nuciferina e pukateina (Calixto et al., 2000). Além disso, estudos têm mostrado que os alcaloides podem apresentar uma importante atividade antiinflamatória. Estes compostos podem suprimir a reação antígeno-anticorpo e proliferação de linfócitos induzida por mitógenos, a atividade de células natural-killer, a citotoxicidade celular, a liberação de histamina pelos mastócitos, a secreção de interleucina-1 (IL-1) pelos monócitos humanos e ação do PAF em plaquetas (Radwan et al., 2007).

Os mecanismos de ação das atividades antinociceptiva e antiinflamatória da caulerpina podem envolver a inibição da COX e atividade antioxidante. Além disso, sua ação antinociceptiva central pode ser devido a sua possível ação como um agonista parcial dos receptores adrenérgicos, serotoninérgicos, colinérgicos e dopaminérgicos. A serotonina já foi relatada como sendo capaz de proteger os tecidos biológicos contra danos causados pela radiação. Isso pode indicar a capacidade de interagir com a serotonina ou gerar espécies reativas de oxigênio sequestrantes por radiações ionizantes e derivados da serotonina também possuem grande potencial como antioxidantes naturais (Stole, 1999; Kang et al., 2009). A sensibilidade do triptofano ao estresse oxidativo, bem como a atividade de proteção radial da serotonina pode ser um indicativo da importância da fração indol em radicais livres (Stole, 1999). Além disso, a indometacina, um AINE indólico, é um potente sequestrador de espécies reativas de oxigênio e inibem a atividade oxidativa intracelular e exercem efeitos antioxidantes na membrana de lipossomas (Maffei-Facino et al., 1993).

Sabe-se que, embora a indução da COX-2 por estímulos inflamatórios seja o principal responsável pelos altos níveis de prostanoídes no sítio inflamatório, o papel da COX-1 em

modular a resposta inflamatória não deve ser menosprezada (Burian; Geisslinger, 2005). A afirmação de que a expressão da isoforma COX-1 está envolvida apenas em funções fisiológicas normais, como a agregação plaquetária, proteção da mucosa gástrica e homeostase eletrolítica renal vêm sendo quebrada. Através do uso de baixas doses de aspirina®, que assim se comporta como um inibidor preferencial da COX-1 plaquetária, esclareceu-se o papel exercido por esta isoenzima em muitos tipos de células de mamíferos. Achados mais recentes sobre a inibição seletiva da COX-1 demonstram sua relevância para várias condições patológicas humana, como câncer, inflamação, febre e dor, além da neuroproteção e cardio-proteção (Perrone et al., 2010).

A indometacina além de suprimir a formação de prostaglandinas por inibição da COX é conhecida por possuir atividade COX-independente, tais como a supressão de transformação maligna de fibroblastos embrionários e ativação do receptor proliferador-ativado α e γ (Hata et al., 2005), e é também um conhecido inibidor de fosfolipase A2 (Touhey et al., 2002). Este fármaco é capaz de inibir a etapa de rolagem de neutrófilos durante o processo inflamatório, devido à inibição na expressão de L-selectina na superfície dessas células (Díaz-González; Sánchez-Madrid, 1998). Então, a caulerpina pode estar atuando de forma semelhante, pois a mesma apresenta um núcleo indol semelhante à indometacina e serotonina. Dessa forma, vem corroborar a sua capacidade de inibir o recrutamento leucocitário no ensaio de peritonite induzida por carragenina.

Analisando a estrutura da caulerpina (figura 10A) é notada a presença de dois grupos indóis (potente núcleo farmacofórico). Possivelmente esse grupo seja responsável pela atividade farmacológica deste alcaloide aqui apresentada, uma vez que esse núcleo é comum também a indometacina (figura 10B), um AINE não-seletivo. Na literatura tem sido relatado que o grupo indol possui ampla variedade de propriedades biológicas como antiinflamatório, anticonvulsivante, cardiovascular, antibacteriana e antifúngica (Radwan et al., 2007; Bhati; Kumar, 2008). Como caulerpina, descrita neste trabalho, ajmalina, annomontina, criptolepina evodiamina e reserpina são outros exemplos de alcaloides indólicos descritos na literatura como ativos em modelos de inflamação (Radwan et al., 2007).

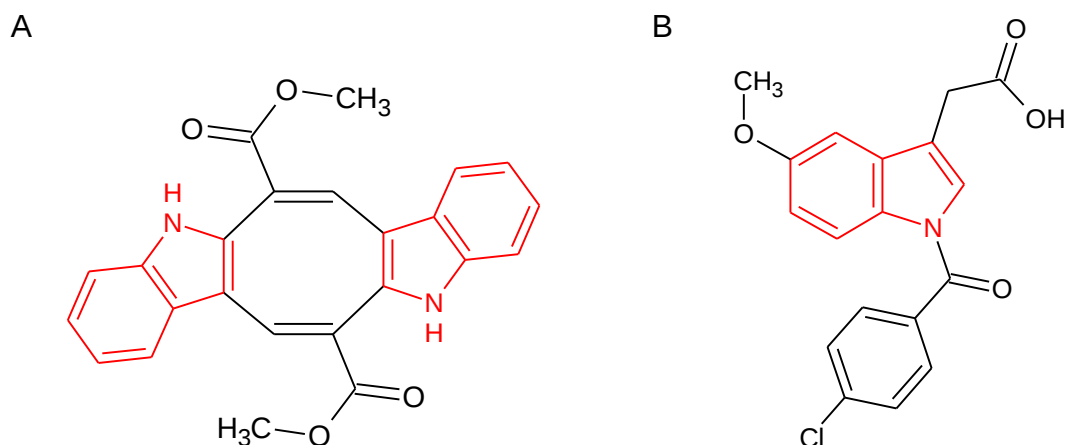


Figura 10. Estrutura da caulerpina (A) e indometacina (B) com destaque núcleo indol (vermelho)

Por apresentar grupamentos químicos em comum com a indometacina e por apresentar atividade antinociceptiva/antiinflamatória, pode-se sugerir que a caulerpina possa está inibindo a COX de forma semelhante à indometacina, ou seja, através de ligações fortes tempo-dependente com esta enzima. Ainda existem outras três formas de inibição da COX que os AINEs não-seletivos podem atuar: (1) através de ligações covalentes, como o ácido acetilsalicílico que acetila o resíduo de serina 530 em COX-1 e 516 em COX-2 (Botting, 2006); (2) de forma competitiva, como ibuprofeno; (3) através de ligações fracas tempo-dependente, como naproxeno (Binghama et al., 2006).

Por fim, a caulerpina parece não apresentar efeitos sedativos, baseado nos resultados do ensaio da barra giratória, diferente da indometacina que apresenta efeitos adversos centrais como tonturas, vertigens, além de induzir psicose. O mecanismo pelo qual a indometacina causa psicose ainda é incerto, no entanto a similaridade estrutural da caulerpina com a serotonina, ambos apresentam o grupo indol, pode ser um dos motivos para desenvolvimento da psicose (Tharumaratnam; Bashford; Khan, 2000). A presença de dois grupos indóis na estrutura da caulerpina, contra apenas um apresentado pela indometacina e serotonina, pode está favorecendo este alcaloide no que concerne ausência de efeitos adversos centrais.

No entanto, estudos estão sendo realizados por nosso grupo para elucidar estas hipóteses.

8 CONCLUSÕES

Diante do exposto, os resultados obtidos permitem concluir que:

- A espécie *C. racemosa* possui atividade antinociceptiva e antiinflamatória descritos pela primeira vez neste trabalho;
- A atividade antinociceptiva do EMB, de fases clorofórmica, acetato de etila, n-butanólica e de um alcaloide isolado da mesma (caulerpina) foi determinada por meio de ensaios de nocicepção química e térmica;
- A atividade antiinflamatória foi determinada em modelos *in vivo* e o mecanismo de ação da caulerpina quanto a sua atividade antiinflamatória é via inibição COX-1;
- A caulerpina não induz efeitos hipnóticos e sedativos como demonstrado no ensaio de rota rod”.

