



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

EVANDRO VALENTIM DA SILVA

**BIOATIVIDADE DE *Caulerpa taxifolia* (VAHL) AGARDH
(1817), (CAULERPACEAE) NA ANGIOGÊNESE E NA
VASCULOGÊNESE DE CÉLULAS TUMORAIS**

RECIFE

2016

EVANDRO VALENTIM DA SILVA

**BIOATIVIDADE DE *Caulerpa taxifolia* (VAHL)
AGARDH (1817), (CAULERPACEAE) NA
ANGIOGÊNESE E NA VASCULOGÊNESE DE
CÉLULAS TUMORAIS**

Tese apresentada ao Programa de PósGraduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Pernambuco, como um dos requisitos para à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. IVONE ANTÔNIA DE SOUZA

COORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. FÁLBA BERNADETE RAMOS DOS ANJOS

RECIFE

2016

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586b Silva, Evandro Valentim da.
Bioatividade de *Caulerpa taxifolia* (VAHL) Agardh (1817),
(Caulerpaceae) na angiogênese e na vasculogênese de células tumorais /
Evandro Valentim da Silva. – 2016.
172 f.: il.; tab.; quad.; 30 cm.

Orientador: Ivone Antônia de Souza.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2016.

Inclui referências.

1. Algas marinhas. 2. Angiogênese. 3. Vasculogênese. 4. *Caulerpa taxifolia*. 5. Antitumoral. I. Souza, Ivone Antônia de (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2017-231)

EVANDRO VALENTIM DA SILVA

**BIOATIVIDADE DE *Caulerpa taxifolia* (VAHL) AGARDH (1817),
(CAULERPACEAE) NA ANGIOGÊNESE E NA VASCULOGÊNESE DE
CÉLULAS TUMORAIS**

RECIFE, 13 DE SETEMBRO DE 2016

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de PósGraduação em
Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito
parcial à obtenção do título de
Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Prof.^a Dr.^a. IVONE ANTÔNIA DE SOUZA

Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. JAMERSON FERREIRA DE OLIVEIRA

Departamento de Antibióticos Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a. VIVIANE DE ARAÚJO GOUVEIA

Universidade Federal de Pernambuco campos Vitória de Santo Antão

Prof.^a Dr.^a. JANE SHEILA HIGINO

Departamento de Ciências Farmacêuticas Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a DANIELA MARIA BASTOS DE SOUZA

Universidade Federal Rural de Pernambuco



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**REITOR
ANISIO BRASILEIRO DE FREITAS DOURADO**

**VICE-REITOR
FLORESBELA DE ARRUDA CAMARA E SIQUEIRA CAMPOS**

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
IRANI RODRIGUES CARVALHO NETO**

**DIRETOR DE CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
NICODEMOS TELES DE PONTES FILHO**

**VICE-DIRETOR DE CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
VÂNIA PINHEIRO RAMOS**

**CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACEUTICAS
ANTÔNIO RODOLFO DE FARIA**

**VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACEUTICAS
ELBA LÚCIA CAVALCANTI DE AMORIM**

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
ALMIR GONÇALVES WANDERLEY**

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
RAFAEL MATOS XIMENEZ**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, por tudo que consegui e venho conseguindo realizar.

A minha mãe, pelo apoio e estímulo que tem feito.

A minha família, minha base, por me acolher em todos os momentos.

Ao meu amor, amiga e companheira Carla Andrea de Moura pelo carinho e compreensão nos momentos de dificuldade.

Aos meus irmãos Inaldo e Inalda pelo apoio.

A minha sobrinha Maryana pelos momentos de descontração.

A minha Orientadora, Prof. Dr^a. Ivone Antônia de Souza, pela confiança a mim dispensada, pela amizade, paciência, incentivo, compreensão e respeito dispensado a mim na realização deste trabalho.

A minha Coorientadora Prof^a. Dr^a. Fálba Bernadete Ramos dos Anjos, por tudo que tem contribuído na realização deste trabalho.

Aos professores George Jimenez e José Ferreira Silva Neto pelo apoio na realização deste trabalho.

A Doutoranda Gabriela Cavalcanti da Silva, pela colaboração durante a realização dos experimentos.

Aos amigos do laboratório de cancerologia experimental, Lívia Nara; Matheus, Amanda, Waneska, Isabela e Jefferson pela colaboração durante a realização dos experimentos.

Aos amigos do laboratório de Toxicidade e Comunicação Celular e Wagner, Dazianne, Malú, Mosar, Willians, Romário, Vinícius, Miranildo e demais amigos.

As Bibliotecárias, Morgana Lins e Monica Uchoa pela ajuda na formatação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao Presidente do Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Prof^o Dr. Almir Gonçalves Wanderley.

Aos Professores que fazem parte do corpo docente da Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas.

As Professoras membros da Banca Examinadora Prof. Dr. Jamerson Ferreira de Oliveira, Prof^a. Dr^a. Jane Sheila Higino, Prof^a. Dr^a. Viviane de Araújo Gouveia e ao Prof. Dr. George Chaves Jimenez, pela gentileza em aceitar o conviete.

A Secretaria da Pós-Graduação Nerilin Trajano pelo apoio administrativo.

A Universidade Federal de Pernambuco pela estrutura fornecida em todas as etapas da realização desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se tornasse possível.

“Dedico este trabalho a minha filha Olga Letícia”

RESUMO

Dentre muitos mecanismos, a estimulação da angiogênese leva ao aumento da secreção de fatores vaso-indutores e diminuição dos inibidores. O presente estudo avaliou as interferências dos extratos hidroalcolico (EHA - 50 µg/mL) e metanólico (EM - 50 µg/mL) de *Caulerpa taxifolia* no metabolismo energético e na Angiogênese de embriões de *Gallus gallus domésticos* L. Ovos vermelhos da raça Rhode Island Red de quatro lotes, foram incubados a 37° C, com viragem automática, para o estudo do metabolismo energético e da angiogênese. Os grupos foram distribuídos e divididos em grupos controle, tratados EHA (50 µg/mL) e ME (50 µg/mL), e controle enriquecidos com ω-3, com e sem tumor. No estágio de 288 horas, o desenvolvimento foi interrompido. Os vasos foram quantificados e caracterizados morfológicamente e os embriões fotografados, fixados e processados. Os resultados do metabolismo energético indicaram que não houve diferença significativa entre grupos controle e tratado normal, contudo os animais com tumores induzidos com EHA e ME e os enriquecidos com ω-3 apresentaram resposta significativa quando comparados ao controle ($p \leq 0,05$). Foi observado que as propriedades físicas e a integridade estrutural da casca dos animais controle tumorado apresentaram anomalias de formação: casca rugosa, áspera e mole. Os parâmetros morfométricos não apresentaram significância entre os grupos ($p \leq 0,05$). Em relação a vasculogênese e angiogênese houve uma redução significativa entre grupos normais e tumorados. Os vasos apresentaram uma discreta redução do calibre quando comparado ao grupo controle ($p \leq 0,05$). O aspecto microscópico da membrana amniótica dos organismos tratados com o EHA e ME, dos grupos normal e tumorado mantiveram a morfologia preservada ao longo do tratamento. O tecido cardiovascular de embriões controle com tumor apresentou pontos hemorrágicos e uma congestão no lúmen do vaso, talvez em função da presença da malignidade das células. A microscopia da medula encefálica se manteve preservada. Nos embriões controle tumorados ela se apresentou pouco conservada, com vasos congestionados na região do manto, possivelmente por interferência da ação do tumor no tecido analisado. Estes biocompostos apresentaram ainda efeito antivasculogênico e antiangiogênico, sem comprometer a anatomia macroscópica e microscópica dos organismos tratados durante o desenvolvimento embrionário. Diante do presente exposto, conclui-se que os compostos presentes nos extratos de *Caulerpa taxifolia* pode ser considerada um potencial agente antitumoral de origem marinha, que talvez atue nos mecanismos intrínsecos relacionados com a matriz extracelular, estabilizando e remodelando a estrutura vascular e a capacidade de indução da neovasculogênese.

Palavras-chave: Algas marinhas. Angiogênese. Vasculogênese. *Caulerpa taxifolia*. Antitumoral.

ABSTRACT

The neovascularization is an important mechanism in tumor development, is responsible for nutritional support to cancer cells proliferating and establishing favorable conditions for metastatic spread. Among many mechanisms, stimulation of angiogenesis leads to increased secretion of vaso-inducing factors and decreased inhibitors. This study evaluated the interference of hydroalcoholic extracts (EHA - 50 mg / mL) and methanol (MS - 50 ug / ml) of *Caulerpa taxifolia* in energy metabolism and angiogenesis of *Gallus gallus domesticus* embryos L. Red breed eggs Rhode Island Red four batches were incubated at 37 C with automatic turning, for study of energy metabolism and angiogenesis. The groups were divided in control groups treated EHA (50 g / mL) and ME (50 ug / ml) and control enriched with ω -3, with and without tumor. In stage age of 288 hours, the development was stopped. The vessels were quantified and characterized morphologically and photographed embryos, fixed and processed. The results of energy metabolism showed no significant difference between control group and the normal treaty, yet tumorados animals treated with EHA and ME and enriched with ω -3 showed significant response compared to control ($p \leq 0.05$). It was observed that the physical properties and structural integrity of the shell tumorado control animals showed formation of defects: rough skin, rough and soft. The morphometric parameters showed no significant difference between the groups ($p \leq 0.05$). For vasculogenesis and angiogenesis was significantly reduced between normal groups and tumorados. The vessel had a slight reduction in size compared with the control group ($p \leq 0.05$). The microscopic aspect of amniotic membrane bodies treated with EHA and ME, the tumorado groups remained normal and preserved morphology throughout the treatment. The cardiovascular tissue with tumor control embryos showed bleeding points and congestion in the vessel lumen, perhaps due to the presence of malignant cells. The brain marrow microscopy remained preserved. However, in tumorados control embryos she had just saved with congested vessels in the mantle region, possibly by tumor action of interference in the analyzed tissue. These biocompounds still had antivasculogênico and antiangiogenic effect without compromising the macroscopic and microscopic anatomy of organisms treated during embryonic development. Given the above this, it is concluded that the compounds present solution in *taxifolia* *Caulerpa* extracts can be considered as a potential antitumor agent of marine origin, which may act on the intrinsic mechanisms related to the extracellular matrix, stabilizing and reshaping the vascular structure and inducibility of neovasculogenesis.

Keywords: Seaweed. Angiogenesis. Vasculogenesis. *Caulerpa taxifolia*. Antitumor.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA		Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C1	_	Animais portadores de Carcinoma do grupo controle
C2	_	Animais portadores de Carcinoma do grupo padrão
C3	_	Animais portadores de Carcinoma do grupo tratado1
C4	_	Animais portadores de Carcinoma do grupo tratado2
<i>Ct</i>	-	<i>Caulerpa taxifolia</i>
IARC	-	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
INCA	-	Instituto Nacional do Câncer
ME	-	Metotrexato
NCI	-	National Cancer Institute
WHO	-	World Health Organization
OECD	-	Organisation for Economic Co-operation and Development
TGO	_	Transaminase Glutâmico Oxalacética
TGP	_	Transaminase Glutâmica Pirúvica
T1	_	Extrato metanólico de <i>Caulerpa taxifolia</i>
Vip	-	Via intraperitoneal
Vo	-	Via oral
S1		Animais portadores de Sarcoma 180 do grupo controle
S2	_	Animais portadores de Sarcoma 180 do grupo padrão
S3	_	Animais portadores de Sarcoma 180 do grupo tratado1
S4	_	Animais portadores de Sarcoma 180 do grupo tratado2
MMPs	-	Matriz Metaloproteinases

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 - Gravura da <i>Caulerpa taxifolia</i>	35
Figura 2 - <i>Caulerpa taxifolia</i> fixa em sedimento de fundo oceânico	36
Figura 3 - Reprodução de <i>Caulerpa taxifolia</i> evidenciando as mudanças no talo durante a gametogênese em torno de 24 h antes da liberação de gametas. (A) detalhe da fronde com despigmentação reticulada, (B) despigmentação reticulada dos talos com papilas.....	36
Figura 4 – Estrutura química da caulerpina	39
Figura 5 – Estrutura química do ácido caulerpínico.	39
Figura 6 – Estrutura química da caulerpicina	39
Figura 7 – Estrutura química da caulerpenina	40
Figura 8 – Estrutura química da caulerpina	40
Figura 9 – Estrutura química da trifarena	40
Figura 10 – Estrutura química do β -sitosterol.....	40
Figura 11 – Estrutura química do β -sitosterol	41
ARTIGO 1	
Figure 1 - Chemical structure caulerpina	67
Figure 2 - Features observed in the organs of animals treated with hydroalcoholic extract of <i>Caulerpa taxifolia</i> in the dose of 1000 mg / kg / ip. (A) lung is visualized in red purple color, (B) spleen hypertrophy and (C) points of hypertrophic and liver Ischemia	74
Figure 3 - Aspects observed macroscopically in the organs treated animals hydroalcoholic <i>Caulerpa taxifolia</i> extract, at a dose of 1000 mg / kg / ip. (A) Hypertrophic Stomach, (B) kidney and adrenal hyperplasia, (C) inflated bowel	74

Figure 4 - Photomicrograph of a liver of the animals treated with hydroalcoholic at a dose of 1000 mg/ kg/ip (A and B), 1 central artery and 2 - liver sinusoids were congested, 3 - hepatócitos apparently preserved, 4 - bleeding points vascular congestion is observed, (C) control with estruras seemingly preserved. HE staining. 40x Obj. 75

Figure 5 - Photomicrograph of mouse testis showing light seminiferous tubule (1) interstitial tissue and the Leydig cells (2) apparently preserved disorganization of germ cells from which they were between the Sertoli cell (3), seminiferous tubules totally disorganized (4) the group treated with hydroalcoholic extract of *C. taxifolia* at a dose of 1000 mg / kg / ip, stained with HE. Obj.10x.. 75

Figure 6 - Renal Fotomicrografia: (A) Animals treated with hydroalcoholic *Caulerpa taxifolia* at a dose of 1000 mg / kg / ip. Kidney tissue morphology apparently conserved both as peripheral cortical region was observed in the distal convoluted tubules (1) and proximal (2). Glomeruli (3) and macula densa (4) preserved. (B) estutures the control group had apparently preserved. HE staining. Obj.40X..... 76

