



UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA – UFDPAr
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA

FERNANDO MESQUITA DE SOUSA DE LIMA

**POLISSACARÍDEO MODIFICADO COM ANIDRIDO PROPIÔNICO EXTRAÍDO DA
MACROALGA *Gracilaria domingensis* POSSUI EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO EM
MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO GERAL EM CAMUNDONGOS**

PARNAÍBA

2022

FERNANDO MESQUITA DE SOUSA DE LIMA

**POLISSACARÍDEO MODIFICADO COM ANIDRIDO PROPIÔNICO EXTRAÍDO DA
MACROALGA *Gracilaria domingensis* POSSUI EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO EM
MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO GERAL EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de conclusão do curso de Bacharelado em Biomedicina, da Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAr, em cumprimento à exigência para obtenção do título de bacharel em Biomedicina.

Linha de pesquisa: Farmacologia.

Orientador: Dr. André Luiz dos Reis Barbosa.

PARNAÍBA

2022

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Delta do
Parnaíba Biblioteca Central Prof.
Cândido Athayde

L732c Lima, Fernando Mesquita de Sousa de.

Polissacarídeo modificado com anidrido propiônico extraído da macroalga *Gracilaria domingensis* possui efeito anti-inflamatório em modelos experimentais de inflamação geral em camundongos [recurso eletrônico] / Fernando Mesquita de Sousa de Lima 2022

1 Arquivo em PDF.

TCC (Bacharelado em Biomedicina)

Universidade Federal do
Delta do Parnaíba, 2022.

Orientação: Prof. Dr. André Luiz Reis Barbosa.

1. Anti-inflamação. 2. Farmacologia. 3. Algas Marinhas.
4. Macroalgas. 5. *Gracilaria domingensis*. 6. Modelos
Experimentais. 7. Camundongos. I. Título.

CDD: 613.2

Dedico,

Primeiramente a Deus,

A minha mãe, irmãos, meu pai (in memoriam) por toda força e amor incondicional.

A meus familiares por todo incentivo.

Aos meus amigos, pelo companheirismo e apoio emocional.

E a mim mesmo, pela paciência, força e perseverança.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre comigo em todos os momentos da minha vida e por me dar sempre força, proteção e sabedoria para lutar por tudo aquilo que almejo.

A minha família por todo o amor, carinho, dedicação, apoio moral e financeiro durante esses quatro anos de estudos, em especial a minha querida mãe Vera Lucia Mesquita, meus irmãos Antonio Rubens Mesquita, Ana Carla Mesquita, meu pai Gessilvado de Lima (in memorian), minha prima Izailda, tia Julia Lima e avó paterna Antonia Maria que sempre me apoiaram e me deram força para seguir firme e forte. Muito obrigado por tudo, amo muito a todos vocês!

Aos meus colegas de turma que fizeram parte da minha trajetória acadêmica e principalmente aqueles que foram mais decisivos para minha estabilidade no curso como Samara Marques, Rubens Renato e Solange Avylla pois sem a parceria e companheirismo como grupo não seria possível vivenciar tantos momentos únicos e divertidos. Além daqueles no qual eu sempre pude contar para todas as horas: Hinaira Cavalcante, Andressa Trindade, Geovana Ferraz e minha madrinha de curso, Jessica Ferreira. Muito obrigado pelo apoio e amizade de vocês. A dona Lisarda que sempre contribuiu para minha estadia em seu apartamento. Obrigado por sua humildade e empatia. Além do mais, ao meu companheiro de quarto, Breno Rodrigues, um amigo intenso e cheio de conhecimentos, obrigado pela sua companhia.

Aos meus professores de curso pelo enriquecimento intelectual e especialmente ao professor André Luiz dos Reis Barbosa pela sua orientação e pela disponibilização de seu laboratório. Ao grupo LAFFEX o qual me receberam tão bem e me fizeram amadurecer e em especial a Diva magalhães e Kleiton Sousa por toda parceria, ensinamentos e contribuição na realização deste trabalho. Muito obrigado.

Por fim, queria agradecer a Universidade Federal do Delta do Parnaíba e a todos que contribuíram de alguma forma com a minha formação. Deus abençoe todos vocês!

"Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a beleza libertadora do intelecto para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer."

- Albert Einstein

RESUMO

Nos últimos anos, a busca de novas moléculas advindas dos produtos de origem marinha, especificamente polissacarídeos extraídos de algas marinhas do Filo Rodophyta (sendo o gênero *Gracilaria* o mais conhecido) vem ganhando bastante atenção diante de inúmeras atividades farmacológicas, entre elas atividade antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva. Espécies desse gênero, assim como a *Gracilaria domingensis* são abundantes em todo litoral nordestino, principalmente na faixa que se estende do Piauí ao Rio Grande do Norte, apresentando grande importância econômica, pois além de serem apropriadas ao consumo humano, elas também são utilizadas na indústria cosmética e pela indústria alimentícia para produção de gelatinas. Assim, uma das maneiras de melhorar os efeitos de algumas substâncias pode ser realizada pela modificação da superfície de materiais alterando as características estruturais, sem que haja alterações drásticas nas propriedades de seu volume, formando compostos com a intenção de melhorar a compatibilidade da matriz polimérica. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação anti-inflamatória a base do polissacarídeo da macroalga *G. domingensis* modificado com anidrido propiônico em modelos farmacológicos clássicos de inflamação aguda (edema de pata induzido por carragenina, histamina e serotonina) em camundongos. A pesquisa é de cunho experimental e teve aprovação no comitê de ética e experimentação animal (CEUA) sob o número 480/18. Os protocolos experimentais seguiram as normas e diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação animal (COBEA). Foram utilizados camundongos Swiss pesando entre 25-30g, sendo 6 animais por grupo: Grupo salina 0,9%, indometacina 10 mg/kg, e os grupos para a avaliação anti-inflamatória do PLS AP nas doses de 2,5; 5,0 ou 10 mg/kg via intraperitoneal (i.p.) e posteriormente submetidos a um edema de pata induzido por carragenina (Cg) 500 µg por pata afim de escolher uma melhor dose com efeito anti-inflamatório que seria usada nos demais testes. Após o edema de Cg os segmentos da região suplantada das patas dos animais foram retirados e utilizados para a avaliação da enzima mieloperoxidase (MPO). Os animais passaram ainda por edema de pata pelos mediadores vasoativos histamina (100 µg/pata) e serotonina (100 µg/pata), foi induzido também peritonite com uma injeção de 250 µg de Cg (i.p.) nos camundongos e o líquido peritoneal foi avaliado quanto a migração de leucócitos e níveis de glutathione (GSH). Os animais tratados com PLS 2,5 mg/kg apresentaram resultados pertinentes e estatisticamente significativos na redução do edema causado por Cg, assim como na resposta vascular pela diminuição dos edemas vasculares causados por histamina e serotonina. Além disso, o referido composto apresentou eficácia na redução dos níveis da enzima MPO e migração de células para a cavidade peritoneal, bem como no aumento de níveis de GSH. Os resultados obtidos permitem inferir que o PLS AP na dose de 2,5 mg/kg possui efeito anti-inflamatório e atenua o estresse oxidativo revelando um potencial farmacológico do composto como um promissor agente anti-inflamatório.

Palavras-chave: Inflamação; edema; Algas marinhas; *Gracilaria domingensis*; anti-inflamação.

ABSTRACT

In recent years, the search for new molecules from products of marine origin, specifically polysaccharides extracted from marine algae of the Filo Rodophyta (the genus *Gracilaria* being the best known) has gained a lot of attention in the face of numerous pharmacological activities, including antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive activity. Species of this genus, as well as *Gracilaria domingensis* are abundant throughout the northeastern coast, mainly in the range that extends from Piauí to Rio Grande do Norte, presenting great economic importance, because in addition to being appropriate for human consumption, they are also used in the cosmetic industry and by the food industry for gelatin production. Thus, one of the ways to improve the effects of some substances can be accomplished by modifying the surface of materials by changing the structural characteristics, without drastic changes in the properties of their volume, forming compounds with the intention of improving the compatibility of the polymer matrix. Therefore, the present work aimed to evaluate the anti-inflammatory action based on the polysaccharide of macroalgae *G. domingensis* modified with propionic anhydride in classical pharmacological models of acute inflammation (carrageenan-induced paw edema, histamine and serotonin) in mice. The research is experimental in nature and was approved by the ethics and animal experimentation committee (CEUA) under number 480/18. The experimental protocols followed the norms and guidelines of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). Swiss mice weighing between 25-30g were used, with 6 animals per group: Saline group 0.9%, indomethacin 10 mg/kg, and groups for the anti-inflammatory evaluation of PLS AP at doses of 2.5; 5.0 or 10 mg/kg intraperitoneally (i.p.) and subsequently submitted to carrageenan-induced paw edema (Cg) 500 µg per paw in order to choose a better dose with anti-inflammatory effect that would be used in the other tests. After Cg edema, the segments of the supplanting region of the animals' paws were removed and used for the evaluation of the enzyme myeloperoxidase (MPO). The animals also underwent paw edema by histamine vasoactive mediators (100 µg/paw) and serotonin (100 µg/paw), peritonitis was also induced with an injection of 250 µg of Cg (i.p.) in mice and peritoneal fluid was evaluated for leukocyte migration and glutathione (GSH) levels. The animals treated with PLS 2.5 mg/kg presented relevant and statistically significant results in the reduction of edema caused by Cg, as well as in the vascular response due to the decrease in vascular edema caused by histamine and serotonin. In addition, this compound showed efficacy in reducing MPO enzyme levels and migrating cells into the peritoneal cavity, as well as increasing GSH levels. The results obtained allow us to infer that PLS AP at a dose of 2.5 mg/kg has an anti-inflammatory effect and attenuates oxidative stress revealing a pharmacological potential of the compound as a promising anti-inflammatory agent.

Keywords: Inflammation; edema; Seaweed; *Gracilaria domingensis*; anti-inflammation.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 1. | Representação esquemática da migração de neutrófilos dos vasos sanguíneos..... | 17 |
| Figura 2. | Macroalga <i>Gracilaria domingensis</i> | 20 |
| Figura 3. | Fluxograma para extração do Polímero da <i>G. domingensis</i> | 24 |
| Figura 4. | Ação do PLS AP sobre o edema de pata induzido por Cg nas 4 horas..... | 32 |
| Figura 5. | Efeito do PLS AP sobre a atividade da enzima mieloperoxidase na pata dos camundongos..... | 33 |
| Figura 6. | Ação do PLS AP sobre o edema de pata induzido por Histamina..... | 35 |
| Figura 7. | Ação do PLS AP frente ao edema de pata induzido por Serotonina..... | 36 |
| Figura 8. | AP na Contagem total de células durante a peritonite induzida por carragenina..... | 38 |
| Figura 9. | Ação do PLS AP sobre os níveis de glutathiona no exsudato peritoneal..... | 40 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Tabela 1. | Descrição dos grupos experimentais do ensaio de edema de pata induzido por carragenina..... | 27 |
| Tabela 2. | Efeito do PLS extraído da alga <i>Gracilaria domingensis</i> modificado com anidrido propiônico sobre o edema de pata induzido por carragenina..... | 30 |

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. | REFERENCIAL TEÓRICO | 15 |
| 2.1 | Inflamação | 15 |
| 2.2 | Resposta inflamatória: Mecanismos envolvidos..... | 16 |
| 2.3 | Terapia e efeitos colaterais decorrentes do uso de anti-inflamatórios não esteroidais – AINEs | 17 |
| 2.4 | Algas marinhas vermelhas fonte de polissacarídeos..... | 18 |
| 2.5 | Polissacarídeos extraídos de algas do gênero <i>Gracilaria</i> com ação biológica..... | 20 |
| 2.6 | Modificação de polissacarídeos..... | |
| 3. | OBJETIVOS | 22 |
| 3.1 | Objetivo geral | 22 |
| 3.2 | Objetivos específicos | 22 |
| 4. | METODOLOGIA | 23 |
| 4.1 | Coleta do material e extração do PLS da <i>Gracilaria domingensis</i> | 23 |
| 4.2 | Modificação hidrofóbica do Polissacarídeo com anidrido propiônico..... | 24 |
| 4.3 | Animais utilizados para os protocolos experimentais | 24 |
| 4.4 | Questões éticas | 25 |
| 4.5 | Processo de eutanásia dos animais..... | 25 |
| 4.6 | Métodos experimentais utilizados nos ensaios para avaliação do efeito anti-inflamatório | 25 |
| 4.6.1 | Edema de pata induzido por carragenina | 25 |
| 4.6.2 | Edema de pata induzido por mediadores inflamatórios | 26 |
| 4.6.3 | Determinação da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina | 27 |
| 4.6.4 | Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase | 27 |
| 4.6.5 | Análises das concentrações de Glutathione | 27 |
| 4.6.6 | Análise estatística | 28 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 28 |

| | | |
|--|--|-----------|
| 5.1 | Efeito do PLS AP sobre o edema de pata induzido por carragenina..... | 28 |
| 5.2 | Efeito do PLS AP sobre a atividade da enzima mieloperoxidase na pata | 31 |
| 5.3 | Ação do PLS AP sobre o edema de pata induzido por Histamina | 33 |
| 5.4 | Ação do PLS AP sobre o edema de pata induzido por Serotonina | 34 |
| 5.5 | Efeito do PLS AP na Contagem total de células na peritonite induzida por carragenina | 36 |
| 5.6 | Ação do PLS AP sobre os níveis de GSH no exsudato peritoneal | 38 |
| 6. | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 40 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 41 |
| ANEXO I. Carta de aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) | | |

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é um mecanismo de defesa ou resposta natural do organismo que se manifesta como resposta a agentes lesivos (físico e químico) e biológicos. É um processo dinâmico, complexo e que envolve a ativação de vias de sinalização que regulam a expressão de mediadores tanto pró como anti-inflamatórios (AKHTAR; SHABBIR, 2019).