REFERÊNCIAS

Abbas, A. K.; Litchman, A. H.; Pillai, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 31, 2008.

Adcock, I.M., Cosio, B., Tsaprouni, L., Barnes, P.J., Ito, K. Redox regulation of histone deacetylases and glucocorticoid-mediated inhibition of the inflammatory response. **Antioxid Redox Signal**, v. 7(1-2), p. 144-52, 2005.

Aguilar-Santos, G. Caulerpin, a new red pigment from green algae of the genus *Caulerpa*. J. **Chemical Society Perkin C: Organic**, v. 6, p. 842–843, 1970.

Aguilar-Santos, G.; Doty, M.S. Chemical studies on three species of the marine algal genus *Caulerpa*. In *Drugs from the Sea*; Freudenthal, H.D., Ed.; **Marine Technology Society: Washington**, 1968, pp. 173–176.

Albertine, R.; Aimbire, F. S. C.; Corre, F. I.; Ribeiro, W.; Cogo, J. C.; Antunes, E.; Teixeira, A. S.; De Nucci, G.; Castro-Faria-Neto, H. C.; Zângaro, R. A.; Lopes-Martins, R. A. B. Effects of different protocol doses of low power galliumaluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw edema. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v.74, p. 101, 2004.

Albuquerque, M.R.; Campos, T. e Koenig, M.L., Detection of antimicrobial activity in marine seaweeds. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 21 (1/2), p. 127-138, 1983.

Ali, M. S.; Saleem, M.; Yamdagni, R. e Ali M.A. Steroid and antibacterial steroidal glycosides from marine green alga *Codium iyengarii* Borgesen. **Natural Products Letters**, v. 16 (6), p. 407-413, 2002.

Amico, V.; Oriente, G.; Piattelli, M.; Tringali, C.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Mayol, L. Caulerpenyne, an unusual sesquiterpenoid from the green alga *Caulerpa prolifera*. **Tetrahedron Letters**, v. 38, p. 3593-3596, 1978.

Anjaneyulu, A.S.R.; Prakash, C.V.S.; Mallavadhani, U.V. Sterols and terpenes of the marine green algal species *Caulerpa racemosa* and *Codium decorticatum*. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 68, p. 480, 1991.

Anjaneyulu, A.S.R.; Prakash, C.V.S.; Mallavadhani, U.V. Two caulerpin analogues and a sesquiterpene from *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3041–3042, 1991.

Ara, J.; Sultana, V.; Ehteshamul-Haque, S.; Qasim, R.; Ahmad, V. U., Cytotoxic activity of marine macro-algae on *artemia salina* (brine shrimp). **Phytotherapy Research**, v. 13 (4), p. 304-307, 1999.

Arif JM, Al-Hazzani AA, Kunhi M, Al-Khodairy F. Novel Marine Compounds: Anticancer or Genotoxic? **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2, p. 93-98, 2004.

Ayyad, S. E. N.; Badria, F. A. Caulerpine: an antitumor indole alkaloid from *Caulerpa racemosa*. **Alexandria Journal of Pharmaceutical**, v. 83, p. 217-219, 1994.

Baker, A.; Erspamer, V. The isolation and amino acid sequence of eledoisin, the active endecapeptide of the posterior salivary gland of *Eledone*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 101, p. 56-65, 1963.

Barata, D. **Taxonomia e Filogenia do gênero *Caulerpa* J. V. Lamour. (Bryopsidales, Chlophyta) no Brasil**. Tese do Instituto de Botânica da Secretaria do meio ambiente, 2008.

Bardi, L.; Schimidt, J.; Alloui, A.; Eschaliier, A. Effect of intrathecal administration of serotonin in chronic pain models in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 409, p. 37-43, 2000.

Barnes, P.J., Adcock, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends Pharmacol Sci**, v. 14(12), p. 436-41, 1993.

Barreiro, E.J.; Fraga, C.A.M. Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos. 2ed. Porto Alegre: **Artmed**, p. 71-135, 2008.

Basbaum, A.; Bautista, D.M.; Scherrer, G.; Julius, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, p. 267-284, 2009.

Basbaum, A. I.; Julius, D. Novos alvos contra a dor. **Scientific American Brasil**, v.50, p.76-83, 2006.

Bergmann, W.; Feeney, R. J.; **Journal of Organic Chemistry**. 16, 981, 1951.

Berkenkopf, J. W. e Weichman, B. M. **Prostaglandins**, v. 36, p. 693–709, 1988.

Besson J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, p. 1610-1615, 1999.

Bhati, S.K.; Kumar, A. Synthesis of new substituted azetidinoyl and thiazolidinoyl-1,3,4-thiadiazino (6,5-b) indoles as promising anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 2323–2330, 2008.

Bhattacharya, D.; Medlin, L. Algal phylogeny and the origin of land plants. **Plant Physiology**. v. 116, p. 9-15, 1998.

Binghama, S.; Beswick, P. J.; Blum, D. E.; Gray, N. M.; Chessell, I. P. The role of the cyclooxygenase pathway in nociception and pain. **Seminars in Cell e Developmental Biology**, v. 17, p. 544–554. 2006.

Bisson, M. P. **Estudo dos efeitos analgésicos do paracetamol em diferentes modelos experimentais**. Dissertação (Mestrado em Ciências – Farmacologia) – Programa de pós-graduação em Ciências, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, SP, 1991.

Blackman, A. J.; Wells, R. J. Flexilin and tritarin, terpene 1,4-diacetoxy 1,3-dienes from two *Caulerpa* species. **Tetrahedron Letters**, v. 33, p. 3063–3064, 1978.

Both, F. L.; Kerber, V. A.; Henriques, A. T.; Elisabetsky, E. Analgesic Properties of Umbellatine. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, No. 5, p. 336–341, 2002.

Botting, R. M. Cyclooxygenase: past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927–2004). **Journal of Thermal Biology**, v. 31, p. 208–219. 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.

Boyton R.J.; Openshaw, P.J. Pulmonary defences to acute respiratory infection. **British Medical Bulletin**, v. 61, p. 1–12, 2002.

Brayner, S.; Pereira, S. M. B.; Bandeira-Pedrosa, M. E. Taxonomia e distribuição do gênero *Caulerpa* Lamouroux (Bryopsidales - Chlorophyta) na costa de Pernambuco e Arquipélago de Fernando de Noronha, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 22(4), p. 914–928, 2008.

Broche F.; Tellado, J.M. Defense mechanisms of the peritoneal cavity. **Current Opinion in Critical Care**, v. 7(2), p. 105–16, 2001.

Burian, M.; Geisslinger, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacology e Therapeutics**, v. 107, p. 139 – 154, 2005.

Burnell, D.J.; Apsimon, J. W. Ecchinoderm Saponins. In: Scheuer, P.J. (ed.) Marine natural products, chemical and biological perspectives. **New York: Academic Press**, p. 287–389, 1983.

Calixto, J.B; Beirith, A.; Ferreira, J.; Santos, A.R.S.; Cechinel-Filho, V.; Yunes, R.A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 401–418, 2000.

Capon, R.J.; Ghisalberti, E.L.; Jefferies, P.R. Metabolites of the green algae, *Caulerpa* species. **Phytochemistry**, v. 22, p. 1465–1467, 1983.

Cardinella II, J.H.; Marner, F.J.; Moore, R.E. Seaweed dermatitis: structure of lyngbyatoxin-A. **Science**, v. 204, p. 193-195, 1979.

Cardozo, K. H. M.; Guaratini, T.; Barros, M. P.; Falcão, V. R.; Tonon, A. P.; Lopes, N. P.; Campos, S.; Torres, M. A.; Souza, A. O.; Colepicolo, P.; Pinto, E.; Comparative Biochemistry and Physiology. **Part C: Toxicology Pharmacology**, v. 146, p. 60, 2007.

Carr D.B.; Goudas L.C. Acute pain. **Lancet**, v. 353 (9169), p. 2051-8, 1999.