Figure 7 - Photomicrograph of the spleen: (A) animals treated with hydroalcoholic *Caulerpa taxifolia* at a dose of 1000 mg/kg/ip. 1 - Cells of the red pulp and 2 - cells in the white pulp of the spleen apparently preserved; (B) 3 - cells of the red pulp and 4 - Cells white pulp of the spleen apparently preserved in the control group. HE staining Obj. 40x 77

Figure 8 - Photomicrograph of the lungs: (A) Condensation of inflammatory cells around the bronchi and bronchioles, the bronchial epithelium and bronchial changed in the animals treated with hydroalcoholic *Caulerpa taxifolia* at a dose of 1000 mg/ kg/ip; (B) Structures morphologically preserved in the control group. (A) 1 Pulmonary artery, 2 respiratory epithelium apparently preserved, (B) structures apparently preserved in the control group. HE staining. Obj.40x..... 77

ARTIGO 2

Figure 1 – Hepatic tissue (A) and (B) renal tissue stained in the HE observed in optical microscope . 10 x 93

Figure 2 – Histologic cut of the testis and lung (B) stained in the HE observed in optical microscope. 10 x 94

Figure 3 – Histologic cut of the testis and lung (B) stained in the HE observed in optical microscope 95

ARTIGO 3

Figura 1 – Média da massa tumoral (em gramas) dos animais dos grupos (n=6) Controle, padrão, tratado 1, e tratado 2. Portadores de Carcinoma de Ehrlich..... 102

Figura 2: A- fígado animal portador de carcinoma Ehrlich tratado com hidroetanólico; B- rim; C- baço; D- pulmão..... 104

Figura 3: A- Fígado, baço, rim e pulmão de animais portadores de carcinoma de Ehrlich tratados com extrato metanólico de *C. taxifolia* na dose de 50 mg/kg..... 105

ARTIGO 4

Figura 1- Contorções abdominais apresentada pelos animais durante o tratamento..... 117

Figura 2 - Fotomicrografia de cicatrização cutânea de animais. Grupo tratado com extrato inorgânico durante 7 (A); 14 (B) e 21 dias (C). Coloração de Hematoxilina-Eosina 40 x 118

Figura 3 - Fotomicrografia de cicatrização cutânea de animais. Grupo tratado com extrato orgânico durante 7 (A); 14 (B) e 21 dias (C). Coloração de Hematoxilina-Eosina 40 x 118

ARTIGO 6

Figura 1- Fotomicrografia dos vasos de embrião com 288 horas de desenvolvimento evidenciando membrana corioalantóica (MC); Vasculogênese (VG) e Angiogênese.400x 149

Figura 2 - Fotomicrografia de cortes transversais da membrana do epitelio amniótico corado com hematoxilina-eosina (HE) de embriões de *Gallus gallus domesticus* L. Com idade de 288 horas. 400 x 150

Figura 3 - Fotomicrografia de corte frontal da membrana do coração corado com hematoxilina-eosina (HE) de embriões de *Gallus gallus domesticus* L. Com idade de 288 horas. 400 x 151

Figura 4 - Fotomicrografia de cortes transversais do tecido cardíaco corado com hematoxilina-eosina (HE) de embriões de *Gallus gallus domesticus* L. Com idade de 288 horas. 400 x 152

Figura 5 - Fotomicrografia de cortes transversais da medula espinhal corado com hematoxilina-eosina (HE) de embriões de *Gallus gallus domesticus* L. Com idade de 288 horas. 400 x 154

Figura 6 - Fotomicrografia de corte transversal da medula espinhal (me) corado com hematoxilina-eosina (HE) de embriões de *Gallus gallus domesticus* L. Com idade de 288 horas. 400 x..... 155

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 – Classification of toxicity of substances seconds70

Tabela 1 – Table dose response of the hydroalcoholic extract of *Caulerpa taxifolia* administered intraperitoneally in albino mice (*Mus musculus*). 72

ARTIGO 2

Tabela 1 – Avedeges and standard deviations of the animals (*Mus musculus*) of Sarcoma 180 (EN) and PT/PA relations of control groups (S1) (control with saline 0.9 via ip), standard (S2) 10 mg/kg cyclophosphamide ip, treat with meoh extract of *Caulerpa taxifolia* at a dose of 50 mg/kg/ip (SA)..... 91

Tabela 2 - Avedeges and standard deviations the between the hematological data obtained by colorimetric method descritbed in Frankel and Rreitman (1957) (*Mus musculus*). 91

ARTIGO 3

Tabela 1 - Médias e desvios padrões da razão entre pesos dos animais (PA) (*Mus musculus*), dos Carcinoma de Ehrlich (PT) e das relações PT/PA dos grupos C1 (grupo controle) recebeu solução salina 0,9 via ip, o grupo C2 (grupo padrão) foi tratado com Metotrexato 10 mg/kg/ip, o grupo C3 recebeu o Extrato metanólico de *C. taxifolia* (grupo tratado 1) na dose de 50 mg/kg/ip, e ao grupo C4 foi administrado o extrato hidroalcoólico de *C. taxifolia* (grupo tratado 2) na dose de 50 mg/kg/ip101

Tabela 2: Media \pm erro padrão da média das Taxas metabólicas específicas dos animais (TXM_{AC}), dos tumores Carcinoma de Ehrlich (TXM_{TC}), e da razão entre TXMAC / TXM_{TC} dos grupos controle, padrão e tratados com o extrato hidroetanólico e tratados com o extrato metanólico de *C. taxifolia*..... 102

Tabela 3 – Médias e desvios padrões dos dados bioquímicos obtidos pelo método colorimétrico descrito em Frankel e Reitman (1957) dos animais (*Mus musculus*) portadores de Carcinoma de Ehrlich dos grupos controle (C1) (controle com solução salina 0,9 via ip), padrão (C2) (padrão com Metotrexato 10 mg/kg/ip), tratado com

extrato metanólico na dose de 50 mg/kg/ip (C3), tratado com extrato hidroalcoólico na dose de 50 mg/kg/ip (C4). 103

ARTIGO 4

Tabela 1. Efeito do extrato hidroetanólico e metanólico de *Caulerpa taxifolia* sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético (n = 6). 116

ARTIGO 5

Tabela 1 – Percentuais de atividade antioxidante pelo método de Tiocianato Férrico expressos pelo extrato hidroalcoólico, extrato metanólico, e do extrato aquoso de *Caulerpa taxifolia* 132

Tabela 2- Valores de absorbância apresentado pelas amostras..... 133

ARTIGO 6

Tabela 1 – Percentual e anomalias da casca de ovos (n= 30 por grupo) de *Gallus gallus domesticus* L., com idade de 288 horas mostrando dos Grupos dos Grupos Controle (0,9 %); Tratado EHA (50 µg/mL); Tratado ME (50 µg/mL) e Tratado ω-3 Tratados, Controle Tumorado (0,9 %); Tratado EHA Tumorado (50 µg/mL), Tratado ME Tumorado (50 µg/mL), Tratado ω-3 Tumorado 146

Tabela 2 – Parâmetros morfométricos do diâmetro, altura e camadas do manto e marginal da medula espinhal de embriões (n= 30 por grupo), de *Gallus gallus domesticus* L., com idade de 288 horas dos Grupos Controle (C); Tratado EHA; Tratado ME e Tratado ω-3 Tratados, Controle Tumorado (CT); Tratado EHA Tumorado (T TEHA), Tratado ME Tumorado (T TME), Tratado ω-3 Tumorado (T T ω-3), Tratado com Metotrexato (10 mg/mL). 155

Tabela 3 – Parâmetros morfométricos do diâmetro e altura do canal central espinhal, espaço direito e esquerdo da medula espinhal de embriões (n= 30 por grupo), de *Gallus gallus domesticus* L., com idade de 288 horas mostrando dos Grupos dos Grupos Controle (C); Tratado EHA; Tratado ME e Tratado ω-3 Tratados, Controle Tumorado (CT); Tratado EHA Tumorado (T TEHA), Tratado ME Tumorado (T TME), Tratado ω-3 Tumorado e Tratado com Metotrexato (10 mg/mL) (T T ω-3). 156

Tabela 4 – Parâmetros morfométricos do diâmetro da cabeça e diâmetro e altura do encéfalo de embriões (n= 30 por grupo), de *Gallus gallus domesticus* L., com idade de 288 horas mostrando dos Grupos dos Grupos Controle (C); Tratado EHA; Tratado ME e Tratado ω-3 Tratados, Controle Tumorado (CT); Tratado EHA Tumorado (T TEHA), Tratado ME Tumorado (T TME), Tratado ω-3 Tumorado (T T ω-3) e Tratado com Metotrexato (10 mg/mL). 156

LISTA DE QUADROS E GRÁFICOS

Artigo 1

Graph 1 - dose response curve: number of deaths in relation to dose of crude hydroalcoholic extract of *Caulerpa taxifolia* intraperitoneally.....73

Artigo 5

Gráfico 1 – Valores médios de absorbância a 500 nm do extrato hidroalcolóico, extrato metanólico e do extrato aquoso da macroalga marinha *Caulerpa taxifolia* ...131

Gráfico 2 – Potencial apresentado pelos extratos *Caulerpa taxifolia* para sequestrar o peróxido de hidrogênio..... 133

Artigo 6

Gráfico 1 – Média (x) das quantidades dos vasos, no processo da Vasculogênese dos embriões de *Gallus gallus domesticus* L. com idade de 288 horas dos..... 147

Gráfico 2 – Média (x) das medidas dos vasos, no processo da Vasculogênese dos embriões de *Gallus gallus domesticus* L. com idade de 288 horas dos..... 148

Gráfico 3 – Média (x) e erro padrão (sd) do comprimento corporal total (cefálicocervical-caudal) (cm) e do peso (g) dos embriões de *Gallus gallus domesticus* L. com idade de 288 horas dos..... 153

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVOS GERAIS	23
2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS	23
3	REVISÃO DA LITERATURA	25
3.1	COMPOSTOS NATURAIS	25
3.2	PRODUTOS NATURAIS E TERAPIA ANTICANCER	26
3.3	ASPECTOS BOTÂNICOS	26
3.3.1	ORDEM HALIMEDALES	27
3.3.1.1	GÊNERO <i>Caulerpa</i>	28
3.3.1.1.1	ESPÉCIE <i>Caulerpa taxifolia</i>	28
3.4	ASPECTOS FITOQUÍMICOS	31
3.5	CÂNCER	35
3.6	ANALGESIA	35
3.7	DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE <i>Gallus</i>	36
3.7.1	<i>gallus domésticos</i> Vasculogênese e Angiogênese.	40
3.7.2	Fisiologia e Farnacologia da Hematopoiese e Imunomodulação.	46
4	ARTIGO I: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE <i>Caulerpa</i> <i>taxifolia</i> POR VIA ORAL	
4.1	INTRODUÇÃO	62
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	63
4.3	RESULTADOS	66
4.4	DISCUSSÃO	72
4.5	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS	75
5	ARTIGO II: ANTITUMOR ACTIVITY of EXTRACTS of <i>Caulerpa taxifolia</i> in the SARCOMA 180 TUMOR	
5.1	INTRODUÇÃO	84
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	86
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
	REFERÊNCIAS	94
6	ARTIGO III: ATIVIDADE ANTITUMORAL DE EXTRATO DE <i>Caulerpa taxifolia</i> NO TRATAMENTO	
6.1	INTRODUÇÃO	92
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	93
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
6.4	CONCLUSÃO	100
	REFERÊNCIAS	

	Caulerpa taxifolia EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO.	
7.1	INTRODUÇÃO	99
7.2	MATERIAL E MÉTODOS	100
7.3	RESULTADOS	104
7.4	DISCUSSÃO	106
	REFERÊNCIAS	108
8	Avaliação da atividade antioxidante de extratos obtidos a partir da macroalgas marinha Caulerpa taxifolia	
8.1	INTRODUÇÃO	114
8.2	MATERIAL E MÉTODOS	115
8.3	RESULTADOS	117
8.4	DISCUSSÃO	119
8.5	CONCLUSÃO	122
	REFERÊNCIAS	122
9	BIOATIVIDADE DE <i>Caulerpa taxifolia</i> (Vahl) Agardh (1817) NO METABOLISMO E NA VASCULOGÊNESE DE CÉLULAS TUMORAIS.	
9.1	INTRODUÇÃO	126
9.2	MATERIAL E MÉTODOS	127
9.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	128
	REFERÊNCIAS	141
10	CONCLUSÃO	144
	REFERÊNCIAS	146
	ANEXOS	165

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença não transmissível que mais cresceu na população brasileira sendo principal responsável pela mudança nas causas destes índices, e vários fatores explicam sua alta incidência na população brasileira, entre eles podemos citar: a maior exposição a agentes cancerígenos, os atuais padrões de vida adotados em relação ao trabalho. À alimentação e o consumo, de modo geral que expõem os indivíduos a fatores ambientais (agentes químicos, físicos e biológicos) resultantes de mudanças no estilo de vida das pessoas e do processo de industrialização cada vez mais intenso (INCA, 2012).

Assim, para garantir a progressão do tumor, as células neoplásicas modificam seu fenótipo a fim de promover alterações funcionais, estimulando a produção de fatores angiogênicos, os quais se ligam a receptores específicos nas células endoteliais pré-existentes, levando a formação de novos vasos sanguíneos (LEE et al., 2007; YU; MOHAN; NATARAJAN, 2012).

A neovascularização é caracterizada pelo crescimento e desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, um processo normal e essencial na cicatrização de feridas e formação de tecidos (HALL et al., 2005). No entanto, também é um passo fundamental na oncogênese, bem como, no crescimento do tumor, a fim de fornecer nutrientes e oxigênio para progressão e proliferação das células tumorais, contribuindo para a formação de metástases (TAKAHASHI; SHIBUYA, 2005; GAVALAS et al., 2013).

Este processo ocorre durante o desenvolvimento e remodelação vascular em uma série controlada de eventos que se inicia a partir de capilares pré-existentes no tumor. O tamanho tumoral pode alcançar aproximadamente 1-2 mm³, antes de suas demandas metabólicas serem restritas devido ao limite de difusão de oxigênio e nutrientes no local (CARMELIET; JAIN, 2011). De acordo com a sua gravidade, a ausência de oxigênio pode tanto promover apoptose como impedir a morte das células, conduzindo a respostas biológicas que induzem o crescimento tumoral (SADRI; ZHANG, 2013).

