

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

IVAN RUI LOPES DE ALBUQUERQUE

Purificação e caracterização parcial de uma Fucana C
de *Dictyota mentrualis* e estudo do seu efeito
antiinflamatório e nociceptivo

NATAL/RN
2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

IVAN RUI LOPES DE ALBUQUERQUE

Purificação e caracterização parcial de uma Fucana C
de *Dictyota mentrualis* e estudo do seu efeito
antiinflamatório e nociceptivo

Dissertação apresentada ao Departamento
de Bioquímica da Universidade Federal
do Rio Grande do Norte, como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre
em Bioquímica.

**Orientador: Prof^o. Dr Hugo Alexandre
de Oliveira Rocha**

NATAL/RN
2005

A Deus pelo seu amor, carinho e atenção para com todos que eu amo e para comigo.

“Que Deus me guie, me ilumine, me abençoe e me proteja, AMEM”

À minha Família, que sempre me apoiou em todos os momentos da minha vida, compartilhando dos momentos felizes e ajudando a superar os momentos difíceis.

A minha Mãe (Idenilda), que é a luz que ilumina meu caminho.

Ao meu Pai (Severino), que tanto trabalhou para dar educação a todos os filhos.

A meu Irmão (Fernando) e à minha Irmã (Ceixa), que dividiram comigo a felicidade de crescer e aprender a ser uma pessoa de bem.

À minha noiva Dahíres, que tem me ajudado a ver que a vida é mais bonita a cada dia.

E a toda sua família: sua mãe – Cleia, seu pai – Guaraci, suas irmãs – Débora, Daliana e a Bia, que sempre me deram carinho, sem esquecer de Tia Aldinha uma tia adotiva pela qual tenho muito carinho.

Ao meu Amigo, Companheiro, Confidente e Orientador Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha, mas como costume chamar afetosamente de “*chefe*”, por todo tempo de convívio (aproximadamente 06 anos), que me fizeram crescer muito como pessoa e profissional e por toda a ajuda que sempre estive disposto a dar sem pedir nada em troca.

A todos que tiveram comigo a felicidade de fazer parte do conjunto de pessoas integram o BioPol.:

- Sara/Mariana
- Leandro (Leonardo)
- Mariana/Sara
- Nednaldo (Meio Quilo)
- Ana (nossa mana)
- Duda (Vulgo Eduardo)
- Edjane
- Bobó

Sem a presença de vocês este trabalho não teria sido realizado.

AGRADECIMENTOS

A Prof.^a Dr^a Edda Lisboa Leite que me ensinou mais do que Bioquímica me ensinou que viver é mais importante que está vivo.

Ao Prof. Dr. Maurício Pereira Sales pessoa a qual aprendi a respeitar e admirar pela força de vontade de fazer as coisas funcionarem.

Aos demais Professores e Funcionários do departamento que sempre estiveram dispostos a ajudar para que eu pudesse crescer e me desenvolver no mundo científico.

A Prof^a. Janeusa Souto que me auxiliou no decorrer do mestrado e aos seus alunos e meus amigos André Dawin, Grace Kelly e Marja pela prazerosa companhia.

A todos os meus amigos de departamento que fizeram do convívio um prazer que vai fazer falta, motivo pelo qual fico um pouco triste pelo mestrado ter chegado ao fim. Em especial a Celina, Fernando (Betão), Tarciana, Carlinhos, Prof. Alexandre, Leonardo (Pepininho), Ranieri.

Em especial a minha amiga e irmã científica Cybelli (carinhosamente chamada de *Ciba*) e ao meu amigo e irmão científico Fabiano (carinhosamente chamado de *O gordo*)

A minha turma de mestrado que nas disciplinas partilharam comigo a difícil missão de não tirar um C.

Aos meus amigos de graduação, onde esta linda estória começou. Vocês sempre vão estar comigo

Ao órgão financiador do laboratório: CNPq / CAPES

Antecipadamente aos componentes da banca examinadora

Finalmente a mim mesmo que consegui concluir uma etapa tão difícil na vida de um estudante no *Brasileiro*.

RESUMO

Em anos recentes, os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas tem emergido como importante classe natural de biopolímeros que podem ser aplicados na assistência médica humana e veterinária, tendo a vantagem da ausência de potencial risco de contaminação por vírus animal. Algumas amostras de fucanas foram isoladas de alga marinha marrom tendo sido estudadas quanto a sua atividade anticoagulante, antitrombótica, antiinflamatória e antiviral. O efeito biológico das fucanas tem sido dependente do grau de sulfatação e do tamanho da molécula do polissacarídeo. Neste estudo foi realizada uma análise da composição da fucana extraída da alga marrom *Dictyota menstrualis* e o efeito na migração de leucócitos no peritônio com sua molécula influencia na modulação da sensação dolorosa periférica. O polissacarídeo sulfatado foi extraído da alga marrom por digestão proteolítica seguida por precipitação com acetona produzindo 05 frações. A eletroforese em gel usando tampão 0,05 M 1,3-diaminopropano-acetato (PDA) pH 9,0 revelado com 1,0% de azul de toluidina demonstrou a presença de polissacarídeos em todas as frações. A análise química demonstrou que todas as frações são compostas principalmente de fucose, xilose, galactose, ácido urônico e sulfato. As eletroforeses em três sistemas de tampões demonstraram que a fração 2,0v possui apenas uma população de fucana. Este componente foi purificado por exclusão molecular e demonstrou uma composição de fucose, xilose, sulfato e ácido urônico de 1,0:1,7:1,1:0,5 respectivamente. O efeito desta heterofucana na migração de leucócito observado 06 horas após a aplicação de zymozan no peritônio. A heterofucana demonstrou alta atividade antimigratória diminuindo a migração em 100% na concentração de 20,0mg/kg, também apresentando um efeito modulado da sensação dolorosa periférica de modo dose dependente. Estes resultados sugerem que esta fucana possa ser utilizada como novo antiinflamatório na indústria farmacêutica.

ABSTRACT

In recent years, sulfated polysaccharides from marine algae have emerged as an important class of natural biopolymers with potential application in human and veterinary health care, while taking advantage of the absence of potential risk of contamination by animal viruses. Among these, fucans isolated from the cell walls of marine brown alga have been studied due to their anticoagulant, antithrombotic, anti-inflammatory and antiviral activities. These biological effects of fucans have been found to depend on the degree of sulfation and molecular size of the polysaccharide chains. In the present study, we examined structural features of a fucan extracted from brown alga *Dictyota menstrualis* and its effect on the leukocyte migration to the peritoneum. The sulfated polysaccharides were extracted from the brown seaweed by proteolytic digestion, followed by sequential acetone precipitation producing 5 fractions. Gel electrophoresis using 0.05 M 1,3-diaminopropane-acetate buffer, pH 9.0, stained with 0.1% toluidine blue, showed the presence of sulfated polysaccharides in all fractions. The chemical analyses demonstrated that all fractions are composed mainly of fucose, xylose, galactose, uronic acid, and sulfate. Electrophoresis in agarose gel in three different buffers demonstrated that the fraction 2.0v has only one population of fucan. This compound was purified by exclusion molecular. It has shown composition of fucose, xylose, sulfate and uronic acid in molar ratio of 1.0: 1.7: 1.1: 0.5 respectively. The effect of this heterofucan on the leukocyte migration was observed 6h after zymozan (mg/g) administration into the peritoneum. The heterofucan showed higher antimigratory activity, it decreased the migration of leukocyte in 83.77% to peritoneum. The results suggest that this fucan is a new antimigratory compound with potential pharmacological applications.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Migração dos neutrófilos.....	27
Figura 02	Polissacarídeos de ouriços; Fonte: VILELA-SILVA, 1999.....	31
Figura 03	Xilofucoglucuronana. Fonte: LEITE 1998.....	33
Figura 04	<i>Dictyota menstrualis</i>	39
Figura 05	Camundongo Suiss	40
Figura 06	Esquema de extração dos polissacarídeos por precipitação com acetona.....	45
Figura 07	Rendimento das frações de polissacarídeos obtidas através do fracionamento com acetona.....	55
Figura 08	Perfil eletroforético das frações de polissacarídeos.....	56
Figura 09	Cromatografia descendente em papel dos hidrolisados ácidos das frações.....	58
Figura 10	Perfil de eluição da Fucana C na coluna Sephdex G75.....	61
Figura 11	Passos de Purificação da Fucana C.....	62
Figura 12	Perfil eletroforético em tampão PDA dos passos de purificação.....	64

Figura 13	Cromatografia descendente em papel dos hidrolisados ácidos das frações F2,0V e Fuc C.....	65
Figura 14	Efeito da fucana C na migração dos leucócitos em camundongos com peritonite induzida por peptona.....	68
Figura 15	Efeito analgésico da fucana C em camundongos.....	70
Figura 16	Efeito da fucana C no teste da placa quente.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela I	Atividades Farmacológicas Atribuídas as Fucanas.....	36
Tabela II	Definição de Grupos Peritonite.....	51
Tabela III	Relação molar dos açúcares e sulfato e percentual de proteínas presentes nas frações de <i>Dictyota menstrualis</i>	59
Tabela IV	Comparação da composição das frações F2,0v e Fuc C.....	66
Tabela V	Efeito da Fucana C no teste de contração Abdominal	70

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
1. INFLAMAÇÃO.....	21
1.1. Considerações Gerais.....	21
1.2. Neutrófilos.....	22
1.3. Rolamento e Migração dos Neutrófilos.....	24
2. NOCICEPÇÃO.....	28
3. POLISSACARÍDEOS DE ALGAS.....	30
MATERIAIS	39
1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	39
1.1. Alga Marinha.....	39
1.2. Animal.....	40
2. OUTROS MATERIAIS.....	40
3. APARELHOS.....	42
MÉTODO	43

I	<i>EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO</i>	43
1.	EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS ÁCIDOS DA ALGA <i>Dictyota menstrualis</i>	43
1.1.	Obtenção do Pó cetônico.....	43
1.2.	Proteólise.....	43
1.3.	Fracionamento com acetona.....	44
II	<i>PURIFICAÇÃO</i>	46
1.	CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA.....	46
2.	CROMATOGRAFIA EM GEL FILTRAÇÃO (Sephadex G75).....	46
III	<i>CARACTERIZAÇÃO</i>	47
1.	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	47
2.	CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL.....	48
3.	ANÁLISES QUÍMICAS.....	48
3.1.	Ácidos Urônicos.....	49
3.2.	Fucose.....	49
3.3.	Xilose.....	49
3.4.	Açúcares Totais.....	50
3.5.	Sulfato.....	50
3.6.	Proteína.....	50
IV	<i>ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS</i>	51
1.	ENSAIO DE INIBIÇÃO DE MIGRAÇÃO.....	51
2.	ENSAIO DA CONTRAÇÃO ABDOMINAL.....	52
3.	ENSAIO DA PLACA QUENTE.....	52

RESULTADOS	54
1. EXTRAÇÃO E RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DA ALGA MARINHA <i>Dictyota menstrualis</i>	54
2. CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS FRAÇÕES CETÔNICAS.....	55
2.1. Eletroforese em gel de agarose.....	55
2.2. Cromatografia descendente em papel.....	57
2.3. Dosagens Químicas	59
3. PURIFICAÇÃO DE UMA FUCANA C DA ALGA <i>Dictyota menstrualis</i>	60
3.1. Cromatografia de Troca Iônica.....	60
4. Caracterização da Fucana C.....	63
5. ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DA FUCANA C.....	66
5.1. Atividade Antiinflamatória.....	66
5.2. Modulação da Sensibilidade Nociceptiva.....	68
5.2.1. Teste da Contração Abdominal.....	69
5.2.2. Teste da Placa Quente.....	71
DISCUSSÃO	73
CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS	81
APÊNDICE I	
APÊNDICE II	

Introdução

1. INFLAMAÇÃO

1.1. Considerações Gerais

Inflamação ou flogose (do latim *inflamare* e do grego *phlogos*, que significa pegar fogo) é uma resposta complexa do tecido conjuntivo vascularizado ao agente agressor, caracterizando-se pelo extravasamento de líquidos e de células do sangue para o interstício, levando a um acúmulo de fluido e neutrófilos nos tecidos extravasculares. Esse processo é uma resposta fundamental de proteção, cuja finalidade é neutralizar e/ou destruir o agente causador da lesão celular (microorganismo, toxina) e as conseqüências dessa lesão, como células e tecidos necrosados (PEREIRA et al., 1998).

As causas para as reações inflamatórias são muito variadas, entretanto os mecanismos de surgimento deste processo são comuns. As causas podem ser classificadas em: endógenas e exógenas. As endógenas seriam aquelas derivadas de degenerações ou necroses tissulares e as derivadas de alterações na resposta imunológica (por imunocomplexo ou autoimune). Enquanto, que as exógenas poderiam ser causadas por agentes físicos (calor e frio; eletricidade; radiações; sons e ultra-sons; magnetismo; gravidade; traumas mecânicos e atritos) e agentes químicos (inorgânicos e orgânicos), ou até mesmo agentes biológicos (Infecciosos ou Parasitários).

A resposta inflamatória aguda é um tipo de resposta relativamente inespecífica e suas funções mais importantes estão relacionadas com a eliminação dos tecidos mortos, proteção contra infecções locais, assim como, permitir o acesso do sistema imune à área danificada. Havendo persistência do agente lesivo, inicia-se a inflamação crônica, neste processo há destruição contínua dos tecidos e tentativas de cicatrização por reparo fibroso, além de respostas imunes concomitantes (STEVENS & LOWE, 1998).

1.2. Neutrófilos

Os diferentes tipos de células sangüíneas se originam na medula óssea, a partir das células-tronco hematopoiéticas. Aproximadamente, 55 a 60% destes progenitores pluripotentes são destinados à linhagem neutrofílica (BAINTON, 1992). Sua produção pode ser aumentada em resposta ao fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e ao fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) (BARREDA *et al.*, 2004).

No processo inflamatório agudo o componente fundamental de defesa são os neutrófilos. Os quais são células de 12 a 15 μm de diâmetro que apresentam um núcleo polimórfico formado por dois a cinco lóbulos (mais freqüentemente, três lóbulos) ligados entre si por finas pontes de cromatina. Seu citoplasma contém um elevado número de grânulos, nos quais estão armazenados um arsenal de agentes bactericidas e proteínas antimicrobianas pré-formados. Por causa destas características, núcleo multilobulado e presença de grânulos, os neutrófilos

também passaram a ser conhecidos como leucócitos polimorfonucleares ou granulócitos neutrófilos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Os neutrófilos são as principais células de defesa inata do organismo e junto com outros polimorfonucleares (PMNs) são considerados células efetoras primárias em reações inflamatórias agudas induzidas por agentes infecciosos, destacando-se pela sua atuação como fagócitos profissionais (VECCHIARELLI *et al.*, 2000). A ativação neutrofílica pode ser induzida por numerosos estímulos provenientes do ambiente extracelular (citocinas, quimioatraentes e materiais estranho ao hospedeiro), os quais podem ser reconhecidos por receptores de superfície dos PMNs. Estes sinais extracelulares são traduzidos em mensagens intracelulares que acionam funções dos neutrófilos como a capacidade de aderência a outras células, resposta coordenada aos efeitos da quimiotaxia, fagocitose, desgranulação e produção de radicais livres provenientes do oxigênio (ROOT *et al.*, 1981; SAWYER *et al.*, 1989).

Com o estabelecimento do processo infeccioso, um extenso número de neutrófilos é rapidamente recrutado da circulação sangüínea para o tecido lesado, processo facilitado pelo efeito de mediadores inflamatórios (histamina, leucotrienos, prostaglandinas e Fator de Necrose Tumoral – TNF- α) produzidos por células do hospedeiro no sítio da infecção. Estes mediadores promovem a dilatação dos vasos, com conseqüente redução do fluxo sangüíneo, aumento da permeabilidade vascular, expressão de moléculas de adesão e a quimiotaxia dos neutrófilos para fora do vaso (SVANBORG *et al.*, 1999). As moléculas de adesão são requeridas para uma interação coordenada entre as células do endotélio vascular e os neutrófilos, sendo essenciais para os processos de rolamento,

ativação, adesão e diapedese não só dos neutrófilos, como também, dos demais fagócitos (ANDREWS *et al.*, 2003). Os agentes quimioatraentes exercem efeito atrativo sobre as células polimorfonucleares ativando e direcionando-os para o sítio da infecção. Entre estes agentes podem ser citados os peptídeos N-formilados (por exemplo, N-formil-metionil-leucilfenilalanina – fMLP) produzidos por bactérias, o componente C5a do complemento, o leucotrieno B₄ (LTB₄), o Fator Ativador de Plaquetas (PAF) e a Interleucina (IL)-8 (DEVRIES *et al.*, 1999; SCAPINI *et al.*, 2000).

1.3. Rolamento e Migração dos Neutrófilos

O processo de aderência dos neutrófilos à parede do vaso é iniciado pelas interações das glicoproteínas leucocitárias com as selectinas (moléculas de adesão) expressas nas células endoteliais, as quais foram ativadas por mediadores inflamatórios, como exemplo, o TNF- α (figura 01). A colisão dos neutrófilos com a parede do vaso permite a ligação de moléculas de selectina P e selectina E das células endoteliais ativadas com a região sialil-Lewis^x (s-Le^x) de certas glicoproteínas da superfície dos neutrófilos (POLLEY *et al.*, 1991; FRENETTE *et al.*, 1997). Estas interações mediadas pelas selectinas não são suficientemente fortes para opor-se às forças do fluxo sangüíneo, mas são suficientes para induzirem uma diminuição da velocidade dos PMNs, que passam a rolar ao longo do endotélio vascular (FRENETTE *et al.*, 1997).

Já há algum tempo vem se estudando o mecanismo de migração dos leucócitos para os sítios de inflamação (SPRINGER T.A. *et al.*, 1994). A

transmigração dos leucócitos do sangue para o sítio de inflamação é um processo que envolve múltiplos passos cooperativos. A rolagem dos leucócitos ao longo do endotélio é o passo inicial que desencadeia esse processo. A mesma é iniciada por uma família de moléculas de adesão, chamadas de selectinas (E-, P- e L-Selectinas) (LEY, et al 1996; LINNEMANN, et al. 2000; KLINTMAN et al, 2002; VENTURI et al, 2003), seguido por um posterior aumento na adesão mediada por outra família de moléculas de adesão, as integrinas (GENG, 2003). Esse processo depende fundamentalmente do mecanismo de interações leucócito-célula endotelial que é mediada por pelo menos 4 famílias de moléculas de adesão (Selectinas, Ligantes de Selectinas, Integrinas e Superfamília IgG).