Caterina, M. J.; Julius, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 487-517, 2001.

Carvalho, W.A.; Carvalho, R.D.S.; Rios-Santos, F. Analgesicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: Avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.54, n.3, p. 448-464, 2004.

Caterina, M.J.; Schumacher, M.A.; Tominaga, M.; Roesn, T.A.; Levin, J.D.; Julius, D. The capsaicin receptor: a heat activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816-824, 1997.

Cengiz, S.; Cavas, L.; Yurdakoc, K.; Pohnert, G. The sesquiterpene caulerpenyne from *Caulerpa* spp. is a lipoxygenase inhibitor. **Marine Biotechnology**, p. 1-6. 2010.

Chandrasekharan, N. V.; Dai, H.; Roos, K. L.; Evanson, N. K.; Tomsik, J.; Elton, T. S.; Simmons, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 21, p. 13926- 13931, 2002.

Cheng, F.; Zhou, Y.; Wu, J.; Zhou, K. Chemical constituents of *Caulerpa peltata*. **Science Journals**, Shizhen Guoyi Guoyao, v. 19, p. 856–857, 2008.

Cheng, J. K.; Ji, R. R. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 10, p. 1970-8, 2008.

Chichorro, J. G.; Lorenzetti, B. B.; Zampronio, A. R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. **Brithish Journal of Pharmacology**, v. 141, n. 7, p. 1175-1184, 2004.

Chu, C.; Huang, Y.; Chen, Y. F.; Wu, J. H.; Rahman, K.; Zheng, H. C.; Qin, L. P. Antinociceptive activity of aqueous fraction from the MeOH extracts of *Paederia scandens* in mice. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 118, p. 177-180, 2008.

Clardy, J.; Walsh, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432 (7019), p. 829-37, 2004.

Clunie, M.; Crone, L.A.; Klassen, L.; Yip, R. Psychiatric side effects of indomethacin in parturients. **Canadian Journal of Anesthesia**, v. 50, p. 586–588, 2003.

Cochilla A.J., Alford, S. NMDA receptor-mediated control of presynaptic calcium and neurotransmitter release. **Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 193–205, 1999.

Cohen, S.S. Sponges, cancer chemotherapy and cellular aging. **Perspective in Biology Medicine**, v. 6, p. 215-227, 1963.

Collier, H.O.J.; Dinneen, J.C.; Johnson, C.A.; Schneider, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmaceutical Chemistry**, v. 32, p. 295–310, 1968.

Costa-Lotufo, L. V.; Wilke, D. V.; Jimenez, P. C.; Epifanio, R. A. Organismos Marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico e Perspectivas. **Química Nova**, v. 32, No. 3, p. 703-716, 2009.

Coutaux, A.; Adam, F.; Willer, J. C.; Le Bars, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, n. 5, p. 359-71, 2005.

Craig A.D. Interoception: the sense of the physiological condition of the body. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 13, p. 500-505, 2003.

Cunha, T. M., Verri, W. A., Jr., Silva, J. S., Poole, S., Cunha, F. Q., e Ferreira, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 1755–1760, 2005.

Damiani, D.; Kuperman, H. Dichtchekian, V.; Manna, T.D.; Setian, N. Corticoterapia e suas repercussões: a relação custo-benefício. **Pediatria**, n. 1, p. 71-82, 2001.

De Clerk, O.; Bolton, J.J.; Anderson, R.J. e Coppejans, E. Guide to the Seaweeds of Kwazulu-Natal. **Scripta Botanica Belgica** v. 33, p. 1-294, 2005.

De Melo, G. O.; Malvar, D. C.; Vanderlinde, F. A.; Rocha, F. F.; Pires, P. A.; Costa, E. A.; De Matos, L. G.; Kaiser, C. R.; Costa, S.S. Antinociceptive and anti-inflammatory kaempferol glycosides from *Sedum dendroideum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 228–232. 2009.

De Paola, D. Mecanismos básicos das doenças. **Introdução ao Estudo da Patologia dos Processos Gerais**, Atheneu; São Paulo, p. 47-71, 1988.

De Silva, E.D.; Scheuder, P.J. Manoalide, an antibiotic sesterterpenoid from the marine sponge *Luffarriella variabilis* (Polejaeff). **Tetrahedron Letters**, v. 21, p. 1611-1614, 1980.

Dessaint, J.; Yu, W.; Krause, J. E.; Yue, L. Yohimbine inhibits firing activities of rat dorsal root ganglion neurons by blocking Na⁺ channels and vanilloid VR1 receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 485, 1-3, p. 11-20, 2004.

Díaz-González, F.; Sánchez-Madrid, F. Inhibition of leukocyte adhesion: an alternative mechanism of action for anti-inflammatory drugs. **Immunology Today**, v. 19, n. 4, p. 169-172, 1998.

Di Rosa, M. Review. Biological proprieties of Carragenan. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 24, p. 89-102, 1972.

Dray A.; Perkins M.N. Kinins and pain. In: Farmer SG (ed). The Handbook of Immunopharmacology. The kinin system. Londres: **Academic Press**, p. 157- 172, 1997.

Dubois, R.N.; Abramson, S.B.; Crofford, L.; Gupta, R.A.; Simon, L.S.; Van De Putte, L.B.; Lipsky, P.E. Cyclooxygenase in biology and disease. **Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 12 (12), p. 1063-1073, 1998.

Du, J.; Yu, Y.; Ke, Y.; Wang, C.; Zhu, L.; Qian, Z.M. Ligustilide attenuates pain behavior induced by acetic acid or formalin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 211–214, 2007.

Dumay, O.; Pergent, G.; Pergent-Martini, C.; Amade, P. Variations in Caulerpenyne contents in *Caulerpa taxifolia* and *Caulerpa racemosa*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, p. 343-352, 2002

Endo, M.; Nakagawa, M.; Hamamoto, Y.; Ishihama, M. Pharmacologically active substances from Southern Pacific marine invertebrates. **Pure and Applied Chemistry**, v. 58, p. 387-394, 1986.

Farsam, H.; Amanlou, M.; Reza Dehpour, A.; Jahaniani, F. Antiinflammatory and analgesic activity of Biebersteinia multifida DC. root extract. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 71, p. 43-7, 2000.

Faulkner, D. J. Highlights of marine natural products chemistry (1972–1999). **Natural Products Reports**, v. 17, p. 1-6, 2000.

Felício, R.; Dbonsi, H. M.; Yokoya, N. S. 4-(hidroximetil)-benzenossulfonato de potássio: metabólito inédito isolado da alga marinha Bostrychia tenella (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 837-839, 2008.

Feng, Y.; Cui., M.; Willis, W. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. **Anesthesiology**, v. 98, p. 729–733. 2003.

Fenical, W. Marine soft-coral of the genus *Pseudopterogorgia*: a resource for novel anti-inflammatory diterpenoids. **Journal of Natural Products**, v. 50, p. 1001-1008, 1987.

Ferrándiz, M.L.; Alcaraz, M.J. Antiinflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Inflammation Research**, v. 32, p. 283–288, 1991.

Ferreira, S.H.; Nakamura, M.; de Abreu Castro, M.S. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2. **Prostaglandins** v. 16, p. 31-7, 1978.

Figueiredo, M. A. O.; Horta, P. A.; Pedrini, A. G.; Nunes, J. M. C. Benthic Marine Algae of the Coral Reefs of Brazil: A Literature Review. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12 (2), p. 258-269, 2008.

FitzGerald, G.A. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. **Nat Rev Drug Discov**, 2 (11), p. 879-90, 2003.

Flower, R.J., Rothwell, N.J. Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. **Trends Pharmacol Sci**, v. 15 (3), p. 71-6, 1994.

Freitas, G. B. L.; Silva, L. L.; Romeiro, N. C.; Fraga, C. A. M. Development of CoMFA and COMSIA models of affinity e selectivity for índoles ligandas of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 2482-2496. 2009.

Furst, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**, v. 48(2), p. 129-41, 1999.