No processo inflamatório, ocorre a formação de alterações morfofuncionais da microcirculação na área lesada (WILCHES et al, 2021) que engloba uma cascata de eventos bioquímicos, abrangendo o recrutamento de células inflamatórias, vasos sanguíneos, linfáticos e liberação de mediadores inflamatórios no sítio da lesão (KUPRASH; NEDOSPASOV, 2016), tais como: óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT), aminas vasoativas, citocinas (fator de necrose tumoral alfa-TNF α - e interleucinas-IL-1, 12). As alterações provocadas nesse processo podem ser mensuradas e determinadas pela intensidade ou persistência do dano, reação do organismo e característica do órgão ou tecido atingido (REHRING et al, 2021; HAWKINS; DAVIES, 2021).

No que diz respeito a terapia medicamentosa para o tratamento da inflamação utiliza-se normalmente os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (ALMEIDA et al., 2017). Apesar de apresentarem um amplo espectro de ação contra a inflamação, na literatura são relatados efeitos colaterais que incluem hepatotoxicidade, toxicidades gastrointestinais e lesões renais, devido a utilização prolongada e automedicação, o que limita a utilização desses fármacos (BINDU; MAZUMDER; BANDYOPADHYAY, 2020).

Os compostos isolados de produtos de origem natural com atividade anti-inflamatória têm sido fontes terapêuticas alternativas, que substituem muitos medicamentos com efeitos colaterais insatisfatório. Assim, no que se refere a busca pelo desenvolvimento de novos fármacos/drogas com finalidade terapêutica, nota-se uma busca incessante por drogas que apresentem tanto ação anti-inflamatória, quanto menos efeitos colaterais (PALANI et al, 2022; NIGAM et al, 2022).

Desta forma, os produtos naturais, mais especificamente os produtos extraídos de algas marinhas ganham cada vez mais destaque e sua utilização incluem aplicações biomédicas (HARARI et al, 2020; CARPENA et al, 2022), tais como potencial antimicrobiano (PINA-PÉREZ; RIVAS; MATÍNEZ, 2017), atividades

anti-inflamatória (SILVA et al, 2019), antibiofilme (VISHWAKARMA & VAVILALA, 2019), antioxidante e hipoglicêmica in vitro (GUNATHILAKA et al, 2019), antinoceptiva (COSTA et al, 2020), regulação de células T reguladoras em modelo murino (HAN et al, 2021) e atenuação em hepatotoxicidade (SOHAIL et al, 2019).

Desta forma, os polissacarídeos oriundos de algas vermelhas (Filo Rodophyta) vem ganhando bastante notoriedade devido as ações farmacológicas já relatadas na literatura, sendo o gênero *Gracilaria* (*Gracilaria caudata*, entre outras espécies) um dos que mais se destacam. Dentro desse gênero, a espécie *Gracilaria domingensis* abundante em todo litoral nordestino, apresenta grande importância econômica, pois além de ser apropriada para o consumo humano, pode ser utilizada na indústria de cosméticos e alimentícia (GUIMARÃES et al., 2005; ALMEIDA et al., 2017).

Apesar dos produtos naturais apresentarem ação biomédica, uma das maneiras de melhorar os efeitos de algumas substâncias pode ser realizada pela modificação da superfície de materiais alterando as características estruturais, sem que haja alterações drásticas nas propriedades de seu volume, formando compostos com a intenção de melhorar a compatibilidade da matriz polimérica (DHENG et al, 2020).

A obtenção de moléculas modificadas quimicamente através da introdução de grupos químicos na estrutura tem revelado ser estratégico para a obtenção e potencialização de propriedades biológicas. Diante das inúmeras atividades descritas, acredita-se que outros polissacarídeos de espécies do gênero *Gracilaria* como o polissacarídeo modificado da alga *Gracilaria domingensis* possa apresentar ação anti-inflamatória. Pois, os polissacarídeos extraídos de algas desse gênero são semelhantes entre si e alguns já apresentam essa atividade biológica (SILVA, et. al, 2012; BRITO, et. al, 2013).

Neste sentido, é justificável a avaliação da ação anti-inflamatória do polissacarídeo extraído da alga marinha vermelha *G. domingensis* modificado com anidrido propiônico em modelos farmacológicos clássicos de inflamação aguda em camundongos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Inflamação

A inflamação acontece em resposta a diferentes estímulos agressivos, que podem ser físico, biológico ou químico, pode desenvolver um processo complexo envolvendo vários mediadores e células. Este processo compreende uma complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares, que incluem extravasamento de fluídos, ativação enzimática, migrações celulares, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores, lise e reparo tecidual. Sendo caracterizada pelo aparecimento dos sinais clássicos como: dor, rubor, calor, edema e até perda de função do local afetada (BHATIA et al., 2015; SAJADIMAJD et al, 2019).

A inflamação é um processo bifásico, sendo dividida em aguda ou crônica conforme o tempo de duração da inflamação. A inflamação aguda representa um processo inicial, benéfico e auto limitado, caracterizada pelo acúmulo extravascular de neutrófilos e formação de edema no início da resposta. Enquanto que a inflamação crônica resulta do desequilíbrio entre os mecanismos pró-inflamatórios e antiinflamatórios, podendo desencadear várias doenças como: câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, artrite, doenças pulmonares e doenças autoimunes (SERHAN, 2008; CHIU et al., 2012; CHAVES et al, 2013).

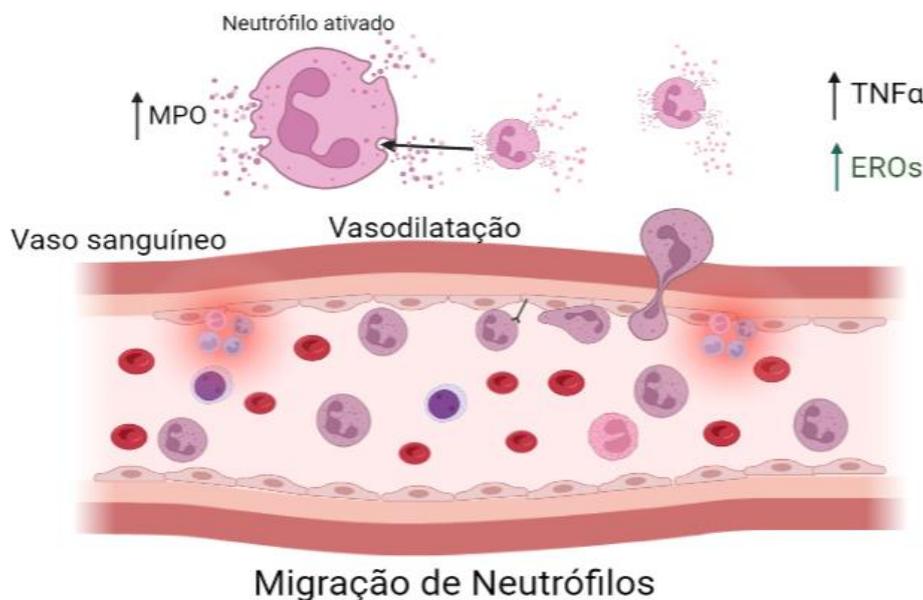
A etapa inicial da inflamação resulta na liberação sequencial de mediadores, incluindo histamina, bradicinina e serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5HT), resultando no influxo imediato de leucócitos polimorfonucleares (PMN). Os leucócitos posteriormente são fagocitados por monócitos-macrófagos, contribuindo para a resolução do processo inflamatório (BUCKLEY et al., 2014; BRANCO et al., 2018).

As aminas vasoativas, como histamina e serotonina, por serem mediadores pré-formados armazenados nas células, são os primeiros mediadores a serem liberados, principalmente através dos mastócitos e monócitos, promovendo vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar. Além disso, são ativados componentes do sistema de cininas, do sistema complemento e do sistema de coagulação, sendo juntamente liberadas citocinas e quimiocinas (KAWAHARA et al., 2015; SCAND et al, 2021).

A migração de leucócitos dos vasos sanguíneos para o endotélio (figura 1) é feita através de uma cascata de eventos clássicos de rolamento, quimiotaxia, adesão firme e diapedese, dependente de uma classe de moléculas da superfície celular conhecida como moléculas de adesão, que culmina na liberação de

neutrófilos para fora dos vasos sanguíneos, liberando grânulos, como a enzima MPO correspondendo a uma das principais (KUPRASH; NEDOSPASOV, 2016). As principais famílias de moléculas de adesão celular incluem as selectinas, a superfamília das imunoglobulinas e as integrinas. As três importantes selectinas na adesão célula-a-célula são: a L-selectina, constitutivamente expressa em leucócitos; a P-selectina, pré-formada e armazenada nas plaquetas ou em células endoteliais; e a E-selectina, que apresenta exclusivamente em células endoteliais. As integrinas são uma grande família de proteínas que medeiam à adesão, migração e ativação celular. As moléculas de adesão são expressas após estimulação por citocinas, como interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (MESQUITA et al., 2008; CHANG et al., 2015; ROE et al, 2021).

Figura 1: Representação esquemática da migração de neutrófilos dos vasos sanguíneos.



Fonte: Própria autoria, 2022.

2.2. Resposta inflamatória: mecanismos envolvidos

No processo inflamatório ocorre uma resposta complexa que envolve os vasos sanguíneos, proteínas plasmáticas e leucócitos com intuito de neutralizar agentes causadores da lesão e promover o reparo do tecido por meio do recrutamento de células polimorfonucleares que se encontram na circulação (GABAY, 2006; SCAND et al, 2021).

Entre os mecanismos envolvidos, destacam-se as mudanças no tônus

vascular (vasoconstrição/vasodilatação), coagulação e liberação de mediadores de sinalização celular e assim o recrutamento de células inflamatórias para a área lesada (KIM; MOUDGIL, 2017). Além das células, participam do processo as aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, produtos do sistema complemento, mediadores lipídicos, óxido nítrico, prostaglandinas, leucotrienos, citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas (IWALEWA *et al.*, 2007; CRUVINEL *et al.*, 2010).

No que se refere aos mediadores, pode-se destacar a serotonina, histamina, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, fator de ativação plaquetária, adenosina, prótons e espécies reativas de oxigênio atuam no desenvolvimento da resposta inflamatória (GODIN, 2014).