O processo da angiogênese envolve um número sequencial de etapas: inicialmente, as células endoteliais são ativadas por fatores pro-angiogênicos produzidos e liberados pelas células tumorais. Em seguida, as células endoteliais pré-existentes secretam enzimas proteolíticas, tais como as Matriz Metaloproteinases

(MMPs) para a degradação da membrana basal e matriz extracelular. Assim, inicia-se a proliferação e migração das células endoteliais para formação de um novo vaso sanguíneo. Finalmente, ocorre a ligação das células denominadas “*tips cells*” nas células endoteliais dos novos capilares, o novo lúmen e uma nova membrana basal são formados (GRIZZI et al., 2005; WEIS; CHERESH, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo visou avaliar a bioatividade de *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817), (CAULERPACEAE) no metabolismo e na vasculogênese de células tumorais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção do extrato hidroalcoólico e metanólico de *Caulerpa taxifolia* (VAHL) AGARDH (1817);
- Obtenção da caracterização bioquímica do extrato hidroalcoólico e metanólico de *Caulerpa taxifolia* (VAHL) AGARDH (1817);
- Avaliar a toxicidade aguda por via intraperitoneal e determinar a DL₅₀ com o extrato hidroalcoólico de *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817) em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*);
- Determinar o efeito da administração do extrato hidroalcoólico e metanólico de *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817) quanto à inibição do Sarcoma 180 e Carcinoma de Erlich em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*);
- Avaliar a atividade do extrato hidroalcoólico e metanólico de *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817) em modelo de cicatrização;
- Verificar o efeito antinociceptivo do extrato hidroalcoólico e metanólico de *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817) através do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético;
- Identificar as alterações no desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domésticos* tratados com o extrato hidroalcoólico de *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817);
- Estudar a vasculogênese e angiogênese no desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus* tratados com o extrato hidroalcoólico de *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817);

- Evidenciar os efeitos metabólicos no desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domesticus* tratados com o extrato hidroalcoólico e metanólico de *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 COMPOSTOS NATURAIS

A triagem de produtos naturais tem guiado inúmeras pesquisas na busca de substâncias promissoras para obtenção de novas drogas antineoplásicas (MAGALHÃES, 2005). Nesta área de pesquisa anticâncer, 74 % das substâncias introduzidas como fármacos até 2003 derivaram de produtos naturais (ROUHI, WASHINGTON, 2003).

As mortes por câncer estão projetadas para continuar a subir, sendo que mais de 70% ocorrem em países de baixa e média renda, que não possuem recursos suficientes para diagnóstico, tratamento e prevenção (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). A completa eliminação dos tumores é um dos grandes desafios da medicina e resultados promissores têm sido obtidos com várias espécies vegetais no Brasil (ALMEIDA et al., 2005; PINTO et al., 2002).

Nos últimos anos, foi possível a vários pesquisadores identificar e/ou isolar compostos bioativos que exibem atividade anticâncer, explorando o fracionamento de extratos por meio de atividades biomonitoradas, através de ensaios de citotoxicidade in vitro, podendo levar a avaliações in vivo quando há interesse, revelando centenas de compostos com atividade anticâncer (MANGAL et al., 2013).

A atividade biológica apresentada por espécies do gênero *Caulerpa* está relacionada principalmente com a caulerpina e estas espécies podem apresentar mais sete compostos de interesse farmacológico, ácido caulerpínico, caulerpenina, caulerpicina, trifarina, colesterol, β -sitosterol, colesteno. A atividade antitumoral da caulerpina, que é o metabólito secundário mais complexo sintetizado por *Caulerpa taxifolia*, foi cientificamente comprovada através de modelos de estudo de cultivo de células utilizando oito linhagens diferentes de células tumorais, que foram inibidas de maior ou menor grau devido a sua atividade citostática. Possivelmente esta ação inibição talvez esteja relacionada com uma primeira interferência na fase S e outra interferência sobre a fase G2 pre-mitótica das células tumorais em estudo, sendo ainda necessária a análise com modelos de estudo que utilize animais com tumores transplantados para confirmar tais respostas inibitórias (FISCHEL et al., 1995).

No que diz respeito a espécies ocorrentes em Mato Grosso do Sul, várias apresentaram substâncias com potencial atividade anticâncer (FIGUEIREDO et al., 2011; GARCEZ et al., 2005; GARCEZ et al., 2006; GARCEZ et al., 2011; MATOS et al., 2006; SILVA et al., 2007; SIMIONATTO et al., 2010).

3.2 PRODUTOS NATURAIS E A TERAPIA ANTICÂNCER

Produtos naturais, produzidos por organismos marinhos, micro-organismos e plantas, exibem, de maneira geral, considerável diversidade estrutural. Quando comparados a compostos orgânicos sintéticos, os produtos naturais apresentam tipicamente mais centros quirais, menos heteroátomicos, átomos de menor massa molecular, e sistemas de anel mais variados. Estes atributos fazem dos produtos naturais um recurso inestimável de diversidade química e, portanto, podem ser considerados como compostos farmacologicamente ativos em potencial ou como modelos para a otimização de métodos de química orgânica sintética na descoberta de fármacos com diferentes atividades, dentre elas atividade antitumoral (LIPAN, 2013).

A Oncologia Experimental procura estudar os mecanismos de desenvolvimento das neoplasias em modelos experimentais, assim como encontrar as possíveis formas de tratá-las (COSTA-LOTUFO, 2010).

O mecanismo antitumoral mais conhecido atualmente é o de indução seletiva das células tumorais a um mecanismo de morte celular denominado apoptose (SUBHASHINI et al., 2005).

A atividade de um fármaco antineoplásico baseia-se na busca de destruição de células tumorais, que têm como característica comum se dividirem muito mais rápido que a maioria das células normais. Porém, podem ocorrer efeitos secundários em células normais de crescimento rápido, como as gastrointestinais, capilares e as células sanguíneas (especialmente na medula óssea), causando efeitos como anorexia, diarreia, náusea, vômito, alopecia e maior susceptibilidade às infecções (BRANDÃO et al., 2010).

3.3 ASPECTOS BOTÂNICOS

Os organismos terrestres são os responsáveis por quase a totalidade dessas substâncias, enquanto que os organismos marinhos, apesar de promissores, passaram a ser investigados de maneira sistemática apenas recentemente (COSTA-LOTUFO; MONTINEGRO; ALVES; MADEIRA; PESSOA; MORAES; MORAES, 2009).

O Brasil possui uma enorme biodiversidade aquática e terrestre que está intimamente ligada com a rica herança sociocultural do país. No ambiente marinho as algas representa um dos maiores grupos em termos de diversidade (MARINHOSORIANO et al., 2011).

As algas verdes estão inseridas no filo Chlorophyta, constituindo o maior e mais diversificado grupo de algas, tanto em nível de espécie, como também de padrões morfológicos, estruturais e reprodutivos. Atualmente o filo encontra-se representado por 17.000 espécies (OLIVEIRA-CARVALHO, 2008).

De todas as algas, as verdes são os produtores menos prolíficos de produtos naturais, com menos de 300 compostos conhecidos e apenas um pequeno número de novos metabólitos secundários reportados a cada ano (BLUNT et al., 2010). As algas marinhas verdes são conhecidas por produzir substâncias semelhantes aos das algas vermelhas, principalmente os di e sesquiterpenoides, mas sem a extensa halogenação das substâncias das algas vermelhas (VIDAL, 2006).

As algas são um grupo de organismos com ampla diversidade de formas, fotossintéticos, polifilético, e apresentam grande importância no ecossistema. É confirmada a presença de mais de 3000 espécies que ocorrem no Brasil, e o grupo de algas verdes estão presentes em diversos habitats e representam grande diversidade de tipos morfológicos (BICUDO; MENEZES, 2010). A ocorrência delas é grande nos mares tropicais e subtropicais como os da costa brasileira, ainda assim precisam ser exploradas. Devido à abundância de algas no ecossistema, estas cada vez mais, tornam-se uma importante fonte de novos compostos bioativos para a indústria farmacêutica (PINTEUS, 2011).

Existem muitas espécies desse gênero, contudo a espécie *C. racemosa* e a *C. lentilífera* são as mais consumidas na alimentação asiática. Conhecidas como “caviar verde” ou “uvas do mar”, são constituídas de uma textura suculenta e macia e apresentam um gosto picante, onde geralmente são consumidas na forma de vegetais frescos em saladas (PEREIRA, 2011). Mesmo existindo algumas espécies consumidas, a *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* tornou-se conhecida pela liberação de substâncias tóxicas na fauna e flora (BEKÇI et al., 2009).

3.3.1 ORDEM HALIMEDALES

Esta ordem compreende um grupo de algas estritamente marinho, onde se encontram distribuídos os gêneros *Halimeda*, *Caulerpa* e *Penicillus*, o talo é sinfonado. O plastidoma é neoplastidial heteroplastidial, onde se observam dois tipos de plastídios: cloroplastos e amiloplastos, estes últimos sendo incolores e cheios de amido. O ciclo de vida é monogenético haplôntico. A fecundação é anisogâmica. O

conteúdo total se transforma em zoóides. Nunca ocorrem zoósporos estefanocontes. As paredes contêm xilanos e pouco ou nada de celulose (RAVIENRS; 2006).

3.3.1.1 GÊNERO *Caulerpa*

Este gênero é constituído por algas marinhas verdes bentônicas e seus representantes dotadas de um talo rastejante formado por uma porção rizomatosa que se expande ao longo do substrato, fixando-se através de estruturas denominadas rizóides muitas espécies deste gênero são encontradas no litoral brasileiro (SZE, 1998; JOLY, 2011). E alguns trabalhos relatam propriedades biológicas, tais como antiviral e anticoagulante (GHOSH et al., 2004; RODRIGUES; FARIAS, 2005)

3.3.1.1.1 ESPÉCIE *Caulerpa taxifolia*

C. taxifolia apresenta fronde similar a uma folha composta dos vegetais superiores, com o limbo dividido que lembra a folha de uma samambaia, um talo com aparência de um caule tipo estolão e rizoides que são estruturas utilizadas para sua fixação no substrato (RAVIENRS, 2006).

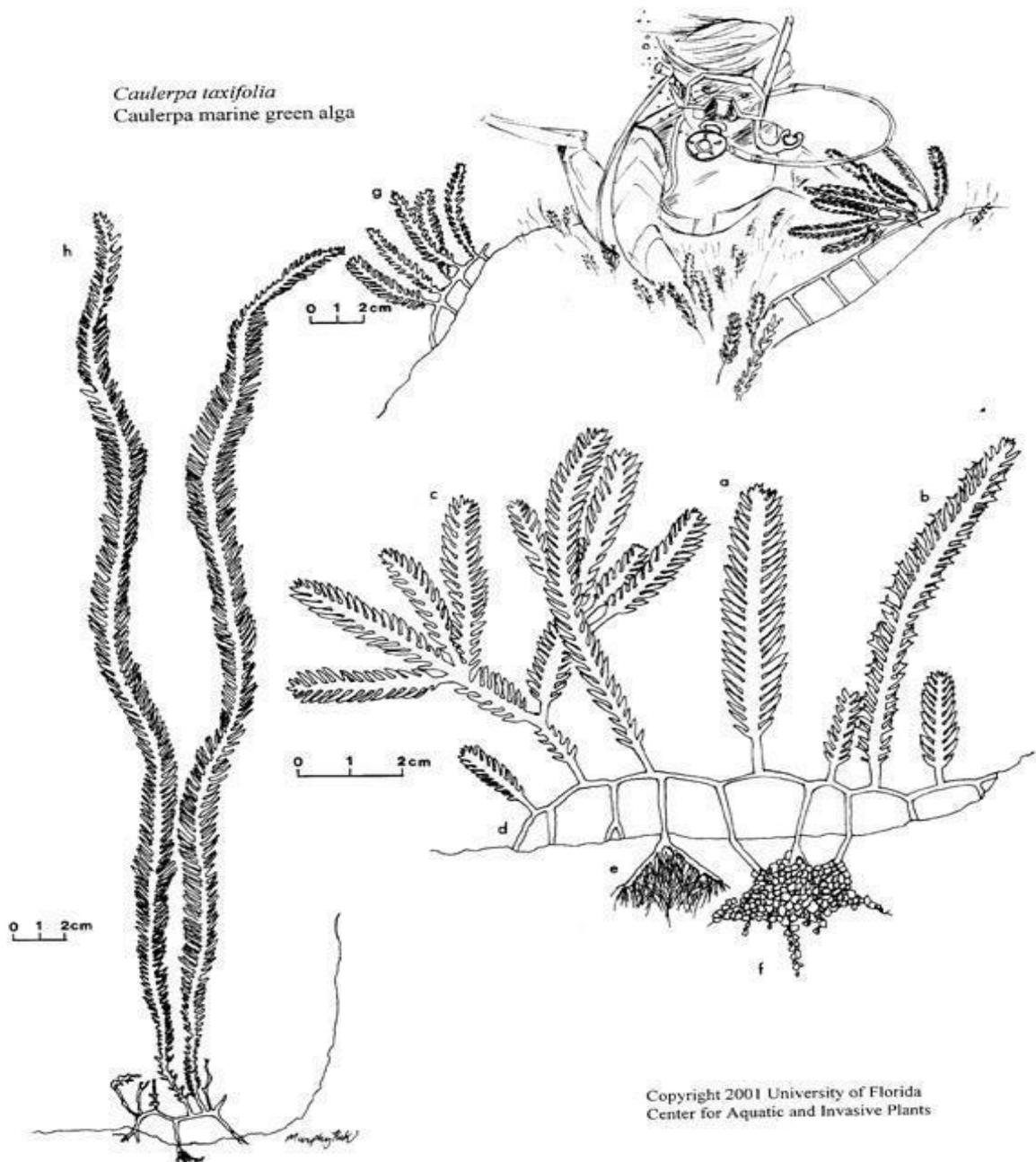


Figura 1 - Gravura da *Caulerpa taxifolia*

Fonte: Center for and Invasive Plants (2001).