García, M.D.; Fernández, M.A.; Alvarez, A.; Saenz, M.T. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extract from leaves of *Pimenta racemosa* var. *ozua* (Mirtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 91, p. 69–73, 2004.

Gilroy, D.W.; Lawrence, T.; Peretti, M.; Rossi, A.G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery** v. 3(5), p. 401-16, 2004.

Godoy, M.C.M.; Figueira, M.R.; Flores, A.E.; Rubin, M.A.; Oliveira, M.R.; Zanatta, N.; Martins, M.A.P.; Bonacorso, H.G.; Mello, C.F. α 2-Adrenoceptors and 5-HT receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazoles, but not of dipyrone. **European Journal of Pharmacology**, 496, 93–97, 2004.

Goodman e Gilman: **Manual of Pharmacology and Therapeutics**. In: BRUTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Ed). 11 th edition. McGraw-Hill Interamericana do Brasil, chapter 26, 2007.

Govenkar, M.B.; Wahidulla, S. Constituents of *Chondria armata*. **Phytochemistry**, v. 54, p. 979–981, 2000.

Gozzani, J. L. Fisiopatologia da dor, em Madallena, e Cavalcanti. **Sociedade de Anestesiologia do Estado do Rio de Janeiro**, v. 1, p. 13–34, 2003.

Gris, P.; Gauthier, J.; Cheng, P.; Gibson, D. G.; Gris, D.; Laur, O.; Pierson, J.; Wentworth, S.; Nackley, A. G.; Maixner, W.; Diatchenko, L. A novel alternatively spliced isoform of the mu-opioid receptor: functional antagonism. **Molecular Pain**. v. 6, p. 33, 2010.

Groweiss, A. et al. Subergorgic acid, a novel tricyclopentanoid cardiotoxin from the Pacific gorgonian coral *Subergorgia suberosa*. **Tetrahedron Letters**, v. 26, p. 2379-2382, 1985.

Guindon, J.; Hohmann, A. G. The endocannabinoid system and pain. **CNS e Neurological Disorders Drugs Targets**, v. 8, p. 403-421. 2009.

Gul, W.; Hamann, M. T. Indole alkaloid marine natural products: an established source of cancer drug leads with considerable promise for the control of parasitic, neurological and other diseases. **Life Sciences**, v. 78, p. 442 – 453. 2005.

Hamburger, M. *Isatis tinctoria* - From the rediscovery of an ancient medicinal plant towards a novel anti-inflammatory phytopharmaceutical. **Phytochemistry Reviews**, v. 1, p. 333-344, 2002.

Handley, J. T.; Blackman, A. J. Monocyclic diterpenes from the marine alga *Caulerpa trifaria* (Chlorophyta). **Australian Journal of Chemistry**, v. 53, p. 1:67-71, 2001.

Hansson GK (2005). Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N Engl J Med**, v. 352(16), p. 1685-95.

Harvey, W.H. Algae. In: *Flora Hybernica*, part 3, **Dublin: Mackay**, J.T. Editors, p. 157-254, 1836.

Hashimoto, Y. Marine Toxins and other Bioactive Marine Metabolites. Tokyo: **Japan Scientific Society Press**, p. 369, 1979.

Hata, A.N.; Lybrand, T.P.; Marnett, L.J.; Breyer, R.M. Structural determinants of arylacetic acid nonsteroidal anti-inflammatory drugs necessary for binding and activation of the prostaglandin D2 receptor CRTH2. **Molecular Pharmacology**, v. 67, p. 640–647, 2005.

Hay, M.E. Marine chemical ecology: What is known and what is next? **Journal of Experimental Marine Biology Ecology**, v. 2006, p. 103, 1996.

Hay, M.E.; Fenical, W. Chemical ecology and marine biodiversity: insights and products from the sea. **Oceanography**, v. 9, p. 10-20, 1997.

Hendershot, L.C. e Forsaith, J. Antagonism of the frequency of phenylquinone-induced writhing in the mouse by weak analgesics and nonanalgesics. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 125, p. 237-240, 1959.

Hockin, J. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid in toxic mussels from Eastern P.I.E. **Cancer Journal of Chemistry**, v. 67, p. 481-490, 1989.

Hoeck, C. Van Den.; MANN, D. G.; JAHNNS, H. M.; Algae. An Introduction to Phycology. **Cambridge University Press**, 1997.

Horta, P.A. Aspectos taxonômicos e ecologia de macroalgas bênticas. UFSC, 2000.

Huang, L.; Cen, Y.; Xu, S.; Li, Y.; Xu, S.; Wu, Q. **Research progress on caulerpin: plant growth regulator from algae**. Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa, v. 13, p. 74-78, 2001.

Hunskar, 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. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 83-91, 2001.

Hutti, J. E.; Turk, B. E.; Asara, J. M.; Ma, A.; Cantley, L. C.; Abbott, D. W. IκB Kinase β Phosphorylates the K63 Deubiquitinase A20 To Cause Feedback Inhibition of the NF-κB Pathway. **Mol cell biol**, p.7451– 7461, 2007.

Iadarola JM, Caudle RM (1997). Good pain, bad pain. **Science** 278:239-40.

Iguchi, K. et al.. Bromovulome I and Iodovulone I, unprecedented brominated and iodinated marine prostanoids with antitumor activity isolated from the Japanese stolonifer *Clavularia viridis* Quoy and Gaimard. **Journal Chemistry Society, Chemistry Community**, v. 2, p. 981-982, 1986.

Ikeda, Y.; Ueno, A; Naraba, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vaniloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**. v. 69, p. 2911-2919, 2001.

Joly, A. B. **Flora marinha do litoral norte do Estado de São Paulo e regiões circunvizinhas**. Tese (Doutorado) -- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 144, 1965.

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

Kalisch, P.A. An overview of research on the history of leprosy. Part 1. From Celsus to Simpson, Circa. 1 A.D. Part 2. From Virchow to Moller- Christense, 1845-1973. **International Journal of Leprosy Other Mycobacterial Disease**, v. 43(2), p. 129-44, 1975.

Kang, K.; Park, S.; Kim, Y.S.; Lee, L.S.; Back, K. Biosynthesis and biotechnological production of serotonin derivatives. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 83,p. 27–34, 2009.

Kaul, P.N. Compounds from the sea with actions on the cardiovascular and central nervous systems. **Federal Proceedments**, v. 40, p. 10-14, 1981.

Kaul, P.N.; Daftari, P. Marine pharmacology: bioactive molecules from the sea. **Annals Review Pharmacology Toxicology**, v. 26, p. 117-142, 1982.

Kelecom, A. Marine natural products in Brazil. Isolation and structure determination. **Ciência e Cultura**, v. 49, n. 5-6, p.321-30. 1997.

Kelecom, A.; Teixeira, V.L.; Pitombo, L.F. Quimiotaxonomia de Dictyotales (Phaeophyta). 6. Da sinonímia entre as algas pardas Dictyota dentata e Dictyota mertensii. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v. 40, p. 67-70, 1991.

Kevekordes, K.; Holland, D.; Haubner, N.; Jenkins, S.; Koss, R.; Roberts, S.; Raven, J.A.; Scrimgeour, C.M.; Shelly, K.; Stojkovic, S.; Beardall, J. Inorganic carbon acquisition by eight species of Caulerpa (Caulerpaceae, Chlorophyta). **Phycologia**, v. 45, p. 442-449, 2006.

Kielland, A.; Carlsen, H. Molecular imaging of transcriptional regulation during inflammation. **Journal of Inflammation**, doi:10.1186/1476-9255-7-20, 2010.