Os mastócitos e monócitos também participam no processo inflamatório, sendo essas células as responsáveis pela liberação das aminas vasoativas histamina e serotonina, promovendo vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar. Além disso, são ativados componentes do sistema de cininas, do sistema complemento e do sistema de coagulação, sendo juntamente liberadas citocinas e quimiocinas (KAWAHARA *et al.*, 2015).

2.3. Terapia e efeitos colaterais decorrentes do uso de anti-inflamatórios não esteroidais – AINEs

Os AINEs são uma classe de medicamentos que possuem ampla utilização e aplicações, destacando-se entre os medicamentos mais populares no mundo, constituindo 5% de todos os medicamentos prescritos (GUTIÉRREZ *et al.*, 2007). Utilizados principalmente para o tratamento de pacientes que sofrem de dor e condições inflamatórias, artrite reumatóide, osteoartrite, condições cirúrgicas de pós-operatório e até mesmo sendo usado amplamente como analgésicos e antipirético, os AINEs apresentam uma grande utilização nas práticas de automedicação. O para aliviar a dor e o desconforto associado a condições crônicas, esses fármacos apesar de serem seguros, podem trazer efeitos adversos (MONTEJO *et al.*, 2005; AMERICAN SOCIETY OF HOSPITAL P, 2010; MCCARBERG, 2013).

Com relação aos efeitos adversos dessa classe de medicamentos, inibidores seletivos da COX-2, trouxeram à tona a possibilidade de aumentar o risco para infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral. Com isso, a ANVISA lançou uma

nota técnica em 2008 regulamentando e exigindo a venda sob prescrição em receita de controle especial, dos chamados inibidores seletivos da COX 2 (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, 2007; ANVISA, 2008).

No TGI os efeitos adversos mais relatados são azia, dispepsia e náusea e estão mais limitados ao trato gastro intestinal (TGI) superior. A principal preocupação associada ao uso de AINEs é a lesão renal aguda (GUTIÉRREZ et al, 2007; REUBEN, 2010; BECHMANN, 2014). No que se refere ao fígado, vários AINEs foram retirados do mercado devido a hepatotoxicidade (bromfenaco, ibufenaco, benoxaprofeno, droxicam, piroprofeno e fenclofenaco); outros, como a nimesulida, nunca foram comercializados em alguns países ou retirados em outros (NDERITU, 2013; DONATIL, 2016).

Desta forma, a busca por drogas com novas abordagens com menos efeitos colaterais são buscadas para evitar ou reduzir as respostas adversas, principalmente aos órgãos mais afetados como o TGI, o fígado e os rins (LAMEIRE, 2005; VIEUX, 2010; BROADIS, 2010). Dentre as abordagens tem-se o uso de AINEs com baixo potencial tóxico, redução ou eliminação dos agentes que atuam causando injúrias e intensificação da defesa da mucosa. Porém, nem todas essas medidas têm demonstrado muito sucesso (JUNIOR, 2020; PEREIRA, 2021).

2.4. Algas marinhas vermelhas fonte de polissacarídeos

Os produtos naturais vêm ganhando bastante notoriedade, diante de diversas substâncias que foram recentemente identificadas e comprovadas suas atividades biológicas. Entre elas, os produtos derivados de algas marinhas, principalmente as macroalgas do filo Rodophyta, composto por cerca de 5000 espécies e popularmente denominadas como algas vermelhas (NIGAM et al, 2022).

Estima-se que desde o século XVII, as macroalgas já eram cultivadas na Ásia para consumo humano, principalmente no Japão, China e Coreia, sendo até os dias atuais os principais mercados consumidores deste tipo de alga. Com a descoberta dos polissacarídeos dessas algas no século XX (agaranas, carragenanas e alginato também conhecidos como ficocolóides, por serem carboidratos complexos que podem formar gel), estes ganharam importância na indústria cosmética, farmacêutica e de bioenergia, onde atualmente a movimentação financeira deste setor ultrapassa a casa de 6 bilhões de dólares (LAURIENZO, 2010; LI et al, 2021; ZHENG et al, 2022).

As principais representantes do filo Rodophyta são as algas do gênero *Gracilaria*. Distribuídas em todo litoral tropical e subtropical e com mais de 100 espécies, sendo cerca de trinta delas de ocorrência em todo litoral brasileiro, principalmente no Nordeste, sendo encontradas com maior frequência nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte e Bahia. No Brasil, as gracilarias tem uso principalmente no ramo alimentício, tendo seus ficocoloides usados em substituição as gelatinas e também como componentes de doces e geleias, além de ser usada na indústria cosmética em cremes, sabonetes, xampu e loções (ALMEIDA et al., 2017; COSTA et al, 2020).

Estruturalmente, os Polissacarídeos do gênero *Gracilaria* são compostos principalmente de unidades alternadas de 3- β -D-galactopiranosose (Gal) e 4-3,6-anidro-L- α -galactopiranosose (Angal), sendo que a unidade Gal pode ser substituída por éster de sulfato ou radicais metil (SILVA et al., 2012; SANTOS et al, 2022), algo que poderia auxiliar em suas atividades farmacológicas, pois essas estruturas são semelhantes na maioria das espécies do gênero já descritas bioquimicamente (SANTOS et al, 2022).

A macroalga vermelha estudada neste trabalho, a *Gracilaria domingensis* (figura 1) apresenta a seguinte classificação biológica: divisão Rhodophyceae, classe Florideophyceae e ordem Gracilariales. A alga *G. domingensis* é uma espécie comumente encontrada na costa brasileira, ocorrendo desde o litoral do Estado do Ceará até Santa Catarina frequentemente em associação com outras espécies de *Gracilaria* na zona intertidal (GUIMARÃES et al., 2003). Sendo bastante utilizada como alimento *in natura* na dieta humana, sendo coletada e exportada para o mercado alimentício japonês (FERNANDEZ et al, 1989; OLIVEIRA, 1998).

Figura 2: Macroalga *Gracilaria domingensis*.



Fonte: Revista H&C, 2022.

Atualmente, a principal atividade econômica relacionada a esta alga é a exploração de ágar, um ficocolóide de alto valor econômico. Os principais ficocolóides extraídos de algas são ágar, carragenana, e alginato. Ficocolóides são polissacarídeos de alto peso molecular compostos por polímeros de açúcar. São os principais componentes estruturais da parede celular das algas (CARDOZO et al., 2007).

2.5 Polissacarídeos extraídos de algas do gênero *Gracilaria* com ação biológica

No que se refere ao gênero *Gracilaria*, os polissacarídeos extraídos dessas algas possuem algumas ações biológicas conhecidas e descritas na literatura. Os extratos de *G. domingensis* por exemplo, apresentam atividade antitumoral (FERNANDEZ et al., 1989) e possuem compostos fotoprotetores, como, por exemplo, os aminoácidos do tipo micosporina (CARDOZO 2007).

As demais atividades descritas, incluem polissacarídeos de espécies do gênero *Gracilaria* como os polissacarídeos da *Gracilaria Caudata*, que apresentam ação antiinflamatória nos estudos de Silva et al (2011), Chaves et al (2013), Sales et al (2020) e de acordo com o estudo de Silva et al. (2019), pode prevenir a alteração do tecido periodontal e hepático causada pela periodontite, bem como estresse oxidativo e esteatose no fígado induzida por etanol. Sendo o mecanismo de proteção mediada pelo polissacarídeo pode estar relacionada com a diminuição da produção de radicais livres e peroxidação lipídica, além da ação antidiarréica no estudo de Costa et al (2016). Outro estudo mostrou que o PLS da *G. Caudata* reduz a resposta inflamatória e hipernociceptiva por diminuir a migração de neutrófilos e concentrações de citocinas (CHAVES, et al. 2012). Os polissacarídeos (PLSs) das algas *G. intermedia* e *G. birdiae* verificaram a ação anti-inflamatória e antinoceptiva em edema de pata de camundongos no estudo de Costa et al. (2020) e anti-inflamatória e antioxidante na colite ulcerativa induzida por ácido trinitrobenzenossulfônico (TNBS) por Brito et al. (2014) e no estudo de Oliveira et al. (2020), respectivamente. Já no estudo de Han et al (2021) e Gong et al (2021) com o PLS extraído da alga *G. lemaneiformis*, foi possível verificar a ação antiinflamatória na colite experimental e in vitro, respectivamente.

2.6 Modificação de polissacarídeos

As algas marinhas possuem muitos componentes presentes em suas paredes celulares, dentre eles podem ser encontrados polissacarídeos sulfatados naturalmente ou obtidos por reações de derivatização química (DENG et al, 2020; HU et al, 2020). Para que ocorra a modificação por sulfatação, é necessário ocorrer a substituição nucleofílica nos grupos hidroxilas por grupamentos sulfatos (O-SO₃H), sendo realizada em polissacarídeos como glucanas, pectinas e quitosanas (WANG et al., 2015; LI, DAI, SHAH, 2017; HU et al, 2020).

Segundo Rowell (1983) a modificação química pode ser definida como uma reação química entre uma parte reativa desse componente e um reagente químico, com ou sem catalisador, formando uma ligação entre as duas.

O uso de polissacarídeos naturais e seus derivados tiveram uma crescente procura, por sua viabilidade para aplicação em produtos industriais químicos (DENG et al, 2020; ZHANG et al, 2021), portadores de uma grande variedade devido a sua funcionalidade, além de um baixo custo para sua obtenção, favorecendo assim estudos para os diversos polissacarídeos existentes passíveis a modificação estrutural (HUANG et al, 2020), estando sujeitos à inserção de novos grupos funcionais que venham melhorar as propriedades físicas, químicas deixando a substância com características anfífilas (MOCANU et al, 2014; QI et al, 2021).

Assim, a modificação pode ser utilizada para mexer na estrutura do polissacarídeo quanto ao grau de solubilidade do mesmo, pela introdução de grupos químicos na estrutura para a obtenção e potencialização de propriedades biológicas dos polissacarídeos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a ação anti-inflamatória do PLS modificado com anidrido propiônico (PLS AP) em modelos farmacológicos de inflamação aguda em camundongos.

3.2. Objetivos Específicos

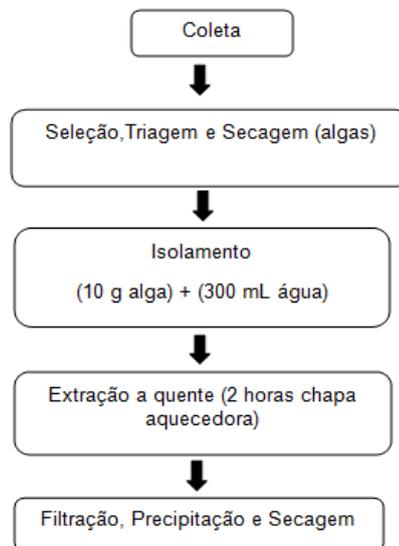
- ✓ Averiguar a possível atividade anti-inflamatória do PLS modificado com anidrido propiônico oriundo da alga *G. domingensis* em edema de pata induzido por carragenina em camundongo;
- ✓ Verificar o provável efeito anti-inflamatório do PLS modificado com anidrido propiônico oriundo da alga *G. domingensis* através do efeito vascular do edema de pata induzido por mediadores vasoativos: histamina e serotonina.
- ✓ Verificar a participação do PLS modificado com anidrido propiônico oriundo da alga *G. domingensis* sobre a migração de neutrófilos de forma indireta pela atividade da enzima MPO nos tecidos das patas.
- ✓ Analisar o potencial efeito anti-inflamatória do PLS modificado com anidrido propiônico oriundo da alga *G. domingensis* no evento de migração de células inflamatórias para a cavidade peritoneal induzido por carragenina em camundongos;
- ✓ Avaliar o provável envolvimento do PLS modificado com anidrido propiônico oriundo da alga *G. domingensis* sobre os níveis de GSH a partir do exsudato peritoneal.

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta do material e extração do polissacarídeo da *Gracilaria domingensis*.

A extração do ágar das algas *G. domingensis* foi realizada de acordo com o fluxograma da Figura 3, com base no trabalho de Yoshimura (2006) realizada algumas modificações.

Figura 3. Fluxograma para extração do Polímero da *G. domingensis*.



Fonte: Magalhães, 2018.