O rolamento dos leucócitos polimorfonucleares aumenta a exposição das células a um grupo variado de substâncias quimioatraentes, que podem ser expressos pelo endotélio ativo, ou serem originados a partir do sítio da infecção e se difundirem no sangue. Podem também estar ligados (como a IL-8) aos grupos glicosaminoglicanos dos proteoglicanos expostos nas células endoteliais (ZIMMERMAN et al., 1992; ZIMMERMAN et al., 1996). Os agentes quimioatraentes ligam-se a receptores específicos de superfície dos PMNs, inclusive dos neutrófilos, deflagrando a ativação neutrofílica, que promove o desencadeamento de alterações nas propriedades de adesão dos neutrófilos com as células da parede vascular. Dentre as alterações, verifica-se a liberação das integrinas (moléculas de adesão) pelos grânulos secundários para a superfície dos neutrófilos, onde sofrem mudanças conformacionais, aumentando muito sua afinidade por seus ligantes no endotélio. Assim, por exemplo, a exposição de um neutrófilo à IL-8 aciona mudanças na configuração de integrinas, especialmente,

LFA-1 (CD11a/CD18) e Mac-1 (CD11b/CD18). Isto resulta no aumento da afinidade das integrinas para se ligar firmemente à molécula-1 de adesão intercelular (ICAM-1) (figura 01), cuja expressão sobre as células endoteliais é aumentada pela ação de mediadores inflamatórios (RUOSLAHTI, 1991; ZIMMERMAN et al., 1992; ZIMMERMAN et al., 1996). As interações mediadas por integrinas promovem contatos moleculares estáveis e prolongados, que impedem o movimento dos neutrófilos e fazem com que ele fique aderido ao endotélio. A forte adesão possibilita o extravasamento dos leucócitos polimorfonucleares através da parede endotelial para os tecidos subepiteliais, processo conhecido como diapedese. Nesta etapa, além das integrinas leucocitárias LFA-1 e Mac-1, também estão envolvidas moléculas de adesão tipo imunoglobulinas, como por exemplo: PECAM ou CD31 (figura 01), expressas tanto nos neutrófilos como nas junções intercelulares das células endoteliais (MULLER et al., 1999). Após o extravasamento para os tecidos, os PMNs são atraídos por fatores quimiotáticos, que se ligam ao pólo da célula induzindo dois mecanismos: liberação dos grânulos que expõem receptores dos fatores quimiotáticos; e, em seguida, emissão de pseudópodos, uma projeção da membrana e citoplasma da célula. Depois da projeção, o pseudópodo ancora-se, e o restante do citoplasma é puxado. Um novo pseudópodo é estendido, repetindo-se o processo. O movimento direcionado de uma célula ao longo de um gradiente de concentração crescente de moléculas de atração é definido como quimiotaxia (ZIGMOND, 1978; ZHELEV *et al.*, 2002).

Uma vez no sítio inflamatório, a estratégia utilizada pelos neutrófilos para eliminar os patógenos é a fagocitose destes microorganismos (WITKO-SARSAT *et al.*, 2000).

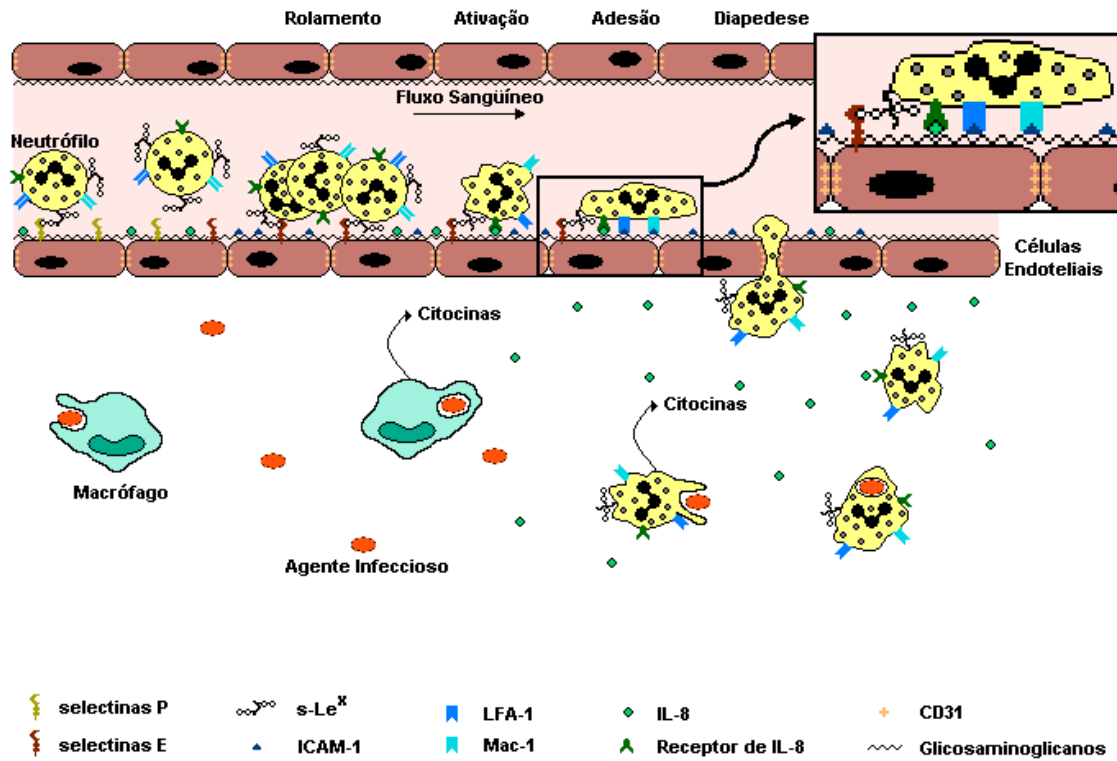


Figura 01: Migração dos neutrófilos da corrente sangüínea para o sítio da infecção. As interações iniciais são mediadas pelas selectinas P, com subsequente expressão das selectinas E. Ambas reconhecem a região sialil-Lewis^x (s-Le^x) das glicoproteínas leucocitárias, constituindo-se interações fracas que possibilitam o rolamento dos neutrófilos sobre a superfície do endotélio. Entretanto, interações mais fortes ocorrem quando uma maior quantidade de ICAM-1 é expresso sobre as células endoteliais e LFA-1 e Mac-1 são ativados no neutrófilo, processos acionados pelas quimiocinas, como IL-8. A forte adesão possibilita a diapedese dos neutrófilos para o sítio da infecção. Nesta etapa, além das interações de LFA-1 e Mac-1 com a ICAM-1, também estão envolvidas as moléculas de superfície celular CD31, expressas tanto nos neutrófilos como nas junções intercelulares das células endoteliais.

Fonte: BEZERRA, 2005.

O processo de migração dos leucócitos está intimamente relacionado com o desenvolvimento do processo inflamatório. Entre os leucócitos os primeiros a chegarem ao sítio de inflamação são os neutrófilos, também conhecidos como polimorfonucleares. O processo de adesão e migração dos neutrófilos está entrelaçado com o seu mecanismo de ativação. Os neutrófilos ativados possuem uma variedade de enzimas que embora sejam essenciais para inativar os microrganismos, podem também causar injúria tecidual no órgão onde está ocorrendo a agressão.

2. NOCICEPÇÃO

No decorrer do processo inflamatório um dos sintomas que mais incomodam é o início da sensação dolorosa, sendo responsabilidade do sistema sensorial, que tem a função de informar o cérebro sobre o estado do meio externo e interno do organismo. Neste contexto a dor é uma percepção, e tal qual, é uma das respostas do sistema de maior envolvimento nos animais, o sistema nervoso (BARS, 2001)

No início do século XX, Sherrington em 1910, introduziu o termo “**nocicepção**”, palavra derivada do latim *nocere* que significa “danificar” e “prejudicar”. O sistema nociceptivo é um componente totalmente ajustável de controle da homeostasia. Por tanto, a dor constitui um alarme que tem o papel fundamental de proteger o organismo, bem como, de aprender a evitar comportamentos potencialmente perigosos (BARS, 2001).

Neste contexto parece apropriado lembrar a opinião de Dennis e Melzack (1983), que a nocicepção/dor tem pelo menos três funções:

- Prevenir o indivíduo da existência de danos teciduais reais.
- Alertar o indivíduo da probabilidade de danos teciduais causados por estímulos potencialmente perigosos.
- Alertar um grupo do perigo

O comportamento resultante da dor pode favorecer a manutenção da homeostase, como a manutenção de tecidos e a regeneração (notavelmente no processo inflamatório). Nos animais, a ausência de comunicação é indubitavelmente um obstáculo para a avaliação da dor. Contudo algumas situações levam a poucas dúvidas sobre a sensação de dor quando o animal responde com estímulos vocais como gritos ou gemidos (BARS, 2001)

Terapias analgésicas para dor aguda e crônica estão normalmente relacionadas com três classes de fármacos: os anti-inflamatórios não esteroidais; os opóides e um grupo de fármacos com funções diversas, conhecidos como coadjuvantes (ex. antidepressivos, anticonvulsivos e analgésicos locais) (SAWYNOK, 2003). Dentro deste contexto, atualmente grandes são os esforços aplicados na tentativa de se descobrir compostos que possam modular o processo inflamatório. Deste modo os polissacarídeos sulfatados vêm se destacando em vários estudos como eficientes compostos inibidores de migração de leucócitos (LINNEMANN, 2000).

3. POLISSACARÍDEOS DE ALGAS

No grupo dos polissacarídeos sulfatados, as fucanas apresentam um grande potencial farmacológico devido a sua grande variabilidade estrutural. O termo fucana foi atribuído a um grupo de polissacarídeos exóticos que podem ser encontrados nas algas marinhas marrons e em equinodermos. Este grupo apresenta como característica principal a presença da α -L-fucose sulfatada (ROCHA, 2002). Nas algas, as fucanas estão presentes nos tecidos intracelulares ou na matriz mucilagenosa

A variabilidade estrutural das fucanas vem sendo demonstrada desde do início do século. KYLIN (1913,1915) iniciou as pesquisas com as algas *Laminaria digitata*, *Fucus vesiculosus* e *Ascophyllum nodosum*, porém só um pouco mais tarde foi demonstrada a presença de grupos sulfatos nos monômeros de fucose (BIRD & HAAS, 1931). Em 1970, LARSEN et al. estudando a alga *Ascophyllum nodosum* obtiveram resultados que indicavam a presença de polissacarídeos com diferentes graus de sulfatação.

Com relação à complexidade estrutural, as fucanas de ouriço do mar são bem simples quando comparadas às fucanas de algas marinhas. Nesses animais, elas têm demonstrado ser formadas apenas por fucose e sulfato, constituindo polímeros lineares (figura 02) agrupados em seqüências repetidas de fucose com um particular padrão de sulfatação (VILELA-SILVA et al., 2002).

Estudos com as fucanas de algas demonstraram que suas estruturas são muito complexas e que variam de espécie para espécie e às vezes em diferentes

partes de mesma planta (FARIAS, 1993; DIETRICH et al., 1995; ALVES, 2000; CHEVOLOT et al., 2001). A grande complexidade na estrutura das fucanas se esta relacionada às muitas possibilidades de ligações entre os diferentes monossacarídeos e às possíveis distribuições dos grupos sulfato.

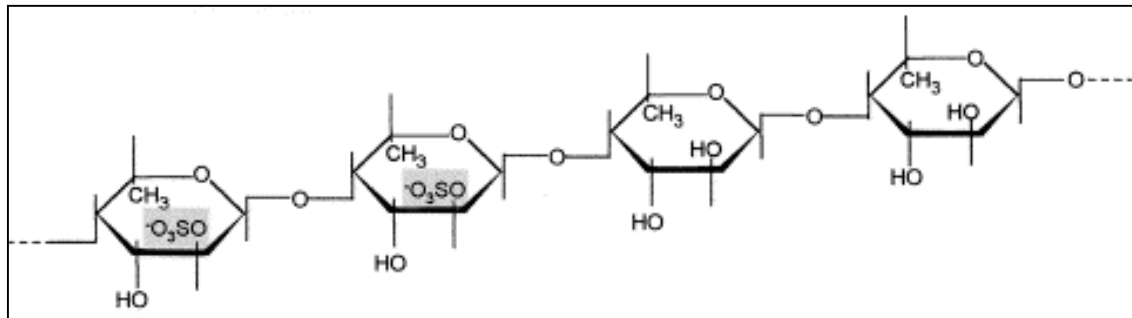


Figura 02: Fucanas de ouriços; Fonte: VILELA-SILVA, 1999.

Os estudos estruturais com as xilofucoglucuronanas (fucanas ricas em ácidos glucurônicos) têm demonstrado que maioria tem em comum a presença de uma estrutura central de ácidos glucurônicos, ao qual se ligam principalmente formadas por 4-D-fucose-xilose e 3-D-xilose-fucose-4-sulfato (KLOAREG & QUATRANO, 1988). Entretanto, devido a heterogeneidade desses compostos, variações em torno dessa estrutura são bastante comuns, como exemplo pode-se citar Abdel-Fattah et al. (1974), mostraram uma fucana de *Sargassum linifolium* constituída por uma estrutura central formada por β -D-glucurônico e β -D-manose e ramificações compostas de galactose-6-sulfato e 3,6-dissulfato, além das fucoses, já da alga *Padina pavonia*, Hussein e col. (1980) extraíram uma fucana que além,

dos resíduos de ácido β -D-glucurônico e β -D-manose em sua estrutura central, apresentava também, resíduos de β -D-glicose.

A presença de xilofucanas em três espécies de algas marrons foi demonstrada por Dietrich et al. (1995). Neste trabalho os autores estudaram algas das ordens Dictyotales: *Padina gymnospora* e *Dictyota mertensis* e da ordem Fucales: *Sargassum vulgare*, evidenciando-se que cada uma das algas apresentava três tipos de fucanas, que se diferenciavam pela sua mobilidade eletroforética em gel de agarose com tampão 1,3 diamino propano acetado e assim denominadas banda A, B e C por ordem crescente de mobilidade eletroforética. Esta classificação também foi utilizada para outras fucanas estudadas pelo nosso grupo (LEITE, 1998; ROCHA,1998; SILVA, 1999). Rocha (2001) verificou que as fucanas não eram compostos formados por bandas mas sim que cada banda era constituída de compostos diferenciados. Deste modo, foram renomeados como fucanas A, B e C.

A fucana A da alga *Spatoglossum schröderi* teve sua estrutura analisada por Leite e col. (1998), por técnicas de metilação, ressonâncias magnética nuclear, infra vermelho e hidrólises ácida e enzimáticas, e a partir dos resultados obtidos foi possível propor a estrutura dessa xilofucoglucuronana (figura 03). Este foi o primeiro trabalho a propor uma estrutura completa para uma xilofucoglucuronana.

com aproximadamente 50% dessas substituídas em C2 por cadeias laterais de α -L-fucose-3-sulfato ou α -L-fucose-3-sulfato (1→4) β -D-xilose-3 (ROCHA, et. al. 2005a).

Os fucoidans, apesar de serem homopolímeros de fucose também se apresentam de difícil determinação estrutural. Contudo algumas características constantes têm sido identificadas com análises feitas a partir de fragmentos obtidos desses polímeros: a presença de 3- e/ou 4-O fucose, assim como a sulfatação desse monossacarídeo nas posições 2 e 4 (BOISSON-VIDAL et al., 1995; PEREIRA et al., 2002; CHEVOLOT et al., 1999; MULLOY et al., 2000; CHEVOLOT et al., 2001).

Atualmente, apesar de todos os esforços empregados em se elucidar a estrutura das fucanas, uma completa descrição de suas estruturas primárias não estão disponíveis. A falta de uma regularidade estrutural mais rigorosa associada as altas massas moleculares apresentadas são as principais dificuldades encontradas para as determinações de todas as características estruturais destes polissacarídeos. Mesmo técnicas modernas de estudos estruturais, como RMN de alto campo e infravermelho estão no limite de suas capacidades (BERTEAU & MULLOY, 2003; ALBUQUERQUE et. al., 2004).

A importância do conhecimento das estruturas desses polissacarídeos algais se faz evidente por conta das possíveis correlações estrutura/atividade que poderão ser feitas a partir dos dados obtidos sobre as mesmas. Isto tornaria mais claro o entendimento das ações farmacológicas apresentadas por esses compostos, bem como a compreensão dos mecanismos de ação nas diversas

patologias, em que essas substâncias venham atuar. Por outro lado, o conhecimento de suas estruturas teria também utilidade, na compreensão dos diversos fenômenos fisiológicos apresentados pelo vegetal e nos estudos taxonômicos, que até no momento estão baseados na morfologia e nos tipos de pigmentos existentes na alga.

Várias atividades biológicas foram atribuídas aos fucoidans, como pode ser visto na tabela I. Cada fucana possui uma conformação estrutural única e portanto podendo possuir atividades farmacológicas diferentes e/ou mais potentes de que outras fucanas ou outros compostos já descritos. Deste modo a caracterização de uma nova fucana vem sempre acompanhada de novas perspectivas de descobertas de um novo fármaco ou de um novo composto a ser utilizado por diversas indústrias, tais como, nas indústrias: química, farmacêutica ou alimentícia.

O interesse sobre a atividade antiinflamatória das fucanas tem crescido desde da década de 90, quando BOISSON-VIDAL (1995) descreveu um modelo experimental. No mesmo ano Angstwurm estudando fucoidan verificou que o mesmo inibiu o influxo de leucócitos para o espaço subaracnóide e fluido cérebro-espinhal no experimento de meningite pneumocócica.

Mais recentemente estudos realizados relatam que o tratamento com fucoidan inibiu a liberação de IL1 e diminuiu a produção de TNF α no fluido cérebro espinhal de coelhos infectados com *Streptococcus pneumoniae* (OSTERGAARD et al., 2000).

Tabela I

Atividades Farmacológicas Atribuídas as Fucanas	
Atividade	Alga
Angiogênico	<i>Fucus vesiculosus</i>
Anti complemento	<i>Laminaria cichorioides</i> , <i>L. japonica</i> , <i>Fucus evanescens</i> , <i>Ascophyllum nodosum</i>
Anti migratória	<i>Fucus vesiculosus</i> , <i>Ascophyllum nodosum</i>
Antiadesiva	<i>Ascophyllum nodosum</i> , <i>Laminaria brasiliensis</i> , <i>Spatoglossum schröderi</i> , <i>Sargassum stenophyllum</i>
Anticoagulante	<i>Ascophyllum nodosum</i> , <i>Ecklonia kurome</i> , <i>Eisenia bicyclis</i>
Antioxidante	<i>Fucus vesiculosus</i>
Antiproliferativa	<i>Ascophyllum nodosum</i> , <i>Turbinaria ornata</i>
Antitrombótico	<i>Ascophyllum nodosum</i>
Antitumoral	<i>Ascophyllum nodosum</i> , <i>Sargassum thumbergii</i> , <i>Eisenia bicyclis</i>
Anti-úlceras	<i>Cladosiphon okamuranus</i>
Antiviral	<i>Sargassum horneri</i> , <i>Fucus vesiculosus</i>
Antimetastático	<i>Fucus vesiculosus</i>
Bloqueio de ligação célula-célula via selectina	<i>Fucus vesiculosus</i>
Bloqueio de ligação de <i>Helicobacter pylori</i> a células da parede gástrica	<i>Cladosiphon okamuranus</i> , <i>Fucus vesiculosus</i>
Bloqueio de ligação espermatozoide-epitélio do oviducto	<i>Fucus vesiculosus</i>
Estímulo da liberação de TNF- α de monócitos	<i>Fucus vesiculosus</i>
Estímulo de síntese de heparan antitrombótico por células endoteliais	<i>Spatoglossum schröderi</i>
Fibrinolítica	<i>Ecklonia kurome</i> , <i>Fucus vesiculosus</i>
Impedir a rolagem de leucócitos	<i>Fucus vesiculosus</i>
Modificação da síntese de FN e trombodina	<i>Fucus vesiculosus</i>

Tabela Modificada de Rocha., 2002

Atualmente os estudos indicam que as atividades biológicas destes polímeros estão relacionadas com as interações entre carboidratos/proteínas e que estas interações são fatores determinantes para a função biológica e fisiológica destes compostos (WILLIAMS, 2001).

Mesmo com todo o esforço realizado pela comunidade científica mundial faz-se necessários mais estudos para descoberta de novos compostos que possam vim a ser utilizados como novos fármacos.

Objetivos

Visto a relevância de estudos que venham descobrir novos compostos que possam ser utilizados na indústria farmacêutica como princípio ativo de fármacos.

O presente trabalho teve os seguintes objetivos:

- 1- Extrair e purificar a fucana C da alga marinha *Dictyota menstrualis*.
- 2- Verificar a atuação da fucana C purificada no processo de migração de leucócitos, para cavidade abdominal, em condições de peritonite química e a sua influência na modulação da sensação dolorosa.