Klaumann, P. R.; Wouk, A. F. P. F.; Sillas, T. Pathophysiology of pain. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, p.1-12, 2008

Kossuga, M. H.; Lira, S. P.; Nascimento, A. M.; Gambardella, M. T. P.; Berlinck, R. G. S.; Torres, Y. R.; Nascimento, G. G. F.; Pimenta, E. F.; Silva, M.; Thiermann, O. H.; Oliva, G.; Tempone, A. G.; Melhem, M. S. C.; Souza, A. O.; Galetti, F. C. S.; Silva, C. L.; Cavalcanti, B.; Pessoa, C. O.; Moraes, M. O.; Hajdu, E.; Peixinho, S.; Rocha, R. M. Isolamento e atividades biológicas de produtos naturais das esponjas Monanchora arbuscula, Aplysina sp., Petromica ciocalyptoides e Topsentia ophiraphidites, da ascídia Didemnum ligulum e do octocoral Carijoa riisei. **Química Nova**, v. 30, p. 1194-1202, 2007.

Koster, R.; Anderson, M.; De Beer, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings of the American Society of Experimental Biological**, v. 18, p. 418-20, 1959.

Kosuge, T. et al. First evidence of toxin production by bacteria in a marine organism. **Chemistry Pharmaceutical Bull**, v. 33, p. 3059-3061, 1985.

Kosuge, T.; Tsuji, K.; Hirai, K. Isolation of neosurugatoxin from the Japanese ivory shell, *Babylonia japonica*. **Chemistry Pharmaceutical Bull**, v. 30, p. 3255-3259, 1982.

Kraychete, D.C.; Calasans, M.T.A.; Valente, C.M.L. Citocinas pró-inflamatórias e dor. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, p. 199-206, 2006.

Kumar, V.; Abbas, A. K.; Fausto, N. Robbins e Cotran: **patologia: bases patológicas das doenças**. 7 ed. São Paulo: Elsevier, 2005.

Kuraishi, Y.; Harada, Y.; Aratani, S.; Satoh, M.; Takagi, H. Involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algescic tests. **Brain Research**, v. 273, n 2, p. 245-252. 1983.

Kutzing, F.T. 1843. *Phycologia generalis oder Anatomie, Physiologie und Systemkunder der Tange*. Leipzig. Oliveira, E.C.; Österlund, K. e Mtolera, M.S.P. Marine plants of Tanzania. A field guide to the seaweeds and seagrasses. **Stockholm University**, 2005.

Lamont, L. A.; Tranquilli, W. J. Physiology of Pain. The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. **Philadelphia: Saunders**, v. 30, n. 4, p. 703-728, 2000.

Lapa, A. J.; Longhini, R.; Bruschi, M. L.; Mello, J. C. P. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. **Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais**, p. 99-117. Porto Alegre. 2003.

Lawrence, T.; Willoughby, D.A.; Gilroy, D.W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 2(10), p. 787-95, 2002.

Le Bars, D.; Gozariu M.; Cadden, S. Animal models of nociception. **Pharmacology Review**, v. 53, n. 4, p. 597-652. 2001.

Lee, R.E. Phycology. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**. 2nd ed. Cambridge, University Press, p. 645, 1989.

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

Levine, J.D.; Taiwo, Y. Inflammatory Pain. In: Wall PD, Melzack R - Textbook of Pain, 3 rd Ed, **Edin-burgh, Churchill Livingtone**, p. 45-56, 1994.

Lima-Filho, J. V. M.; Carvalho, A. F. F. U.; Freitas S. M. e Melo, V. M. M. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the Northeastern brazilian coast Brazilian. **Journal of Microbiology**, v. 33, p. 311-312, 2002.

Liu H., Mantyh, P.W., Basbaum, A.I. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. **Nature**, 386:721–724, 1997.

Look, S.A. et. al. The pseudopterosins: a new class of anti-inflammatory and analgesic diterpene pentosides from the marine sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae* (Octocorallia). **Journal Organization Chemistry**, v. 51, p. 5140-5145, 1986.

Lu, Y.; Lu, D.; Zheng, Q-T.; Lian, B.; Su, J-Y.; Cen, Y-Z. Crystal structure determination of caulerpin. **Jiegou Huaxue**, v. 13, p. 472–476, 1994.

Maffei-Facino, R.; Carini, M.; Aldini, G.; Saibene, L.; Macciocchi, A. Antioxidant profile of nimesulide, indomethacin and diclofenac in phosphatidylcholine liposomes (PCL) as membrane model. **International Journal of Tissue Reactions**, v. 15, p. 225–234, 1993.

Maiti, B.C.; Thomson, R.H.; Mahendran, M. The structure of caulerpin, a pigment from *Caulerpa* algae. **Journal of Chemistry Research Synopsis**, v. 4, p. 126–127, 1978.

Mamet, J.; Baron, A.; Lazdunski, M.; Voilley, N. Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 24, p. 10662-70, 2002.

Mantione, C.R.; Rodrigues, R.A. Bradykinin (BK)₁-receptor antagonist blocks capsaicin-induced ear inflammation in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 99, p. 516–518, 1990.

Mao, S.-C.; Guo, Y.-W.; Shen, X. Two novel aromatic valerenane-type sesquiterpenes from Chinese green alga *Caulerpa taxifolia*. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 2947–2950, 2006.

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

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 Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas, 1989.

Matta, C. B. B.; Souza, E. T.; Queiroz, A. C.; Lira, D. P.; Araújo, M. V.; Cavalcante-Silva, L. H. A.; Miranda, G. E. C.; Araújo-Júnior, J. X.; Barbosa-Filho, J. M.; Santos, B. V. O.; Alexandre-Moreira, M. S. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activity from Algae of the Genus *Caulerpa*, **Marine Drugs**, v. 9, p. 307-318, 2011.

Matsumoto, K. K.; Mizowaki, M.; Suchitra, T.; Murakami, Y.; Takayama, H.; Sakai, Shin-ichiro, Aimi, N.; Watanabe, H. Central antinociceptive effects of mitragynine in mice: contribution of descending noradrenergic and serotonergic systems. **European Journal of Pharmacology**, v. 317, p. 75-81, 1996.

Matsumoto, K.; Horie, S.; Ishikawa, H.; Takayama, H.; Aimi, N.; Ponglux, D.; Watanabe, K. Antinociceptive effect of 7-hydroxymitragynine in mice: Discovery of an orally active opioid analgesic from the Thai medicinal herb *Mitragyna speciosa*. **Life Sciences**, v. 74, p. 2143-2155, 2004.

Mattei, R.; Franca, C. I.F. Teste gerais para confirmar a ação central. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 138-142.

Mayer, A. M. S.; Hamann, M. T. Marine pharmacology in 2001–2002: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Toxicology e Pharmacology**, v. 140 (3-4), p. 265-86, 2005.

Mayer, A.M.S.; Lehmann, V.K.B. Marine Pharmacology in 1999: Antitumor and Citotoxic Compounds. **Anticancer Research**, v. 21, p. 2489-2500, 2001.

Mayer, A.M.S.; Rodriguez, A.D.; Berlinck, R.G.S.; Hamann, M.T. Marine pharmacology in 2003-4: Marine Compounds with Anthelmintic, Antibacterial, Anticoagulant, Antifungal, Antiinflammatory, Antimalarial, Antiplatelet, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; affecting the Cardiovascular, Immune and Nervous Systems, and other Miscellaneous Mechanisms of Action. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicol Pharmacology**, v. 145(4), p. 553–581, 2007.

McConnell, O.J.; Hughes, P.A.; Targett, N.M.; Daley, J. Effects of secondary metabolites from marine algae on feeding by the sea urchin, *Lytechinus variegatus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 8, p. 1437–1453, 1982.

Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428–435, 2010.

Messlinger, K. What is a nociceptor? **Anaesthesist**, v. 46, n. 2, p. 142-53, 1997.

Millan, M.J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 355-474, 2002.

Millan MJ (1999). The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57: 1-164.

Millar, J.G.; Haynes, K.F. Methods in chemical ecology. In: Biological method, London: **Kluwer Academic Publishers**, 1998.

Minale, L.; Riccio, R.; Sodano, G. Avarol, a novel sesquiterpenoid hydroquinone with a rearranged drimane skeleton from the sponge *Dysidea avara*. **Tetrahedron Letters**, v. 4, p. 3401-3404, 1974.