A obtenção do polissacarídeo foi realizada por meio de extração aquosa, na qual foram utilizados 5g de alga e adicionados 150 ml de água ao béquer, postos em banho-maria (após obter a temperatura adequada em torno de 80°C) por 1 hora, sendo agitado manualmente com um bastão de vidro. Após, esta etapa foi retirada a solução do banho-maria, esfriando a temperatura ambiente, filtrando a solução e armazenando o líquido obtido da filtração, rotulando-o e guardando na geladeira, o resíduo será armazenado em embalagem plástica para posteriores extrações (este se encontra apto a outras extrações). As etapas seguintes consistiram da retirada da solução viscosa (SV), o qual foi mantido a temperatura ambiente, sendo homogeneizado com o auxílio de um triturador, a fim de reduzir a viscosidade, foi colocada a SV em um agitador com auxílio de barra magnética por alguns minutos no intuito de minimizar as bolhas presentes.

A solução viscosa foi medida (previamente antes de ir pra agitação) e para cada 100 ml de SV serão acrescentados 0,5g de NaCl à solução em agitação, até

ocorrer a dissolução do NaCl, sendo ajustado o pH com hidróxido (Ideal pH 7). Após esse processo com o auxílio de uma proveta foi separada a solução de SV em beakers (1000 ml). Em seguida acrescentando 300 ml de etanol (99,5%) para cada 100 ml de SV, observando a formação de precipitado, filtrando as soluções (por filtração simples), lavando os precipitados por mais duas vezes com etanol (99,5%) e uma vez com acetona, a etapa de secagem foi feita com auxílio de almofariz e pistilo e seco sobre fluxo de ar quente do secador, obtendo a forma de um pó.

4.2. Modificação hidrofóbica do polissacarídeo com anidrido propriônico

A hidrofobização do polímero foi realizada, adaptando o protocolo proposto por Prashant et al., (2006), que visa modificar e/ou aprimorar o uso de polímeros naturais que no decorrer dos anos vem apresentando resultados promissores, viabilizando a aplicação em formulações de produtos nas indústrias farmacêutica e alimentícia.

Para a modificação do polímero com o anidrido propriônico foram usados em cada reação a proporção 1:4 (polímero/anidrido), em um sistema de banho-maria sob agitação de 1200 rpm e aquecimento em torno de 60°C por 8 hs. Foi pesado 1 g de polímero ao qual será acrescentados 1 g de NaHCO₃ e homogenizado com 1 ml de etanol. Após, a solução viscosa foi submetida ao banho e acrescentado 8 mL de anidrido propriônico por gotejamento. Transcorrido o tempo da reação, as soluções foram retiradas precipitadas inicialmente em 10 mL de etanol e em sequência precipitado em água e centrifugadas para a retirada do sobrenadante, a secagem do material se deu por meio do Centripav e finalizadas com o auxílio de almofariz e pistilo usando o ar quente de secador, sendo maceradas até a obtenção de um pó. Sendo este pesado e armazenado pra posteriores caracterizações.

4.3. Animais Experimentais

Nos ensaios foram utilizados 90 animais de acordo com o cálculo amostral descrito item 4.6.6, camundongos Swiss albinos fêmeas, pesando 25-30 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura (22 ± 2°C) e ciclo claro/escuro (12h/12h) controlados. Também foram mantidos com água e alimentação *ad libitum* até o momento da realização dos experimentos. Todos os

tratamentos e procedimentos realizados estavam de acordo com o Guia de cuidados em uso de animais do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.4. Questões éticas

O presente projeto foi realizado seguindo todos os princípios e normas para a utilização de animais em projetos de pesquisa de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Lei Federal 11.794 de outubro de 2008, ditada pela Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório. O projeto foi submetido e aprovado na comissão de ética no uso de animal (CEUA) da Universidade Federal do Piauí – UFPI sob o protocolo nº 480/018 e foi desenvolvido de acordo com a Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015, regulamentada pelo decreto nº 8.772, de 11 de maio de 2016 com acesso ao patrimônio genético e ao seu conhecimento tradicional associado, com número de registro: A00BA4D.

4.5 Eutanásia dos animais

Os animais foram eutanasiados ao final de cada experimento pela utilização de uma dose letal de Quetamina (240 mg/kg) combinado com Xilazina (30 mg/kg) de acordo com a dose anestésica utilizada por Guazelli et al., 2013. Após a administração do anestésico foi feita a confirmação da morte do animal pela verificação da ausência de movimento respiratório (apneia) e ausência de batimentos cardíacos por meio do uso de estetoscópio, segundo a Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018, sobre a prática de eutanásia.

4.6 Métodos experimentais utilizados nos ensaios para avaliação do efeito anti-inflamatório

4.6.1 Edema de pata induzido por carragenina

Nesse ensaio foram utilizados 36 animais divididos em 6 grupos contendo 6 animais cada (n=6), descrito na tabela 1. O edema foi induzido pela injeção intraplantar de 50µL de uma suspensão de carragenina (500µg/pata) em solução salina estéril 0,9% na pata direita traseira dos animais. Um dos grupos não recebeu

nenhum pré-tratamento, somente o agente inflamatório (grupo não tratado – grupo II). Os animais foram tratados por injeção intraperitoneal (i.p.) com salina 0,9% (grupo não tratado- grupo I) ou com indometacina 10 mg/kg (grupo VI controle referência) ou com o polissacarídeo modificado com anidrido propriônico (APM 1:4-30 / doses 2,5, 5 ou 10 mg/kg) nos grupos III, IV e V, respectivamente. O volume da pata foi mensurado por meio de plestismometria (Panlab LE75000), sendo as leituras realizadas antes do experimento (volume basal, V_0) e em 1, 2, 3 e 4 horas após o tratamento com carragenina (V_t) usando pletismômetro (WINTER, 1962).

O efeito do pré-tratamento foi calculado como porcentagem de inibição do edema relativa ao volume da pata do grupo controle não tratado usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{inibição do edema} = \frac{(V_t - V_0)_{\text{control}} - (V_t - V_0)_{\text{tratado}}}{(V_t - V_0)_{\text{control}}} \times 100$$

Tabela 1. Descrição dos grupos experimentais do ensaio de edema de pata induzido por carragenina.

| Grupos Experimentais | Animais por grupo |
|--|-------------------|
| Grupo I - Salina 0,9% | 6 animais |
| Grupo II - Carragenina (Cg; 500µg/pata) | 6 animais |
| Grupo III – PLS AP 1:4 - 30 (2,5 mg/kg) + Cg | 6 animais |
| Grupo IV – PLS AP 1:4 - 30 (5 mg/kg) + Cg | 6 animais |
| Grupo V – PLS AP 1:4 - 30 (10 mg/kg) + Cg | 6 animais |
| Cg Grupo VI - Indometacina 10 mg/kg + Cg | 6 animais |

Após a realização desse edema foi escolhida a melhor dose a base do polissacarídeo modificado com anidrido propriônico da *G. domingensis* (dose do experimento com carragenina) de acordo com a resposta anti-inflamatória para ser utilizada na realização dos demais ensaios.

4.6.2 Edema de pata induzido por mediadores inflamatórios

Para a realização do edema de pata induzido por alguns mediadores inflamatórios, foi utilizada a melhor dose do PLS APM obtida no experimento de edema de pata induzido por Cg. Os animais foram pré-tratados por via intraperitoneal com solução salina 0,9% (grupo I controle negativo), Indo 10 mg/kg (grupo II – grupo controle/fármaco referência), ou PLS AP (grupo III - grupo teste). Após 30 minutos do tratamento foi administrado 50 µl de salina estéril (0,9 %), ou serotonina (100 µg/pata), ou histamina (100 µg/pata) na pata traseira direita dos animais, como adotado no modelo de Silva et al (2013). O volume da pata dos

animais foi mensurado por meio de pletismometria (Panlab LE75000), sendo as leituras realizadas antes da administração dos agentes flogísticos (volume basal) e em 30 min, 60 min, 90 min e 120 min após a administração para os diferentes grupos de animais. Os resultados foram expressos como variação do volume da pata (ml).

4.6.3 Determinação da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina

Inicialmente foi administrado 250 µl de solução salina (0,9%) i.p. (grupo I - controle negativo), ou indo 10 mg/kg i.p. (grupo II – controle/fármaco referência), ou a melhor dose de PLS APM v.o. (grupo III – teste). Trinta minutos depois, foi administrado Cg (250 µl / 500 µg/cavidade) i.p. nos camundongos dos grupos II, III e em um grupo que recebeu apenas Cg (grupo IV – controle positivo). Logo após o período de 4 horas, foi feita a eutanásia dos animais e a cavidade peritoneal foi lavada com 1,5 ml de solução salina tamponada com fosfato de heparina (PBS) para colher células peritoneais segundo a metodologia adaptada por Chaves et al. (2013).

Para a contagem total de células presentes no líquido peritoneal foi utilizado 20 µL do lavado após ser diluído em líquido de Turkey (380 µl) e realizada a contagem em uma câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio óptico com aumento de 40x. Os resultados foram expressos como número total de leucócitos por cavidade. Foram coletados também líquido peritoneal para posteriormente realizar dosagem dos níveis de GSH.

4.6.4 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase

O procedimento seguiu o protocolo estabelecido por Bradley et al. (1982). Para mensurar a concentração dessa enzima, foi utilizado 50-100 mg de tecido celular subcutâneo proveniente da pata, por animal, de cada grupo. Sucintamente, o tecido da pata traseira foi homogeneizado em 1 mL de tampão de potássio com 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio para cada 50 mg de tecido. Tal homogeneizado foi então centrifugado a 4500 rpm durante 12 min a 4°C. A atividade da MPO na suspensão foi então avaliada pela medida da alteração na absorvância a 450 nm utilizando o-dionisidina e peróxido de hidrogênio a 1%. O resultado foi expresso como sendo Unidade de MPO/mg de tecido.

4.6.5 Análises das concentrações de Glutathiona

Para avaliar os níveis de glutathiona (GSH), foi utilizado o método de Sedlak e Lindsay (1968). Em suma, o lavado peritoneal foi centrifugado a 1500 rpm por 15 min a 4°C. Na sequência, alíquotas de 400 µL do homogeneizado foram misturadas a 320 µL de água destilada e a 80 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação das proteínas. Este material foi então novamente centrifugado a 3.000 rpm por 15 min a 4°C. A 400 µL do sobrenadante será adicionado em 800 µL de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e 20 µL de DTNB (Reagente de Ellman) 0,01M. A mistura foi então agitada por 3 minutos e a absorbância lida a 412 nm em espectrofotômetro. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-protéicos foram expressas em µg de GSH/g de tecido.

4.6.6 Análise estatística

De todos os experimentos foram calculadas as médias \pm erro padrão da media (EPM) de certo número de eventos (n) em cada grupo, com exceção dos escores histológicos que foram expressos como mediana. Para realização dos testes estatísticos foi utilizado o *Software* Prisma versão 6.0 da *GraphPad Software*. A diferença estatística entre os grupos foi determinada através de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Uma diferença de $p < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Efeito do PLS AP sobre o edema de pata induzido por carragenina

O PLS AP da *G. domingensis* nas doses 2,5; 5,0 e 10 mg/kg foi testado e demonstrou que os animais que receberam a dose do agente inflamatório carragenina (1h - $0,093 \pm 0,010$ ml; 2h - $0,103 \pm 0,012$ ml; 3h - $0,120 \pm 0,013$ ml; 4h $0,140 \pm 0,013$ ml) apresentaram aumento significativo no edema de pata quando comparado ao grupo controle negativo: salina 1h - $0,030 \pm 0,014$ ml; 2h - $0,015 \pm 0,002$ ml; 3h - $0,011 \pm 0,003$ ml; 4h - $0,006 \pm 0,004$ ml). Já com relação aos grupos do PLS AP, a dose 2,5mg/kg foi a que apresentou a melhor resposta anti-inflamatória, demonstrando uma redução significativa do edema 1h - $0,074 \pm 0,005$

ml; 2h - $0,088 \pm 0,004$ ml; 3h - $0,088 \pm 0,003$ ml; 4h - $0,073 \pm 0,005$ ml) quando comparado aos animais que receberam apenas carragenina (Tabela 2). Foi observado também a diminuição do edema nas outras doses testadas de PLS AP 5,0 mg/kg (1h - $0,084 \pm 0,002$ ml; 2h - $0,100 \pm 0,005$ ml; 3h - $0,086 \pm 0,008$ ml; 4h - $0,088 \pm 0,008$ ml) e em PLS AP 10 mg/kg (1h - $0,084 \pm 0,002$ ml; 2h - $0,093 \pm 0,006$ ml; 3h - $0,088 \pm 0,002$ ml; 4h - $0,081 \pm 0,004$ ml), no entanto, a dose de 2,5 mg/kg foi a que apresentou a maior reutilidade do edema durante todo o percurso temporal do edema. Foi observado ainda que a referida dose teve um efeito redutor do edema com porcentagem mais aproximada do grupo que foi tratado com a dose de controle da resposta antiinflamatória: indometacina (1h - $0,078 \pm 0,007$ ml; 2h - $0,062 \pm 0,003$ ml; 3h - $0,055 \pm 0,004$ ml; 4h - $0,051 \pm 0,006$ ml). Desta forma, a dose utilizada nos demais ensaios foi a dose de 2,5 mg/kg.