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. Alga Marinha

A alga marinha marrom *Dictyota menstrualis* (figura 04), objeto deste estudo foi coletada na praia de Búzios, município de Parnamirin/RN. A coleta foi realizada em períodos de mares baixas (0,0 - 0,2 m).

As algas foram trazidas ao laboratório, acondicionadas em sacos plásticos, sendo lavadas em água doce corrente e limpas cuidadosamente para que ficassem livres de epífitas, inclusões calcárias e sais. Posteriormente as algas foram secas em estufa aerada a 45^oC e a seguir foram trituradas, pesada e guardada em frascos de vidros devidamente fechados até o início da extração.

CLASSIFICAÇÃO



DIVISÃO: Phaeophyta

CLASSE: Phaeophyceae

COORTE: Isogeneratae

ORDEM: Dictyotale

GÊNERO: Dictyota

ESPÉCIE: *Dictyota menstrualis*

Figura 04: *Dictyota menstrualis*

1.2. Animais

Os animais utilizados foram gentilmente cedidos pela professora Dr^a Janeusa Souto do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFRN, sendo os mesmos obtidos no biotério da Universidade Potiguar (UNP) campus Salgado Filho (figura 05). Os camundongos pesavam entre 20 – 25 g.



Figura 05: Camundongo Swiss

2. OUTROS MATERIAIS

- Ácido acético, acetona, metanol, etanol, n-butanol, cloreto de sódio, tiosulfato de sódio da Reagen Quimibrás Indústrias Químicas S.A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).
- Resina de troca iônica Lewatite da Bayer, gentilmente cedida por Açúcar Guarani S/A (Olimpia, São Paulo, lote AD001, safra 95/96).
- Sephadex G-50 e G-75 da Pharmacia (Upsalla, Suécia).
- ρ -nitrofenil- β -D-glucuronopiranosídeo, ρ -nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo, ρ -nitrofenil- β -D-xilopiranosídeo, ρ -nitrofenil- α -L-fucopiranosídeo da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA).

- Ácido 5,5'-dietilbarbitúrico (barbital), ácido sulfúrico, ácido clorídrico, floroglucinol da Merck (Darmstadt, Alemanha).
- Acrilamida da BHD Chemicals Ltd. (Poole, Inglaterra).
- Agarose (Standart Low-Mr) da BioRad Laboratories (Richmond, CA, EUA)
- Azul de toluidina, vermelho de cresol, carbazol, Tris (hidroximetilamino metano), coomasie brilliant blue R 250, bisacrilamida, EDTA (etilenodiamino tetracetato), N,N,N',N'-tetra-metileno diamino (TEMED), oriundos da Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA.
- Maxatase (protease alcalina P 126) da BIOCON do Brasil industrial Ltda. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- 1,3-diaminopropano, antrona, carbazol, brometo de cetiltrimetilamônio (CETAVLON), ácido isobutírico, piridina, N-N-metil bisacrilamida, e tolueno da Aldrich Chemical Co. Inc. (Millwaukee, WI, EUA).
- Papéis Whatman n.º 3 foi obtido da W & R Balston Ltd. (Maidstone, Inglaterra).

Todos os demais reagentes e materiais empregados foram da melhor qualidade disponível.

3. APARELHOS

Além dos aparelhos usuais de laboratório podemos destacar:

- Agitador orbital mod. 255-B da FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).
- Banhos e estufas de temperatura constante da FANEM Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).
- Bombas peristálticas Microperpex S mod. 2232 da LKB (Bromma, Suécia) e Econo Pump mod. EP-1 da Bio Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA).
- Câmara para eletroforese em gel de agarose, modelo desenvolvido por Jaques e col. (1968) (Técnica Permatron Ltda., São Paulo, SP, Brasil).
- Centrífuga refrigerada CR 21 da Hitachi Koki Co. Ltd. (Tóquio, Japão).
- Espectrômetro de infravermelho modelo FT1 6PC da Perkin Elmer (EUA)
- Fontes de corrente contínua regulável desenvolvidas pelo Dr. H. Rzeppa, Técnica Permatron Ltda. (São Paulo, SP, Brasil).
- Coletores de frações Redirac mod. 2112 da LKB (Bromma, Suécia) e mod. 2128 da Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA);
- Densitômetro Quick Scan Flur Vis, Helena Laboratories (Beaumont, TX, EUA) e densitômetro CS-9000 da Shimadzu Corporation (Quioto, Japão).
- Medidor de pH Orion Research, modelo 701 A/digital Ionalyzer (Cambridge, MA, EUA).

Método

I – EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO

1. EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS ÁCIDOS DA ALGA *Dictyota menstrualis*

1.1. Obtenção do Pó cetônico

A alga seca e pulverizada (100 g) foi tratada quatro vezes, com dois volumes de acetona, durante 12 horas para despigmentação e delipidação do material.

A acetona foi decantada e o resíduo colocado para secar a temperatura ambiente (30°C), após nova aferição do seu peso seco (95,3g), o material, que se convencionou chamar de “pó cetônico” foi, então, armazenado em garrafas de polietileno até o momento da extração.

1.2. Proteólise

Ao pó cetônico foram adicionados dois volumes de NaCl 0,25M e o pH ajustado para 8,0 com NaOH. A este material foi adicionada a enzima proteolítica Maxatase (15 mg por grama de pó cetônico) e esta suspensão permaneceu a 60°C, sob agitação constante, durante 24 h. A suspensão foi em seguida centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos. O sobrenadante, denominado de “cru de

polissacarídeos”, foi medido e estocado a 4°C. Este material foi submetido a um processo de fracionamento com concentrações crescentes de acetona que separou os polissacarídeos de acordo com a solubilidade em meio apolar.

1.3. Fracionamento com acetona.

O “cru de polissacarídeos” obtido após proteólise foi fracionado com volumes crescentes de acetona como proposto por Rocha (1998). Inicialmente foram adicionados, sob agitação leve, um volume de acetona correspondente a 50% do volume inicial do cru de polissacarídeos, mantendo-se essa solução em repouso a 4°C durante 18h. O precipitado foi coletado por centrifugação a 10.000 x g por 10 min e seco a pressão reduzida. Ao sobrenadante foi adicionado um volume de acetona necessário para uma concentração final de 100% de acetona com relação ao volume inicial do cru de polissacarídeos, sendo mantido a 4°C durante 18h. Esse procedimento foi repetido usando-se volumes de acetona necessários para que a solução ficasse nas concentrações finais de acetona de 150, 200, e 300%, com relação ao volume inicial de acetona, dando origem, respectivamente, as frações de acetona F0,5v; F1,0v; F1,5v; F2,0v e F3,0v; que correspondem, às frações precipitadas com 50, 100, 150, 200 e 300% de acetona (figura 06).

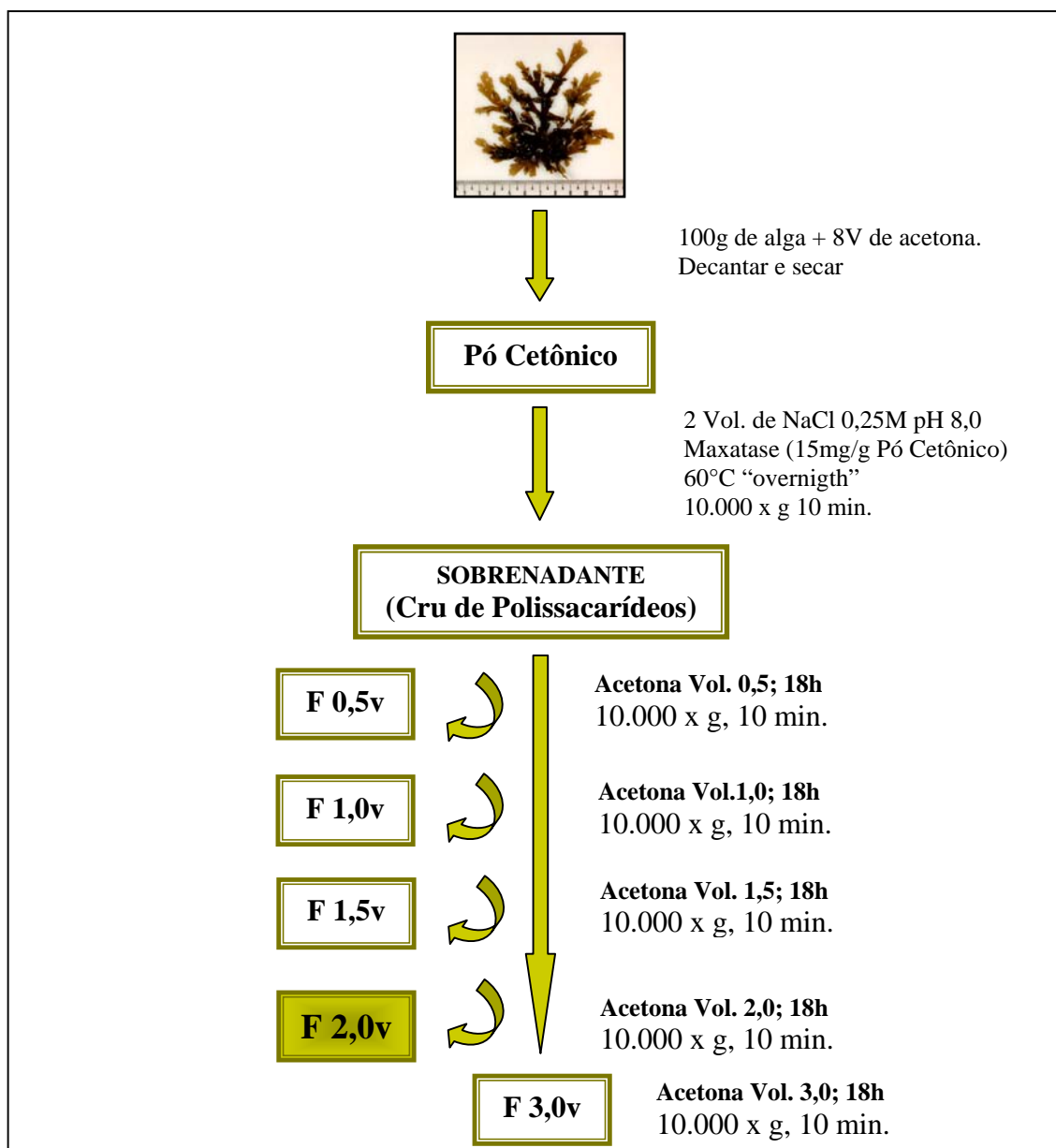


Figura 06: Esquema de extração dos polissacarídeos por precipitação com acetona.

A alga, depois de coletada foi limpa, seca, triturada. Esse material foi submetido a uma delipidação para retirar os contaminantes lipídicos e posteriormente foi realizada uma extração enzimática para liberar os compostos solúveis em água, obtendo-se o cru de polissacarídeos, que foi fracionado com acetona.

II - PURIFICAÇÃO

1. CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE TROCA IÔNICA

A fração F2,0v contendo a fucana C (Fuc C) foi submetida à fracionamento, por complexação com resina de troca iônica Lewatite (2,5 g do material para 200ml de resina) e eluição com concentrações crescentes de sal, essencialmente como descrito por DIETRICH et al. (1995).

A eluição do material complexado foi realizada por “step wise” utilizando-se molaridades crescentes de NaCl. Foram coletadas frações, com volume total de três vezes o volume da resina para cada molaridade de sal (0,25 - 0,5 - 0,7 - 1,0 - 1,5 - 2,0 - 3,0M), nas quais foi determinado pela ausência de positividade para o método de fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). O fluxo de coleta foi de 1ml /min.

2. CROMATOGRAFIA EM GEL FILTRAÇÃO (Sephadex G75)

Foram aplicados 250 mg da fração F2,0v em coluna de gel filtração Sephadex G-75 (101,9 x 1,94 cm) que fraciona polissacarídeos com massa molecular compreendida entre 1.000 e 50.000 Da. A coluna foi eluída com solução de ácido acético 0,2 M e NaCl 0,25 M, coletando-se frações de 3 mL com um fluxo de 30mL/hora à temperatura ambiente. O perfil de eluição foi monitorado pelas dosagens de açúcares totais (DUBOIS et al., 1956) e fucose (DISCHE et al., 1962a)

III - CARACTERIZAÇÃO

1. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A eletroforese em gel de agarose foi iniciada pelo preparo das lâminas de vidro (7,5 x 5,0 x 0,2cm e 7,5 x 7,5 x 0,2cm) que foram devidamente limpas. Posteriormente, a agarose (0,6%) dissolvido no tampão de escolha, foi acomodado sob as lâminas de vidro, formando assim uma camada de gel sob cada lâmina. Alíquotas de 5 µl (50µg) da amostra foram aplicadas em canaletas no gel e submetidas à eletroforese, em caixa resfriada a 4°C. A origem corresponde ao pólo negativo.

As eletroforeses foram realizadas nos seguintes tampões:

- ✓ 1,3 diamino propano acetato (PDA), pH 9,0 (DIETRICH & DIETRICH,1976).
- ✓ Tris - acetato, pH 8,6
- ✓ Acetato de Bário, pH 5,8

Nestas eletroforeses foram usados como referência de mobilidade os padrões de glicosaminoglicanos sulfatados e amostras de fucana A, fucana B e fucana C da alga marinha marrom *Spatoglossum schröderi*. Decorrido o tempo previsto para a migração eletroforética em cada sistema de tampão, os compostos foram precipitados com solução de CETAVLON 0,1%, por um tempo mínimo de duas horas, à temperatura ambiente.

Em seguida o gel foi seco sob uma corrente de ar quente e corado com azul de toluidina 0,1%, numa solução de ácido acético 1% e etanol 50%, sendo o excesso de corante removido por uma solução de ácido acético 1% em etanol 50% (solução descorante). A operação foi repetida até a descoloração completa do fundo da lâmina. A seguir o gel foi seco à temperatura ambiente.

2. CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL

As frações de polissacarídeos obtidas da alga marinha *Dictyota menstrualis*, foram hidrolisadas (HCl 3N, 2h, 100°C), e com o produto de sua hidrólise foi realizada a cromatografia em papel Whatman N°1 nos sistemas de solvente:

- ✓ Butanol: Piridina: Água (2:3:1,5) v/v
- ✓ Ácido Isobutírico : 1,25N Hidróxido de Amônio (5:3) v/v
- ✓ Acetato de Etila: Isopropanol: Água (5:2:1) v/v
- ✓ Acetato de Etila: n-Butanol: Piridina: Ác. Butírico: Água (10:5:10:1:5) v/v

3. ANÁLISES QUÍMICAS

Em cada análise química as frações e o padrão sofram submetidos às mesmas condições experimentais, sendo realizado uma curva em cada análise (com os seus respectivos padrões), para efeito quantitativo.

3.1. Ácidos Urônicos

O conteúdo de ácido urônico foi determinado pela reação do carbazol, segundo DISCHE (1974), utilizando-se como padrão ácido D-glucurônico sendo as leituras realizadas a 525 nm.

3.2. Fucose

Os teores de fucose foram determinados de acordo com o método de DISCHE (1962a) para 6-desoxi-oses, usando-se como padrão L-fucose. O período de aquecimento foi de 10 minutos e as leituras foram realizadas após 30 minutos à temperatura ambiente.

Para eliminar a interferência de ácidos urônicos e pentoses, foram realizadas leituras dicromáticas a 400 e 430 nm. Sendo a concentração de fucose uma função linear de $D.O.400nm - D.O.430nm$.

3.3. Xilose

Os teores de xilose foram determinados por reação colorimétrica específica para aldo-pentoses propostas por DISCHE (1962b), usando-se como padrão D-xilose.

Foi utilizado o método do floroglucinol/ácido acético/HCl. Somente aldo pentoses desenvolvem a cor púrpura, porém ácidos urônicos e hexoses podem

contribuir para a absorção a 552 nm. Esta interferência foi eliminada por leituras dicromáticas a 552 e 510 nm.

3.4. Açúcares Totais

Açúcares totais foram determinados pelo método do fenol/ácido sulfúrico de acordo com DUBOIS e col. (1956), empregando-se como padrão L-fucose, sendo as leituras realizadas a 490 nm.

3.5. Sulfato

O sulfato total foi medido após hidrólise ácida (HCl 8N, 6 horas, 100°C) e foi quantificado por turbidimetria pelo método da gelatina-bário (DODGSON & PRICE, 1962). Sulfato de sódio (1,0 mg/ml) foi empregado como padrão.

3.6. Proteína

Foi determinada com o reagente Comassie Blue R segundo o método de SPECTOR (1978), sendo a leitura realizada à 595nm.

IV – ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

1. ENSAIO DE INIBIÇÃO DE MIGRAÇÃO

Para a realização do ensaio de migração, os animais (n=05) foram separados da colônia no dia anterior. Após 12 horas de jejum, os animais foram tratados profilaticamente com a fucana teste (Fucana C), administrada intravenosamente (i.v.) 30 minutos antes da indução do estímulo de migração. De acordo com a tabela II. Esta foi realizada com aplicação de Peptona 10% (01 mL) por via intra peritonial (i.p.) como descrito por XIE et al. (2000). Decorrido o tempo de migração (6 h), os animais foram mortos em câmara de gás contendo éter etílico saturado. De cada animal foi realizada uma lavagem peritonial para a coleta das células da cavidade. As células foram então centrifugada a 1000 rpm por 10 min. e ressuspensas em 01 mL de solução salina (NaCl 0,85% p/v), sendo posteriormente contadas em câmara de Newbawer.

Tabela II
Definição de Grupos Peritonite

Grupos	i.v	i.p
Controle Positivo	Salina 0,9%	Peptona
Controle Negativo	Salina 0,9%	Salina 0,9%
Teste 01	FS 0,25 mg/kg	Peptona
Teste 02	FS 0,5 mg/kg	Peptona
Teste 03	FS 1,0 mg/kg	Peptona
Teste 04	FS 2,0 mg/kg	Peptona
Teste 05	FS 4,0 mg/kg	Peptona
Teste 06	FS 20,0 mg/kg	Peptona
Teste 07	FS 40,0 mg/kg	Peptona

2. ENSAIO DA CONTRAÇÃO ABDOMINAL

O modelo de contorção abdominal foi realizado de acordo como descrito por COLLIER et al. (1968). Este método foi usado propiciar a observação do efeito analgésico periférico da substância teste. Os animais foram separados da colônia, para um período de 12 h de jejum, antes do experimento, apenas com água livre. Posteriormente os animais foram separados em grupos (n=05). Os animais foram tratados profilaticamente 30 minutos antes da indução dolorosa por ácido acético 0,6%, (i.p.) com a fucana teste nas concentrações de 0,25; 0,5; 1; 2; 4 e 20 mg/kg de animal (i.v.) (ver apêndice I). A quantificação dolorosa foi realizada por contagem cumulativa do número de contrações abdominais (ver apêndice I) ocorrido no período de 30 minutos logo após a indução do estímulo por ácido acético 0,6% (RIBEIRO et al., 2000). O grupo controle recebeu apenas solução salina 0,9% i.v..

3. ENSAIO DA PLACA QUENTE

O modelo de placa quente foi realizado segundo EDDY and LEIMBACH (1953). O teste foi realizado em placa quente ($51,5 \pm 1^{\circ}\text{C}$). Os animais passaram por uma triagem 30 min. antes do início do experimento, aqueles que responderam em um tempo inferior a 10 seg. foram descartados. Decorrido o intervalo de 30 min. os animais foram tratados com a fucana teste (Fucana C) nas concentrações de 01 e 20 mg/kd de animal e imediatamente recolocado na placa

quente para a verificação de resposta no tempo zero, sendo então observado o tempo de reação nos intervalos de 30, 60 e 90 min. a partir do início do experimento. Para evitar injúria tecidual o tempo máximo de exposição à placa foi de 40 seg. (RIBEIRO et al., 2000). O teste foi realizado com grupos de 05 animais que foram tratados com a fucana teste nas concentrações de 01 e 20 mg/kg de animal, sendo utilizado morfina 5 mg/kg de animal e solução salina 0,9% para controles positivo e negativo respectivamente.