Miranda, H.F., Prieto, J. C.; Puig, M. M.; Pinardi, G. Isobolographic analysis of multimodal analgesia in an animal model of visceral acute pain. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v.88, p.481-486, 2008.

Montenegro, M. R.; Fecchio, M. **Inflamações: conceitos gerais e inflamação aguda**. In: Franco, M.; Montenegro, M. R.; Brito, T. Bacchi, C. E.; Almeida, P. C. (Org.). Patologia: Processos gerais. 5 ed. São Paulo: Atheneu, cap.7, 2010.

Moore, R.E.; Scheuer, P.J. Palytoxin, a new marine toxin from a coelenterate. **Science**, v. 172, p. 495-498, 1971.

Mosso, J.A.; Kruger, L. Spinal trigeminal neurons excited by noxious and thermal stimuli. **Brains Res**, v.38, p.206-210, 1972.

Muir III, W. W.; Hubbell, J. A. E.; Skarda, R. T.; Bednarski, R. M. Manual de anestesia veterinária. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 242-249, 2001.

Munro, J. M. Endothelial-leukocyte adhesive interactions in inflammatory diseases. **European Heart Journal**, v. 14(K), p. 72-7, 1993.

Munro, M.H.; Blunt, J. W.; Barns, G.; Battershill, C. N; Lake, R. J. e Perry, N. B. Biological activity in New-Zealand marine organisms. **Pure and Application Chemistry**, v. 61, p. 529-534, 1989.

Murakami, S. et. al. Studies of the effective principles of *Digenea simplex* Ag. VIII. Structure of Kainic acid (1) and (2). **Yakugaku Zasshi**, v. 75, p. 866-873, 1953.

Nakamura, H.; Yamaguchi, S.; Hayashi, T.; Baba, M.; Okada, Y.; Tanaka, J.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Okuyama, T. Studies on the biological activities of marine algae(III). Antitumor promoting activity and inhibitory effect of aldose reductase. **Natural Medicine**, v. 51(2), p. 162-169, 1997.

Nielsen, P. G.; Carle, J. S.; Christophersen, C. **Final structure of caulerpicin, a toxic mixture from the green alga *Caulerpa raceniosa***. *Phytochemistry*, v. 21, p. 1643-1645, 1982.

Newman, D. J.; Cragg, G. M., Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

Oliveira-Carvalho, M. F. Taxonomia, distribuição geográfica e filogenia do gênero *Codium* stackhouse (Bryopsidales-Bhlorophyta) no litoral brasileiro. **Tese do Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGB) da Universidade Federal Rural de Pernambuco**, 2008.

Oliveira-Carvalho, M. F.; Pereira, S. M. B.; Zickel, C. S. Florística e distribuição espaço-temporal das clorofíceas bentônicas em trechos recifais do litoral norte do Estado de Pernambuco – Brasil. **Hoehnea – Instituto de Botânica**, v. 30 (3), p. 201-212, 2003.

Oliveira, G.L. **Mecanismos envolvidos na antinocicepção causada pela agmatina em camundongos**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Universidade do Vale do Itajaí, 2005.

Ong, C.K.S.; Lirk, P.; Tan, C.H.; Seymour, R.A. An Evidence-Based Update on Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. **Clin. Med. e Res.**, v. 5, n. 1, p. 19-34, 2007.

Park, K.A.; Vasko, M.R. Lipid mediators of sensitivity in sensory neurons. **Trends Journal of Pharmacology Sciences**, v. 26(11), p. 571-7, 2005.

Parveen, Z.; Yulin, D.; Saeed, M. K.; Dai, R.; Ahamad, W.; YU, Y. H. 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.

Patapoutinam, A.; Tate, S.; Woolf, C. J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 1, p. 55-68, 2009.

Paul, V.J. Ecological role of marine natural products. **United Kindgon: Comstock Publishing Associates**, 1992.

Paulino, N.; Abreu, S. R.; Uto, Y.; Koyama, D.; Nagasa, W. A. H.; Hori, H.; Dirsch, V. M.; Vollmar, A. M.; Scremin, A.; BRETZ, W. A. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, p. 1- 6, 2008.

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

Pawlik, J.R. Marine invertebrate chemical defenses. **Chemical Review**, v. 15, p. 1911, 1993.

Peraza, G. G.; Rodrigues, S. T.; Medeiros, S. H. L.; Muccillo-Baishch, A. L. O uso de modelos animais para avaliar o potencial antinociceptivo dos produtos de origem natural. **Rio Grande Virtual**, v. 19, n. 1, p. 35-44, 2007.

Pereira, S. M. B.; Oliveira-Carvalho, M. F.; Angeiras, J. A. P.; Oliveira, N. M. B.; Torres, J.; Gestinari, L. M.; Badeira-Pedrosa, M. E.; Cocentino, A. L. .M.; Santos, M. D.; Nascimento, P. R. F. e Cavalcanti, D. R. Algas bentônicas do Estado de Pernambuco. In: Tabarelli, M.; Silva, J. M. C. Diagnóstico da Biodiversidade de Pernambuco. Recife. Massagana e SECTMA, p. 97-124, 2002.

Perez, R. M.; Avila, J.G.; Perez, S.; Martinez, A.; Martinez, G. Antimicrobial activity of some american algae, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 29 (1) p. 111-116, 1990.

Perry, N.B.; Blunt, J. W.; Munro, M. H. G.; Pannell, L. K. Mycalamide A, an antiviral compound from a New Zealand sponge of the genus Mycale. **Journal of American Chemistry Society**, v. 110, p. 4850-4851, 1988.

Petroff, E. Y.; Price, M. P.; Snitsarev, V.; Gong, H.; Korovkina, V.; Abboud, F. M.; Welsh, M. J. Acid-sensing ion channels interact with and inhibit BK K⁺ channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 8, p. 3140-4, 2008.

Pettit, G.R.; Cherry, H. L.; Doubek, D. L.; Herald, D. L.; Arnold, E.; Clardy, J. Isolation and structure of bryostatin 1. **Journal of American Chemistry Society**, v. 104, p. 6846-6848, 1982.

Petrovski, 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 Parana, Curitiba, 2004.

Perrone, M. G.; Scilimati, A.; Simone, L.; Vitale, P. Selective COX-1 Inhibition: A Therapeutic Target to be Reconsidered. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 3769-3805 (37), 2010.

Pisera, D. Fisiologia da dor. In: Dor Avaliação e Tratamento em Pequenos Animais. Oter, P. E. São Paulo: **Interbook**, p. 30-74, 2005.

Premanathan, M.; Kathiresan, K.; Chandra, K.; Bajpai, S. K. In vitro anti-vaccinia virus activity of some marine plants. **Journal of Medical Research**, v. 99 (5), p. 236-238, 1994.

Premanthan, M.; Kathiresan, K.; Chandra, K. Antiviral evaluation of some marine plants against semLiki forest virus. **International Journal of Pharmacology**, v. 33 (1), p. 75-77, 1995.

Proksch, P.; Edrada-Ebel, R. e Ebel, R. Drugs from the Sea-Opportunities and Obstacles. **Marine Drugs**, v. 1, n.1, p. 5-17, 2003.

Quinn, R.J.; Gregson, R. P.; Cook, A. F. and Bartlett, R.T. Isolation and synthesis of 1-methysioinosine, a potent pharmacologically active constituent from the marine sponge *Tedania digiata*. **Tetrahedron Letters**, v. 21, p. 567-568, 1980.

Radwan, M. A. A.; Ragab, E. A.; Sabry, N. M.; El-Shenawy, S. M. Synthesis and biological evaluation of new 3-substituted indole derivatives as potential anti-inflammatory and analgesic agents. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 3832–3841. 2007.

Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 202-237, 2007.

Rang, H.P.; Bevan, S.; Dray, A. Nociceptive peripheral neurons: cellular properties, In: Wall PD, Melzack R. Textbook of Pain, 3rd Ed, Edinburgh, **Churchil Livingstone**, p. 57-78, 1994.