Tabela 2 – Efeito do PLS extraído da alga *Gracilaria domingensis* modificado com anidrido propiônico sobre o edema de pata induzido por carragenina.

| Tratamento mg/kg | Volume da pata em ml (tempo após a administração do inflamógeno) | | | |
|---------------------|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | 1h | 2h | 3h | 4h |
| Sal | 0.030 ± 0.014 | 0.015 ± 0.002 | 0.011 ± 0.003 | 0.006 ± 0.004 |
| Cg | $0.093 \pm 0.010^{\#}$ | $0.103 \pm 0.012^{\#}$ | $0.120 \pm 0.013^{\#}$ | $0.140 \pm 0.013^{\#}$ |
| Ind | 0.078 ± 0.007 (16,1%) | 0.062 ± 0.003 (39,9%)* | 0.055 ± 0.004 (54,2%)* | 0.051 ± 0.006 (63,6%)* |
| PLS AP 2,5 mg | 0.074 ± 0.005 (20,5%) | 0.088 ± 0.004 (15,6%) | 0.088 ± 0.003 (26,7%)* | 0.073 ± 0.005 (47,9%)* |
| PLS AP 5,0 mg | 0.084 ± 0.002 (9,7%) | 0.100 ± 0.005 (2,9%) | 0.086 ± 0.008 (28,3%)* | 0.088 ± 0.008 (37,1%)* |
| PLS AP 10 mg | 0.084 ± 0.002 (9,7%) | 0.093 ± 0.006 (9,8%) | 0.088 ± 0.002 (26,7%)* | 0.081 ± 0.004 (42,1%)* |

Valores são expressos como média \pm E.P.M. em ml de pelo menos cinco animais por grupo, analisada pela análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Newman Keuls ($p < 0.05$)

Legenda: PLS AP: Polissacarídeo modificado com anidrido propiônico; Cg: carragenina; Sal: Salina; Ind: Indometacina.

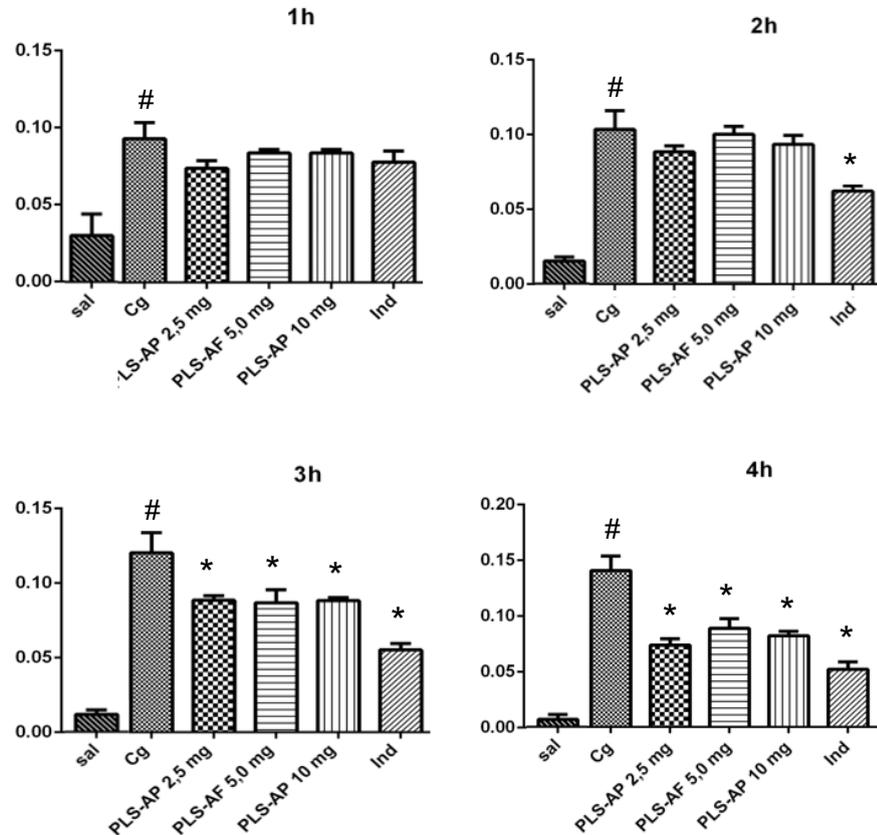
*Comparado com o grupo Carragenina.

Nos estudos de inflamação aguda, um dos modelos clássicos para estudar como ocorre a inflamação é o modelo que utiliza como agente flogístico a Cg no edema de pata induzido por carragenina. O método foi introduzido por Winter em 1962, sendo utilizado até a atualidade.

Dentre os sinais cardinais e iniciais da inflamação é possível observar a formação de edema devido os mediadores inflamatórios que provocam o aumento do fluxo sanguíneo para o tecido inflamado através do aumento da dilatação arterial e do aumento da permeabilidade microvascular (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011); sendo desta maneira, a formação de edema muito utilizada para estudo da inflamação aguda. Por caracterizar um edema Bifásico, o edema induzido por Cg possui duas fases, a primeira constitui-se da ação de mediadores pró inflamatórios, tais como serotonina, bradicinina e histamina que permite o aumento da permeabilidade vascular em um pequeno intervalo de tempo (1 à 2 horas). A segunda fase é conhecida pela ação de prostaglandinas, óxido nítrico (CRUNKHORN; MEACOCK, 1971; CARDIA *et al.*, 2018) e com infiltração de células polimorfonucleares (DAMASCENO *et al.*, 2014), e várias citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α (RAMOS *et al.*, 2020) ocorrendo dentro de 3 - 4 horas.

Assim, o presente estudo demonstrou que os camundongos que receberam Cg subplantar, tiveram um aumento da pata com pico máximo na terceira e quarta hora após a injeção. No que se refere ao grupo que recebeu um pré-tratamento com PLS AP 2,5 mg/kg, foi possível observar um volume de pata menos edemaciado, demonstrando resultados significacantes em todo curso da inflamação, com redução mais expressiva na terceira e quarta hora após a indução do edema, como observado na imagem abaixo.

Figura 4. Ação do PLS AP sobre o edema de pata induzido por Cg nas 4 horas.



Fonte: Imagem obtida através do software GraphPad Prism 6.

$p < 0,05$ comparado ao grupo PLS vs Cg; * $p < 0,05$ comparado ao grupo Cg vs Sal (A análise estatística foi realizada por meio do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls)

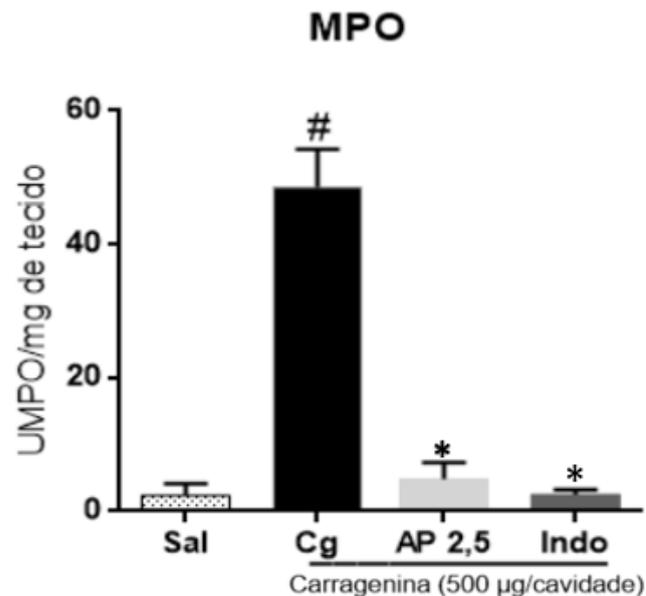
Resultados semelhantes foram observados nos estudos de Costa et al (2020) e Sales et al (2020), na qual o polissacarídeo extraído das macroalgas vermelhas *G. intermedia* e *G. caudata* demonstraram efeito anti-inflamatório e redutor do edema na pata em camundongos e proteção na mucosa da barreira esofágica humana, respectivamente.

5.2 Efeito do PLS AP sobre a atividade da enzima mieloperoxidase na pata

Para a análise da atividade da enzima MPO, foram utilizados os tecidos da pata (região subplantar) dos animais que passaram pela eutanásia. Na figura 5, observa-se que o grupo Cg demonstrou uma intensa atividade da enzima MPO nos tecidos das patas ($48,58 \pm 2,846$ UMPO/mg) em relação ao grupo salina ($2,386 \pm 0,782$ UMPO/mg). O grupo tratado com PLS AP 2,5 mg/kg apresentou redução significativa de MPO ($4,810 \pm 1,262$ UMPO/mg) em relação ao grupo Cg,

já com relação ao grupo salina a análise estatística constatou que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos. Foi notório também que o grupo Indo teve efeito reduzindo a enzima MPO de forma significativa ($2,539 \pm 1,006$ UMPO/mg) em relação ao grupo que recebeu apenas Cg.

Figura 5. Efeito Do PLS AP sobre a atividade da enzima mieloperoxidase na pata dos camundongos.



Fonte: Imagem obtida através do software GraphPad Prism 6.

A atividade da MPO foi determinada por espectrofotometria após a retirada da região subplantar das patas dos animais. Os valores foram representados como média \pm E.P.M. de unidade da enzima MPO/mg de tecido. * $p < 0,05$ comparado com o grupo Cg; # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina. A análise estatística foi realizada por meio do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. Legenda: Sal: Salina, PLS AP: Polissacarídeo modificado com anidrido propiônico, Indo: Indometacina. Fonte: Graphpad prisma 6.0.

Os neutrófilos são células do sistema imune que apresentam grânulos azurófilos. Dentre esses grânulos, é possível encontrar a enzima MPO (NIU *et al.*, 2013; ODOBASIC *et al.*, 2016) que auxilia na produção de produção de ácido hipocloroso, um potente oxidante que após reagir com H_2O_2 e Cl^- que provoca danos aos tecidos (COLOMBO *et al.*, 2018). Bioquimicamente, a enzima MPO tem sido relatada e utilizada como parâmetro da atividade de células inflamatórias (polimorfonucleares) em eventos inflamatórios agudos (REHRING *et al.*, 2021). Desta forma, na literatura é relatado a utilização da enzima MPO como um marcador indireto de infiltração de neutrófilos nos tecidos, pois reflete a

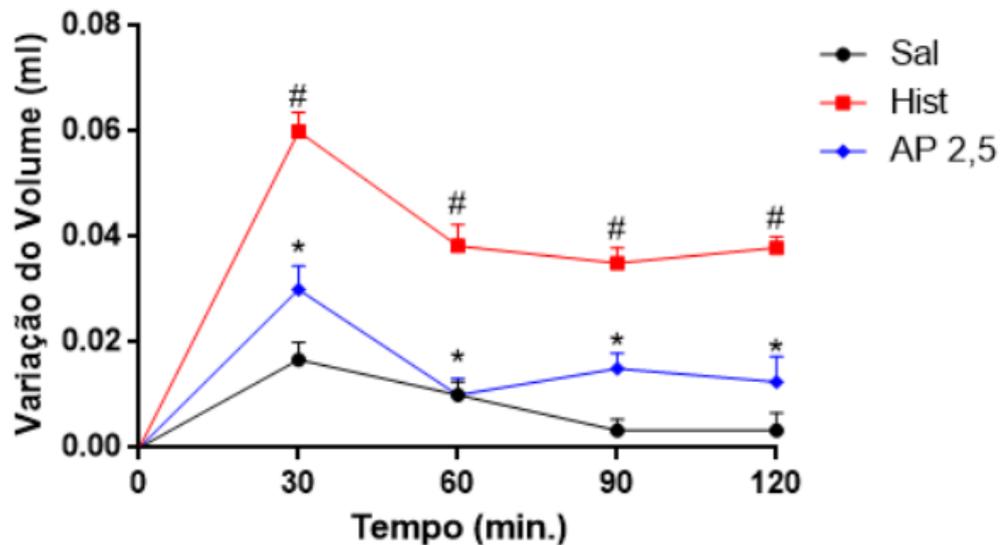
presença de células migrando para o local da lesão (CARDIA *et al.*, 2018), assim, sendo muito estudada em condições inflamatórias, também por estar envolvida durante o estresse oxidativo e contribuindo para a patogênese da inflamação (NIGAM *et al.*, 2022).