Resultados

1. EXTRAÇÃO E RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DA ALGA MARINHA

Dictyota menstrualis.

Para separação dos polissacarídeos extraídos foi aplicado a precipitação com volumes crescentes de acetona PA de acordo com Rocha (1998), sendo a mesma acompanhada pelo surgimento de uma turvação, atribuída a presença de polissacarídeos encontrados nas frações. Depois de secas à pressão reduzida, as frações obtidas, serviram como ponto de partida para as diversas análises realizadas. O rendimento das frações foi calculado através da media aritmética dos valores obtidos das cinco extrações realizadas. A figura 07 mostra que não houve uma concentração do material precipitado em uma ou duas frações. Contudo, vale a pena salientar que as frações F1,0v e F3,0v foram as que apresentaram respectivamente, maior e menor rendimentos.

A fração F0,5v apesar de ter rendimento compatível com as frações F1,5v e F2,0v apresentava-se contaminada por ácidos alginicos, como visto posteriormente na eletroforese tampão PDA.

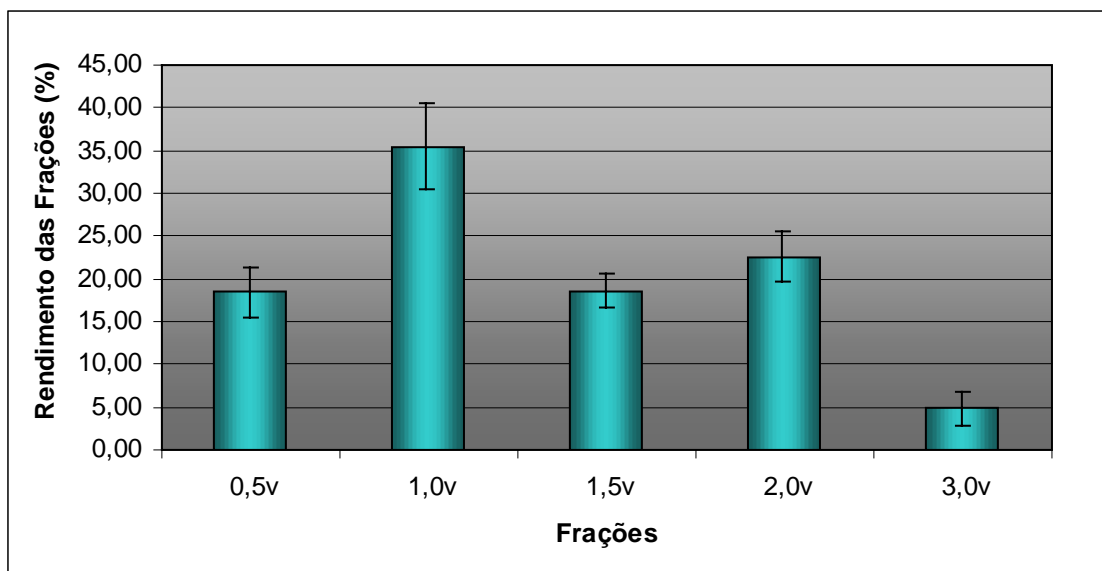


Figura 07: Rendimento das frações de polissacarídeos obtidas através do fracionamento com acetona.

A barra representa a média aritmética \pm desvio padrão.

2. CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS FRAÇÕES CETÔNICAS

2.1. Eletroforese em gel de agarose

Uma caracterização preliminar dos polissacarídeos foi feita por eletroforese. Todas as frações foram submetidas a eletroforeses em gel de agarose em 03 sistemas de tampões (figura 08). A realização da eletroforese, em diferentes tipos de tampões, possibilitou a separação dos componentes das frações por características distintas, tais como: quantidades e distribuição de cargas e

interação com o tampão, deste modo tem-se um conhecimento prévio da homogeneidade estrutural das frações. Foram utilizados neste trabalho o tampão 1,3-diamino propano (PDA), tris-acetado e acetato de bário.

O perfil eletroforético dos polissacarídeos sulfatados das frações nos três sistemas de tampões indica que esses compostos possuem na sua composição mais de um tipo de fucanas. Observando-se lâmina feita em PDA, verifica-se que a fração F0,5v é constituída predominantemente por fucanas A; a fração F1,0v é constituída por um conjunto de populações de fucanas A e B; a fração 1,5 é constituída por um conjunto de fucanas B e C e as frações F2,0v e F3,0v são constituídas por populações de fucanas C.

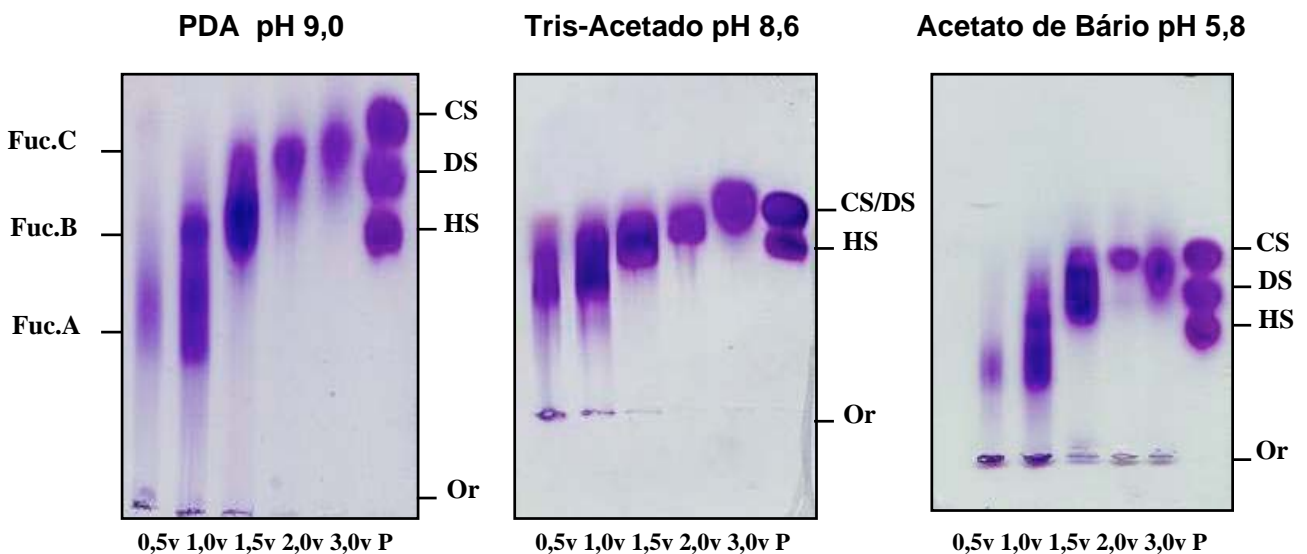


Figura 08: Perfil eletroforético das frações de polissacarídeos.

P – mistura de padrões de glicosaminogliganos: condroitin sulfato (**CS**), dermatam sulfato (**DS**) e heparam sulfato (**HS**), **Or** – origem. **Fuc.A** – Fucana A, **Fuc.B** – Fucana B, **Fuc.C** – Fucana C.

A análise do perfil eletroforético dos três sistemas de tampões permite visualizar que as frações F0,5, F1,0v e F1,5v demonstram polidispersão, o que indica uma maior diversidade estrutural das populações de fucanas presentes em cada fração. Já as frações F2,0v e F3,0v demonstraram um perfil eletroforético mais homogêneo servindo como indicativo de uma maior homogeneidade estrutural das populações de fucanas presentes nestas frações. No sistema acetato de bário a fração F2,0v demonstrou apenas uma banda compacta, já a fração F3,0v demonstrou uma leve polidispersão.

2.2. Cromatografia descendente em papel

As frações de polissacarídeos tiveram seus monossacarídeos constituintes (fucose, xilose, ácidos urônicos, galactose, manose e glicose) identificados por cromatografia descendente em papel em 04 sistemas de solventes (figura 09). A necessidade de se utilizar solventes diferentes, ocorre devido a diferentes solubilidades dos monossacarídeos nos diversos solventes. Sendo que em um mesmo solvente alguns monossacarídeos podem apresentar solubilidades iguais e não se diferenciar entre si. A utilização de solventes diferentes minimiza a ocorrência deste efeito.

O conjunto de cromatos demonstra que todas as frações são ricas em galactose e fucose. As frações iniciais apresentam uma forte presença de ácido glucurônico, sendo a mesma não evidenciada nas frações finais. Os monossacarídeos foram em seguida quantificados por análises químicas.

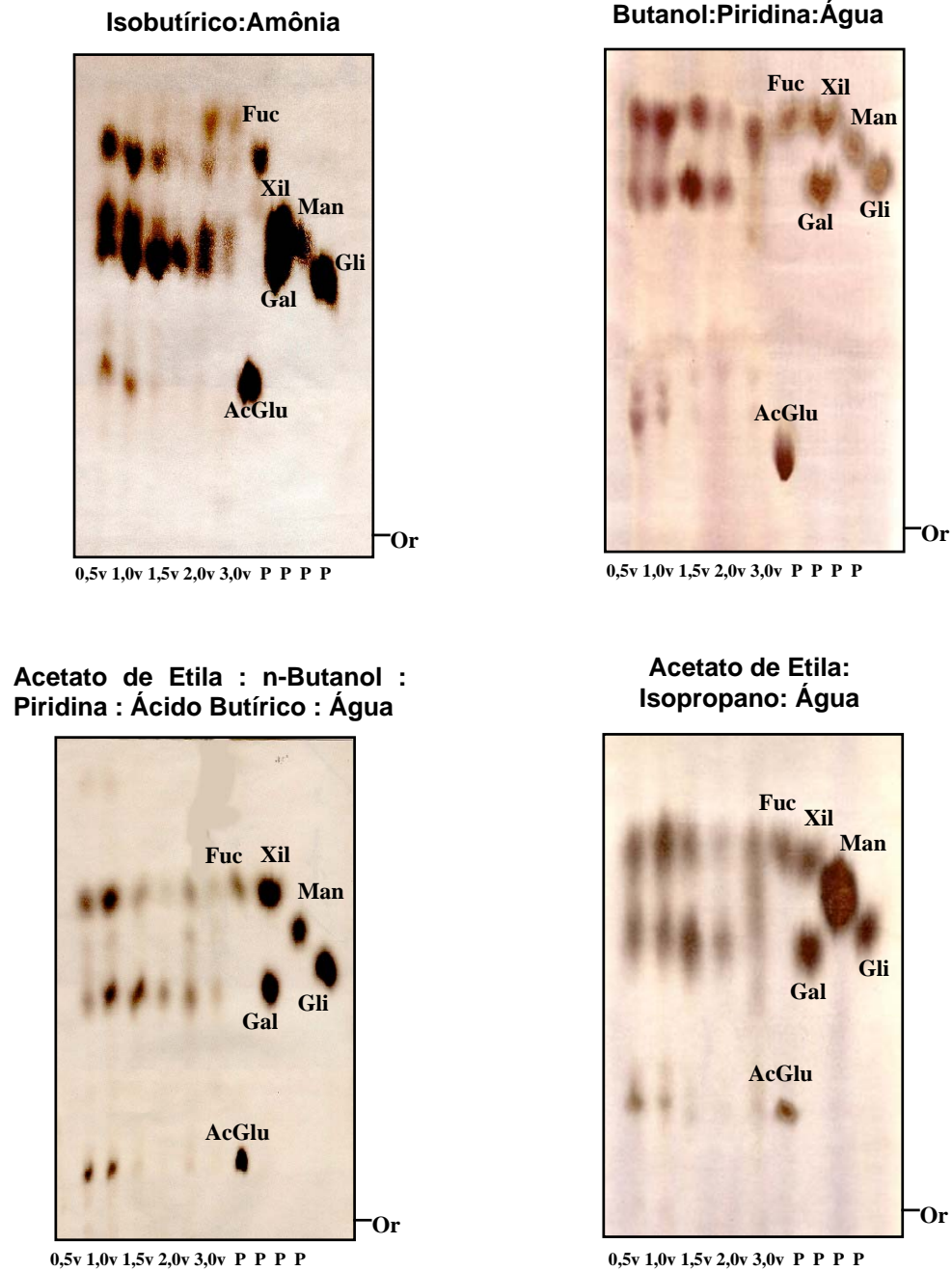


Figura 09: Cromatografia descendente em papel dos hidrolisados ácidos das frações.

Foram aplicados cerca de 50µg de cada fração nas origens correspondentes, e 10µg de padrões. Os compostos foram submetidos à cromatografias diferentes em 04 sistemas de solventes. **Or**-origem, **Gal**-galactose, **Fuc**-fucose, **AcGlu**-ácido glucurônico, **Xil**-xilose, **Gli**-glicose, **Man**-manose.

2.3. Dosagens Químicas

A tabela III resume os dados obtidos com as dosagens químicas. Pode-se observar que todas as frações apresentam uma contaminação por proteínas, que variou entre 0,7 e 3,5%.

Tabela III

Relação molar dos açúcares e sulfato e percentual de proteínas presentes nas frações de polissacarídeos de *Dictyota menstrualis*.

Frações	Açúcares Totais*	Proteína	Relação Molar				
			Fucose	Xilose	Ác. Urônico	Galactose	SO ₃ Na
0,5v	19,0%	3,5%	1	0,4	0,8	0,8	0,04
1,0v	28,7%	2,3%	1	0,8	0,7	0,8	0,4
1,5v	15,7%	2,0%	1	0,3	0,4	1,5	1,3
2,0v	16,2%	2,2%	1	0,7	0,2	1,2	1,1
3,0v	10,9%	0,7%	1	1,1	0,5	1,0	1,2

NOTA:* Calculado com relação ao teor de açúcares totais (DUBOIS e col., 1956)

A confirmação da presença de fucose, em todas as frações, somado a presença de sulfato, corrobora para confirmar que todas as frações são constituídas de fucanas. Os demais monossacarídeos encontrados em todas as frações, porém não apresentaram nenhuma tendência de distribuição o que confirma a diferença estrutural das frações. O conjunto dos resultados da caracterização química indicou a presença de heterofucanas em todas as frações obtidas. A composição monossacarídica das frações demonstra que as frações

F,05v e F1,0 tem maior presença de fucose na composição, já nas frações F1,5V e F 2,0v o monossacarídeos de maior presença na constituição é a galactose. A fração F3,0v apresentou maior uniformidade na concentração dos monossacarídeos.

Com relação ao sulfato percebe-se que ele é encontrado em maior relação molar nas frações precipitadas com maiores volumes de acetona, uma vez que, que a metodologia empregada propicia uma separação entre compostos pouco carregados e os mais carregados, no caso das fucanas diferentes graus de sulfatação.

3. PURIFICAÇÃO DE UMA FUCANA C (Fuc C) DA ALGA *Dictyota menstrualis*

3.1. Cromatografia de Troca Iônica

A fração F2,0v foi submetida a uma cromatografia de troca iônica. O perfil de eluição foi acompanhado por metacromazia em papel impregnado com azul de toluidina (dado não mostrado). O material sulfatado só foi detectado (fucana) na fração 3,0M de NaCl. O perfil eletroforético desse composto pode ser observado na figura 12. Apesar de se ter obtido uma banda com mobilidade correspondente a Fuc C, esse passo de purificação foi descartado, pois o seu rendimento foi muito baixo, o que inviabilizaria a continuação do estudo.

3.2. Cromatografia de Exclusão Molecular

Para a purificação da Fuc C, a Fração F2,0v foi submetida uma cromatografia de exclusão molecular.

O perfil de eluição foi monitorizado pelas dosagens de açúcares totais (DUBOIS et al., 1956) e fucose (DISCHE et al., 1962a) (figura 10). Desta forma obteve-se dois picos sobrepostos que confirmaram a presença de fucana nos tubos 31 a 41. Esse material foi reunido e precipitado com dois volumes de acetona PA, centrifugado e seco a pressão reduzida, passando a ser denominado de Fuc C. Essa foi dissolvida em água destilada numa concentração conhecida e utilizada nos experimentos posteriores.

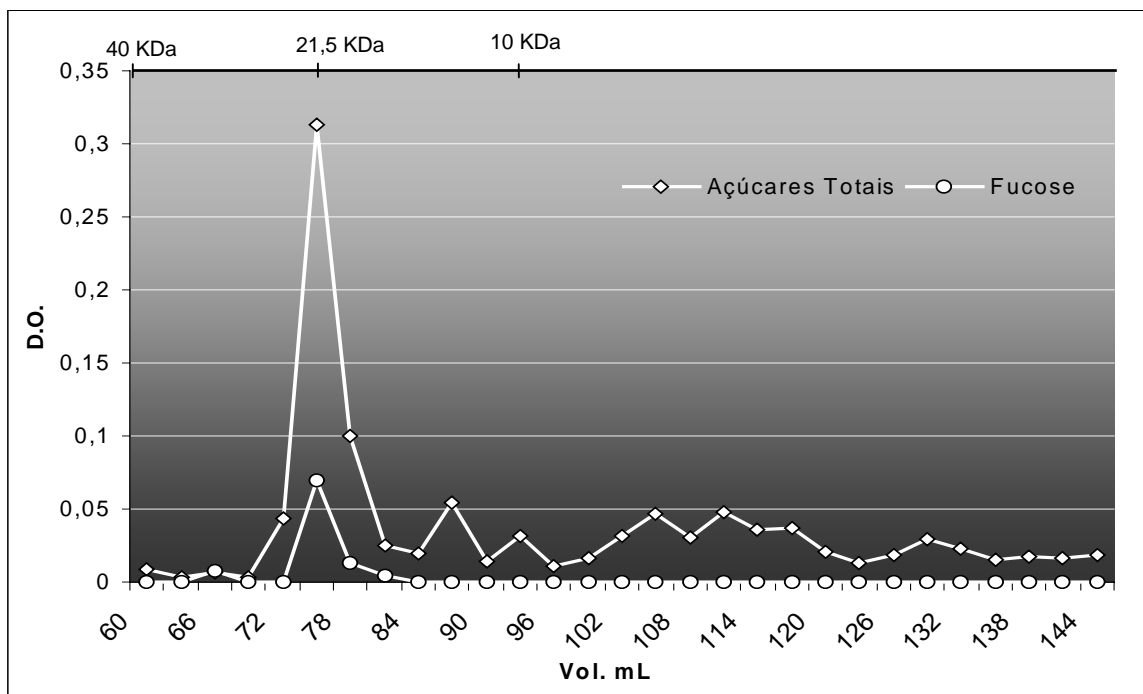


Figura 10: Perfil de eluição da Fucana C na coluna Sephadex G75

De acordo com a calibração realizada na cromatografia de exclusão molecular, a fucana C demonstrou massa molecular aproximado de 21,5 KDa,

A eficiência da purificação da fucana C pode ser observada por dosagens de açúcares totais dos teores de proteína, realizados nas etapas de extração, fracionamento e purificação final. De acordo com os resultados obtidos a fração F2,0v apresentava aproximadamente 14% do total de polissacarídeos extraídos, após o processo de purificação, esta fração foi concentrada aproximadamente 3,5 vezes. Concomitantemente, o teor de proteína caiu de 3,79% no cru de polissacarídeos para 2,2% na fração F2,0v e finalmente para 0,7% para a Fuc C (figura 11).