Raub, M. F.; Cardellina II, J. H.; Schwede, J. G. The green algal pigment caulerpin as a plant growth regulator. **Phytochemistry**, v. 26 (3), p. 619-620, 1987.

Ribeiro, R. A.; Vale, M. L.; Thomazzi, S. M.; Paschoalato, A. B.; Poole, S.; Ferreira, S. H.; Cunha, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, p. 111–118. 2000.

Ribeiro, S.; Schmidt, A.P.; Schmidt, S.R.G. O Uso de Opioides no Tratamento da Dor Crônica Não Oncológica: O Papel da Metadona. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, p. 644 – 651, 2002.

Riedel, W.; Neeck, G. Nociception, pain and antinociception: current concepts. **Zeitschrift fur Rheumatologie**, v.60, n. 6, p. 404-415, 2001.

Rinehart, K.L. et al.. Didemnins: antiviral and antitumor depsipeptides from a Caribbean tunicate. **Science**, v. 212, p. 933-935, 1981.

Rocca, B.; Fitzgerald, G. A. Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 603–630. 2002.

Rocha, F.D.; Soares, A.R.; Houghton, P.J.; Pereira, R.C.; Kaplan, M.A.C.; Teixeira, V.L. Potential cytotoxic activity of some Brazilian seaweeds on human melanoma cells. **Phytother. Res**, v. 21, p. 170–175, 2007.

Roome, T.; Dar, A.; Ali, S.; Naqvi, S.; Choudhary, M. I. A study on antioxidant, free radical scavenging, anti-inflammatory and hepatoprotective actions of *Aegiceras corniculatum* (stem) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 514–521, 2008.

Roy, M.; Piché, M.; Chen, J. I.; Peretz, I.; Rainville, P. Cerebral and spinal modulation of pain by emotions. **PNAS**, v. 106, n. 49, p. 20900- 20905, 2009.

Russo, C.M.; Brose W.G. Chronic pain. **Annual Review of Medicine**, v. 49, p. 123-133, 1998.

Safayhi H, Sailer, E.R. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. **Planta Med** 63 (6): 487-93, 1997.

Salam, O. M. E. A. Vinpocetine and piracetam exert antinociceptive effect in visceral pain model in mice. **Pharmacological Reports**, v. 58, p. 680-691. 2006.

Sampson, A.P. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. **Clinical e Experimental Allergy**, v. 30(1), p. 22-7, 2000.

Sanchez, T.; Moreno, J. J. Role of prostaglandin H synthase isoforms in murine ear edema induced by phorbol ester application on skin. **Prostagl. Other Lip. Med.** 57(2-3):119-31, 1999.

Santos, A.R.S.; Vedana, E.M.A.; Freitas, G.A.G. Antinociceptive effects of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflammation Research**, v.47, p.302-307, 1998.

Santos, G.A.; Doty, M.S. Constituents of the green alga *Caulerpa lamourouxii*. **Lloydia**, v. 34, p. 88–90, 1971.

Sasaki, M.; Ishizaki, K.; Obata, H.; Goto, F. Effects of 5-HT₂ and 5-HT₃ receptors on the modulation of nociceptive transmission in rat spinal Cord according to the formnalin test. **European Journal of Pharmacology**, v. 424, p. 45-52, 2001.

Schaible, H. G. Pathophysiology of pain. **Orthopade**, v. 36, n. 1, p. 8-16, 2006.

Scheuer, P.J. Marine natural products and biomedicine. **Medical Journal Review**, v. 9, p. 535-545, 1989.

Schmid-Schonbein, G. W. Analysis of inflammation. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v.8, p.93-131, 2006.

Schneider, C. et al.. Control of Prostaglandin Stereochemistry at the 15-Carbon by Cyclooxygenases-1 and -2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 103. p. 478, 2002.

Schuett, W.; Rapaport, H. Saxitoxin, the paralytic shellfish poison. Degradation to a pyrrolopyrimidine. **Journal of American Chemistry Society**, v. 84, p. 2266-2267, 1962.

Schroder, H.C.; Badria, F.A.; Ayyad, S.N.; Batel, R.; Wiens, M.; Hassanein, H.M.A.; Kurelec, B.; Muller, W.E.G. Inhibitory effects of extracts from the marine alga *Caulerpa taxifolia* and of toxin from *Caulerpa racemosa* on multixenobiotic resistance in the marine sponge *Geodia cydonium*. **Environ. Toxicology e Pharmacology**, v. 5, p. 119–126, 1998.

Schwede, J. G.; Cardellina II, J. H.; Grode, S. H.; James JR, T.R.; Blackman, A. J. Distribution of the pigment caulerpin in species of the green alga *Caulerpa*. **Phytochemistry**, v. 26 (1), p. 155-158, 1987.

Shibata, M.; Ohkubo, T.; Takahashi, H.; Inoki, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347-52, 1989.

Shimizu, Y. Dinoflagellates Toxins, In: Marine Natural Products, **Chemical and Biological Perspectives**, vol. II, chap.1, New York: Academic Press, p. 1-41, 1978.

Sibille, Y.; Reynolds, H.Y.. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. **American Review of Respiratory Disease**, v. 141(2), p. 471-501, 1990.

Simmons, D.L., Botting, R.M., Hla, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacol Ver**, 56, 387 – 437, 2004.

Silva, R.R.; Oliveira, T.T.; Nagem, T.J.; Leão, M.A. Efeito de flavonoides no metabolismo do ácido araquidônico. **Medicina**, v. 35, p. 127-133, 2002.

Sogin, M. L.; Gunderson, J. H.; Elwood, H. J.; Alonso, R. A. e Peattie, D. A. Phylogenetic significance of the Kingdom concept: an unusual eukaryotic 16S-like ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. **Science**, v. 243, p. 75 – 77, 1989.

Springer, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, v. 76(2), p. 301-14, 1994.

Sridhar, P.; Lakshmi, V. V., Polasa, H.; Reddy, V.S.; Rao, C.P.; Srimannarayana, G., Biological activity of some marine algal extracts, **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 13 (2) p. 90-91, 1984.

Stole, S. Indole derivatives as neuroprotectants. **Life Science**, v. 65, p. 1943–1950, 1999.

Suckling, C. J.; **Science Program Journal**, v. 75, p. 323, 1991.

Suganuma, M.; Fujiki, H.; Suguri, H.; Yoshizawa, S.; Hirota, M.; Nakayasu, M.; Ojika, M.; Wakamatsu, K.; Yamada, K.; Sugimura, T. Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 85, p. 1768-1771, 1988.

Sze, P. Introduction to algal characteristics and diversity. A Biology of the Algae. 3 ed. New York: McGraw-Hill **Science e Engineering**, p. 288, 1997.

Takemoto et. al. Studies on the constituents of Chondria armata VIII. On the structure of domoic acid. **Yakugaku Zasshi**, v. 86, p. 874-877, 1966.

Tashibana, K.; Sakaitani, M.; Nakanishi, K. Pavoninins: shark-repelling ichthyotoxins from the defense secretion of the Pacific sole. **Science**, v. 226, p. 703-705, 1984.

Tegeder, I.; Niederberger, E.; Vetter, G., Braëtigam, L.; Geisslinger, G. Effects of selective COX-1 and -2 inhibition on formalin-evoked nociceptive behaviour and prostaglandin E2 release in the spinal cord. **Journal of Neurochemistry**, v.79, p. 777-786, 2001.

Thangam, T. S. e Kathiresan, N. K., Mosquito larvicidal effect of seaweed extracts. **Botanic Marine**. v. 34 (5), p. 433-435, 1991.

Thangam, T. S.; Kathiresan, K., Repellency of marine plant extracts against the mosquito Aedes Aegypti, **International Journal of Pharmacognosy**, v. 31 (3) p. 321-323, 1993.

Tharumaratnam, D.; Bashford, S.; Khan, S. A. Indomethacin induced psychosis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 76, p. 736-737, 2000.