Resultados semelhantes foram relatados nos estudos de Mesquita *et al.* (2021) e Oliveira *et al.* (2020) que ao estudarem a lectina da alga vermelha *Amansia multifida* e o PLS da macroalga *Gracilaria caudata*, respectivamente, verificaram a redução da atividade da enzima MPO nos modelos de edema de pata e artrite em camundongos. Assim, no presente estudo foi evidenciado que o PLS AP na dose de 2,5 mg/kg reduziu de forma indireta a migração de células polimorfonucleares para os tecidos das patas dos animais que foram tratados com esse composto, se assemelhando ao grupo controle da droga Indo 10 mg/kg que foi utilizado como referência no controle do processo inflamatório. No entanto, quando comparado ao grupo Cg, observa-se que o MPO apresenta valores elevados, demonstrando a migração e ação das células polimorfonucleares no edema.

5.3 Ação do PLS AP sobre o edema de pata induzido por Histamina

Para a análise do efeito anti-inflatório do PLS AP 2,5 mg/kg no edema de pata induzido por Histamina foi administrado uma injeção i.pl. de Histamina (100 µg/pata) que provocou um intenso efeito edematogênico, com pico máximo observado nos primeiros 30 minutos ($0,0600 \pm 0,0036$ ml), pois quando comparado ao grupo salina que obteve ($0,017 \pm 0,003$ ml) é possível observar o contraste no volume formado. Apesar de decair, o edema provocado pela Histamina manteve uma constante nos minutos medidos posteriormente: 60 min ($0,038 \pm 0,004$), 90 min ($0,035 \pm 0,003$) e 120 min ($0,038 \pm 0,002$), o que pôde ser verificado pelo acentuado volume das patas dos animais que receberam estímulo flogístico. No que se refere ao efeito provocado pelo PLS AP (2,5 mg/kg) em relação ao grupo Histamina, foi possível verificar uma diminuição significativa em todo o curso temporal estabelecido: 30 min ($0,030 \pm 0,004$), 60 min ($0,010 \pm 0,004$), 90 min ($0,015 \pm 0,002$) e 120 min ($0,012 \pm 0,004$).

Figura 6. Ação do PLS AP sobre o edema de pata induzido por histamina.



Fonte: Imagem obtida através do software GraphPad Prism 6.

Os animais foram pré-tratados com 2,5 mg/kg de PLS AP 30 min antes da administração de histamina (100µg) na pata. O volume da pata foi medido no tempo 0 e após 30, 60, 90 e 120 min da administração do agente edematogênico. Os valores foram representados como média ± E.P.M. da variação do volume da pata em ml. * $p < 0,05$ comparado com o grupo Hist; # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina. A análise estatística foi realizada por meio do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. Legenda: Sal: Salina, Hist: Histamina, PLS AP: Polissacarídeo Anidrido Propiônico. Fonte: Graphpad prisma 6.0.

A histamina é descrita como um mediador inflamatório que provoca aumento da permeabilidade vascular, alterações vasculares, vasodilatação, além de provocar alterações teciduais (HOLSAPPLE; SCHNUR; YIM, 1980; BRANCO *et al.*, 2018). Como esperado, a administração da Histamina na pata dos camundongos provocou um aumento do volume da pata dos animais devido as ações relatadas anteriormente que ocorrem na microcirculação.

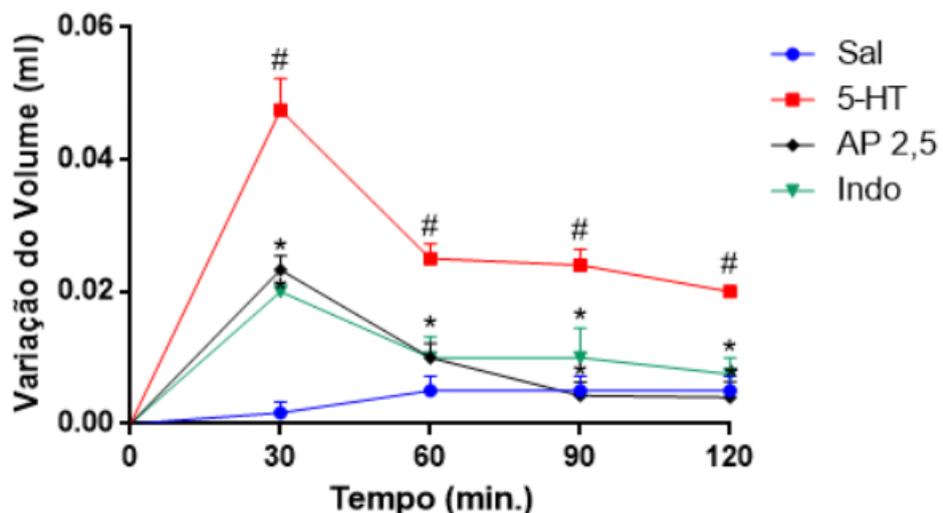
Como observado na figura 6, o PLS AP (2,5 mg/kg) reduziu o edema induzido por histamina em todos os tempos de leitura, corroborando com os trabalhos de COSTA *et al* (2020) e HAN *et al* (2021) que demonstraram a ação dos PLS sulfatados extraídos de algas (*Gracilaria intermedia* e *Gracilaria lemaneiformis*, respectivamente) nos modelos de edema de pata e colite ulcerativa em camundongos. Assim, é possível inferir uma possível participação do PLS AP em receptores específicos de eventos vasculares, pois a Histamina possui

receptores específicos no endotélio, evidenciando o efeito inibitório na resposta inflamatória pelo PLS AP testado.

5.4 Ação do PLS AP sobre o edema de pata induzido por Serotonina

Para a verificação da ação do PLS AP 2,5 mg/kg no edema de pata induzido por Serotonina (5-HT 100 µg/pata), foi observado um aumento no volume da pata dos camundongos do grupo controle positivo (injeção i.pl.) que causou um edema intenso nas patas dos camundongos nos primeiros 30 min em relação ao grupo controle negativo que receberam apenas solução salina i.pl. (figura 7) (5-HT – $0,047 \pm 0,005$ ml versus Sal – $0,002 \pm 0,002$ ml). Apesar de ir diminuindo no decorrer das demais medições (60, 90 e 120 min), foi possível verificar uma diferença significativa entre os grupos 5-HT e salina em todo o percurso temporal de medições. O PLS AP 2,5 mg/kg demonstrou ação sigficativa em relação ao grupo 5-HT reduzindo o edema provocado por Serotonina em todos os tempos testados, no tempo 30 min ($0,023 \pm 0,002$ ml), 60 min ($0,010 \pm 0,002$ ml), 90 min ($0,004 \pm 0,002$ ml) e 120 min ($0,004 \pm 0,002$ ml). Já com relação ao grupo controle de ação anti-inflamatória, foi observado que o grupo PLS AP 2,5 mg/kg se aproxima dos valores apresentados pelo grupo Indometacina (30 min – $0,020 \pm 0,001$; 60 min - $0,010 \pm 0,003$; 90 min - $0,010 \pm 0,004$; 120 min - $0,007 \pm 0,002$), apresentando valores menores nos tempos 60, 90 e 120 min.

Figura 7. Ação do PLS AP frente ao edema de pata induzido por Serotonina.



Fonte: Imagem obtida através do software GraphPad Prism 6.

Os animais foram pré-tratados com 2,5 mg/kg de PLS AP 30 min antes da administração de

Serotonina (100µg) na pata. O volume da pata foi medido no tempo 0 e após 30, 60, 90 e 120 min da administração do agente edemogênico. Os valores foram representados como média ± E.P.M. da variação do volume da pata em ml. *p<0,05 comparado com o grupo 5-HT (Tanto para os grupos AP 2,5 e Indometacna); #p<0,05 comparado com o grupo salina. A análise estatística foi realizada por meio do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. Legenda: Sal: Salina, 5-HT: Serotonina, PLS AP: Polissacarídeo modificado com anidrido propiônico. Fonte: Graphpad prism 6.0.

Assim como a Histamina, a Serotonina possui ação sobre os vasos sanguíneos, provocando vasodilatação (HOLSAPPLE; SCHNUR; YIM, 1980; RAMOS *et al.*, 2020). Após serem produzidas, as aminas ativam o endotélio vascular, expressando moléculas de adesão que medeia eventos que normalmente se expressam na inflamação, tais como o rolamento, adesão celular e transmigração de neutrófilos (MANLUSOC *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2020).

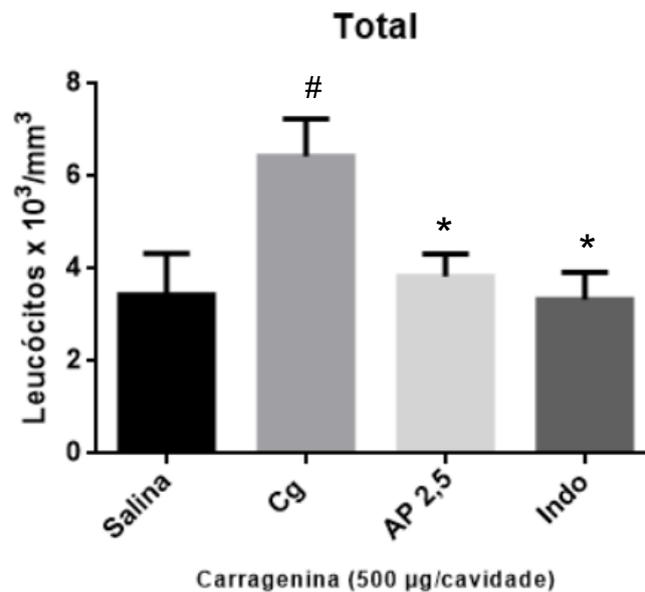
Assim, observa-se na imagem 7 o potencial anti-inflamatório do PLS AP 2,5 mg/kg frente a ação da Serotonina, corroborando com os resultados encontrados por Coura *et al.* (2017) e Oliveira *et al.* (2020) que estudaram a ação anti-inflamatória do PLS sulfatado extraído da alga *Gracilaria cornea* e *Gracilaria caudata* em edema de pata em camundongos (respectivamente), desta forma é evidenciado a redução do edema no grupo tratado com o PLS AP em relação ao grupo controle positivo 5-HT, com redução da vasodilatação e da permeabilidade vascular em todos os tempos testados. Ou seja, o PLS AP apresentou uma ação inibitória frente ao processo inflamatório mediado pela serotonina, semelhante ao apresentado pelo grupo controle da droga anti-inflamatória, indometacina.