Figura 2 – *Caulerpa taxifolia* fixa em sedimento de fundo oceânico

Fonte: RICHARD LING (2011).

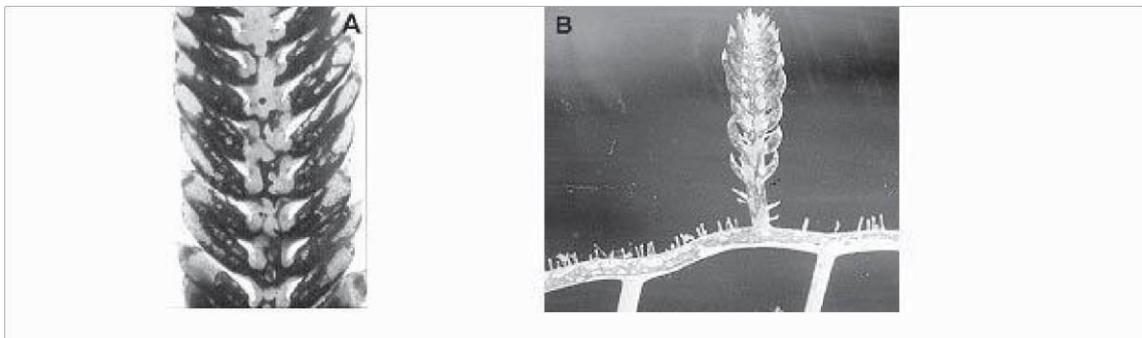


Figura 3 - Reprodução de *Caulerpa taxifolia* evidenciando as mudanças no talo durante a gametogênese em torno de 24 h antes da liberação de gametas. (A) detalhe da fronde com despigmentação reticulada, (B) despigmentação reticulada dos talos com papilas.

Fonte: ZULJEVIC; ANTOLIC (2000).

Caulerpa taxifolia é nativa de águas tropicais dos oceanos Índico, Pacífico e Atlântico, apresentando um crescimento rápido foi amplamente encontrada por toda

extensão do Noroeste do mar Mediterrâneo, onde provavelmente foi lançada depois da lavagem do Aquário do Museu de Mônaco, e que hoje continua a provocar danos ao ecossistema local, devido a sua rápida propagação (MEINESZ et al. 1997). Até o ano 2000, aproximadamente 131 km² havia sido colonizado o que abrangia a costa de seis países (Espanha, França, Mônaco, Itália, Croácia, e Tunísia). Desde então as invasões também têm ocorrido pelo oceano Pacífico na Califórnia, Japão e sul da Austrália.

(GLASBY et al., 2005; WEST, 2007).

3.4 ASPECTOS FITOQUÍMICO

Tendo em vista o processo adaptativo, e a capacidade de habitar em diversos ambientes, as algas produziram uma variedade de substâncias: ácidos graxos, esteroides, carotenoides, polissacarídeos, entre outras, e isso tem chamado a atenção da indústria farmacêutica, pois elas tem grande potencial antinociceptivo, antiinflamatório, antioxidante e antimicrobiano (CARDOZO et al., 2007; RIBEIRO et al., 2014). Para produzir todas essas substâncias, os seres vivos são dotados de ações ao nível celular, formando os metabólitos secundários. Diferentemente das grandes moléculas como DNA, proteínas e lipídios sem as quais as funções celulares não seriam possíveis, os metabólitos secundários não estão envolvidos diretamente nos processos de desenvolvimento e manutenção das condições vitais. Mesmo assim apresentam uma elevada diversidade estrutural, e são comumente usado tanto nas algas como nas plantas para sua proteção contra predadores (SUDATTI, 2010).

O halimedatriol, um trialdeído diterpênico, isolado de alga verde calcárea *Halimeda opuntia*, exibe ações inotrópicas positivas, potencializando a contração muscular esquelética, da mesma forma que a alga *Bryopsis pennata*. Este composto promove a inibição da divisão celular, e é um poderoso inibidor do comportamento alimentar de insetos. Possui também, forte atividade contra bactérias, fungos, peixes, espermatozoides, ovos fertilizados e larvas de ouriços do mar, sendo considerado um dos elementos mais ativos e bem estudados do grupo (HAY; FENICAL, 1988).

Organismos da ordem Caulerpales têm apresentado um quadro mais homogêneo que o esperado, exibindo sesquiterpenóides e diterpenóides bastante relacionados. Dentre os sesquiterpenóides conhecidos temos o rhipocephanal, isolado de *Rhipocephanal phoenix* (FENICAL, 1984).

O gênero *Caulerpa* apresenta diterpenos como a clorodesmina, isolada de *C. fastigiada*, relacionada com sesquiterpenóides e com diterpenóides observados em

algas do gênero *Halimeda*, como o halimedatrial, um alcalóide indólico, derivado do triptofano, isolado de espécies “tóxicas” de *Caulerpa* (AGUILAR-SANTOS, 1970; MAITTI, 1977). Entre outros compostos químicos presentes no gênero *Caulerpa*, destacam-se o alcaloide indolico caulerpina (Figura 5), ácido caulerpínico (Figura 6), a mistura de amidas denominadas caulerpicina (Figura 7), os terpenos caulerpina (Figura 8) e trifarina (Figura 9) e os esteroides: colesterol (Figura 10), β -sitosterol (Figura 11) e colesteno (Figura 12) (NAPRALERT, 2014).

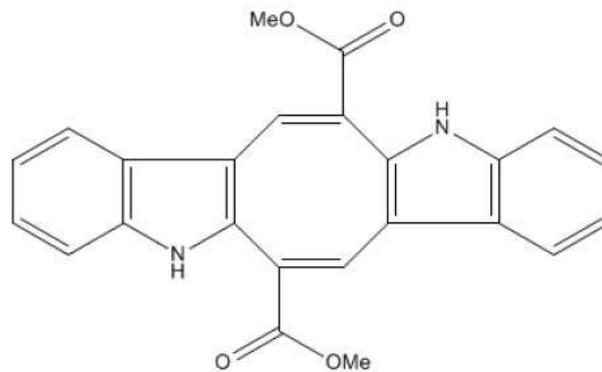


Figura 4 – Estrutura química da caulerpina

Fonte: NAPRALERT (2014).

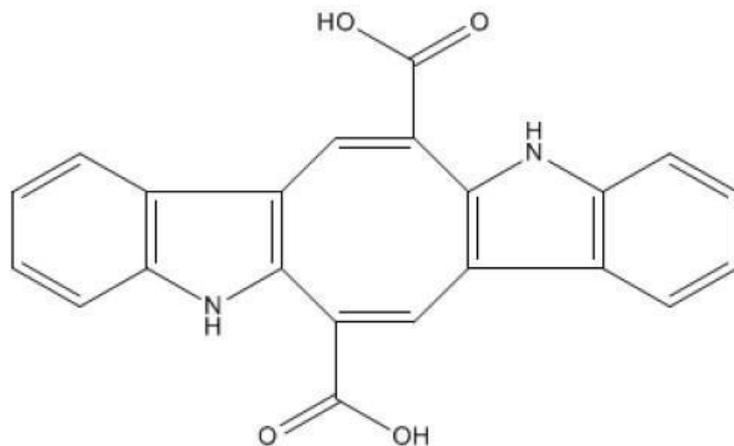


Figura 5 – Estrutura química do ácido caulerpínico

Fonte: NAPRALERT (2014).

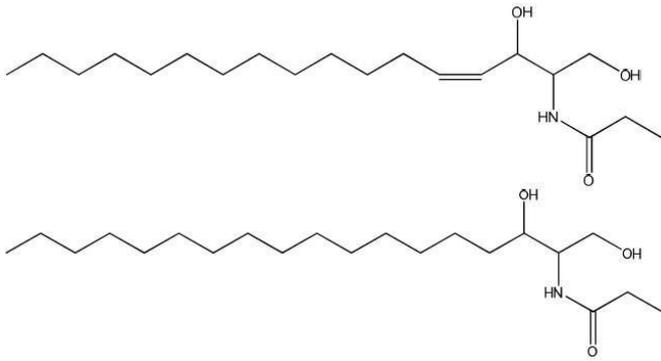


Figura 6 – Estrutura química da caulerpicina

Fonte: NAPRALERT (2014).

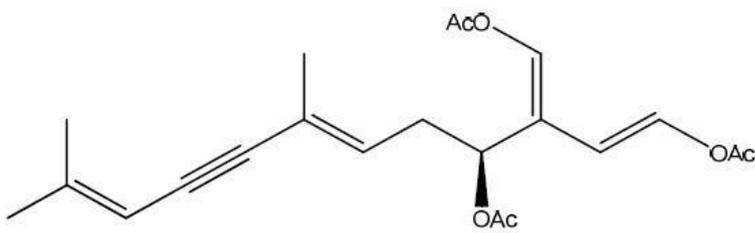


Figura 7 – Estrutura química da caulerpina

Fonte: NAPRALERT (2014).

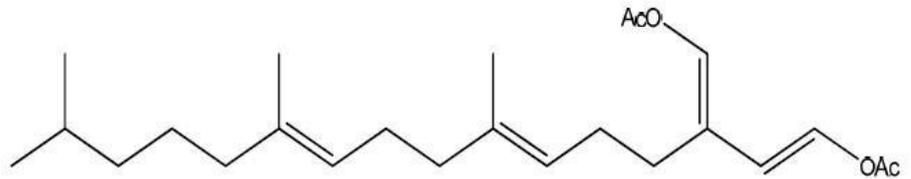


Figura 8 – Estrutura química do trifarina

Fonte: NAPRALERT (2014).

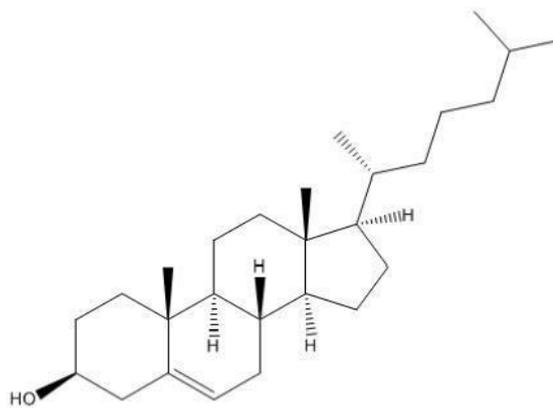


Figura 9 – Estrutura química do colesterol

Fonte: NAPRALERT (2014).

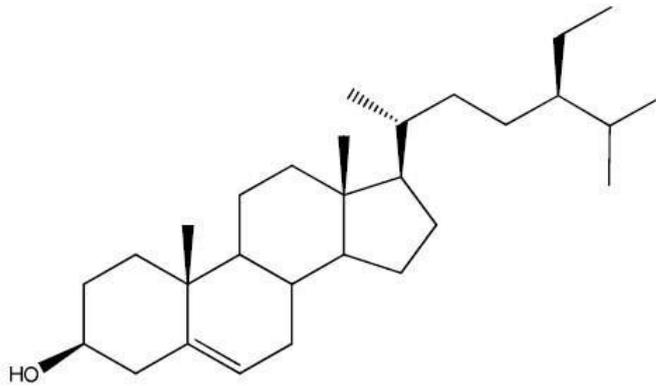


Figura 10 – Estrutura química do β -sitosterol Fonte: NAPRALERT (2014).

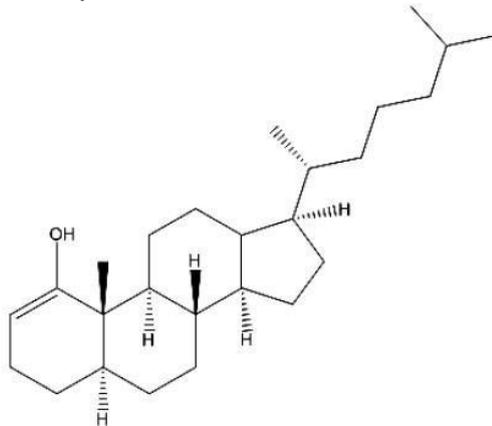


Figura 11 – Estrutura química do colestenoil Fonte: NAPRALERT (2014).

A caulerpenina, metabólito secundário majoritário encontrado em *C. taxifolia* foi analisada através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), obtendo-se como resultado uma diferença na concentração da substância entre partes eretas e estolões da espécie. Os níveis mais elevados foram observados na parte ereta, independente da profundidade e do período do ano onde os espécimes foram coletados. Esses resultados estão de acordo com o modelo de defesa ótima (MDO), visto que a parte ereta em relação ao estolão está mais exposta e, conseqüentemente, mais susceptível à ação de herbívoros (AMADE; LEMÉE, 1998). O mesmo foi observado em *C. sertularioides*, *C. racemosa* e *C. cupressoides* (MEYER; PAUL, 1992).

A abordagem fitoquímica da espécie *C. taxifolia* realizada com extrato metanólico bruto indicou a presença de Alcaloides, terpenos, esteroides e saponinas. (MOURA et al., 2012).

3.5 CÂNCER

O câncer é caracterizado pelo comportamento inadequado da célula, que surge da quebra do equilíbrio celular, após uma sequência de alterações genéticas nas células, causadas por fatores tóxicos ambientais, ou mesmo fatores internos da própria célula, levando após sucessivas mutações a uma perda do controle de seus mecanismos, fazendo que de forma autônoma prolifere desordenadamente e migre, resultando em invasão tecidual e possível metástase (ALBERTS et al., 2002; KUMAR et al., 2005).

De acordo com o tipo de célula normal que o originou, independente dos tecidos que tenha migrado, o câncer recebe uma classificação primária. O sufixo “oma” denota tumor, sendo que quase todos se enquadram em um dos seguintes grupos, conforme relatam Almeida et al, (2005): Carcinomas, Sarcomas, Linfomas, Leucemias, Mielomas, Melanomas, Gliomas, Neuroblastomas, Tumores das células germinativas.

As alterações que ocasionam as neoplasias podem ocorrer em genes especiais, a princípio inativos em células normais, denominados proto-oncogenes, que quando ativados, transformam-se em oncogenes, responsáveis pela transformação das células normais em células tumorais (ALMEIDA et al., 2005).