Tjolsen, A.; Hole, K.1997. Animal models of analgesia. In The Pharmacology of Pain; Dickenson, A., Besson, J., Eds.; **Springer Verlag**: Berlin, Germany, v. 130, p. 1-20, 1997.

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

Touhey, S.; O'Connor, R.; Plunkett, S.; Maguire, A.; Clynes, M. Structure-activity relationship of indomethacin analogues for MRP-1, COX-1 and COX-2 inhibition: identification of novel chemotherapeutic drug resistance modulators. **European Journal of Cancer**, v. 38, p. 1661-1670, 2002.

Tracey, I.; Mantyh, P.W. The cerebral signature for pain perception and its modulation. **Neuron**, v. 55, p. 377-391. 2007.

Tranquilli, W. J. Fisiologia da dor aguda. In: GREENE, S. A. **Segredos em anestesia veterinária e manejo da dor**. Porto Alegre: Artmed, p. 399-402, 2004.

Trowbridge, H.O.; EmLing, R.C. Mediadores químicos da resposta vascular. In: Inflamação uma revisão do processo. **Quitessence Publishing Co. Inc.**, São Paulo, v. 172, p. 27-42, 1996.

Uddin, J.; Rao, P.; Praveen, N.; Knaus, E.E. Design and synthesis of acyclic triaryl (Z)-olefins: a novel class of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 5929–5940, 2004.

Usmanghani, K.; Shameel, M.; Sualeh, M.; Khan, K. H.; Mahmood, Z. A. **Fitoterapia**, v. 55, p. 73-77, 1984.

Vairappan, C.S. Antibacterial activity of major secondary metabolites: found in four species of edible green macroalgae genus *Caulerpa*. **Asian Journal of Microbiology. Biotechnology and Environmental Science**, v. 6, p. 197-201, 2004.

Valmsen, K. et al. The origin of 15R-prostaglandins in the Caribbean coral *Plexaura homomalla*: Molecular cloning and expression of a novel cyclooxygenase. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 5, p. 7700-7705, 2001.

Vanderlei, E.S.; Patoilo, K. K.; Lima, N. A.; Lima, A. P.; Rodrigues, J. A.; Silva, L. M.; Lima, M. E.; Lima, V.; Benevides, N. M. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. **International immunopharmacology**, v.10, n.9, p. 1113-8, 2010.

Vane, J. R.; Bakhle, Y.S.; Botting, R.M. Cyclooxygenase 1 and 2. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, v. 38, p.97-120, 1998.

Vane, J.R., Botting, R.M. News insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Inflamm. Res**, p. 1-10, 1995.

Vest, S.E.; Dawes, C.J.; Romeo, J.T. Distribution of caulerpin and caulerpicin in eight species of the green alga *Caulerpa* (*Caulerpales*). **Botanica Marina**, v. 26, p. 313–316, 1983.

Vidal, J. P.; Laurent, D.; Kabore, S.A.; Rechencq, E.; Boucard, M.; Girard, J.P.; Escale, R.; Rossi, J.C. Caulerpin, Caulerpicin, *Caulerpa scalpelliformis*: Comparative acute toxicity study. **Botanica Marina**, v. 27, p. 533–537, 1984.

Vidotti, E. C.; Rollemberg, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, No. 1, p. 139-145, 2004.

Vinegar, R.; Truax, J. F. Quantitative studies of the pathway to acute carrageenan inflammation. **Fed Proc**, v.35, n.13, Nov, p.2447-56. 1976.

Voilley, N.; Weille, J.; Mamet, J.; Lazdunski, M. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 20, p. 8026-33, 2001.

Wahl, S.M.; Feldman, G.M.; McCarthy, J.B. Regulation of leukocyte adhesion and signaling in inflammation and disease. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59(6), p. 789-96, 1996.

Waisbrod, H.; Hansen, D.; Gerbershagen H.U. Chronic pain in paraplegics. **Neurosurgery**, v.15, p.993-994, 1984.

Watkins, L.R.; Maier, S.F. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 981-1011, 2002.

Weber, C. Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. **Journal of Molecular Medicine** 81(1):4-19, 2003.

Weinheimer, A.J.; Spraggins, R.L. The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA2 and its acetate, methyl ester) in the gorgonian *Plexaura homomalla*. **Tetrahedron Letters**, v. 2, p. 5185-5188, 1969.

Williams, D. G.; Dickenson, A.; Fitzgerald, M.; Howard, R. F. Developmental regulation of codeine analgesia in the rat. **Anesthesiology**, v. 100, n. 1, p. 92-97, 2004.

Williams TJ (1983). Interactions between prostaglandins, leukotrienes and other mediators of inflammation. *Br Med Bull* 39(3):239-42.

Wood, J.N.; Docherty R. Chemical activators of sensory neurons. *Ann. Rev. Physiology*, v. 59, p. 57-82. 121, 1997.

Woolf, C.J.; MA, Q. Nociceptors—Noxious Stimulus Detectors. **Neuron**, v. 55, p. 353- 364, 2007.

Woolfe, G.; Macdonald, A. L. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 80, p. 300, 1944.

Wynne, M.J. A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: second revision. **Nova Hedwigia**, v. 116, p. 72, 2005.

Wu, J.T.; Wu, L.L. Acute and Chronic Inflammation: Effect of the Risk Factor (s) on the Progression of the Early Inflammatory Response to the Oxidative and Nitrosative Stress. **Journal of Biomedical and Laboratory Science**, v. 19, p. 71-75, 2007.

Xu, S. H.; Cen, Y. Z.; Zeng, L. M. Isolation and identification of red prisms from *Caulerpa sertularioides*. **Huaxue Shijie**, v. 20(5), p. 265-266, 1998.

Xu, S.; Seng, L. M.; Su, J. Y.; Ziao, S. Sterols in alga *Caulerpa sertularioides*. *Zhongshan Daxue Xuebao Ziran Kexueban*, v. 36(1), p. 113-115, 1997.

Xu, X.; Su, J. The separation, identification and bioassay of caulerpin. *Ziran Kexueban*, v. 35, p. 64-66, 1996.

Xu, X.H.; Su, J.Y.; Zeng, L.M.; Wang, M.Y. Chemical constituents of the alga *Caloglossa leprieurii*. **Gadeng Xuexiao Huaxue Xuebao**, v. 19, p. 249-251, 1998.

Xu, X-H.; Zhu, Y.D.; Gao, W.; Kong, C.H. **Agricultural lead compounds from *Laurencia majuscula***. In Proceedings of International Forum on Green Chemical Science e Engineering and Process Systems Engineering, Tianjin, China, 8-10 October, v. 1, p. 538-541, 2006.

Yamamoto I.; Nagumo, T.; Yagi, K.; Tominaga H. e Aoki, M. Antitumor effects of seaweeds 1: Antitumor effect of extracts from *Sargassum* and *Laminaria*. **The Japanese journal of experimental medicine**, v. 44 (6), p. 543-546, 1974.

Yan, S.; Su, J.; Wang, Y.; Zeng, L. Studies on chemical constituents of *Halimeda incrassata*. **Redai Haiyang**, v. 18, p. 91-94, 1999.

Yasumoto, T. et al. Interspecies distribution and biogenetic origin of tetrodotoxin and its derivatives. **Pure and Applied Chemistry**, v. 61, p. 505-508, 1989.

Yokoo, A. Chemical studies on tetrodotoxin. Rep. No 3, Isolation of spheroidine. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 71, p. 590-592, 1950.

Zeashana, H.; Amresha, G.; Raoa, C.V.; Singhb, S. Antinociceptive activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. **Journal Ethnopharmacol**, v. 122, p. 492-496, 2009.

Zhou, H. Y.; Shin, E. M.; Guo, L. Y.; Zou, L. B.; Xu, G. H.; Lee, S. H.; Ze, K. R.; Kim, E. K.; Kang, S. S.; Kim, Y. S. Anti-inflammatory activity of 21 (α , β)-methykmelianodiol, novel compounds from *Poncirus trifoliata* Rafinesque. **Eur J Pharmacol**, v. 572, p. 239-248, 2007.

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