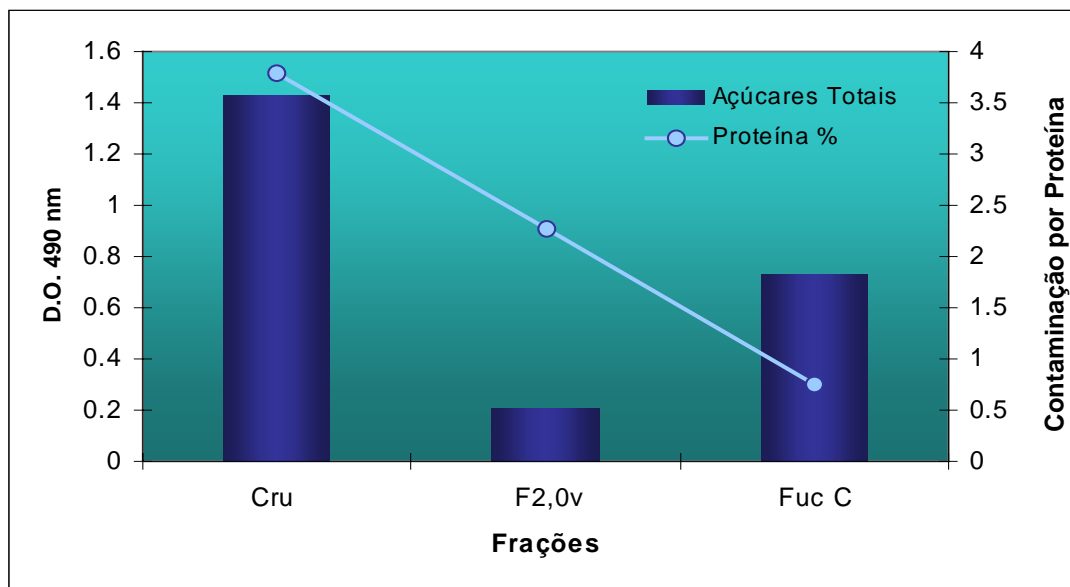


Figura 11: Passos de Purificação da Fucana C

Relação entre o teor de Açúcares Totais verificado pela D.O. obtida pelo método Dubois et. al., (1956) e a contaminação por Proteína segundo Spector (1978). Foram aplicados em cada amostra 15 μ L para dosagem de açúcares totais e 50 μ L em cada amostra para dosagem de proteínas

4. Caracterização da Fucana C

Os perfis eletroforéticos das frações obtidas durante a purificação da Fuc C são mostrados na figura 12. A Fuc C de *Dictyota menstrualis* apresentou a mesma mobilidade que a Fuc C da alga *Spatoglossum schröderi* em gel de agarose, tampão PDA.

Com a finalidade de confirmar se a manipulação e/ou o processo de purificação não teria alterado o comportamento e/ou a composição da fucana C foram realizadas eletroforeses e cromatografias em papel desses compostos. A migração eletroforética da fração Fuc C antes e após a purificação não diferiram (figura 12). A diferença de intensidade metacromática entre a fração F2,0v e a Fuc. C está relacionada com a maior concentração de fucana na última, o que mais um indicativo da purificação da Fuc C após a cromatografia de exclusão molecular.

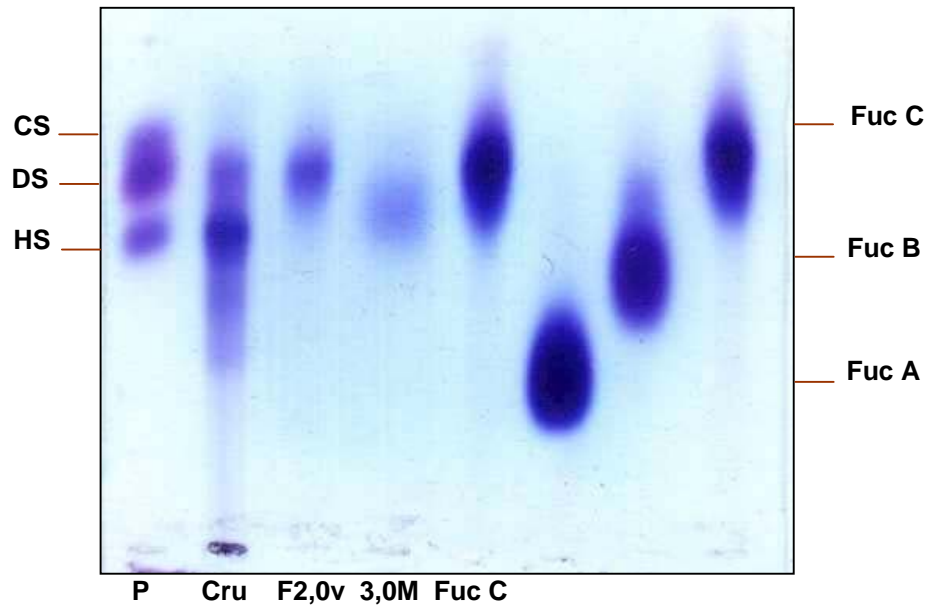


Figura 12: Perfil eletroforético em tampão PDA dos passos de purificação

Foram aplicados 50µg do padrão (**P**); 100µg do Cru de polissacarídeos (**Cru**); 80µg da fração **F2,0v**; 20µg de **Fuc C** e um concentrado da fração **3,0M** (Lewatite). **P** – mistura de padrões de glicosaminogliganos: condroitin sulfato (**CS**), dermatam sulfato (**DS**) e heparan sulfato (**HS**), **Or** – origem. **Fuc A.** – Fucana A, **Fuc B.** – Fucana B, **Fuc C.** – Fucana C, da alga *Spatogossium schoederi*.

A identificação dos monossacarídeos de Fuc C foi realizada por cromatografia descendente em papel (figura 13) e a relação molar dos constituintes é demonstrada na tabela IV. As fração F2,0v e a Fuc C apresentaram composição monossacarídica semelhante.

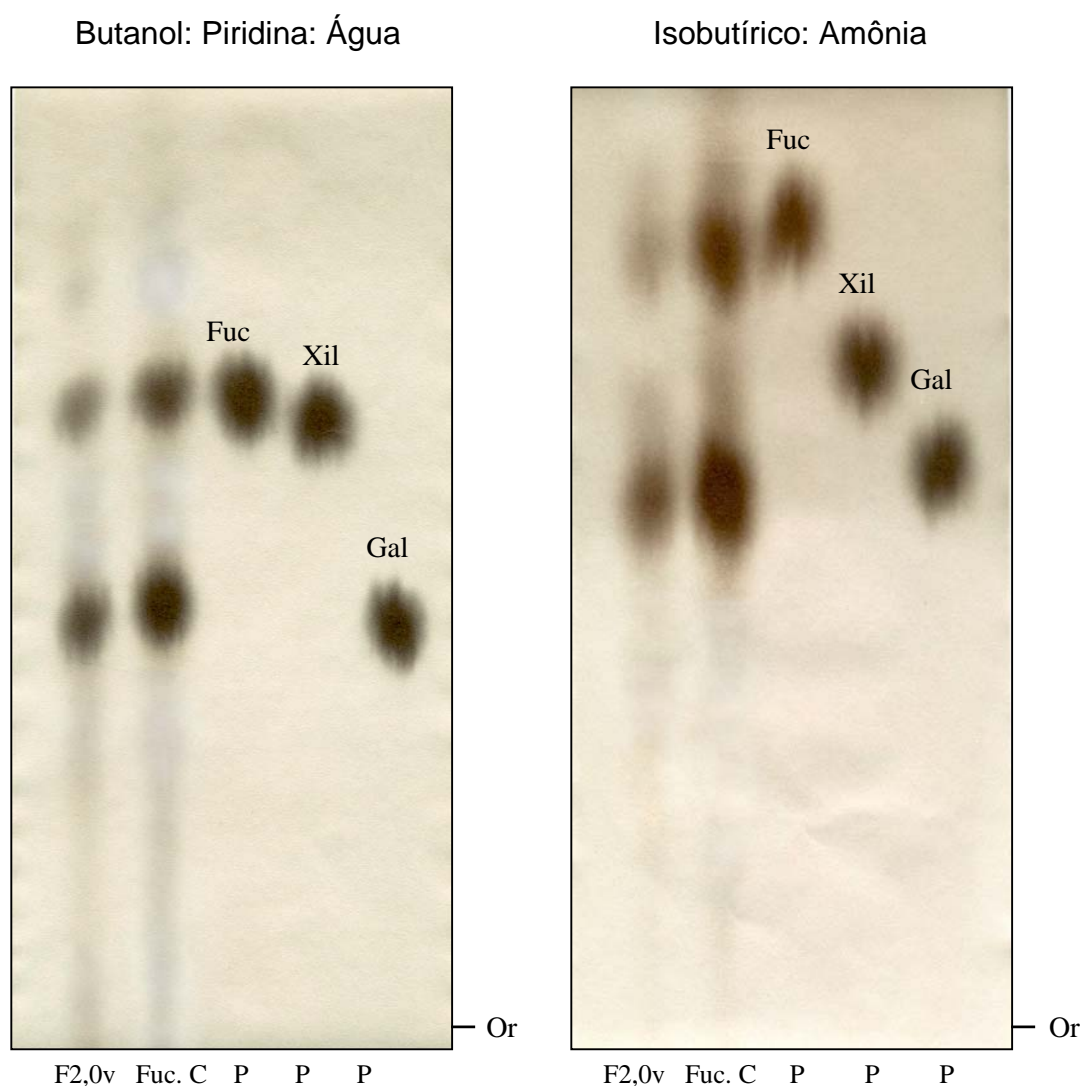


Figura 13: Cromatografia descendente em papel dos hidrolisados ácidos das frações F2,0V e Fuc C.

Foram aplicados cerca de 100 μ g da Fuc. C e 400 μ g da fração F2,0v nas origens correspondentes, juntamente 10 μ g de padrões. **Or**-origem, **Gal**-galactose, **Fuc**-fucose, **Xil**-xilose, **Man**-manose.

Tabela IV

Comparação da composição das frações F2,0v e Fuc C

Frações	Açúcares Totais	Proteína	Relação Molar*				
			Fucose	Xilose	Ác. Urônico	Galactose	SO ₃ Na**
F2,0v	16,2%	2,2%	1	0,2	--	1,2	1.1
Fuc C	56.7%	0,7%	1	0,4	--	1,5	1.3

NOTA: * Calculado por desidrometria das cromatografias em papel

** Calculado por Dodgson & Price, 1962.

O conjunto de resultados apresentado pela eletroforese e pelas cromatográficas em papel evidenciam que o processo de purificação não promoveu alterações na composição e/ou na estrutura da população de polissacarídeos contidos na fração F2,0v. A pequena diferença na composição estrutural das frações F2,0v e Fuc C (Tabela IV) pode ser decorrência da variação intrínseca da metodologia utilizada.

5. ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DA FUCANA C

5.1. Atividade Antiinflamatória

O efeito antiinflamatório foi verificado através do ensaio de inibição da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal. Os animais foram separados em grupos (n = 05 animais).

Neste estudo, os resultados obtidos foram analisados estatisticamente e demonstraram uma distribuição Gaussiana comprovada pelo teste Kolmogorov e Smirnov, e pela análise de variância ANOVA com $F = 164,60$ (ver apêndice II).

Os grupos em análise (controles e testes), foram submetidos ao teste de Tukey-Kramer, para comparações múltiplas, com nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$). O teste de Tukey-Kramer revelou que todos os tratamentos demonstraram diferenças significativas quando comparados com o controle positivo ($p < 0,001$), o que indica que todas as concentrações de Fuc C foram capazes de inibir com eficiência a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal (figura 14). As concentrações de 20 e 40 mg/kg não apresentaram diferenças significativas quando comparadas entre si, indicando que nessas concentrações tem-se um platô de inibição. Também, nessas concentrações foi observado que os valores obtidos não se diferenciavam significativamente daqueles encontrados com o controle negativo (figura 14), evidenciando que a fucana C, nessas concentrações, promoveu uma inibição de 100% da migração de leucócitos induzida pelo agente irritante.

Estes resultados indicam que a heterofucana Fuc C extraída da alga *Dictyota menstrualis* apresenta uma capacidade antiinflamatória considerável. Sendo este composto um forte candidato para indústria farmacêutica como antiinflamatório, contudo faz-se necessário estudo mais detalhado.

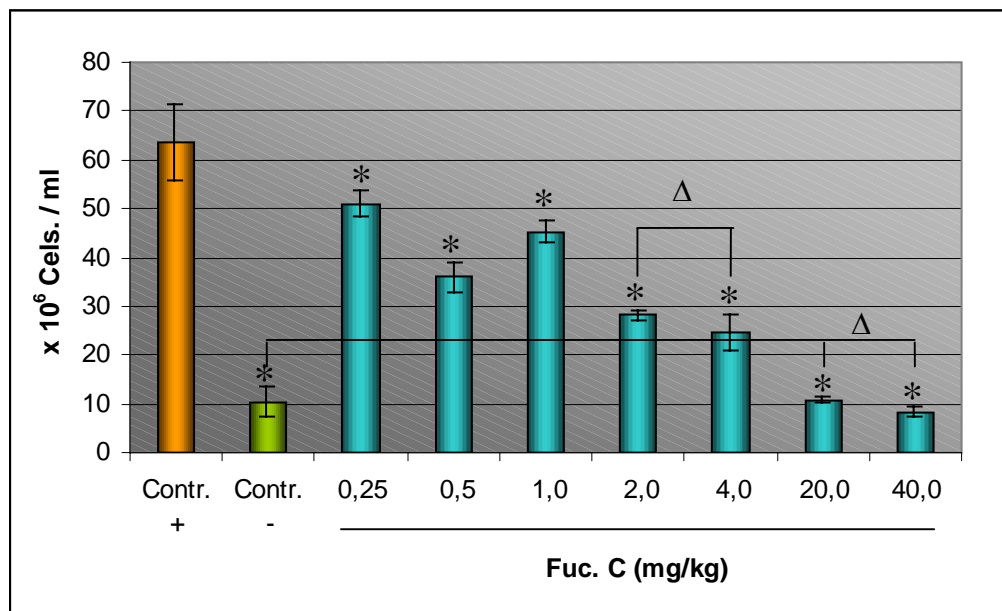


Figura 14: Efeito da fucana C na migração dos leucócitos em camundongos com peritonite induzida por peptona.

O gráfico representa a comparação entre as medias do número de leucócitos por ml de líquido peritoneal, 6 horas após a administração intraperitoneal do indutor de inflamação, exceto para o controle negativo.

* Estatisticamente diferente com $p < 0,001$; Δ Não apresenta diferença estatística.

5.2. Modulação da Sensibilidade Nociceptiva

O estágio inflamatório tem como um dos seus fatores a produção de compostos que estimulam uma sensação dolorosa (KIDD, 2001), visto a existência de uma correlação entre o mecanismo inflamatório e o desenvolvimento de uma sensação dolorosa, buscou-se verificar a influência da heterofucana Fuc C como modulador da dor.

5.2.1. Teste da Contração Abdominal

O efeito analgésico da Fuc C foi testado de acordo com metodologia descrita por COLLIER et al. (1968).

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente e demonstraram uma distribuição Gaussiana comprovada pelo teste Kolmogorov e Smirnov, e pela análise de variância ANOVA com $F = 107,02$ (apêndice II).

Os grupos em análise (controles e testes), foram submetidos ao teste de Tukey-Kramer, para comparações múltiplas, com nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$). O teste de Tukey-Kramer revelou que todos os tratamentos demonstraram diferenças consideravelmente significativas ao se comparar com o controle positivo ($p < 0,001$), o que indica que todas as concentrações da fucana C foram capazes de diminuir com eficiência a sensação dolorosa (figura 15 e Tabela V). O efeito demonstrou-se ser dose dependente. Sendo que nem uma baixa concentração de 4,00 mg/kg de animal a redução da sensação dolorosa foi de 61,8%. As concentrações de 0,5–1,0 e 2,0–4,0 mg/kg não apresentaram diferenças significativas entre si, o que demonstra um platô de atividade entre as concentrações 0,5-1,0 e 2,0-4,0 mg/kg. Contudo houve uma diferença significativa entre os grupos 0,5-1,0 e 2,0-4,0 mg/kg.

O controle negativo (salina i.v. e salina i.p.) não demonstrou contração por isto não foi mostrado.

Tabela V

Efeito da Fucana C no teste de contração Abdominal

Grupo	Dose mg/kg	N ^o Contração Abdominal	Inibição* %
Salina	----	105,2 ± 6,5	0,0
Teste 01	0,25	84,8 ± 7,5	19,4
Teste 02	0,5	70,0 ± 4,0	33,7
Teste 03	1,0	62,2 ± 3,9	40,9
Teste 04	2,0	49,6 ± 4,0	52,8
Teste 05	4,0	40,2 ± 8,6	61,8
Teste 06	20,0	28,2 ± 2,3	71,2

* com relação ao n^o de contração da Salina

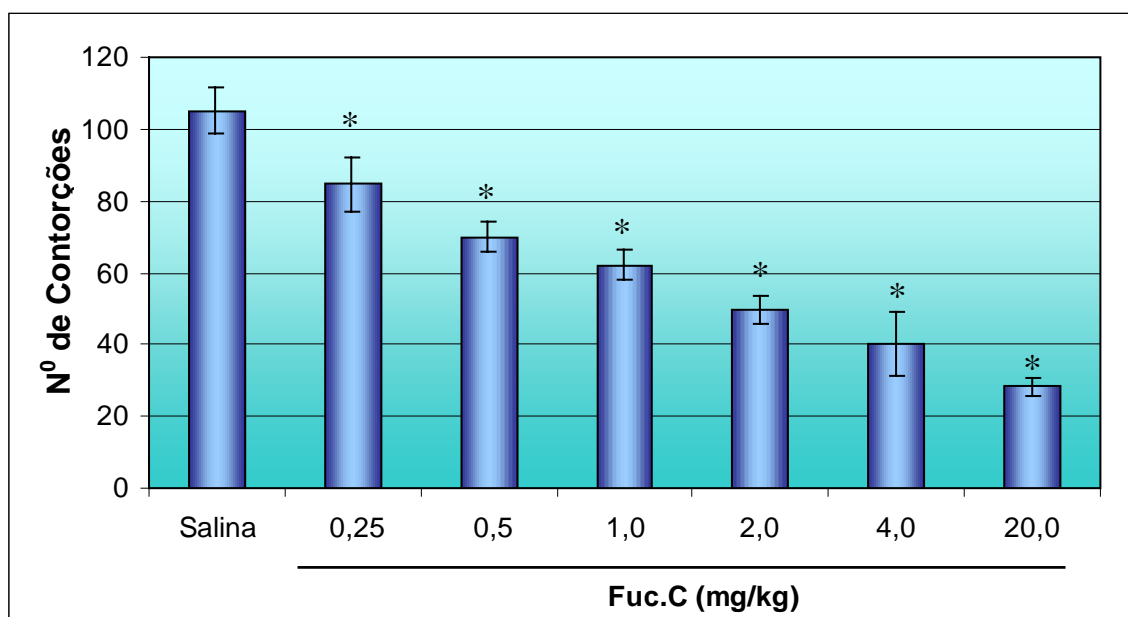


Figura 15: Efeito analgésico da fucana C em camundongos.

O gráfico representa a comparação entre os números contrações durante um período de 30 minutos, após a indução por ácido acético 0,6%.

* Estatisticamente diferentes com $p < 0,001$

5.2.2. Teste da Placa Quente

A atividade anestésica foi mensurada segundo método desenvolvido por EDDY e LEIMBARCH (1953).

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente e demonstraram uma distribuição Gaussiana comprovada pelo teste Kolmogorov e Smirnov (apêndice II).