Superado apenas por doenças cardiovasculares, o câncer é uma das principais causas de morte no mundo, na população da maioria dos países desenvolvidos INCA (Instituto Nacional do Câncer, 2011). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em nível global, o câncer foi responsável por cerca de 8,2 milhões de mortes em 2012. Estima-se a ocorrência de 27 milhões de casos incidentes de câncer até 2030, dos quais 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com a doença (INCA, 2012). As estimativas para o Brasil no ano de 2012, válidas também para 2013, apontaram a previsão de mais de 518.510 novos casos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a dimensão do problema do câncer no país (INCA, 2012).

Para 2014, as estimativas do INCA e do Ministério da Saúde foram de mais de 576 mil novos casos no Brasil, mostrando um aumento no número de casos previstos quando comparado aos anos anteriores, apontado como consequência de um processo de envelhecimento da população brasileira (INCA, 2014).

3.6 ANALGESIA

A dor é uma sensação importante, pois é através dela que se percebe um sinal de alerta para um perigo iminente, estando assim relacionada com a proteção do

organismo, mostrando os limites que não podem ser transgredidos (CHAPMAN; GAVRINI, 1999; MILLAN, 1999; DIAS, 2007). Apesar das sensações dolorosas serem um aviso do qual o organismo se utiliza para sinalizar um processo de agressão, a problemática da dor acompanha a humanidade na medida em que interfere na homeostasia do indivíduo e da sua relação com o meio (PIRES, 2007). A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), 1994, como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão”. Oliveira (1979) descreve a dor como um alerta que o Sistema Nervoso Central (SNC) utiliza para sinalizar um processo de agressão ao organismo com risco para a sua integridade física. Este alerta desencadeia um conjunto de reações de adaptação, de ordem psicológica, autonômica e motora, visando afastar o organismo da causa da agressão, preservando-o (MILLAN, 1999; WOOLF et al., 1999; VITOR et al., 2008).

A dor disfuncional pode ser considerada uma condição causada por um mau funcionamento do aparelho somatosensorial, e ocorre em situações nas quais não há identificação de estímulo nocivo, na ausência de inflamação detectável ou por danos ao sistema nervoso. Pode ser incluído dentro deste tipo de dor, a dor neuropática que é uma síndrome adaptativa, com acúmulo progressivo da dor em resposta a estímulos repetidos, com dispersão espacial, e redução do limiar de dor (COSTIGAN et al., 2009).

No aspecto inflamatório, a dor pode ocorrer em resposta à lesão tecidual e resposta inflamatória subsequente, através de mudanças que ocorrem na tentativa de proteger o corpo contra um estímulo potencialmente nocivo e envolve a participação de mediadores inflamatórios no local da lesão. Estes mediadores incluem bradicinina, substância P, prostaglandinas, fatores de crescimento, óxido nítrico (NO), citocinas, quimiocinas que podem ser chamados de substâncias algogênicas (LINLEY, 2010).

3.7 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *Gallus gallus* domésticos

A embriogênese das aves está diretamente relacionada à temperatura de incubação, estabelecendo-se a polaridade durante a segmentação do ovo, que na galinha se processa no oviduto à temperatura de 40 °C aproximadamente. Após a postura, em incubação a 37,5 °C, completa-se o processo de gastrulação e modela-se progressivamente o organismo. Ao final do 4º dia de incubação, evidenciam-se as

flexuras e a rotação do SNC que, juntamente com o padrão metamérico dos somitos, arcos branquiais, membros e botão caudal, caracterizam externamente o embrião.

A espécie de ave mais utilizada em laboratório é a *Gallus gallus* (galinha), cujo desenvolvimento inicial pode ser comparado ao dos humanos até o segundo mês de gestação. A clivagem nas aves tem início 3 horas após a fecundação, o que corresponderia a 24 horas após a fertilização em humanos. O terceiro dia, quando são formados os somitos, cérebro, olhos, ouvidos e componentes do sistema vascular equivale a terceira - quarta semana de gestação em humanos. Já o quarto dia de incubação, corresponderia ao segundo mês de desenvolvimento humano intrauterino (MOORE, PERSAUD, 2015).

O desenvolvimento embrionário da galinha é muito bem documentado (HAMBURGER; HAMILTON, 1951) e os embriões são classificados em estádios, que relacionam o surgimento de estruturas no embrião e o tempo de desenvolvimento. A divisão em estádios é importante, pois vários fatores - diferenças genéticas, sazonais, tamanho dos ovos, tempo entre a postura e a incubação dos ovos, temperatura dos ovos quando colocados na incubadora, temperatura, tipo e tamanho da incubadora - podem causar variações nos embriões, o que torna ineficiente a classificação baseada somente na idade cronológica. Do estágio 7 ao 14 a classificação é baseada principalmente no número de pares de somitos, enquanto que do estágio 15 em diante, os critérios utilizados para identificação dos estádios embrionários são baseados em estruturas externas, como os brotos dos membros e arcos viscerais (HAMBURGER; HAMILTON, 1951; MOORE; PERSAUD, 2015).

O embrião de ave também tem sido utilizado como modelo para estudo dos efeitos de agentes tóxicos sobre o desenvolvimento embrionário. Através da análise de diferentes biomarcadores morfológicos (VAN STEENIS; VAN LOGTEN, 1971; YAMAMOTO et al., 2012), bioquímicos (HADANI; EGYED, 1967; BRUNSTRÖM, 1992; WANG; WANG, PENG, 2008; YAMAMOTO et al., 2012), genéticos, moleculares (THOMPSON et al., 2010; DOI et al., 2011) é possível investigar a ação de xenobióticos nos embriões em desenvolvimento.

As aves apresentam ovos do tipo telolécito, que possui grande quantidade de vitelo (GILBERT, 2003). No ovo estão presentes todos os componentes necessários ao desenvolvimento do embrião, exceto o oxigênio, que entra pelos poros presentes na casca (BELLAIRS, OSMOND, 2005).

O processo de clivagem é do tipo meroblástica discoidal e ocorre somente no citoplasma ativo no polo animal do ovo (GILBERT, 2003). A clivagem tem início aproximadamente 3 horas após a fecundação, logo que o ovo atinge o istmo, ainda no aparelho reprodutor da galinha. Após repetidas clivagens, no momento da postura, o embrião é composto por aproximadamente 32.000 - 60.000 células, formando o blastodisco (GILBERT, 2003; BELLAIRS, OSMOND, 2005).

Nas primeiras 24 horas de desenvolvimento, o blastodisco é dividido em área pelúcida e área opaca. A área pelúcida corresponde à região central, que está separada do vitelo pela cavidade subgerminativa, enquanto que a área opaca é formada por células da região marginal, que estão em contato com o vitelo. No momento da postura do ovo, o blastodisco é formado por duas camadas de células, o epiblasto, que dará origem ao embrião e alguns anexos embrionários (âmnio, córion, alantóide), e o hipoblasto, que formará apenas estruturas extraembrionárias (saco vitelino). Entre o epiblasto e o hipoblasto encontra-se uma cavidade, a blastocele (GILBERT, 2003; BELLAIRS, OSMOND, 2005; MOORE; PERSAUD, 2015).

Com aproximadamente 10 horas de incubação, tem início a gastrulação, um período de proliferação e migração celular (BELLAIRS, OSMOND, 2005), cujo marco inicial é o desenvolvimento da linha primitiva, formada inicialmente por um espessamento da camada de células na linha média do epiblasto. Essas células se estendem anteriormente, marcando o eixo ântero-posterior do embrião, e perdem a adesão, formando uma depressão na linha, o sulco primitivo, através da qual células do epiblasto irão migrar para a blastocele. Na extremidade anterior do sulco, há um espessamento de células, o nódulo primitivo (nódulo de Hensen). As células que ingressam na blastocele a partir do nódulo de Hensen, migram anteriormente e vão formar o intestino anterior, a mesoderme da cabeça e a notocorda, ao passo que as que ingressam pela fenda primitiva darão origem aos demais tecidos endodérmicos e mesodérmicos (GILBERT, 2003; BELLAIRS, OSMOND, 2005). Após 20 horas de incubação, a regressão da linha primitiva move o nódulo de Hensen para uma região mais posterior e há formação da notocorda da extremidade anterior para a posterior, à medida que a regressão ocorre (GILBERT, 2003). Ao final da gastrulação estão formados os folhetos germinativos: ectoderme, mesoderme e endoderme (BELLAIRS, OSMOND, 2005). A endoderme dará origem principalmente ao epitélio do trato respiratório, digestório, incluindo órgãos associados como pulmões e fígado.

A mesoderme formará diversos tecidos, incluindo o sistema musculoesquelético, tecido conjuntivo, sangue e órgãos internos como coração e rins. Já a ectoderme originará principalmente a epiderme e o sistema nervoso (WOLPERT et al., 2008).

A neurulação é o processo pelo qual é formado o tubo neural, a partir da interação das células mesodérmicas da notocorda e da placa pré-cordal com as células da ectoderme adjacente. Essa interação induz as células ectodérmicas a formarem a placa neural, a partir de 20 horas de incubação. A placa neural sofre uma invaginação na linha média, formando o sulco neural e as pregas neurais, as quais começam a se fundir com 26 horas de incubação. As células da porção mais dorsal do tubo neural se tornam as células da crista neural, que migram somente após o fechamento do tubo neural, separando-se do mesmo. As cristas neurais originarão diversas estruturas, incluindo aquelas do sistema nervoso periférico, enquanto que o tubo neural formará o encéfalo e a medula espinhal (GILBERT, 2003; BELLAIRS, OSMOND, 2005).

A somitogênese se inicia com aproximadamente 24 horas de incubação, formando progressivamente pares de somitos no sentido ântero-posterior. Cada par de somitos surge em intervalos de 90 minutos, na mesoderme paraxial de ambos os lados da notocorda. Essas estruturas darão origem aos moldes cartilagosos das vértebras, musculatura esquelética de praticamente todo o organismo e a derme da região dorsal do corpo (WOLPERT et al., 2008). No terceiro dia de desenvolvimento o embrião de ave possui aproximadamente 40 pares de somitos, apresenta batimentos cardíacos e a circulação com as membranas extraembrionárias (saco vitelínico e alantóide) já está bem estabelecida (BELLAIRS, OSMOND, 2005).

Enquanto o embrião é formado, surgem também as membranas extraembrionárias, que fornecem proteção e nutrição ao embrião em desenvolvimento. O saco vitelínico e o alantóide são formados pela somatopleura (endoderme e mesoderme), enquanto que o âmnio e o córion pela esplancopleura (ectoderme e mesoderme). O saco vitelínico provê nutrição ao embrião a partir do transporte de nutrientes do vitelo para o corpo do embrião através dos vasos que envolvem o saco. O alantóide armazena excretas em sua luz e ao se fundir com o córion para formar a membrana córioalantóica, realiza trocas gasosas e transporte do cálcio da casca para o embrião, através de seus vasos sanguíneos, o que torna a casca mais frágil e facilita a eclosão. O córion é a membrana extraembrionária mais

externa, fica aderida a casca e permite as trocas gasosas com o ambiente. O âmnio envolve o embrião, formando o saco amniótico, preenchido por um líquido que fornece proteção contra a desidratação e choques mecânicos. (GILBERT, 2003).

O desenvolvimento embrionário da galinha apresenta vários períodos críticos, em que o embrião está mais vulnerável a influências externas, como exposição a agentes tóxicos (SPREEN et al., 1984 apud DEWITT; MEYER; HENSHEL, 2005). Segundo Christensen (2001), existem 5 períodos críticos: o primeiro corresponde ao período pré-oviposital, com duração de 18 a 20 horas, de intensa proliferação celular, em que diversas condições maternas como temperatura no oviduto e estado nutricional da mãe, influenciam na mortalidade dos embriões.

O segundo compreende o tempo de pré-incubação, em que o desenvolvimento é estacionado e só é retomado quando o ovo é submetido às condições normais de incubação (± 38 °C). Nesse período, os parâmetros de umidade, ventilação e temperatura e o tempo entre a oviposição na viabilidade embrionária. O terceiro, quarto e quinto períodos críticos se passam durante o tempo de incubação. Do primeiro ao quarto dias (terceiro período) o embrião se adapta às condições de incubação e são retomadas a proliferação e diferenciação celulares. É nesse período que ocorre a organogênese, formação inicial dos órgãos (PATTEN, 1971), e a sensibilidade à temperatura e exposição a agentes tóxicos é alta. No quarto período, de 5 a 18 dias, o fator mais importante é a nutrição, devido ao intenso crescimento do embrião. O quinto período (19 a 21 dias) é considerado crítico, pois ocorrem eventos importantes que possibilitam a eclosão, como o correto posicionamento do bico e rompimento da membrana para que se inicie a respiração pulmonar.

3.7.1 Vasculogênese e Angiogênese.

A angiogênese é o processo de geração de novos vasos sanguíneos derivados de um ramo vascular pré-existente (STOCKMANN et al., 2014). No humano adulto a taxa de proliferação das células endoteliais é muito lenta comparada a outros tipos celulares, mas existem ocasiões especiais onde ocorre a expressão controlada de indutores da angiogênese, como no processo de cicatrização de feridas (POLVERINI, 2002; SHIBUYA, 2014).

A angiogênese é um importante fenômeno biológico, alvo terapêutico de diversas condições patológicas (PRATHEESHKUMAR et al., 2012; SUREKHA et al., 2013). É especialmente relevante nas neoplasias malignas onde o tumor em crescimento

necessita de uma extensa rede capilar que forneça nutrientes e oxigênio, além disso os novos vasos intratumorais promovem um caminho para vias circulatórias, permitindo assim, a migração.

Na angiogenese, a Ang-1 (angiopoietina-1) está envolvida na estabilização e maturação da rede vascular, efetuando o recrutamento de células parietoteliais (pericitos e células musculares lisas); o contato da Ang-1 com o Tie-2 está envolvido na interação das células endoteliais e células perietoteliais de apoio. (PENG et al., 2003; MACHEIN et al., 2004; TAIT; JONES, 2004). O receptor Tie-2 é importante no processo angiogênico e na remodelagem vascular enquanto o outro receptor para angiopoietinas Tie-1 é direcionado à manutenção da integridade vascular (NAKAYAMA et al., 2005).