5.5 Efeito do PLS AP na Contagem total de células na peritonite induzida por carragenina

O modelo de peritonite foi utilizado com o objetivo de quantificar a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal. Após eutanásia dos animais, foi realizado a contagem em câmara de Neubauer do material que foi coletado a partir da peritonite induzida por carragenina: líquido peritoneal e células leucocitárias. Desta forma, pode-se observar que o grupo PLS AP 2,5 mg/kg (3,833 ± 0,200) reduziu a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal dos animais quando comparado ao grupo Cg (6,438 ± 0,404), demonstrando assim que ação semelhante ao grupo Indometacina na dose de 10 mg/kg (3,333 ± 0,241), ou seja, sem diferença

significativa. Já o grupo Cg apresentou aumento significativo na contagem de leucócitos quando comparado com os valores do grupo Salina ($3,438 \pm 0,450$). Assim, o estímulo inflamatório por carragenina provocou um aumento significativo no número de leucócitos totais que migraram para a cavidade peritoneal dos camundongos.

Figura 8. Efeito do PLS AP na Contagem total de células durante a peritonite induzida por carragenina.



Fonte: Imagem obtida através do software GraphPad Prism 6.

Os animais foram pré-tratados com 2,5 mg/kg de PLS AP 30 min antes da indução da peritonite com administração de Cg (500µg) intraperitoneal. Os valores foram representados como média \pm E.P.M. de leucócitos totais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo Cg; # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina. Análise estatística foi realizada por meio do teste de variância seguido pelo teste de Newman-Keuls. Legenda: Sal: Salina, PLS AP: Polissacarídeo modificado com anidrido propiônico, Indo: Indometacina. Fonte: Graphpad prisma 6.0.

A migração leucocitária, em especial de neutrófilos, é um importante passo para a instalação do processo inflamatório, em especial a destruição de patógenos e para cicatrização de tecidos (GUSDON et al, 2017). No entanto, essas células quando ativadas induzem metabolismo oxidativo caracterizado por um intenso consumo de oxigênio e produção de substâncias reativas, gerando estresse oxidativo e lesão tecidual (SALEM et al, 2021; MACCARSON; FEHRENBACHER 2021).

A peritonite é um modelo clássico utilizado para verificação de drogas anti-

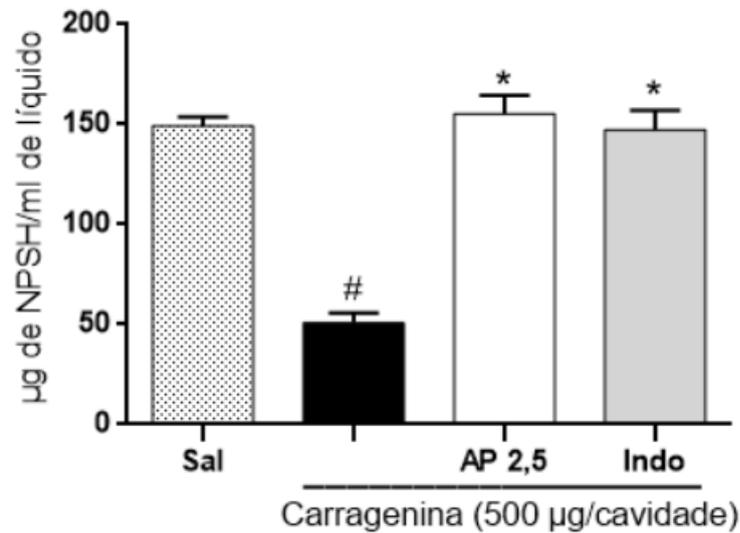
inflamatórias, podendo ser avaliados a migração de células inflamatórias e acúmulo de exsudato na cavidade pleural (PACHECO et al, 2021). Na literatura, é relatado que a supressão de moléculas de adesão e substâncias quimiotáticas podem provocar inibição da migração leucocitária para a cavidade peritoneal (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; SOBEH *et al.*, 2020).

Assim, na presente pesquisa, o PLS AP 2,5 mg/kg foi capaz de reduzir de maneira significativa a migração de células inflamatórias, em relação ao grupo Cg. Desta forma, esse resultado corrobora com os dados de estudos anteriores, como os de Zheng et al (2022) que estudando o polissacarídeo sulfatado extraído da alga *Gelidium crinale* na concentração abaixo de 100 µg/mL não apresenta toxicidade para células HT1080, mas apresentou excelente atividade na inibição da migração e invasão celular.

5.6 Ação do PLS AP sobre os níveis de GSH no exsudato peritoneal

Na mensuração dos níveis de GSH, foi verificado que os animais que receberam Cg apresentaram um elevado consumo dos níveis de GSH ($35,67 \pm 1,594$ µgNPSH/ml) quando comparado ao grupo que recebeu apenas solução salina ($146,0 \pm 5,669$ µgNPSH/ml) e Indo 10 mg/kg ($138,6 \pm 4,756$ µgNPSH/ml). O grupo tratado com o PLS AP na dose de 2,5 mg/kg na dose v.o. demonstrou uma diminuição nos níveis de consumo de GSH ($146,3 \pm 2,948$ µgNPSH/ml) quando comparado ao grupo Cg, demonstrando significativamente a manutenção dos níveis da enzima. O grupo PLS AP não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado aos grupos salina e Indo 10 mg/kg (figura 9).

Figura 9. Ação do PLS AP sobre os níveis de glutathiona no exsudato peritoneal.



Fonte: Imagem obtida através do software GraphPad Prism 6.

Os animais foram pré-tratados com 2,5 mg/kg de PLS AP 30 min antes da indução da peritonite com administração de Cg (500µg) intraperitoneal. Os valores foram representados como média ± E.P.M. de leucócitos totais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo Cg; # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina. A análise estatística foi realizada por meio do teste de variância seguido pelo teste de Newman-Keuls. Legenda: Sal: Salina, PLS AP : Polissacarídeo modificado com anidrido propiônico, Indo: Indometacina. Fonte: Graphpad prisma 6.0.

Relatado na literatura como biomarcador nos processos de oxidação tecidual, o GSH é um antioxidante endógeno natural que atua na prevenção das lesões oxidativas nas células e tecidos (ROSSI *et al.*, 2006; MAK *et al.*, 2017). De acordo com o observado na figura 9, os animais que foram tratados com PLS AP 2,5 mg/kg antes da indução da peritonite, não tiveram consumo significativo dos níveis de GSH, mantendo-se os níveis semelhantes aos níveis do grupo que recebeu apenas salina 0,9% e indometacina. Assim, juntamente com os valores encontrados no teste de MPO, é possível relacionar de forma indireta a diminuição da migração neutrofílica para a região lesada, pois a ação dessas células para o foco inflamatório provoca a produção de espécies reativas de oxigênio.

Os resultados apresentados corroboram com os resultados encontrados por Rudtanatip *et al.* (2022) e Khongthong *et al.* (2021) que ao estudar a atividade antioxidante e imunomoduladora do galactano sulfatado extraído da alga *Gracilaria fishani*, verificaram o aumento do GSH e assim é possível correlacionar a ação anti-inflamatória do PLS AP 2,5 mg/kg uma vez que o mesmo apresentou

resultados satisfatórios nos testes de inflamação geral provocada por agentes flogísticos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para o surgimento de novos fármacos, são necessários estudos referentes as propriedades e ação de compostos naturais em conjunto com informações fisiofarmacológicas e etnobotânicas. Os resultados alcançados deste estudo sugerem que o polissacarídeo extraído da macroalga *Gracilaria domingenses* e modificado com anidrido propiônico tem efeito durante a resposta anti-inflamatória e na atenuação do estresse oxidativo. Resultados que podem ser comprovados pela redução significativa de parâmetros inflamatórios analisados nos edemas de pata induzidos pelos agentes edematogênicos, Cg, serotonina e histamina; nas avaliações bioquímicas da enzima MPO, GSH e migração de leucócitos para a cavidade peritoneal. Diante disso, o presente trabalho revela um potencial farmacológico do PLS AP 2,5 mg/kg como um promissor agente anti-inflamatório, podendo servir como fonte de novas moléculas naturais com uso na inflamação. Todavia, mais estudos são necessários para comprovar os seus efeitos de forma mais abrangente para aplicabilidades farmacológicas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C. L. F. et al. Bioactivities from Marine Algae of the Genus *Gracilaria*. **Int J Mol Sci**, v.12, p.4550-4573, 2017.

AKHTAR, Ghazala; SHABBIR, Arham. *Urginea indica* attenuated rheumatoid arthritis and inflammatory paw edema in diverse animal models of acute and chronic inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 238, p. 111864, 2019.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n.3, p. 618-622, 1982.

BRANCO, A. et al. Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. **Mediators of inflammation**, p. 9524075, 2018.

BECHMANN, L. P. et al. Drug-induced liver injury as predominant cause of acute liver failure in a monocenter study. **Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 139, p. 878–882, 2014.

BINDU, Samik; MAZUMDER, Somnath; BANDYOPADHYAY, Uday. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. **Biochemical pharmacology**, v. 180, p. 114147, 2020.

BONECCHI, R.; GRAHAM, G. J. Atypical Chemokine Receptors and Their Roles in the Resolution of the inflammatory Response. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. 224, p. 1-7, 2016.

BRITO, T.V. et al. Sulfated-polysaccharide fraction extracted from red algae *Gracilaria birdiae* ameliorates trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 66, n. 8, p. 1161-70, 2013.

BROADIS, E. Et al. Bilateral ureteric obstruction secondary to renal papillary necrosis. **Pediatric Surgery International**, v. 26, n. 8, p. 867-920, 2010.

BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; SERHAN, C. N. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. **Immunity**, v. 40, n. 3, p. 315-27, 2014.

BUDOFF, P. W. Use of mefenamic acid in the treatment of primary dysmenorrhea. **JAMA**, v. 241, n. 25, p. 2713–2716, 1979.

CAN, G. et al. The Syk Inhibitor Fostamatinib Decreases the Severity of Colonic Mucosal Damage in a Rodent Model of Colitis. **Journal of Crohn's & colitis**, v.9, n. 10, p. 907–917, 2015.

CARDOSO, J. C.; OLIVEIRA, M. E. B.S.; CARDOSO, F. C. Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 124-132, 2019.

CARDIA, G. et al. **Effect of Lavender (*Lavandula angustifolia*) Essential Oil on Acute Inflammatory Response**. Evidence-based complementary and alternative medicine, v. 2018, p. 1413940, 2018.

CARPENA M. Biological properties and potential of compounds extracted from red seaweeds. **Phytochem Rev.** 1-32. 2022.

COURA C O. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of sulphated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** 110(4):335-41. 2012.

CHANG, C. Z. et al. Valproic acid attenuates intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin through a chemokine ligand 5 dependent mechanism and subarachnoid hemorrhage induced vasospasm in a rat model. **Journal of inflammation (London, England)**, v.12, n. 27, 2015.

CHAVES, L. S. et al. Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 35, p.93–100, 2013.

COLOMBO, B. B. et al. Vinpocetine Ameliorates Acetic Acid- Induced Colitis by Inhibiting NF- κ B Activation in Mice. **Inflammation**, v. 41, n. 4, p. 1276–1289, 2018.

COSTA, L.E.C. et al. Chemical structure, anti-inflammatory and antinociceptive activities of a sulfated polysaccharide from *Gracilaria intermedia* algae. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 159, p. 966-975, 2020.

CRUNKHORN, P.; MEACOCK, S. C. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. **British Journal of Pharmacology**, v. 42, n. 3, p. 392–402, 1971.

CRUVINEL, W. M. et al. Immune system – Part I Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50. n. 4, p. 434-461, 2010.

DENG Q. et al. Structural characterization, modification and hepatoprotective effects of polysaccharide from *Mori Fructus*. **Int J Biol Macromol.** 153:357-363. 2020.

EJAZ, P.; BHOJANI, K.; JOSHI, V.R. NSAIDs and kidney. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 52, p. 632-640, 2004.

FERNANDEZ L E. et al. Isolation and characterization of an antitumor active agar-type polysaccharide of *Gracilaria domingensis*. **Carbohydr Res.** 190(1):77-83. 1989.

GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 8, n. 2, p. 1- 6, 2006.

GONG, Yufeng et al. Structural characteristics and anti-inflammatory activity of

UV/H₂O₂-treated algal sulfated polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 152, p. 112157, 2021.