Os grupos em análise (controles e testes), foram submetidos ao teste de Tukey-Kramer, para comparações múltiplas, com nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$). O teste de Tukey-Kramer revelou que no tempo 0 (zero) minutos todos tiveram $p > 0,05$, sendo considerado deste modo que não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Nos demais tempos de exposição 30, 60 e 90 minutos, o controle negativo (salina) e os grupos testes de Fuc. C (1,0 e 20,0 mg/kg) também não demonstraram diferença significativa entre si, mas todos apresentaram diferenças significativas quando esses são comparados com o controle positivo (morfina) com $p < 0,001$, o que indica que todas as concentrações da fucana C não foram capazes de diminuir a sensação dolorosa neste experimento (figura 16).

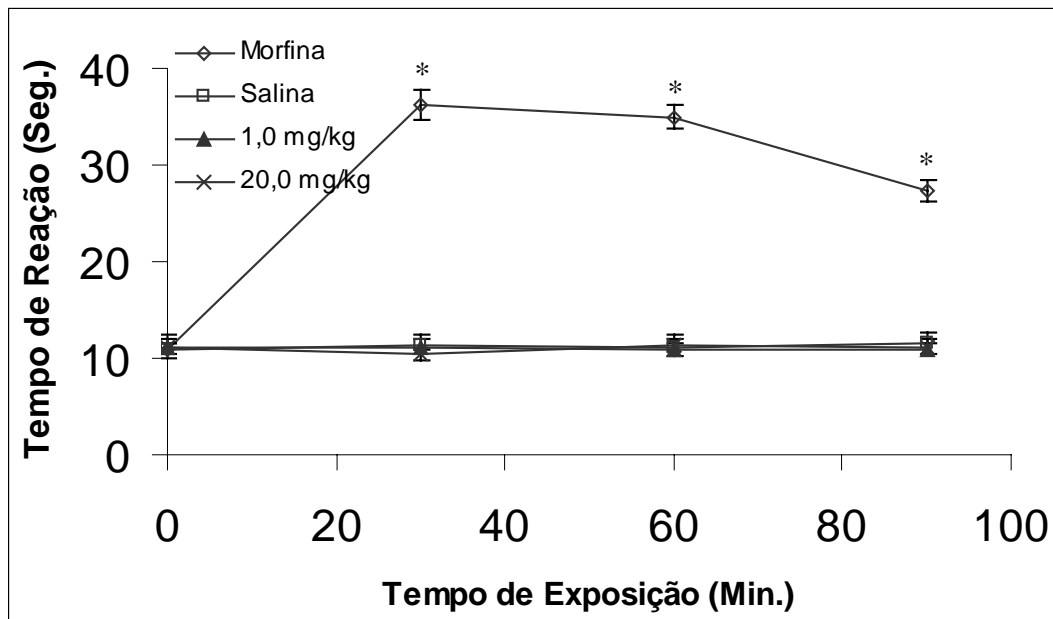


Figura 16: Efeito da fucana C no teste da placa quente em camundongos.

* Estatisticamente diferentes com $P < 0,001$

Discussão

Existe uma grande variedade de metodologias descritas na literatura que são utilizadas nos processos de extração e purificação de fucanas de algas marrons (KLOAREG & GUATRANO, 1988; BOISSON-VIDAL et al. 1995; PEREIRA et al. 1999; BERTEAU e MULLOY, 2003; ANDRADE, et al 2004). Contudo, uma análise crítica dessas metodologias demonstra que elas não se diferenciam muito nas técnicas que são utilizadas, mas se diferenciam principalmente na ordem em que essas técnicas são utilizadas. Por outro lado, não há relatos que demonstrem uma maior eficácia de uma metodologia em detrimento de outra. Esses fatos ocorrem devido principalmente as características estruturais das fucanas que estão sendo purificadas. Como as fucanas são polissacarídeos estruturalmente complexos, elas não apresentam um padrão estrutural definido e que, portanto exigem adaptações das metodologias que se adequem as suas características, para que essas metodologias se tornem mais eficazes.

A metodologia utilizada neste trabalho combina passos de purificação (proteólise, precipitação diferencial com acetona e cromatografias) com eletroforese em gel agarose em tampão PDA. Essa tem principal função servir de ferramenta de monitoramento dos passos de purificação das fucanas. A metodologia utilizada pelo nosso grupo se mostrou bastante eficaz no processo de purificação de fucanas de diversas algas das ordens Dictyotales e Fucales (outras

ordens ainda não foram avaliadas) (ROCHA et al., 2005a; SILVA et al., 2005; QUEIROZ 2003; ALVES, 2000; LEITE et al., 1998; DIETRICH 1995).

Os dados obtidos das frações provenientes do fracionamento com acetona demonstraram que todas elas são constituídas de fucanas, que em eletroforese em gel de agarose apresentam mobilidades distintas. Utilizando essas características como padrão, essas fucanas foram reunidas em três grandes grupos: as fucanas A (menor mobilidade), fucanas B (mobilidade intermediária) e fucanas C (maior mobilidade), da mesma forma que foi proposto por Rocha et al (2001) para as fucanas da alga *Spatoglossum schröderi*.

A confirmação de fucose, em todas as frações, somado à presença de sulfato e de outros monossacarídeos como: xilose, galactose e ácido glucurônico indicam a presença de heterofucanas nas frações cetônicas. A presença destes compostos parece ser comum nas Dictyotales, pois há um número considerável de citações na literatura de algas dessa classe que apresentam heterofucanas na sua composição (QUEIROZ, 2003; ROCHA 2005a, b; BEZERRA, 2003; ALBUQUERQUE, et al. 2004; KLOAREG & QUATRANO, 1988; SILVA, 2005; PERCIVAL, et al. 1984; ABDEL-FATTAH et al., 1978; MIAN and PERCIVAL, 1973; HUSSEIN e col. 1980).

A presença de proteína nas frações pode estar relacionada com a metodologia de extração utilizada, assim como pode ser um fator intrínseco da alga estudada. As frações da alga *Dictyota menstrualis* apresentaram um baixo nível de contaminação de 0,7-3,5% (tabela III) quando comparados com outros autores, como, por exemplo, Hussein e col. (1980) que encontraram em fucanas de *Padina povonia* um elevado teor de proteínas (67%). Já Detrich e col. (1995)

obtiveram para *Padina gymnospora* valores compreendidos entre 1,6-7,5%. Silva e col. 2005 obteve frações com nível de contaminação variando de 0,6 a 5,8. Já as frações A, B e C de *Fucus vesiculosus* apresentaram, respectivamente, 0,24%, 0,16% e 87,4% (CARVALHO, 2001), o que confirma a eficiência da metodologia utilizada na extração. Bons resultados foram observados em estudo anterior, quando Queiroz (2003) demonstrou um baixíssimo nível de contaminação nas suas frações chegando ao máximo de 0,9% de contaminação protéica.

Com relação a presença de sulfato, as frações 1,5v e 2,0v demonstraram os maiores teores. Estes resultados já eram esperados visto, que a metodologia empregada para separação das frações por precipitação com volumes crescentes de acetona aqui utilizada, promove o aumento gradativo da constante dielétrica do sistema, o que faz com que ocorra primeiro a precipitação de compostos neutros e menos carregados.

Apesar de pequena contaminação protéica da fração F2,0v, a mesma foi submetida a métodos de purificação. Inicialmente a população de polissacarídeos passou por uma cromatografia de troca iônica (Lewatite). Contudo, o seu baixíssimo rendimento inviabilizou a continuação da utilização de tal metodologia. Desta forma a purificação da fucana C foi realizada por cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G75). Na literatura há apenas um relato da purificação de uma fucana C, que foi obtida da alga *Spatoglossum schröderi* (ROCHA et al. 2005a), este composto é uma xilogalagtofucana com massa molecular de 24kDa, bastante sulfatado. Apesar dos poucos dados sobre fucanas C de *Dictyotales* os resultados têm levados a crer que as fucanas C são heterofucanas ricas em

xilose, galactose e sulfato. Espera-se que com a purificação e determinação estrutural de outras fucanas C estas características venham a se confirmar.

A grande diversidade estrutural das fucanas tem sido um desafio constante para elucidação de suas estruturas, mas também faz dessa família de polissacarídeos um grupo com elevadas chances de possuir atividades farmacológicas diversas. (BERTEAU e MULLOY, 2003; VILELA-SILVA et al., 2002) Fazendo de cada nova fucana descoberta uma icognita sobre suas possíveis aplicações na terapêutica.

A fucana C extraída da alga marinha *Dictyota menstrualis* apresentou ser um excelente inibidor da migração celular em peritonite induzida por agente químico, chegando a inibir 100% da migração na concentração de 20 mg/kg de animal. Inúmeros trabalhos tem citado o fucoidan como um potente inibidor da migração dos leucócitos, através da interação com P- e L-selectina (KLINTMAN et al. 2002; ZHANG et al, 2001), o que possibilita uma atenuação da rolagem dos leucócitos. O mecanismo pelo qual este composto teste está inibindo a migração dos leucócitos ainda não foi esclarecido, mas por se tratar de um polissacarídeo sulfatado como o fucoidan, podemos estipular que a fucana C testada neste trabalho possa atuar por mecanismos semelhantes. Outro mecanismo de atuação que vem sendo estudado é a modulação de um grupo de proteínas denominado de quimiocinas, que foram descritas inicialmente pelos seus efeitos quimiotáticos em leucócitos (ROLLINS, 1997) dando a esses compostos um papel importante no recrutamento de células para o foco inflamatório. Anastese-Ravion e col. (2001) estudando uma fucana extraída de alga marinha marrom (*A. nodoson*), verificou que, a mesma, teve a capacidade de modular a produção de citocinas

proinflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8) em monócitos estimulados com LPS, demonstrando capacidade de regular mediadores do processo inflamatório.

Linnemann (2000) estudando o efeito do fucoidan na rolagem e migração de leucócitos em modelo animal, após pulsão ilíaca cecal verificou que os animais tratados apresentavam uma migração menor para a cavidade abdominal, para o pulmão e para o fígado. No presente estudo a fucana C inibiu significativamente a rolagem de leucócitos para cavidade peritoneal, revelando este composto teste como um forte candidato a aplicação pela indústria farmacêutica.

O processo inflamatório apesar de ser uma resposta normal do organismo, quando sem controle pode causar danos teciduais que promovendo entre outros a liberação de Ions (K⁺, H⁺), histamina, ATP, e óxido nítrico. Isto tem como resultado o aumento do recrutamento das células do sistema imune (principalmente macrófagos). Alguns destes mediadores ativam diretamente a via da dor periférica através de receptores nociceptivos, outros atuam de maneira indireta através de células do sistema imune para liberação adicional de agentes que induzam a dor. (KIDD, 2001).

Devido a esta íntima relação entre o processo inflamatório e o desenvolvimento de uma sensação dolorosa e visto que a fucana C possui uma considerável atividade antiinflamatória, verificamos em seguida sua atividade analgésica e/ou anestésica. Dois diferentes métodos testes foram empregados com objetivo de identificar o efeito periférico e central da fucana C. O teste da placa quente e o teste de contração abdominal que utiliza ácido acético 0,6% como irritante químico.

A administração intraperitoneal de agentes irritantes provoca um comportamento estereotipado nos camundongos, que é caracterizado por contrações abdominais, movimentos do corpo como torção da musculatura dorsoabdominal e redução na atividade motora e coordenação (BARS, et al. 2001).

A figura 15 demonstra que o efeito dose dependente da fucana C na diminuição da sensação nociceptiva periférica, provocada por indução química (teste da contração), possuindo uma inibição de 61,18% na concentração de 4,00 mg/kg de animal. Esta é a primeira vez que se demonstra atividade antinociceptiva de uma fucana, sendo necessário mais estudos para propor um mecanismo de ação para este composto. Entretanto, é provável que este resultado possa ser explicado pela inibição da migração celular e/ou liberação de mediadores químicos. Neste estudo a diminuição da sensação dolorosa pode estar relacionado como o efeito anti-migratório da fucana C.

Confirmando a influência dos leucócitos na sensação dolorosa, Ribeiro (2000 b) investigou o papel dos leucócitos residentes na cavidade peritoneal durante indução nociceptiva causada por ácido acético e por zimosan, verificando o efeito significativo da indução por solução de ácido acético 0,6% na indução da sensação dolorosa e a diminuição da mesma quando foi promovida uma baixa no número de leucócitos na cavidade peritoneal, sugerindo que a indução nociceptiva promovida pelo ácido acético se dá através de um mecanismo dependente da presença dos polimorfonucleares. Também foi verificado que células obtidas da lavagem peritoneal de animais tratados com solução de ácido acético 0,6% produziam quantidade significativamente maiores de, IL- β e TNF, que os animais

não tratados. Quando estes animais foram tratados com soro anti-IL- β e anti-TNF a sensação dolorosa foi diminuída.

Sugere-se que a fucana C apresenta seu mecanismo analgésico através da inibição da migração dos leucócitos e/ou pela diminuição de mediadores químicos, tais como a IL-1 e TNF, apresentando desta forma um efeito de inibição dolorosa periférica e provavelmente por não atuar a nível de mediadores endógenos como prostaglandina, adrenalina e opióides, não apresentou ação sobre a sensação dolorosa central, quantificada pelo teste da placa quente.

Ribeiro 2000(b) estudando o efeito da talidomida na dor inflamatória, demonstrou resultados semelhantes a fucana C, verificando que animais tratados com este composto apresentavam uma diminuição dose dependente da sensação dolorosa periférica, contudo não demonstrava atividade quando testada para sensação dolorosa vinculada ao sistema nervoso central.

Conclusões

- Cada fração apresentou-se constituída por populações de polissacarídeos diferentes, o que pôde ser comprovado pelos diferentes perfis de migração eletroforética nos três sistemas de tampões e pela diferente proporção dos monossacarídeos constituintes de cada fração.
- A fucana C demonstrou-se ser uma Xilogalactofucana com massa molecular de 21,5 kDa.
- A fucana C apresentou-se como um eficiente anti-inflamatório inibindo 100% da migração de leucócitos, nas concentrações de 20 mg/kg e 40 mg/kg.
- A fucana C demonstrou uma atividade anti-nociceptiva de 71,2% na concentração de 20mg/kg, sendo esta vinculada a atividade antimigratória.
- A fucana C não demonstrou nenhuma atividade antinociceptiva relacionada ao sistema nervoso central.

Referências

ABDEL-FATTAH, A. F.; HUSSEIN, M. M. D.; SALEM, H. M.- Studies of the purification and some properties of sargassan, a sulphated heteropolysaccharide from *Sargassum linifolium*. **Carbohydr. Res.**, **33**: 9-17, 1974

ALBUQUERQUE I.R.L., QUEIROZ K.C.S., ALVES L.G., SANTOS E.A., Leite E.L. and ROCHA H.A.O. Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulant activity. **Braz J Med Biol Res**, , Volume 37(2), 167-171, 2004.

ALVES LG. Polissacarídeos Ácidos Presentes No Folíolo, Talo E Flutuador Da Alga Marinha *Sargassum Vulgare*. (**Dissertação**). Natal-RN: Universidade Federal Do Rio Grande Do Norte. 2000.

ANASTASE-RAVION, S.; CARRENO, M.P.; BLONDIN, C.; RAVION, O.; CHAMPION, J.; CHAUBET, F.; HAEFFNER-CAVAILLON, N.; LETOURNEUR, D., Heparin-like polymers modulate proinflammatory cytokine production by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. **J. Biomed Mater Res**, 60, 375-383, Paris/França, 2002.

ANDRADE L. R., SALGADO L. T., FARINA M., PEREIRA M. S., MOURÃO P. A. S. AND AMADO FILHO G. M. Ultrastructure of acidic polysaccharides from the cell walls of brown algae. **J Struct Biol.**,145(3), 216-25, 2004.

ANDREWS, T., SULLIVAN, K.E. Infections in patients with inherited defects in phagocytic function. **Clin. Microbiol. Rev.**, **16(4)**: 597-621, 2003.

ANGSTWURM K, WEBER JR, SEGERT A, BURGER W, WEIH M, FREYER D, EINHAUPL KM, DIRNAGL U. Fucoidin, a polysaccharide inhibiting leukocyte rolling, attenuates inflammatory responses in experimental pneumococcal meningitis in rats. **Neurosci Lett.** 191 (1-2), 1-4, 1995

BAINTON, D.F. Developmental Biology of Neutrophils and Eosinophils. In J.I. Gallin, I.M. Goldstein, R. Snyderman (eds): **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates (2nd ed)**. New York: Raven, Pp 303-324. 1992.

BARREDA, D.R., HANINGTON, P.C., BELOSEVIC, M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. **Dev. Comp. Immunol.**, **28(5)**: 509-54, 2004.

BERTEAU O, MULLOY B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. **Glycobiology.** Jun;13 (6), 29-40. 2003.

BEZERRA CA, BRUSCHINI H, CODY DJ. Traditional suburethral sling operations for urinary incontinence in women. **Cochrane Database Syst Rev.** 20, 2005

BIRD, G. M. & HASS, P. – **Biochem. J.**, **25**: 403-411, 1931

BOISSON-VIDAL, C.; HAROUN, F.; ELLOUALLI, M.; BLODIN, C.; FICHER, A.M.; AGOSTINI, A. & JOZEFONVICZ, J. – Biological activities of polysaccharides from marine algae. **Drugs of the future**, **20**(12): 1237-1249,1995.

CARVALHO, L.C.M. Efeito de frações de fucanas de *Fucus vesiculosus* na proliferação celular. (**Dissertação**). Natal-RN: Universidade Federal Do Rio Grande Do Norte. 2001.

CHEVOLOT, L.; FOUCAULT, A.; CHAUBET, F.; KERVAREC, N.; SINQUIN, C.; FISHER, A.; BOISSON-VIDAL C. - Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity. **Carbohyd. Res.**, **319**: 154-165, 1999.

CHEVOLOT, L.; MULLOY, B.; RATISKOL, J.; FOUCAULT, A.; COLIEC-JOUAULT S. – A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. **Carbohyd. Res.** , **330**: 529 - 535, 2001.

COLLIER, H.O.J., DINNEEN, J.C., JONHSON, C.A., SCHNEIDER, C., 1968. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmacol. Chemother.** **32**, 295–310.

DIETRICH, C.P. & DIETRICH, S.M.C. -Electrophoretic behaviour of acidic ucopolysaccarides in diamine buffers. **Anal. biochem.**, **70**: 645-647, 1976.

DIETRICH, C. P.; PAIVA, J. F.; MORAES, C. T.; TAKAHASHI, H. K.; PORCIANOTTO, M.A; NADER, H.B. - Isolation and characterization of heparin with high anticoagulant activity from *Anomalocardia brasiliiana*. **Biochim. Biophys. Acta.**; **843**: 1-7, 1985.

DIETRICH, C.P.; FARIAS, G.G.M.; ABREU, L.R.D.; LEITE, E.L.; SILVA, L.F.; NADER, H.B. - A new approach for the characterzation of polysaccharides from algae: Presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. **Plant Science**,**108**: 108, 143-153, 1995.

DISCHE, Z. - A new specific color reaction of hexuronic acids. **J.Biol.Chem.**, **167**:189.1974.

DISCHE, Z. - Color reactions of pentoses. In: WHISTLER, R.L. & WOLFROM,M.L., **Methods in carbohydrate chemistry**, Vol.1. pg.484 - 488, Academic Press, 1962b,

DISCHE, Z. - Color reactions of 6-Deoxi and 3-6-Dideoxioses. In: WHISTLER, R.L. & WOLFROM, M.L., **Methods in carbohydrate chemistry**, Vol.1, pg. 501 - 503. London, Academic Press.,1962a.

DEVRIES, M.E., RAN, L., KELVIN, D.J. On the edge: the physiological and pathophysiological role of chemokines during inflammatory and immunological responses. **Semin. Immunol.**, **11(2)**: 95-104, 1999.