Angiogenina é uma ribonuclease angiogênica de 14 kDa inicialmente isolada de cultivo de células de adenocarcinoma de cólon humano. Sua expressão está correlacionada em vários tipos de câncer, incluindo colorretal, pancreático, fígado, rim, ovariano, linfoma, melanoma, osteosarcoma. Angiogenina contribui para angiogênese de carcinoma gástrico e câncer de próstata além de promover o crescimento desses dois tipos de células musculares lisas e endoteliais dos vasos quando ligada às proteínas de membrana e que resulta na sua translocação nuclear acarretando uma ampla variedade de respostas celulares incluindo migração, invasão, proliferação das células e formação de estruturas tubulares (ZHANG et al., 2008).

A formação do sistema vascular do embrião envolve dois processos: a vasculogênese e a angiogênese. A formação dos vasos sanguíneos (vasculogênese) no embrião e nas membranas extra-embriônicas durante a terceira semana de desenvolvimento se iniciam quando células mesenquimais se diferenciam em células precursoras de células endoteliais – os angioblastos (células formadoras de vasos) – que se agregam e formam grupos de células angiogênicas – as ilhotas sanguíneas (MOORE, PERSAUD, 2015). Dentro das ilhotas, fendas intercelulares confluem, formando pequenas cavidades, os angioblastos se achatam, tornando-se células endoteliais, que se dispõem em torno das cavidades revestidas por endotélio logo se fundem para formar redes de canais endoteliais (vasculogênese). Os vasos avançam para áreas adjacentes por brotamento endotelial e se fundem com outros vasos (angiogênese) (CARSLON, 2014, MOORE, PERSAUD, 2015).

As células sanguíneas desenvolvem-se a partir de células endoteliais dos vasos (hemangioblastos), a medida que elas se desenvolvem nas paredes do saco

vitelino e da alantoide, no fim da terceira semana. A formação do sangue (hematogênese) se inicia na quinta semana. Ela ocorre primeiro em várias partes do mesenquima do embrião, principalmente no fígado, e mais tarde no baço, na medula óssea e nos linfonodos. Os eritrócitos fetais e adultos derivam de diferentes células progenitoras hematopoiéticas. As células mesenquimais que circundam os vasos sanguíneos endoteliais primitivos diferenciam-se nos elementos musculares e conjuntivos dos vasos (CARSLON, 2014, MOORE; PERSAUD, 2015).

Os vasos sanguíneos são formados por dois tipos distintos de células; endoteliais e células de suporte perivascular, denominadas pericitos. As células endoteliais são células epiteliais de revestimento dos vasos sanguíneos, enquanto os pericitos são células perivasculares que formam uma camada única de células musculares lisas em torno das células endoteliais, proporcionando suporte mecânico e estabilidade à parede dos vasos, regulando a função vascular (GERHARDT; BETSHOLTZ, 2003; RUAN, SONG; OUYANG, 2009).

A angiogênese é caracterizada pelo crescimento e desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, um processo normal e essencial na cicatrização de feridas e formação de tecidos (HALL et al., 2005). No entanto, também é um passo fundamental na oncogênese, bem como no crescimento do tumor, a fim de fornecer nutrientes e oxigênio para progressão e proliferação das células tumorais, contribuindo para a formação de metástases (TAKAHASHI; SHIBUYA, 2005; GAVALAS, et al., 2013).

Este processo ocorre durante o desenvolvimento e remodelação vascular em uma série controlada de eventos que se inicia a partir de capilares pré-existentes no tumor. O tamanho tumoral pode alcançar aproximadamente 1-2 mm³, antes de suas demandas metabólicas serem restritas devido ao limite de difusão de oxigênio e nutrientes no local (CARMELIET; JAIN, 2011). De acordo com a sua gravidade, a ausência de oxigênio pode tanto promover apoptose como impedir a morte das células, conduzindo a respostas biológicas que induzem o crescimento tumoral (SADRI; ZHANG, 2013).

Assim, para garantir a progressão do tumor, as células neoplásicas modificam seu fenótipo a fim de promover alterações funcionais, estimulando a produção de fatores angiogênicos, os quais se ligam a receptores específicos nas células endoteliais pré-existentes, levando a formação de novos vasos sanguíneos (LEE et al., 2007; YU; MOHAN; NATARAJAN, 2012).

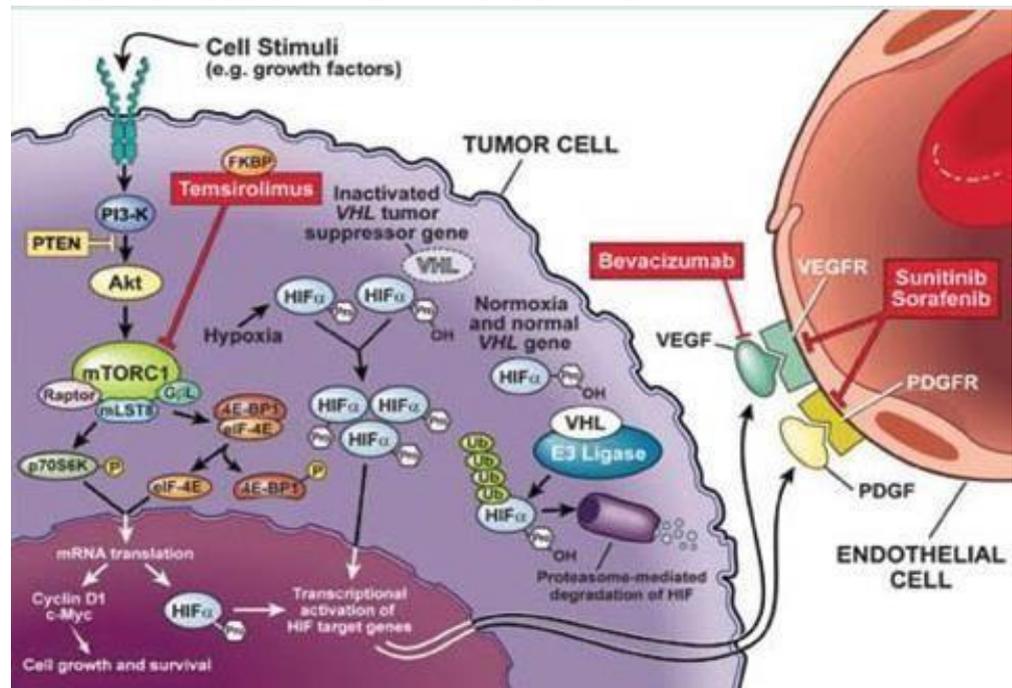
O processo da angiogênese envolve um número sequencial de etapas: inicialmente, as células endoteliais são ativadas por fatores pro-angiogênicos produzidos e liberados pelas células tumorais. Em seguida, as células endoteliais pré-existentes secretam enzimas proteolíticas, tais como as Matriz Metaloproteinases (MMPs) para a degradação da membrana basal e matriz extracelular. Assim, inicia-se a proliferação e migração das células endoteliais para formação de um novo vaso sanguíneo. Finalmente, ocorre a ligação das células denominadas tips cells nas células endoteliais dos novos capilares, o novo lúmen e uma nova membrana basal são formados (GRIZZI et al., 2005; WEIS; CHERESH, 2011).

Em resposta à redução do oxigênio disponível, as células tumorais expressam o fator induzível por hipóxia (HIF-1), que é um fator de transcrição induzido sob hipóxia e que nestas condições, migra desde o citoplasma para o núcleo das células, ligando-se aos elementos de resposta à hipóxia (SEMENZA, 2013). O HIF-1 é composto por duas subunidades, HIF- α e HIF-1 β . A subunidade HIF- α apresenta três isoformas HIF-1 α , HIF-2 α , e HIF-3 α , que estão presentes em células tumorais apenas na ausência do oxigênio. Estudos demonstram que a alta expressão de HIF-1 α está diretamente associada ao pior prognóstico em tumores de mama. A subunidade HIF-1 β é constitutivamente expressa em células normais de diversos órgãos, como rins, pulmão e coração (BOS et al., 2003; RUNDQVIST; JOHNSON, 2013). Em situações normais de oxigênio, o HIF α é reconhecido pela proteína supressora tumoral Von Hippel-Lindau (pVHL) ubiquitinilado para sofrer degradação proteossomal. No entanto, em situações de hipóxia, o pVHL se liga ao NO e o HIF-1 α não é reconhecido. Nesse caso, o HIF α é ativado e induz a expressão de genes de resposta à hipóxia como o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) (SEMENZA, 2002; MIMÉAULT; BATRA, 2013; TUNG et al., 2013).

O VEGF é considerado um dos fatores pró-angiogênicos mais importantes por promover a formação de novos vasos pela sua capacidade de regular a permeabilidade vascular, estimular o crescimento, migração e invasão das células endoteliais (HOEBEN et al., 2004; DELLI CARPINI et al., 2010; GREENBERG; RUGO, 2010; SHIBUYA, 2011). É composto por uma família de cinco isoformas referidas como VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e o fator de crescimento placentário (PlGF). O VEGF atua por sua ligação a receptores específicos do tipo tirosina quinase (RTK), promovendo uma cascata de eventos intracelulares. Cada isoforma pode ativar

um ou mais receptores conhecidos, como VEGFR1 localizado na superfície de células hematopoiéticas, macrófagos e monócitos, VEGFR2 encontrado no endotélio vascular e linfático e o VEGFR3 localizado predominantemente no endotélio linfático (STEFANINI et al., 2008; TANEJA et al., 2010).

MOLÉCULAS ASSOCIADAS A ANGIOGÊNES



RINI et al. (2009)

A isoforma VEGF-A é uma glicoproteína dimérica, constitutivamente expressa em baixos níveis nos tecidos normais na fase adulta, e em níveis mais elevados em diferentes tecidos epiteliais, como mama, rim e pulmão (HOEBEN et al., 2004; CARMELIET; JAIN, 2011). O VEGF-A, um dos maiores reguladores do processo de angiogênese, foi detectado inicialmente em vários tipos de linhagens de células tumorais, enquanto os seus receptores VEGFR1 e VEGFR2 foram encontrados predominantemente expressos em células endoteliais. No entanto, recentes estudos revelam que células tumorais também são capazes de apresentar expressão significativa de receptores do VEGF (FERRARA, 2009; 2010).

O VEGF-B foi descoberto há pouco mais de 10 anos como um membro da família VEGF. Apresenta afinidade pelo VEGFR1, sendo abundantemente expresso em tecidos musculares esqueléticos e lisos, como coração e diafragma (NASH et al., 2006). Recentes estudos demonstram que níveis de expressão de VEGF-B estão aumentados em tecidos tumorais de mama quando comparados ao tecido normal,

sugerindo que o VEGF-B pode complementar o papel de outros membros da família VEGF (YUE et al., 2014). Além disso, o VEGF-B apresenta baixa atividade angiogênica, e também, segundo um estudo de Li et al. (2008) em células neuronais humanas, possui potencial para inibir a apoptose estimulando a proliferação celular.

A isoforma de VEGF-C, também conhecida como proteína relacionada ao VEGF (VRP), desempenha papel na regulação do processo angiogênico na embriogênese precoce, mas tem essencialmente a função de estimular a proliferação, crescimento e sobrevivência das células endoteliais linfáticas, que conduz à formação de novos vasos linfáticos (WANG et al., 2012). O VEGF-C é altamente expresso em tecidos tumorais, especialmente mama, colo do útero, cólon, pulmão e próstata. Apresenta elevada afinidade com os receptores celulares VEGFR2 e VEGFR3 (HAJRASOULIHA et al., 2012). O VEGF-D possui características e funções semelhantes ao VEGF-C. Sua alta expressão em tecidos tumorais está relacionada com a ocorrência de metástase pela formação de novos vasos linfáticos (KARNEZIS et al., 2012).

Estudos indicam que a inibição da sinalização de VEGF-D pode regular negativamente a linfangiogênese, restringindo a formação de vasos linfáticos (ALITALO et al., 2013). A isoforma PIGF é predominantemente expressa em altos níveis no tecido placentário, mas também pode ser encontrada em tecidos como pulmão, coração e músculo esquelético. O PIGF estimula o crescimento, migração e sobrevivência das células endoteliais, levando a formação de novos vasos sanguíneos (SUN et al., 2012). Além do VEGF-A, o PIGF também se liga ao receptor VEGFR1, estimulando o aumento da expressão do VEGF-A, levando a um efeito sinérgico dessa proteína, e conseqüente maior resposta angiogênica (FISCHER et al., 2008).

A inibição do VEGF pelo bloqueio de seus receptores representa um novo enfoque para a terapia contra o câncer, podendo ser utilizada na regressão de vasos sanguíneos imaturos, característicos dos tumores e reduzir a permeabilidade vascular de modo a diminuir a pressão intratumoral, com isto diminuindo a probabilidade da formação de metástases. (FERRARA, 2004). A alta expressão de fatores angiogênicos como VEGF e seus receptores está relacionada com o grau de vascularização tumoral, e tem sido proposta como fator prognóstico para avaliar a sobrevivência dos pacientes.

Assim, torna-se extremamente importante a identificação destas proteínas envolvidas na angiogênese, para a escolha do tratamento adequado, bem como para o

desenvolvimento de terapias eficazes que envolvam uma combinação de vários fatores (ALI et al., 2010; ARBAB, 2012). Neste contexto, o VEGF e seus receptores parecem ser, particularmente, alvos promissores para a terapia molecular do câncer.

O efeito é consistente com as atividades dos outros inibidores de tripsina, sob o aspecto da inibição da angiogênese, embora manifestado de maneira mais intensa, sugerindo que os mecanismos podem estar relacionados. Além disso, os inibidores de tripsina do tipo Kunitz, oriundos da soja, mostraram atividade anti-angiogênica por meio da inibição do VEGF, um importante estimulador da formação de novos vasos (DREWES et al., 2012).

Entretanto, grande parte dos efeitos provenientes da administração de pentamidina tem sido atribuídos à sua capacidade de se ligar ao sulco menor do DNA e inibir a replicação e a síntese de proteínas (HILDEBRANDT et al., 1998). Alguns estudos também apontam sua ação direta sobre enzimas envolvidas na reparação de danos no DNA, e ressaltam a possibilidade do seu uso como agente anticancerígeno (CHOW et al., 2004). Além disso, a pentamidina também inibe enzimas envolvidas na acetilação de histonas e clivagem de regiões alteradas do DNA (KOBAYASHI et al., 2010).