GUIMARÃES, C. L. S. **Estudo do efeito antinociceptivo e antiofídico do extratoetanólico das raízes de surucuína, *Humirianthera ampla* (miers)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental), Núcleo de saúde, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2005.

GUPTA, A.; BAH, M. NSAIDs in the Treatment of Postoperative Pain. **Current Pain and Headache Reports**, v. 20, n. 11, p. 62, 2016.

HAN R. The possible mechanism of the protective effect of a sulfated polysaccharide from *Gracilaria Lemaneiformis* against colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. **Food Chem Toxicol**. 149:112001.2021.

HARARI, Alexandre et al. Antitumour dendritic cell vaccination in a priming and boosting approach. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 19, n. 9, p. 635-652, 2020.

HAWKINS, Clare L.; DAVIES, Michael J. Role of myeloperoxidase and oxidant formation in the extracellular environment in inflammation-induced tissue damage. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 172, p. 633-651, 2021.

HOLSAPPLE M P; SCHNUR M; YIM G K. Pharmacological modulation of edema mediated by prostaglandin, serotonin and histamine. **Agents Actions**. 10(4):368-73. 1980.

HU H. et al. Chemical modification and antioxidant activity of the polysaccharide from *Acanthopanax leucorrhizus*. **Carbohydr Res**. 487:107890. 2020.

HUANG S. et al. Modification and application of polysaccharide from traditional Chinese medicine such as *Dendrobium officinale*. **Int J Biol Macromol**. 157:385-393. 2020.

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

KAWAHARA, K. et al. Prostaglandin E₂-induced inflammation: Relevance of prostaglandin e receptors. **Biochim Biophys Acta**, v. 1851, n. 4, p. 414-21, 2015.

KHONGTHONG S. et al. Caracterização e atividade imunomoduladora de galactana sulfatada da alga vermelha *Gracilaria fisheri*. **Int J Biol Macromo**.3; 1 de outubro de 2021.

KIM E; MOUDGIL K. Immunomodulation of autoimmune arthritis by pro-inflammatory cytokines. **Cytokine**. Oct;98:87-96. 2017.

KUPRASH, D. V.; NEDOSPASOV, S. A. Molecular and cellular mechanisms of inflammation. **Biochemistry (Moscow)**, v. 81, n. 11, p. 1237-1239, 2016.

LI, Q. et al. Carnosic acid protects against lipopolysaccharide- induced acute lung injury in mice. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 18, n.5, p. 3707–3714, 2019.

LORIA, V. Et al. Myeloperoxidase: A new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. **Mediators of Inflammation**, n. 135625, p. 1–4, 2008.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J.; BADIMON, L. Mechanisms Underlying the Cardiovascular Effects of COX-Inhibition: Benefits and Risks. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, p. 2215-2227, 2007.

MACCARSON K; FEHRENBACHER J. Models of Inflammation: Carrageenan- or Complete Freund's Adjuvant (CFA)-Induced Edema and Hypersensitivity in the Rat. **Curr Protoc.**;1(7):e202. 2021.

MAK T W. Et al. Glutathione Primes T Cell Metabolism for Inflammation. **Immunity**. 46(4):675-689. 2017.

MESQUITA J X. Et al. Lectin from red algae *Amansia multifida* Lamouroux: Extraction, characterization and anti-inflammatory activity. **Int J Biol Macromol**. 15;170:532-539. 2021.

NIGAM S. Et al. Perspectiva sobre as aplicações terapêuticas de polissacarídeos de algas. **J Polym Environ** .30(3):785-809. 2022.

MCCARBERG, B.; TENZER, P. Complexities in the pharmacologic management ofosteoarthritis pain. **Current Medical Research and Opinion**, 2013.

MELO, G. A.N. et al. Inhibitory effects of ginger(*Zingiber officinale* Roscoe) essential oil on leukocyte migration in vivo and in vitro. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, n. 1, p. 241–246, 2011.

MERLANI, G.; FOX, M.; OEHEN, H. P.; CATHOMAS, G.; RENNER, E. L.; FATTINGER, K. *et al.* Fatal hepatotoxicity secondary to nimesulide. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 57, p. 321–326, 2001.

MESQUITA Jr, D. et al. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Sinopse de Reumatologia**, p. 66 – 81, 2008.

MICHELIN, A. F. et al. Renal Toxicity of the Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors: Celecoxib and Rofecoxib. **Revista de Ciências Médicas**, v.15, p. 321-332, 2006.

MONTINARI, M.R.; MINELLI, DE CATERINA, S. R. The first 3500 years of aspirin history from its roots - A concise summary. **Vascular Pharmacology**, v. 113, p. 1–8, 2019.

MURI, E. M. F.; SPOSITO, M. M. M.; METSAVAHT, L. Antiinflamatórios não-esteroidais e sua farmacologia local. **Acta Fisiátrica**, v. 16, n. 4, p. 186-190, 2016.

NDERITU, P. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and chronic kidney disease progression: a systematic review. **Family Practice**, v. 30, n. 3, p. 247-255, 2013.

NIGAM S. Et al. Perspectiva sobre as aplicações terapêuticas de polissacarídeos de algas. **J Polym Environ** .30(3):785-809. 2022.

OKUSADA, K. et al. The antinociceptive and anti-inflammatory action of the CHCl₃-soluble phase and its main active component, damnacanthal, isolated from the root of *Morinda citrifolia*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, v. 1, p. 103–107, 2011.

OLIVEIRA, E. L. P. et al. Inflammasome and its clinical impact: literature review. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.11, n.1,p.96-102, 2012.

OLIVEIRA F F. Sulfated polysaccharide from *Gracilaria caudata* reduces hypernociception and inflammatory response during arthritis in rodents . **Int J Biol Macromol**. 161:1061-1069. 2020.

OLIVEIRA, Leticia Castelo Branco Peroba et al. Antioxidant sulfated polysaccharide from edible red seaweed *Gracilaria birdiae* is an inhibitor of calcium oxalate crystal formation. **Molecules**, v. 25, n. 9, p. 2055, 2020.

OLIVEIRA, M. T. P. **Efeito anti-inflamatório do MHTP, uma nova molécula do tipo alcaloide tetrahydroisoquilínico. 2014.** 114 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

PAGE, M.; CHRISTIN, F.; HAYI-SLAYMAN, D.; BAILLON, J.J.; BER, C.E., PAUL, W. E. **Fundamental Immunology**. Philadelphia: Wolters KluwerHealth/Lippincott Williams & Wilkins, 7 ed. 2013.

PACHECO A G. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae) in mice. **Braz J Biol**. 82:e240359. 2021.

PALANI K. Et al. Sulfated Polysaccharides Derived from *Hypnea valentiae* and Their Potential of Antioxidant, Antimicrobial, and Anticoagulant Activities with *In Silico* Docking. **Evid Based Complement Alternat Med**. 3715806.2022.

PEREIRA, C. M. C. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase gamma participates in nimesulide- induced hepatic damage. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 73, p. 496– 504, 2021.

PINA-PÉREZ, M. Consuelo et al. Antimicrobial potential of macro and microalgae against pathogenic and spoilage microorganisms in food. **Food chemistry**, v. 235, p. 34-44, 2017.

POSSO, I. P.; ASHMAWI, H. A. Tratamento farmacológico da dor aguda. In: Grünenthal. Tratamento Farmacológico da Dor Aguda e Crônica. São Paulo: EuropaPress, p. 3-15, 2014.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 6° Ed. Editora: Elsevier, 2007.

REHRING, Jacob F. et al. Released myeloperoxidase attenuates neutrophil migration and accumulation in inflamed tissue. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 654259, 2021.

REUBEN, A.; KOCH, D. G.; LEE, W. M. Acute Liver Failure Study Group. Drug-induced acute liver failure: results of a US multicenter, prospective study. **Hepatology** v.52, p, 2065–2076, 2010.

REVEGLIA, P.; CIMMINO, A.; MASI, M.; NOCERA, P.; BEROVA, N.; ELLESTAD, G.; EVIDENTE, A. Pimarane diterpenes: Natural source, stereochemical configuration, and biological activity. **Chirality**, v. 30, n. 10, p. 1115–1134, 2018.

RIBEIRO, R. G. **Estudo etnobotânico e físico-químico da batata-mairá (Casimirella spp. –Icacinaceae)**. 2018. 126 folhas. Dissertação (Ciências Biológicas (Botânica)) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus,2018.

ROSSI, R.; DALLE-DONNE, I.; MILZANI, A.; GIUSTARINI, D. Oxidized forms of glutathione in peripheral blood as biomarkers of oxidative stress. **Clinical Chemistry**, v.52, n.7, p.1406–1414, 2006.

ROE K. An inflammation classification system using cytokine parameters. **Scand J Immunol**. 93(2):e12970. 2021.

RUDTANATIP T. et al. Caracterização estrutural, atividade antioxidante e efeito protetor contra o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio de galactanos sulfatados *Gracilaria fisheri* quimicamente degradados. **Int J Biol Macromol**. 206:51-63. 2022.

RUBIO´, L.; MARIA-JOS, M.; MARIA-PAZ, R. Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: a review of the most effective antioxidant and antiinflammatory active principles. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**,v. 53, p. 943–953, 2013.

SÁ, R. C. S.; Andrade, L. N.; Oliveira, R. R. B.; Sousa, D. P. A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. **Molecules (Basel,Switzerland)**, v. 19, n. 2, p. 1459–1480, 2014.

SAJADIMAJD S. Et al. Molecular Mechanisms Underlying Cancer Preventive and Therapeutic Potential of Algal Polysaccharides. **Curr Pharm Des**. 25(11):1210-1235. 2019.

SALES, T M. et al. Polysaccharide from *Gracilaria caudata* protects the human esophageal mucosal barrier: A differential topical effect and structural dependence. **International journal of biological macromolecules**, v. 150, p. 354-

361, 2020.

SALEM S. et al. Reduction of paw edema and liver oxidative stress in carrageenan-induced acute inflammation by *Lobaria pulmonaria* and *Parmelia caperata*, lichen species, in mice. **Int J Vitam Nutr Res.** 91(1-2):143-151. 2021.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, n.1, p. 192-205, 1968.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best practice & research. Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385–405, 2004.

SILVA, F.R.P. et al. Sulfated polysaccharides from the marine algae *Gracilaria caudata* prevent tissue damage caused by ligature-induced periodontitis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 1-8, 2019.

SILVA, J. C. et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: umarevisão. **Revista Brasileira de Farmacia**, v. 94, n. 1, p. 18-23, 2012.

SOSTRES, C. et al. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology**, v.24,n. 2, p. 121-132, 2010.

SOUSA, S. G. et al. Chemical structure and anti-inflammatory effect of polysaccharide extracted from *Morinda citrifolia* Linn (Noni). **Carbohydrate Polymers**, v. 197, p. 515–523, 2018.

SOHAIL, N. et al. Marine macro-algae attenuates nephrotoxicity and hepatotoxicity induced by cisplatin and acetaminophen in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, 2019.

VISHWAKARMA, Jyoti; VAVILALA, Sirisha L. Evaluating the antibacterial and antibiofilm potential of sulphated polysaccharides extracted from green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, n. 4, p. 1004-1017, 2019.

WILCHES I. Atividades anti-inflamatórias e sedativas de *Peperomia galioides* : estudos in vivo em camundongos. **Nat Prod Res.** 35(10):1657-1661. 2021.

WINTER, C. A.; RISLEY E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544–547, 1962.

YOSHIMURA, C. Y. **Avaliação do potencial de cultivo e produção de ágar de *Gracilaria domingensis* e de *Gracilaria caudata* (Rhodophyta, Gracilariales) na Enseada de Armação do Itacoroy (Penha, Santa Catarina). 163 p.** (Tese de Doutorado em Ciências - Área Botânica). Instituto de Biociências da Universidade de

São Paulo, 2006.

ZHANG, R. Et al. Recent advances in cell membrane-camouflaged nanoparticles for inflammationtherapy. **Drug Delivery**, v. 28, n. 1, p. 1109 –1119, 2021.

ZHENG H. et al. A Sulfated Polysaccharide from Red Algae (*Gelidium crinale*) to Suppress Cells Metastasis and MMP-9 Expression of HT1080 Cells. **Aliments**. 11(15):2360. 2022.