DODGSON, K.S. & PRICE, R.G. - A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochem. J.**, **84**: 106 - 110, 1962.

DUARTE, M. E. R.; CARDOSO, M. A.; NOSEDA, M. D.; CEREZO, A. S. - Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Carbohydr. Res.**, **333**: 281-293, 2001.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. - Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. **Anal. Chem.**, **28**: 350 -356, 1956.

EDDY, N.B., LEIMBACH, P.. Synthetic analgesics; dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 107, 385–389, 1953.

FARIAS, G. G. M. - Uma nova abordagem para o estudo comparativo dos polissacarídeos de algas: classe Phaeophyceae. Natal-RN, 1993 [Tese - Mestrado - Universidade Federal de São Paulo - Depto. de Bioquímica].

FRENETTE, P.S., WAGNER, D.D. Insights into selectin function from knockout mice. **Thromb. Haemost.**, **78(1)**: 60-4, 1997.

HUSSEIN, M. M. D. - **Phytochemistry**, **14**: 1866-1869, 1975.

HUSSEIN, M. M. D.; MAGDEL-DIN, B.; ABDEL-AZIZ, A; SALEM, H. M. I. – Some structural features of a new sulphated heteropolysacchride from *Padina pavonia*.

Phytochemistry, **19**: 2133-2135, 1980.

JUNQUEIRA, J. & CARNEIRO, L.C.U. Células do Sangue. In: JUNQUEIRA, J. & CARNEIRO, L.C.U. **Histologia Básica** (9^a. ed). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 192–205.

KIDD, B.L. and URBAN, L.A. Mechanism of inflammatory pain. *British Journal of Anaesthesia*. 87, p. 1-3, London, UK. 2001

KLINTMAN D, SCHRAMM R, MENGER MD, THORLACIUS H. Leukocyte recruitment in hepatic injury: selectin-mediated leukocyte rolling is a prerequisite for CD18-dependent firm adhesion. **J Hepatol**. 36(1):53-9, 2002

KLOAREG, B. & QUATRANO, R.S. Structure of cell wall of marine algae and ecophysiological function of matrix polysaccharides. **Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Ver.**, 26: 259-315, 1988

KYLIN, H. – Biochemistry of sea algae. *Z. Physiol. Chem.*, 83: 171-197, 1913.

KYLIN, H. – Biochemistry of sea algae. *Z. Physiol. Chem.*, 94: 337-425, 1915.

LARSEN B, HAUG A, PAINTER T. Sulphated polysaccharides in brown algae. 3. The native state of dfucoidan in *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. **Acta Chem Scand.** 24(9) 3339-52. 1970.

LE BARS D, GOZARIU M, CADDEN SW. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev.** 53 (4):597-652, 2001.

LEITE, E. L.; MEDEIROS, M. G. L.; ROCHA, H. A. O.; FARIAS, G. G. M.; SILVA, L. F.; CHAVANTE, S. F.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. - Structure of a new fucan from the algae *Spatoglossum schröderi*. **Plant Science**, **132**: 215-228,1998.

LINNEMANN, G.; REINHART, K.; PARADE, U.; PHILIPP, A.; PFISTER, W.; STRAUBE, E.; KARZAI, W., The effects of inhibiting leukocyte migration with fucoidin in a rat peritonitis model. Intensive **Care Med.**, 26, 1540-1546, Jena/Germany, 2000.

MEDCALF, E. G.; WHITMEN, P.; LARSEN, B. – Fucose-containing polysaccharides in the brown algae *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. **Carbohydr. Res.**, **59**: 531-536, 1977.

MORY, H. & NISIZIWA, K. – Sugar constituents of sulfated polysaccharides from the fronds of *Sargassum ringgoldianum*. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.**, **48**: 981-986, 1982.

MULLER, W.A., RANDOLPH, G.J. Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. **J. Leukoc. Biol.**, **66(5)**: 698-704, 1999.

MULLOY B.; MOURÃO P. A. S.; GRAY E. - Structure/function studies of anticoagulant sulphated polysaccharides using NMR. **J. of Biotechnol.**, **77**: 123-135, 2000.

OSTERGAARD C, YIENG-KOW RV, BENFIELD T, FRIMODT-MOLLER N, ESPERSEN F, LUNDGREN JD. Inhibition of leukocyte entry into the brain by the selectin blocker fucoidin decreases interleukin-1 (IL-1) levels but increases IL-8 levels in cerebrospinal fluid during experimental pneumococcal meningitis in rabbits. **Infect Immun**, 68(6), 3153-7, 2000.

PERCIVAL, E.G.V. & MCDOWELL, R.H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides, London, **Academic Press**, p. 219, 1967.

PERCIVAL, E. & YOUNG, M – **Carbohydr. Res.**, **32**: 195-201, 1974.

PERCIVAL, E.; VÉNEGAS-JARA, M. F.; WEIGEL, H. - Structural studies of water-soluble fucan from *Lessonia nigrescens*. **Carbohydr. Res.**, **125**: 263-290, 1984

PEREIRA, M. S.; MULLOY, B.; MOURÃO, P.A. S. - Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. **J. Biol. Chem.**, **274**: 7656-7667, 1999.

PEREIRA, F.E.L.; BOGLIOLO, L. Inflamações In: **Patologia**. 2nd., cap7, p112-148, 1998.

PEREIRA MS, VILELA-SILVA AC, VALENTE AP, MOURAO PA. A 2-sulfated, 3-linked alpha-L-galactan is an anticoagulant polysaccharide. **Carbohydr Res**. 337 (21-23), 2231-8, 2002.

POLLEY, M.J., PHILLIPS, M.L., WAYNER, E., NUDELMAN, E., SINGHAL, A.K., HAKOMORI, S., PAULSON, J.C. CD62 and endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) recognize the same carbohydrate ligand, sialyl-Lewis^x. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, **88(14)**: 6224-8, 1991.

RIBEIRO RA, VALE ML, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. **Eur J Pharmacol**. Mar 10;391(1-2):97-103, 2000 (a).

RIBEIRO RA, VALE ML, THOMAZZI SM, PASCHOALATO AB, POOLE S, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur J Pharmacol**. 3;387(1), 111-8, 2000 (b).

ROCHA, H.A.O. – Extração e purificação de uma fucana da alga marinha *Spatoglossum schröderi*. São Paulo-SP, 1998.[Tese-Mestrado-Escola Paulista de Medicina].

ROCHA HAO, FRANCO CRC, TRINDADE ES, CARVALHO LCM, VEIGA SS, LEITE EL., DIETRICH C. P AND NADER H. B. A fucan from the brown seaweed *spatoglossum schröderi* inhibits chinese hamster ovary cell adhesion to several extracelular matrix proteins. **Braz. J. Med. Biol.** 34, 621-6. 2001.

ROCHA, H.A.O. – Caracterização de uma fucana da alga *Spatoglossum schoröderi* e análise de suas atividades anti-adesiva, antimigratória, antiproliferativa e antitrmbótica. Natal-RN. 2002. [Tese de Doutorado].

ROCHA H. A., MORAES F. A., TRINDADE E. S., FRANCO C. R. C., TORQUATO R. J. S., VEIGA S.S., VALENTE A. P., MOURAO P. A., LEITE E. L., NADER H. B., AND DIETRICH C. P. Structural and haemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *spatoglossum schrdelta ederi*. An ideal antithrombotic agent?. **J Biol Chem.** 2005.(a)

ROCHA HAO, BEZERRA LC, ALBUQUERQUE IRL, COSTA LS, GUERRA CM, ABREU LD, NADER, H.B. and LEITE, E.L. A xylogalactofucan from the brown seaweed *spatoglossum schroederi* stimulates the synthesis of an antithrombotic heparan sulfate from endothelial. **Planta Med.** 71 (4),379-81, 2005.(b)

ROLLINS, B.J., Chemokines. **Bood**, 90, 909-928, 1997.

RIBEIRO, R. A., VALE, M. L., FERREIRA, S. H., CUNHA F. Q., Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. **European Journal of Pharmacology**. 391, 97–103, 2000.

ROOT, R.K., COHEN, M.S. The microbicidal mechanisms of human neutrophils and eosinophils. **Rev. Infect. Dis.**, **3**: 565-98, 1981.

RUOSLAHTI, E. Integrins. **J. Clin. Invest.**, **87**: 1-5, 1991.

SAWYER, D.W., DONOWITZ, G.R., MANDELL, G.L. Polymorphonuclear neutrophils: an effective antimicrobial force. **Rev. Infect. Dis.**, **11 (suppl 7)**: S 1532-44, 1989.

SAWYNOK J. Topical and peripherally acting analgesics. **Pharmacol Rev.** 55(1), 1-20, 2003.

SCAPINI, P., LAPINET-VERA, J.A., GASPERINI, S., CALZETTI, F., BAZZONI, F., CASSATELLA, M.A. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunol. Rev.**, **177**: 195-203, 2000.

SPECTOR, J. – Refinement of the comassie blue method of protein quantification. A simple and liner spectrofotometric assay of 0,5 to 50 µg of protein. **Anal. Biochem.**, v. 86,p.142-146.1978.

SILVA T.M, ALVES L.G, QUEIROZ, K.C., SANTOS M, MARQUES C.T, CHAVANTE SF, ROCHA, H.A., LEITE, E.L. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. 2005. **Braz J Med Biol**, 38 (4), 523-33.

STEVENS, A.; LOWE, J. Patologia 2ed. 1998.

SVANBORG, C., GODALY, G., HEDLUND, M. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. **Curr. Opin. Microbiol.**, 2: 99-105, 1999.

VECCHIARELLI, A., MONARI, C., PALAZZETTI, B., BISTONI, F., CASADEVALL, A. Dysregulation in IL-12 secretion by neutrophils from HIV-infected patients. **Clin. Exp. Immunol.**, 121(2): 311-9, 2000.

VILELA-SILVA AC, ALVES AP, VALENTE AP, VACQUIER VD, MOURAO PA. Structure of the sulfated alpha-L-fucan from the egg jelly coat of the sea urchin *Strongylocentrotus franciscanus*: patterns of preferential 2-O- and 4-O-sulfation determine sperm cell recognition. **Glycobiology**. 9(9), 927-33, 1999

VILELA-SILVA AC, CASTRO MO, VALENTE AP, BIERMANN CH, MOURAO PA. Sulfated fucans from the egg jellies of the closely related sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis* and *Strongylocentrotus pallidus* ensure species-specific fertilization. **J Biol Chem.**, 277(1), 379-87, 2002.

WILLIAMS, S. J.; DAVIES, G.J. Protei-Carbohydrate interations: learning lessns from nature. **Trends in Biotechnology**, v. 19, n. 9, p. 356-362, 2001.

WITKO-SARSAT, V., RIEU, P., DESCAMPS-LATSCHA, B., LESAVRE, P., HALBWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab. Investig.**, **80**: 617-653, 2000.

XIE, X. Et al., Inhibition of selecti-mediated cell adhesion and prevention of acute inflammation by noanticoagulant sulfated saccharide- studies with carboxy-reduced and sulfated heparin and trestatin sulfated. **J. Biol. Chem.** 275: 34818-25, 2000.

ZIMMERMAN, G.A., PRESCOTT, S.M., MCINTYRE, T.M. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. **Immunol. Today**, **13(3)**: 93-100, 1992.

ZIMMERMAN, G.A., MCINTYRE, T.M., PRESCOTT, S.M. Adhesion and signaling in vascular cell-cell interactions. **J. Clin. Invest.**, **98(8)**: 1699-702, 1996.

ZHANG, X.W.; LIU, Q. & THORLACIUS, H. Inhibition of selectin function and leukocyte rolling protects against dextran sodium sulfate-induced murine colitis. **Scand J Gastroenterol.**, 36(3):270-5, 2001.

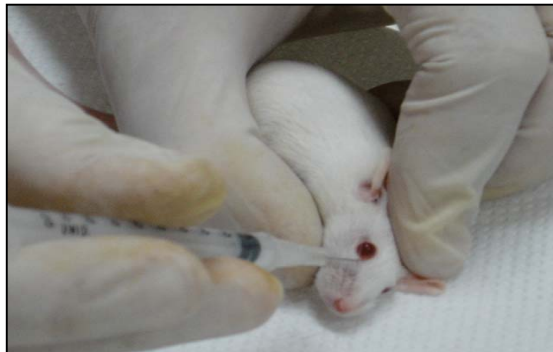
ZHELEV, D.V., ALTERAIFI, A. Signaling in the motility responses of the human neutrophil. *Ann. Biomed. Eng.*, 30(3): 356-70, 2002.

ZIGMOND, S.H. Chemotaxis by polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell. Biol.*, 77(2): 269-87, 1978.

FIGURAS DEMONSTRATIVAS



Injeção Intraperitoneal



Injeção Intravenoso



Contração Abdominal
Vista Lateral



Contração Abdominal
Vista Lateral



Contração Abdominal
Vista Superior



Contração Abdominal
Vista Superior

Apendice II

Avaliação estatística realizada nos resultados obtidos.

 One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
 Variation among column means is significantly greater than expected
 by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.669 then the P value is less
 than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
Controle+ vs Controle-	53.300	34.762	*** P<0.001
Controle+ vs 0,25 mg/kg	12.700	8.283	*** P<0.001
Controle+ vs 0,5 mg/kg	27.700	18.066	*** P<0.001
Controle+ vs 1,0 mg/Kg	18.380	11.987	*** P<0.001
Controle+ vs 2,0 mg/Kg	35.560	23.192	*** P<0.001
Controle+ vs 4,0 mg/Kg	39.200	25.566	*** P<0.001
Controle+ vs 20,0 mg/Kg	52.880	34.488	*** P<0.001
Controle+ vs 40,0 mg/Kg	55.380	36.118	*** P<0.001
Controle- vs 0,25 mg/kg	-40.600	26.479	*** P<0.001
Controle- vs 0,5 mg/kg	-25.600	16.696	*** P<0.001
Controle- vs 1,0 mg/Kg	-34.920	22.775	*** P<0.001
Controle- vs 2,0 mg/Kg	-17.740	11.570	*** P<0.001
Controle- vs 4,0 mg/Kg	-14.100	9.196	*** P<0.001
Controle- vs 20,0 mg/Kg	-0.4200	0.2739	ns P>0.05
Controle- vs 40,0 mg/Kg	2.080	1.357	ns P>0.05
0,25 mg/kg vs 0,5 mg/kg	15.000	9.783	*** P<0.001
0,25 mg/kg vs 1,0 mg/Kg	5.680	3.704	ns P>0.05
0,25 mg/kg vs 2,0 mg/Kg	22.860	14.909	*** P<0.001
0,25 mg/kg vs 4,0 mg/Kg	26.500	17.283	*** P<0.001
0,25 mg/kg vs 20,0 mg/Kg	40.180	26.205	*** P<0.001
0,25 mg/kg vs 40,0 mg/Kg	42.680	27.836	*** P<0.001
0,5 mg/kg vs 1,0 mg/Kg	-9.320	6.078	** P<0.01
0,5 mg/kg vs 2,0 mg/Kg	7.860	5.126	* P<0.05
0,5 mg/kg vs 4,0 mg/Kg	11.500	7.500	*** P<0.001
0,5 mg/kg vs 20,0 mg/Kg	25.180	16.422	*** P<0.001
0,5 mg/kg vs 40,0 mg/Kg	27.680	18.053	*** P<0.001
1,0 mg/Kg vs 2,0 mg/Kg	17.180	11.205	*** P<0.001
1,0 mg/Kg vs 4,0 mg/Kg	20.820	13.579	*** P<0.001
1,0 mg/Kg vs 20,0 mg/Kg	34.500	22.501	*** P<0.001
1,0 mg/Kg vs 40,0 mg/Kg	37.000	24.131	*** P<0.001
2,0 mg/Kg vs 4,0 mg/Kg	3.640	2.374	ns P>0.05
2,0 mg/Kg vs 20,0 mg/Kg	17.320	11.296	*** P<0.001
2,0 mg/Kg vs 40,0 mg/Kg	19.820	12.926	*** P<0.001
4,0 mg/Kg vs 20,0 mg/Kg	13.680	8.922	*** P<0.001
4,0 mg/Kg vs 40,0 mg/Kg	16.180	10.552	*** P<0.001
20,0 mg/Kg vs 40,0 mg/Kg	2.500	1.630	ns P>0.05

Difference	Mean	95% Confidence Interval	
	Difference	From	To
Controle+ - Controle-	53.300	46.141	60.459
Controle+ - 0,25 mg/kg	12.700	5.541	19.859
Controle+ - 0,5 mg/kg	27.700	20.541	34.859
Controle+ - 1,0 mg/Kg	18.380	11.221	25.539

Controle+ - 2,0 mg/Kg	35.560	28.401	42.719
Controle+ - 4,0 mg/Kg	39.200	32.041	46.359
Controle+ - 20,0 mg/Kg	52.880	45.721	60.039
Controle+ - 40,0 mg/Kg	55.380	48.221	62.539
Controle- - 0,25 mg/kg	-40.600	-47.759	-33.441
Controle- - 0,5 mg/kg	-25.600	-32.759	-18.441
Controle- - 1,0 mg/Kg	-34.920	-42.079	-27.761
Controle- - 2,0 mg/Kg	-17.740	-24.899	-10.581
Controle- - 4,0 mg/Kg	-14.100	-21.259	-6.941
Controle- - 20,0 mg/Kg	-0.4200	-7.579	6.739
Controle- - 40,0 mg/Kg	2.080	-5.079	9.239
0,25 mg/kg - 0,5 mg/kg	15.000	7.841	22.159
0,25 mg/kg - 1,0 mg/Kg	5.680	-1.479	12.839
0,25 mg/kg - 2,0 mg/Kg	22.860	15.701	30.019
0,25 mg/kg - 4,0 mg/Kg	26.500	19.341	33.659
0,25 mg/kg - 20,0 mg/Kg	40.180	33.021	47.339
0,25 mg/kg - 40,0 mg/Kg	42.680	35.521	49.839
0,5 mg/kg - 1,0 mg/Kg	-9.320	-16.479	-2.161
0,5 mg/kg - 2,0 mg/Kg	7.860	0.7011	15.019
0,5 mg/kg - 4,0 mg/Kg	11.500	4.341	18.659
0,5 mg/kg - 20,0 mg/Kg	25.180	18.021	32.339
0,5 mg/kg - 40,0 mg/Kg	27.680	20.521	34.839
1,0 mg/Kg - 2,0 mg/Kg	17.180	10.021	24.339
1,0 mg/Kg - 4,0 mg/Kg	20.820	13.661	27.979
1,0 mg/Kg - 20,0 mg/Kg	34.500	27.341	41.659
1,0 mg/Kg - 40,0 mg/Kg	37.000	29.841	44.159
2,0 mg/Kg - 4,0 mg/Kg	3.640	-3.519	10.799
2,0 mg/Kg - 20,0 mg/Kg	17.320	10.161	24.479
2,0 mg/Kg - 40,0 mg/Kg	19.820	12.661	26.979
4,0 mg/Kg - 20,0 mg/Kg	13.680	6.521	20.839
4,0 mg/Kg - 40,0 mg/Kg	16.180	9.021	23.339
20,0 mg/Kg - 40,0 mg/Kg	2.500	-4.659	9.659

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 29.959

The P value is 0.0002.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is extremely significant.