3.7.2 Fisiologia e Farmacologia da Hematopoiese e Imunomodulação.

A produção de células sanguíneas é controlada fisiologicamente por fatores de crescimento hematopoiéticos, um grupo diversificado, porém com superposição funcional de glicoproteínas sintetizadas pelo corpo em resposta a determinados sinais, a condição de hipóxia estimula a produção do fator de crescimento, a eritropoietina, que, por sua vez, estimula a produção de eritrócitos na tentativa de aliviar as baixas concentrações de oxigênio (GOLAN et al., 2012).

Certos fatores estimulam seletivamente o crescimento e a diferenciação de uma única linhagem, como a eritropoietina para linhagem de eritrócitos. Outros como o fator de células-tronco, estimulam a proliferação de múltiplas linhagens e são designados como pleiotropicos. Muitos fatores de crescimento atuam de modo sinérgico entre si e, com frequência apresentam uma superposição de efeitos. Essa superposição pode funcionalmente desempenhar um papel protetor, assegurando o a manutenção dos processos de importância vital (GOLAN et al., 2012).

3.7.3 Desenvolvimento do Sistema Nervoso.

A região do tubo neural cefálica ao quarto par de somitos dá origem ao encéfalo. A fusão das pregas neurais da região cefálica e o fechamento do neuroporo rostral formam as três vesículas encefálicas primárias das quais se forma o encéfalo. As três vesículas encefálicas primárias formam o encéfalo anterior, médio e posterior (SANDLER, 1997, CARSLON, 2014).

A proliferação e a diferenciação de células neuroepiteliais na medula espinhal em desenvolvimento leva à formação de paredes espessas e de delgadas placas do teto e do assoalho. O espessamento diferencial das paredes laterais da medula espinhal produz, rapidamente um sulco longitudinal raso de ambos os lados – o sulco limitante (ALI et al., 2010; ARBAB, 2012).

Os corpos celulares das placas alares formam as colunas cinzentas dorsais, que se estendem por todo o comprimento da medula espinhal.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR-SANTOS, G.; J .CHEM.SOC, C. Chemical studies on three species of marine algal genus *Caulerpa*. In. Froedenthal, H.D. (ed.) Drugs from the sea. **Marine Technology Society**, v.84, n.2, p. 173-176. 1970.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, v.28, n.1, p.118129, 2005.
- BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. Introdução as Algas do Brasil. Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 49-60, v. 1, 2010.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York : Garland Science, 2002.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, v.28, n.1, p.118129, 2005.
- AMADE, P.; LEMÉE, R. Chemical defence of the mediterranean alga *Caulerpa taxifolia*: variations in caulerpenyne production. **Aquatic Toxicology** v.43, p.287-300. 1998.
- BALUNAS, M.J.; SU,B.; BRWGGEMUR, R.W.; KINGHAM, A.P. **Natural product as aromatase inhibitors, anticancer agents med chem**,v.8,n.6 p. 646-682. 2008
- BELLAIRS, R.; OSMOND, M. *The Atlas of Chick Development*. 2. ed. San Diego: Elsevier, 2005.
- BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. Introdução as Algas do Brasil. Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 49-60, v. 1, 2010.
- BOYD, M.; PAULL, K. Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. **Drug Development Research**, v. 34, p. 91-109, 1995.
- BRANDÃO, H.N.; DAVID,J.P.; COUTO,R.D.; NASCIMENTO, J.A.P. DAVID,J.M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*, v.33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.
- BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine Natural products. *Nat. Prod. Rep.*, v. 29, p. 144–222, 2012.

CAIRNS, J. The origin of human cancers. *Nature*, v.289, n.5796, p.353-357, 1981.

CALUX, N. M. DE C. T.; RIBALTA, J. C. L.; STÁVALE, J. N.; FOCCHI, J.; BARACAT, E. C.; DE LIMA, G. R. Angiogenesis in squamous cervical neoplasia: comparative study of two endothelial cells. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v.23, n.5, p.313-319, 2001.

CARDOZO, K. H. M. GURATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R. TONON, A. P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A.O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.*, v. 146, p. 60–78, 2007.

CARMELIET, P.; RAKESH, K. J. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, v.407, p.249-257, 2000.

CHOW T.Y., ALAOUI-JAMALI M., YEH C., YUEN L., GRILLER D. (2004) The DNA double-stranded break repair protein endo-exonuclease as a therapeutic target for cancer. *Mol Cancer Ther* 3, 911-919.

COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; ALVES, A.P.N.N.; MADEIRA, S. V.F.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O.A. Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudo no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Revista Virtual Química*, v.2,n.1,p.47-58,2010.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annual Review of Neuroscience*, vol 32, p.1-32, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1830, n.6, p.3670-3695, 2013.

DEWITT, J. C.; MEYER, E. B.; HENSHEL, D. S. Environmental toxicity studies using chickens as surrogates for wildlife: effects of injection day. *Archives of environmental contamination and toxicology*, v. 48, n. 2, p. 270–7, 2005.

DREWES, C. C., DIAS, R.Y.S., HEBEDA, C.B., SIMONS, S.M., BARRETO, S.A., FERREIRA JUNIOR, J.M., CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M., FARSKY, S.H.P. (2012) Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. *Toxicon* 60, 333–340.

DOI, T.; PURI, P.; MCCANN, A.; BANNIGAN, J.; THOMPSON, J. Epigenetic effect of cadmium on global de novo DNA hypomethylation in the cadmium-induced ventral body wall defect (VBWD) in the chick model. *Toxicological Sciences*, v. 120, n. 2, p. 475–480, 2011.

FEINBERG, A.P.; OHLSSON, R.; HENIKOFF, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature Reviews Genetics*, v.7, n.1, p.21-33, 2006.

FENICAL, W.; PAUL, V; **Hydrobiologia**, v. ,n. p.116-135.1984.

FERRI, P.H. **Química de produtos naturais**: métodos gerais. In: DI STASI, L.C. Plantas medicinais: arte e ciência. São Paulo: Editora da Unesp; p.129-56. 1996.

FISCHEL, J.L.; LEMEE, R.; FORMENTO, P.; CALDANI, C.; MOLL, J.L.; PESANDO, D.; MEINESZ, A.; GRELIER, P.; PIETRA, P.; GUERRIERO, A. Cell growth inhibitory effects of caulerpenyne, a sesquiterpenoid from the marine algae *Caulerpa taxifolia*. Centre Antoine Lacassagne, Nice, France. **Rev.Europe PubMed Central**.1995.

GHOSH, T.; PETERSON, B.; TOMASEVIC, N.; PECULIS, B.A. Xenopus U8 sno RNA binding protein is a conserved nuclear decapping enzyme. **Mol Cell**. v.13, n.6, p.817828, mar.2004.

GILBERT, S. F. Biologia do Desenvolvimento. 5. ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2003.

GLASBY T.M.; CONNELL S.D.;HOLLOWAY,M.G. HEWITT,C.L. Nonindigenous on artificial structures: could habitat creation facilitate biological invasion. **Mar Biol**, n.151, p.887-895, 2007.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, v.140, n.6, p.883-899, 2010.

HAMILTON, H; HAMBURGER, V. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, v.88, p.49-92, 1951.

HARBONE, J.B. **Phytochemical methods**. 3 ed., London: Chapman & Hall, p.228, 1998.

HAY, M.E; FENICAL, W, Marine plant-herbivore interactions. The ecology of Chemical defense, **Ann. Ver. Ecol. Syst**, v.19 n.1, p. 111-145, 1988.

HILDEBRANDT, E., BOYKIN, D., KUMAR, A., TIDWELL, R.R., DYKSTRA, C.C. (1998) Identification and characterization of an endo/exonuclease in *Pneumocystis carinii* that is inhibited by dicationic diarylfurans with efficacy against *Pneumocystis pneumonia*. *J Eukaryot Microbiol* 45, 112-121.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P. J.; Lee, C. C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*, v. 42, n.4, p.377-387, 2007.

INCA. Estatísticas do Câncer. Vigilância do Câncer e de Fatores de Risco. [Acesso em 4 de janeiro de 2012]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/> INCA – Instituto Nacional de Cancer, Rio de Janeiro, 2012, 2ª edição revista e atualizada. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/ABC_do_cancer_2ed.pdf>. Acessado em: 18 maio de 2014.

INCA – Instituto Nacional de Cancer, <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativa_s_cancer_2014> Acesso em: 20 de maio de 2014.

INCA. Estatísticas do Câncer. Vigilância do Câncer e de Fatores de Risco. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>>. Acesso em 20 de maio de 2014.

INCA. Fisiopatologia do câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf>>. Acesso em 16 de junho de 2014.

JAHNKE, L. S., WHITE, A. L. Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *J. Plant Physiol.*, v.160: p.1193-1202.2003.

JOLY, C. A. et al. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. *Revista USP*, n.89, p.114-133, 2011.

KAMER, K., FONG, P. A fluctuating salinity regime mitigates the negative effects of reduced salinity on the estuarine macroalga, *Enteromorpha intestinalis* (L.) link. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* v254, p.53-69. 2000.

KOBAYASHI, J., KATO, A., Ota1, Y., Ohba1, R., Komatsu, K. (2010) Bisbenzamidine derivative, pentamidine represses DNA damage response through inhibition of histone H2A acetylation. *Molecular Cancer* 9:34.

KUMAR, V.; ABBAS, ABUL, K.; FAUSTO, N. ROBBINS & COTRAN. *Patologia – Bases Patológicas das Doenças*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LEE O.O, YANG L.H, LI X, PAWLIK J.R, QIAN P-Y Surface bacterial community, fatty acid profile, and antifouling activity of two congeneric sponges from Hong Kong and the Bahamas. **Marine Ecology Progress Series** v.33 n.9: p.25-40, 2007.

LIMA, A. P.; PEREIRA, F. C.; VILANOVA-COSTA, C. A. S. T.; RIBEIRO, A. S. B. B.; SILVEIRA-LACERDA, E. P. Avaliação da atividade antitumoral e citotóxica da planta *Siolmatra brasiliensis* *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.3, n.2, p.10-12, 2006.

LINLEY, J. E.; ROSE, K.; OOI, L.; GAMPER, N. Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. *European Journal Physiology*, vol 459, p.657-669, 2010.

MAGALHÃES, F. I. E. Atividade Antitumoral (in vitro e in vivo) das fisalinas B e D isoladas da *Physalis angulata* LIN. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Ceará, 2005.

MAITI, B.C., THAMSON, R.H.AND MAHENDRAN M. The structure of caulerpina, a pigment from *Caulerpa* algae. **J. Chem. Res.**v.n.: p.126-127. 1978.

MARTINS, E.R.;CASTRO, D.M.;CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**, Viçosa, MG:UFV, 1994.p.220.

MATOS, F.J.A., **Plantas Medicias**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil . 2. ed. Fortaleza, Imprensa Universitária / UFC., p.171172. 2000.

MEINESZ, A., COTTALORDA, J. M., CHIAVERINI, D., BRAUN, M. et al. **Survi de l' invasion de l' algue tropicale *Caulerpa taxifolia* devant lês cotes françaises de la Méditerranée. Situation au 31 décembre 1996.** Lab. Environ. Mar. Lit., Université de Nice-Sophia Antipolis, France. 1997

MELO, J. G.; SANTOS, A. G.; AMORIM, E. L. C.; NASCIMENTO, S. C. D.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v.2011, article ID 365359, p.14, 2011.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. Embriologia Clínica. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015

MOURA, C.A. et al. **Perfil Fitoquímico da Macroalgas Marinha *Caulerpa taxifolia* (VAHL) C. AGARDH, 1817 (caulerpaceae)** Congresso Brasileiro de Oceanografia, Rio de Janeiro, Novembro 2012

NAPRALERT. Disponível em: <www.napralert.org> Acessado em: 12 agosto de 2014.

NASH, A.D.; BACA, M.; WRIGHT, C.; SCOTNEY, P.C. The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B). *Pulm Pharmacol Ther.* 2006; 19 (1): 61-9.

PEREIRA, L. A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds. In: Seaweed: Ecology Nutrient Composition of Selected Edible Seaweeds. Nova Science Publishers, Inc, v. 2 p. 15-47, 2011.

PINTEUS, SUSETE FILIPA GONÇALVES. Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana em algas da costa de Peniche (Portugal): identificação de compostos bioativos com elevado potencial biotecnológico. Dissertação (Mestrado em Biologia de Recursos Marinhos). Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria, 2011.

PLATE, K. H.; BREIER, G.; MILLAUER, B.; ULLRICH, A.; RISAU, W. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Research*, v.53, n.23, p.5822-5827, 1993.

PRATHEESHKUMAR, P.; BUDHRAJA, A.; SON, Y. O.; WANG, X.; ZHANG, Z.; DING, S.; WANG, L.; HITRON, A.; LEE, J. C.; XU, M.; CHEN, G.; LUO, J.; SHI, X. Quercetin Inhibits Angiogenesis Mediated Human Prostate Tumor Growth by Targeting VEGFR- 2 Regulated AKT/mTOR/P70S6K Signaling Pathways. *PloS one*, San Francisco, v. 7, n. 10, p. e47516, 2012.