Since ANOVA assumes populations with equal SDs, you should consider transforming your data (reciprocal or log) or selecting a nonparametric test.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle+	0.2640	>0.10	Yes
Controle-	0.2200	>0.10	Yes

0,25 mg/kg	0.3000	>0.10	Yes
0,5 mg/kg	0.3000	>0.10	Yes
1,0 mg/Kg	0.2967	>0.10	Yes
2,0 mg/Kg	0.3179	>0.10	Yes
4,0 mg/Kg	0.2449	>0.10	Yes
20,0 mg/Kg	0.3108	>0.10	Yes
40,0 mg/Kg	0.3074	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	8	15478	1934.8
Residuals (within columns)	36	423.18	11.755
Total	44	15902	

$$F = 164.60 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Controle+	5	63.700	7.743	3.463	65.000
Controle-	5	10.400	2.945	1.317	9.500
0,25 mg/kg	5	51.000	2.550	1.140	51.000
0,5 mg/kg	5	36.000	3.062	1.369	36.000
1,0 mg/Kg	5	45.320	2.407	1.076	45.300
2,0 mg/Kg	5	28.140	0.8905	0.3982	28.100
4,0 mg/Kg	5	24.500	3.606	1.612	24.000
20,0 mg/Kg	5	10.820	0.7362	0.3292	10.800
40,0 mg/Kg	5	8.320	1.080	0.4831	8.300

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
Controle+	51.000	71.000	54.088	73.312
Controle-	7.500	14.000	6.743	14.057
0,25 mg/kg	48.000	55.000	47.835	54.165
0,5 mg/kg	31.000	38.500	32.199	39.801
1,0 mg/Kg	41.500	48.000	42.332	48.308
2,0 mg/Kg	27.000	29.500	27.034	29.246
4,0 mg/Kg	20.000	30.000	20.024	28.976
20,0 mg/Kg	10.000	12.000	9.906	11.734
40,0 mg/Kg	7.000	10.000	6.979	9.661

* * *

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.669 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
Controle+ vs Controle-	53.300	34.762	*** P<0.001
Controle+ vs 0,25 mg/kg	12.700	8.283	*** P<0.001
Controle+ vs 0,5 mg/kg	27.700	18.066	*** P<0.001
Controle+ vs 1,0 mg/Kg	18.380	11.987	*** P<0.001
Controle+ vs 2,0 mg/Kg	35.560	23.192	*** P<0.001
Controle+ vs 4,0 mg/Kg	39.200	25.566	*** P<0.001
Controle+ vs 20,0 mg/Kg	52.880	34.488	*** P<0.001
Controle+ vs 40,0 mg/Kg	55.380	36.118	*** P<0.001
Controle- vs 0,25 mg/kg	-40.600	26.479	*** P<0.001
Controle- vs 0,5 mg/kg	-25.600	16.696	*** P<0.001
Controle- vs 1,0 mg/Kg	-34.920	22.775	*** P<0.001
Controle- vs 2,0 mg/Kg	-17.740	11.570	*** P<0.001
Controle- vs 4,0 mg/Kg	-14.100	9.196	*** P<0.001
Controle- vs 20,0 mg/Kg	-0.4200	0.2739	ns P>0.05
Controle- vs 40,0 mg/Kg	2.080	1.357	ns P>0.05
0,25 mg/kg vs 0,5 mg/kg	15.000	9.783	*** P<0.001
0,25 mg/kg vs 1,0 mg/Kg	5.680	3.704	ns P>0.05
0,25 mg/kg vs 2,0 mg/Kg	22.860	14.909	*** P<0.001
0,25 mg/kg vs 4,0 mg/Kg	26.500	17.283	*** P<0.001
0,25 mg/kg vs 20,0 mg/Kg	40.180	26.205	*** P<0.001
0,25 mg/kg vs 40,0 mg/Kg	42.680	27.836	*** P<0.001
0,5 mg/kg vs 1,0 mg/Kg	-9.320	6.078	** P<0.01
0,5 mg/kg vs 2,0 mg/Kg	7.860	5.126	* P<0.05
0,5 mg/kg vs 4,0 mg/Kg	11.500	7.500	*** P<0.001
0,5 mg/kg vs 20,0 mg/Kg	25.180	16.422	*** P<0.001
0,5 mg/kg vs 40,0 mg/Kg	27.680	18.053	*** P<0.001
1,0 mg/Kg vs 2,0 mg/Kg	17.180	11.205	*** P<0.001
1,0 mg/Kg vs 4,0 mg/Kg	20.820	13.579	*** P<0.001
1,0 mg/Kg vs 20,0 mg/Kg	34.500	22.501	*** P<0.001
1,0 mg/Kg vs 40,0 mg/Kg	37.000	24.131	*** P<0.001
2,0 mg/Kg vs 4,0 mg/Kg	3.640	2.374	ns P>0.05
2,0 mg/Kg vs 20,0 mg/Kg	17.320	11.296	*** P<0.001
2,0 mg/Kg vs 40,0 mg/Kg	19.820	12.926	*** P<0.001
4,0 mg/Kg vs 20,0 mg/Kg	13.680	8.922	*** P<0.001
4,0 mg/Kg vs 40,0 mg/Kg	16.180	10.552	*** P<0.001
20,0 mg/Kg vs 40,0 mg/Kg	2.500	1.630	ns P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval	
		From	To
Controle+ - Controle-	53.300	46.141	60.459
Controle+ - 0,25 mg/kg	12.700	5.541	19.859
Controle+ - 0,5 mg/kg	27.700	20.541	34.859
Controle+ - 1,0 mg/Kg	18.380	11.221	25.539

Controle+ - 2,0 mg/Kg	35.560	28.401	42.719
Controle+ - 4,0 mg/Kg	39.200	32.041	46.359
Controle+ - 20,0 mg/Kg	52.880	45.721	60.039
Controle+ - 40,0 mg/Kg	55.380	48.221	62.539
Controle- - 0,25 mg/kg	-40.600	-47.759	-33.441
Controle- - 0,5 mg/kg	-25.600	-32.759	-18.441
Controle- - 1,0 mg/Kg	-34.920	-42.079	-27.761
Controle- - 2,0 mg/Kg	-17.740	-24.899	-10.581
Controle- - 4,0 mg/Kg	-14.100	-21.259	-6.941
Controle- - 20,0 mg/Kg	-0.4200	-7.579	6.739
Controle- - 40,0 mg/Kg	2.080	-5.079	9.239
0,25 mg/kg - 0,5 mg/kg	15.000	7.841	22.159
0,25 mg/kg - 1,0 mg/Kg	5.680	-1.479	12.839
0,25 mg/kg - 2,0 mg/Kg	22.860	15.701	30.019
0,25 mg/kg - 4,0 mg/Kg	26.500	19.341	33.659
0,25 mg/kg - 20,0 mg/Kg	40.180	33.021	47.339
0,25 mg/kg - 40,0 mg/Kg	42.680	35.521	49.839
0,5 mg/kg - 1,0 mg/Kg	-9.320	-16.479	-2.161
0,5 mg/kg - 2,0 mg/Kg	7.860	0.7011	15.019
0,5 mg/kg - 4,0 mg/Kg	11.500	4.341	18.659
0,5 mg/kg - 20,0 mg/Kg	25.180	18.021	32.339
0,5 mg/kg - 40,0 mg/Kg	27.680	20.521	34.839
1,0 mg/Kg - 2,0 mg/Kg	17.180	10.021	24.339
1,0 mg/Kg - 4,0 mg/Kg	20.820	13.661	27.979
1,0 mg/Kg - 20,0 mg/Kg	34.500	27.341	41.659
1,0 mg/Kg - 40,0 mg/Kg	37.000	29.841	44.159
2,0 mg/Kg - 4,0 mg/Kg	3.640	-3.519	10.799
2,0 mg/Kg - 20,0 mg/Kg	17.320	10.161	24.479
2,0 mg/Kg - 40,0 mg/Kg	19.820	12.661	26.979
4,0 mg/Kg - 20,0 mg/Kg	13.680	6.521	20.839
4,0 mg/Kg - 40,0 mg/Kg	16.180	9.021	23.339
20,0 mg/Kg - 40,0 mg/Kg	2.500	-4.659	9.659

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 29.959

The P value is 0.0002.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is extremely significant.

Since ANOVA assumes populations with equal SDs, you should consider transforming your data (reciprocal or log) or selecting a nonparametric test.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle+	0.2640	>0.10	Yes
Controle-	0.2200	>0.10	Yes

0,25 mg/kg	0.3000	>0.10	Yes
0,5 mg/kg	0.3000	>0.10	Yes
1,0 mg/Kg	0.2967	>0.10	Yes
2,0 mg/Kg	0.3179	>0.10	Yes
4,0 mg/Kg	0.2449	>0.10	Yes
20,0 mg/Kg	0.3108	>0.10	Yes
40,0 mg/Kg	0.3074	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	8	15478	1934.8
Residuals (within columns)	36	423.18	11.755
Total	44	15902	

F = 164.60 = (MStreatment/MSresidual)

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Controle+	5	63.700	7.743	3.463	65.000
Controle-	5	10.400	2.945	1.317	9.500
0,25 mg/kg	5	51.000	2.550	1.140	51.000
0,5 mg/kg	5	36.000	3.062	1.369	36.000
1,0 mg/Kg	5	45.320	2.407	1.076	45.300
2,0 mg/Kg	5	28.140	0.8905	0.3982	28.100
4,0 mg/Kg	5	24.500	3.606	1.612	24.000
20,0 mg/Kg	5	10.820	0.7362	0.3292	10.800
40,0 mg/Kg	5	8.320	1.080	0.4831	8.300

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
Controle+	51.000	71.000	54.088	73.312
Controle-	7.500	14.000	6.743	14.057
0,25 mg/kg	48.000	55.000	47.835	54.165
0,5 mg/kg	31.000	38.500	32.199	39.801
1,0 mg/Kg	41.500	48.000	42.332	48.308
2,0 mg/Kg	27.000	29.500	27.034	29.246
4,0 mg/Kg	20.000	30.000	20.024	28.976
20,0 mg/Kg	10.000	12.000	9.906	11.734
40,0 mg/Kg	7.000	10.000	6.979	9.661

Fuc. 2,0 mg/kg - Fuc. 20 mg/kg	21.400	9.896	32.904
Fuc. 4 mg/kg - Fuc. 20 mg/kg	12.000	0.4958	23.504

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 8.100

The P value is 0.2309.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is not significant.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle +	0.3724	>0.10	Yes
Fuc. 0,25 mg/kg	0.2639	>0.10	Yes
Fuc. 0,5 mg/kg	0.2028	>0.10	Yes
Fuc. 1,0 mg/kg	0.1601	>0.10	Yes
Fuc. 2,0 mg/kg	0.2001	>0.10	Yes
Fuc. 4 mg/kg	0.3092	>0.10	Yes
Fuc. 20 mg/kg	0.2924	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	6	21080	3513.4
Residuals (within columns)	28	919.20	32.829
Total	34	22000	

$F = 107.02 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Controle +	5	105.20	6.573	2.939	104.00
Fuc. 0,25 mg/kg	5	84.800	7.563	3.382	88.000
Fuc. 0,5 mg/kg	5	70.000	4.062	1.817	70.000
Fuc. 1,0 mg/kg	5	62.200	3.962	1.772	62.000
Fuc. 2,0 mg/kg	5	49.600	4.037	1.806	49.000
Fuc. 4 mg/kg	5	40.200	8.672	3.878	39.000
Fuc. 20 mg/kg	5	28.200	2.387	1.068	27.000

Fuc. 2,0 mg/kg - Fuc. 20 mg/kg	21.400	9.896	32.904
Fuc. 4 mg/kg - Fuc. 20 mg/kg	12.000	0.4958	23.504

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 8.100

The P value is 0.2309.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is not significant.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle +	0.3724	>0.10	Yes
Fuc. 0,25 mg/kg	0.2639	>0.10	Yes
Fuc. 0,5 mg/kg	0.2028	>0.10	Yes
Fuc. 1,0 mg/kg	0.1601	>0.10	Yes
Fuc. 2,0 mg/kg	0.2001	>0.10	Yes
Fuc. 4 mg/kg	0.3092	>0.10	Yes
Fuc. 20 mg/kg	0.2924	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	6	21080	3513.4
Residuals (within columns)	28	919.20	32.829
Total	34	22000	

$F = 107.02 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Controle +	5	105.20	6.573	2.939	104.00
Fuc. 0,25 mg/kg	5	84.800	7.563	3.382	88.000
Fuc. 0,5 mg/kg	5	70.000	4.062	1.817	70.000
Fuc. 1,0 mg/kg	5	62.200	3.962	1.772	62.000
Fuc. 2,0 mg/kg	5	49.600	4.037	1.806	49.000
Fuc. 4 mg/kg	5	40.200	8.672	3.878	39.000
Fuc. 20 mg/kg	5	28.200	2.387	1.068	27.000

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
Controle +	98.000	116.00	97.040	113.36
Fuc. 0,25 mg/kg	76.000	94.000	75.411	94.189
Fuc. 0,5 mg/kg	64.000	75.000	64.957	75.043
Fuc. 1,0 mg/kg	57.000	67.000	57.281	67.119
Fuc. 2,0 mg/kg	44.000	54.000	44.588	54.612
Fuc. 4 mg/kg	30.000	54.000	29.434	50.966
Fuc. 20 mg/kg	26.000	32.000	25.236	31.164

* * *

Teste da Placa Quente Tempo 0'

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.8385, considered not significant.
Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Post tests

Post tests were not calculated because the P value was greater than 0.05.

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 1.211

The P value is 0.7504.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is *not significant*.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Morfina	0.2305	>0.10	Yes
Salina	0.2305	>0.10	Yes
Fuc. 1,0	0.2213	>0.10	Yes
Fuc. 20,0	0.2305	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	0.8000	0.2667
Residuals (within columns)	16	15.200	0.9500
Total	19	16.000	

$F = 0.2807 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
-------	------------------	------	--------------------	------------------------	--------

Morfina	5	10.800	0.8367	0.3742	11.000
Salina	5	10.800	0.8367	0.3742	11.000
Fuc. 1,0	5	11.200	1.304	0.5831	11.000
Fuc. 20,0	5	11.200	0.8367	0.3742	11.000

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
Morfina	10.000	12.000	9.761	11.839
Salina	10.000	12.000	9.761	11.839
Fuc. 1,0	10.000	13.000	9.581	12.819
Fuc. 20,0	10.000	12.000	10.161	12.239

Placa Quente Tempo 30'

 One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
 Variation among column means is significantly greater than expected
 by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.046 then the P value is less
 than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
Morfina vs Salina	24.800	49.600	*** P<0.001
Morfina vs Fuc 1,0	25.000	50.000	*** P<0.001
Morfina vs Fuc 20,0	25.800	51.600	*** P<0.001
Salina vs Fuc 1,0	0.2000	0.4000	ns P>0.05
Salina vs Fuc 20,0	1.000	2.000	ns P>0.05
Fuc 1,0 vs Fuc 20,0	0.8000	1.600	ns P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval	
		From	To
Morfina - Salina	24.800	22.777	26.823
Morfina - Fuc 1,0	25.000	22.977	27.023
Morfina - Fuc 20,0	25.800	23.777	27.823
Salina - Fuc 1,0	0.2000	-1.823	2.223
Salina - Fuc 20,0	1.000	-1.023	3.023
Fuc 1,0 - Fuc 20,0	0.8000	-1.223	2.823

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical
 SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 4.338

The P value is 0.2272.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is
 not significant.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow
 Gaussian distributions. This assumption is tested using the method
 Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
-------	----	---------	------------------------

Morfina	0.2868	>0.10	Yes
Salina	0.2371	>0.10	Yes
Fuc 1,0	0.2305	>0.10	Yes
Fuc 20,0	0.3674	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	2384.2	794.73
Residuals (within columns)	16	20.000	1.250
Total	19	2404.2	

$$F = 635.79 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Morfina	5	36.200	1.643	0.7348	37.000
Salina	5	11.400	1.140	0.5099	11.000
Fuc 1,0	5	11.200	0.8367	0.3742	11.000
Fuc 20,0	5	10.400	0.5477	0.2449	10.000

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
Morfina	34.000	38.000	34.160	38.240
Salina	10.000	13.000	9.985	12.815
Fuc 1,0	10.000	12.000	10.161	12.239
Fuc 20,0	10.000	11.000	9.720	11.080

* * *

Caça Quente Tempo 60'

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
 Variation among column means is significantly greater than expected
 by chance.

Key-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.046 then the P value is less
 than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
Morfina vs Salina	23.800	51.936	*** P<0.001
Morfina vs Fuc 1,0	24.200	52.809	*** P<0.001
Morfina vs Fuc 20,0	23.600	51.499	*** P<0.001
Salina vs Fuc 1,0	0.4000	0.8729	ns P>0.05
Salina vs Fuc 20,0	-0.2000	0.4364	ns P>0.05
Fuc 1,0 vs Fuc 20,0	-0.6000	1.309	ns P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval	
		From	To
Morfina - Salina	23.800	21.946	25.654
Morfina - Fuc 1,0	24.200	22.346	26.054
Morfina - Fuc 20,0	23.600	21.746	25.454
Salina - Fuc 1,0	0.4000	-1.454	2.254
Salina - Fuc 20,0	-0.2000	-2.054	1.654
Fuc 1,0 - Fuc 20,0	-0.6000	-2.454	1.254

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical
 SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 0.8719

The P value is 0.8322.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is
 not significant.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow
 Gaussian distributions. This assumption is tested using the method
 Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
-------	----	---------	------------------------

Morfina	0.3000	>0.10	Yes
Salina	0.2305	>0.10	Yes
Fuc 1,0	0.2305	>0.10	Yes
Fuc 20,0	0.2371	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	2137.0	712.33
Residuals (within columns)	16	16.800	1.050
Total	19	2153.8	

$$F = 678.41 = (MStreatment/MSresidual)$$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Morfina	5	35.000	1.225	0.5477	35.000
Salina	5	11.200	0.8367	0.3742	11.000
Fuc 1,0	5	10.800	0.8367	0.3742	11.000
Fuc 20,0	5	11.400	1.140	0.5099	11.000

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
Morfina	34.000	37.000	33.480	36.520
Salina	10.000	12.000	10.161	12.239
Fuc 1,0	10.000	12.000	9.761	11.839
Fuc 20,0	10.000	13.000	9.985	12.815

* * *

Placa Quente Tempo 90'

 One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant. Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.046 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
Morfina vs Salina	15.800	35.330	*** P<0.001
Morfina vs Fuc 1,0	16.600	37.119	*** P<0.001
Morfina vs Fuc 20,0	16.200	36.224	*** P<0.001
Salina vs Fuc 1,0	0.8000	1.789	ns P>0.05
Salina vs Fuc 20,0	0.4000	0.8944	ns P>0.05
Fuc 1,0 vs Fuc 20,0	-0.4000	0.8944	ns P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval	
		From	To
Morfina - Salina	15.800	13.991	17.609
Morfina - Fuc 1,0	16.600	14.791	18.409
Morfina - Fuc 20,0	16.200	14.391	18.009
Salina - Fuc 1,0	0.8000	-1.009	2.609
Salina - Fuc 20,0	0.4000	-1.409	2.209
Fuc 1,0 - Fuc 20,0	-0.4000	-2.209	1.409

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 0.6833

The P value is 0.8771.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is not significant.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
-------	----	---------	------------------------

Morfina	0.2371	>0.10	Yes
Salina	0.2371	>0.10	Yes
Fuc 1,0	0.2305	>0.10	Yes
Fuc 20,0	0.2305	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	985.75	328.58
Residuals (within columns)	16	16.000	1.000
Total	19	1001.8	

$$F = 328.58 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Morfina	5	27.400	1.140	0.5099	27.000
Salina	5	11.600	1.140	0.5099	12.000
Fuc 1,0	5	10.800	0.8367	0.3742	11.000
Fuc 20,0	5	11.200	0.8367	0.3742	11.000

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
Morfina	26.000	29.000	25.985	28.815
Salina	10.000	13.000	10.185	13.015
Fuc 1,0	10.000	12.000	9.761	11.839
Fuc 20,0	10.000	12.000	10.161	12.239

* * *

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)