- STOCKMANN, C.; SCHADENDORF, D.; KLOSE, R.; HELFRICH, I. The Impact of the Immune System on Tumor: Angiogenesis and Vascular Remodeling. *Frontiers in Oncology*, Lausanne, v. 4, n. p. 69, 2014.
- STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. A. The cancer genome. *Nature*, v.45, n.8, p.719-24, 2009.
- RAMARATHNAM, N. OSAWA, T.; NAMIKI, M.; TASHIRO, T. Studies on the relationship between antioxidative activity of Rice hull and germination ability of rice seeds. *J. Sci. Food Agric.*, v.37, p. 719-726.1986.
- RAMARATHNAM, N. OSAWA, T. OCHI, H. KAWAKISHI, S. The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends Food Sci.Technol.*, v.6, p. 75-82,1995.
- RAO, A.S., RAO, M.U. Interaction of salinity and photon flux density on the growth of six marine algae. *Seaweed Resour. Util.* v.21, p.41-47,1999.
- RAO, Y.K.; FANG, SHIH-HUA; TZENG, YEW-MIN. Antiinflammatory activities of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima*. *Journal of Ethnopharmacology* v.100,p. 249–253. 2005.
- RAVIENS,B. **Biologia e Filogenia das algas**, Porto Alegre,Artmed, 2006.p.280.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. *Farmacologia*. Elsevier, 5. ed, p. 434-449, 2004.
- RIBEIRO, N. A.; ABREU, T. M.; CHAVES, H. V.; BEZERRA, M. M.; MONTEIRO, H. S. A.; JORGE, R. J. B.; BENEVIDES, N. M. B. Sulfated polysaccharides isolated from the green seaweed *Caulerpa racemosa* plays antinociceptive and anti-inflammatory activities in a way dependent on HO-1 pathway activation. *Inflammation Research*, 2014.
- RODRIGUES, J.A.G.; FARIAS, W.R.L. Extração, fracionamento, purificação e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (Caulerpales, Chlorophyta). In: Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca (PP.1693-1701). Fortaleza: CD-Room do CONBEP,14. 2005.
- ROUHI, A. M.; WASHINGTON, C. Rediscovering natural products. *Chemical & Engineering News*, v.81, n.41, p.77-91, 2003.
- LING,R. Foto tirada em 2011:*Caulerpa taxifolia* Disponível em: <WWW.rling.com> acessado em : 20 julho 2014.
- PATTEN, B. M. *Early embryology of the chick*. 5. ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 1971.
- PINTO, A. C.; SIQUEIRA, S. D. H.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A.

Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. *Química Nova*, v.25, n.1, p.4561, 2002.

POLVERINI, P. J. Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of Dental Education*, Washington, v. 66, n. 8, p. 962-975, 2002.

SHIBUYA, M. VEGF-VEGFR Signals in Health and Disease. *Biomolecules and Therapeutics*, Seoul, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2014.

SUDATTI, D. B. Influência de fatores abióticos e bióticos na química defensiva da macroalga marinha *Laurencia dendroidea* J. Agardh (Ceramiales: Rhodophyta), Tese da Universidade Fluminense, 2010.

SUREKHA, K. L.; WAGHCHOUDE, M.; GHASKADBI, S. Enhancement of angiogenesis by a 27 kDa lectin from perivitelline fluid of horseshoe crab embryos through upregulation of VEGF and its receptor. *Journal of Natural Products*, Cincinnati, v. 76, n. 1, p. 117-120, 2013.

SZE, P. **A biology to the algae**. New York: McGraw-Hill. 1998, p.278.

THIEL M.; MACAYA, E.C.; ACAÑA, E. et al. The Humboldt Current system of Northern and Central Chile oceanographic processes, ecological interactions and socioeconomic feedback. ***Oceanography and Marine Biology***: an Annual Review v.45, p.195-344. 2007.

THOMPSON, J.; DOI, T.; POWER, E.; BALASUBRAMAN, I.; PURI, P.; BANNIGAN, J. Evidence against a direct role for oxidative stress in cadmium-induced axial malformation in the chick embryo. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 243, n. 3, p. 390– 8, 2010.

VIDAL, A. Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, p. 509-600, 2006.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis** – A thin layer chromatography atlas. 2nd. ed. Berlin: Springer-Verlag; 1996.

WANG, T. JONSDOTTIR, R. LIU, H. GU, L. KRISTINSSON, H. G. RAGHAVAN, S. OLAFSDOTTIR, G. Antioxidant Capacities of phlorotannins extracted from the brown algae *focus vesiculosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, p. 58745883, 2012

WEST, E. P.; BARNES, J.; WRIGHT, A. DAVIS. Anchors aweigh: Fragment generation of invasive *Caulerpa taxifolia* by boat anchors and its resistance to desiccation. ***Aquatic Botany*** 87(3), 2007, p.196–202.

WESTPHALEN, G.; COLLINGS, G.; ROWLING, K.; THEIL, M.; CHESHIRE, A. Port river and Barker Inlet *Caulerpa taxifolia* (Vahl) C.Agardh distribution and eradication.

Milestone report to PIRSA Biosecurity. SARDI. **Aquatic Sciences Pub.** RD02/0161, 2004.

WILTSHIRE, K. *Caulerpa taxifolia* - Survey of current distribution and high risk areas, and summary of distribution patterns 2003-2010. SARDI **aquatic sciences**, 2010.

WOLPERT, L.; JESSELL, T.; LAWRENCE, P.; MEYEROWITZ, E.; ROBERTSON, E.; SMITH, KIM. *Princípios de biologia do desenvolvimento*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WHO - World Health Organization. World Cancer Day: Global action to avert 8 million cancer-related deaths by 2015. Geneva, 2006. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2006/pr06/en/index.html>

ZULJEVIC A.; ANTOLIC B., Synchronous release of male gametes of *Caulerpa taxifolia* (Caulerpales, Chlorophyta) in the Mediterranean Sea. **Phycologia** v.39, n.2. p.157-159, 2000.

4. Artigo 1

Submetido ao International Journal of Clinical and
Experimental Pathology



EVALUATION OF ACUTE TOXICITY INTRAPERITONEALLY, MACROSCOPIC AND MICROSCOPIC ANALYSIS OF BODIES ALBINO MICE (*Mus musculus*) TREATED WITH EXTRACT OF HYDROALCOHOLIC *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817) CAULERPACEAE

Evandro V. Silva ^{1,*}, **Carla A. Moura**^{1,†}, **José F. Silva Neto**^{2,†}, **George C. Jimenez**^{2,†}, **Fálba B. R. Anjos** ^{1,†} and **Ivone Antonia de Souza**¹,

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Mores Rego 1235 – Cidade Universitária, Recife-PE; E-Mails: moura721@yahoo.com.br, falbabernadete@gmail.com ; idesouza5@gmail.com

² Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, S/N – Dois Irmãos, Recife-PE; E-Mails: ferreirapeneto@hotmail.com; g3jime@yahoo.com.br

† These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: evandrovalentimblack@yahoo.com.br; Tel.: +55-081-8725-0054.

ABSTRACT

Caulerpa taxifolia is a seaweed which produces secondary metabolites as caulerpina and caulerpenina, in the environment, have the role to repel predators, contributing to the reduction of its consumption of this specie. These secondary metabolite concentration vary in concentration according to the time of year. This study evaluated the acute toxicity of hydroalcoholic extract of *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817), to obtain the lethal dose (LD₅₀). The acute toxicity was conducted with (n = 6) male Swiss albino (*Mus musculus*) mice. All animals were kept in polypropylene cages under control illumination cycle (12 hours light / dark) and temperature (22 ± 2 ° C) to stop feeding for 12 hours before the test and *ad libitum* water. The hydroalcoholic extract of *C. taxifolia* was weighed and dissolved in saline 0.9% NaCl (w / v) according to the concentration of the dose was administered (250,500,750,950,1000,1500,1750 and 2000 mg/kg /ip), the animals were evaluated for 60 minutes and the reactions presented were recorded. After the experiment, the animals were kept under observation for 14 days in polyethylene cages after this period were weighed, sacrificed by cervical dislocation and underwent surgical incision that extends from the chest to the abdomen for withdrawal of the following column organs: kidneys, liver, lung, spleen and testicles for macroscopic and microscopic examination. The hydroalcoholic extract of *C. taxifolia* when administered intraperitoneally produced characteristic reactions of excitement in the central and peripheral nervous system, which were dose dependent type. However, the highest dose at which no adverse effect level (NOAEL) was observed was. 950 mg / kg, while the lowest dose that showed adverse effects (LOAEL) was 1000 mg / kg. From the obtained data, the LD₅₀ was found to be 1750 mg /kg. The hydroalcoholic extract of *C. taxifolia* when administered in high doses produced (≥ 1,000 mg / kg / ip) effects such as swelling of the liver, kidneys, spleen and lung, besides that hypertrophy in the stomach and bladder. In liver were observed intense ischemia and hemorrhage in medullary and cortical region respectively. The results showed that *Caulerpa taxifolia* possibly acts by promoting portal hypertension, indirectly involving the renin-angiotensin-aldosterone system, interfering with the control of

blood pressure, hydrosaline metabolism, causing severe and perhaps irreversible damage in the animal.

Key words: Bioactivity. *Caulerpa taxifolia*. Histology. Seaweed. Toxicity.

1 INTRODUCTION

Algae are important sources of essential compounds for human nutrition. In many countries, the food industry consumes a large amount of algae which has a nutritional value similar to many consumed terrestrial plants and some species are used to produce gels and pigment, and produce high concentrations of vitamins and elements which serve for proper functioning of the body [1,2,3,4].

They are well known for providing large amounts of fiber, minerals, vitamins and antioxidants. In recent decades, there has been an effort in the development of large-scale cultivation at the expense of indiscriminate exploitation of natural banks [3,4].

A variety of secondary metabolites have been identified in marine algae, including terpenes, acetogenins, polyphenols, substances derived from amino acids [5,6] polysaccharides and mineral salts [3]. Some of these compounds recognized by defensive action against herbivores [7,8]. The species of the order Caulerpaceae present diterpenes and sesquiterpenes from the known secondary metabolites [9].

A joint compound to the genus *Caulerpa* is caulerpina (Figure 1) whose biological properties are not yet well known. Algae extracts that genre, revealed the presence of hydroxyamides whose mixture is called caulerpicina [10].

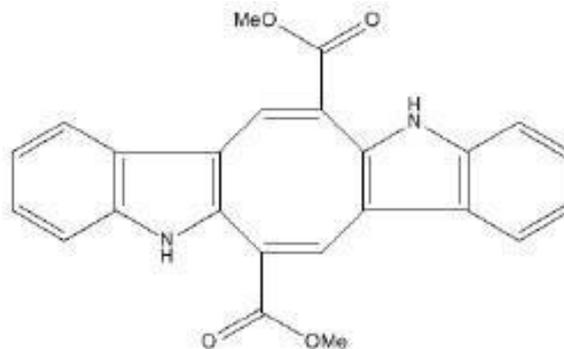


Figure 1: Chemical structure of caulerpina (Fonte: [11])

Caulerpa taxifolia is typical of tropical seas, the size of their fronds and its density varies with the seasons. Among the factors that influence its rapid growth are the high temperature and light intensity, as well as various types of habitat such as rocks, sand and other substrates, which allows large changes in biomass during the year. *C. taxifolia* produces significant changes in the

surrounding ecosystems and diversity of echinoderms and other benthic organisms [12,13]. This algae produced as secondary metabolites caulerpina which has a role in the environment to repel predators, thereby reducing the consumption of the species [8,14,15].

The present study aimed to investigate the acute toxicity of the hydroalcoholic extract of *C. taxifolia* (Eact) (Vahl) Agardh (1817) Caulerpaciae determine the DL_{50} value in Swiss albino mice (*Mus musculus*) intraperitoneally, and analyze macroscopically and microscopically the vital organs of animals treated with hydroalcoholic of seaweed.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Material and obtaining botanical raw material

Samples of seaweed *C. taxifolia* were collected on the beach in Barra do Sirinhaém under the geographical coordinates: S 08°, 36'.34 "5 W 35°.03'.45", 3, município de Sirinhaém , estado de Pernambuco, Brasil.

Were identified according to a taxonomic key described in [16], photographed and stored in polyethylene bags were sent to the Laboratório de Toxicidade e Comunicação Celular (Departamento de Embriologia e Histologia, Universidade Federal de Pernambuco).

One specimen was collected in order to produce a deposit in the herbarium voucher specimen Universidade Federal Pernambuco, Herbário UFP - Geraldo Mariz, which is registered under the number: 68,863.

2.2 Obtaining hydroalcoholic

The extraction procedures used in this work were idealized according to the methodology of [17,18,19].

Samples of biological material after cleaning procedures and accommodation, were crushed in a mechanical grinder and subsequently the material available for extraction procedures. Next, a 300 g sample of this material was added to a volume of one liter of 50 % ethanol solution, staying in maceration at room temperature for a period of one week under constant agitation. After this step the material was filtered with 14µm porosity filters and the supernatant collected was subjected to a procedure of condensation under reduced pressure in rotaevaporator Laborota model 4000 rpm of Heidolph.

2.3 Experimental animals

The animals (n = 54) used in this activity were Swiss albino mice (*Mus musculus*), with approximately 60 days of born weighing between 25 and 30g and 60 days after birth, maintained under controlled lighting conditions (cycle 12 hours light / dark) and temperature (22 ± 2 °C) in polypropylene cages receiving specific food and water *ad libitum* [20].

2.4 Acute toxicity of the extract and determination of DL₅₀

The study was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (protocol number 179/04). The experimental work was conducted at the Departamento de Antibioticos from the Universidade Federal de Pernambuco selection of Swiss albino mice (*Mus musculus*) male rats were divided into groups of six animals each previously marked and heavy.

The test was conducted by administering intraperitoneally. Acute toxicity studies and determination of DL₅₀ was carried out according to the methodology proposed by [20], conducted in two stages, a preliminary and a final. In the preliminary phase of increasing doses of EHACT set D1 (higher survival rate) and D2 (lowest dose able to determine 100 % mortality of animals). The animals received doses of D1 and D2 after the geometric progression of ratio 1/2 in determining the DL₅₀ (the dose lethal to 50 % of the mice). After dosing the animals were observed for 60 minutes and the reactions were shown the various behavioral responses, such as hiking, changes in respiratory rate, diuresis among others. Calculation of DL₅₀ was obtained by the following formula:

$$DL_{50} = DF - (\Sigma (AB)) / n$$

Where: DF = minimum dose capable of killing all animals, A = difference between two consecutive doses, B = number of animals killed between two consecutive doses, n = total number of animals per group. And the degree of toxicity was determined in accordance with the data in Table 1, according to [21].

Table 1 - Classification of toxicity of substances seconds [21].

Degree of toxicity of the substance	DL ₅₀ Substance
Grade 1 - Practically nontoxic	> 15 g kg ⁻¹
Grade 2 - Slightly toxic	5-15 g kg ⁻¹
Grade 3 - Moderately toxic	0,5 -5 g kg ⁻¹
Grade 4 - Very toxic	50-500 mg kg ⁻¹
Grade 5 - Extremely toxic	5-50 mg kg ⁻¹
Grade 6 – Super Toxic	< 5 mg kg ⁻¹

2.5 Histopathological analysis

After the experiment, the animals were kept under observation for 14 days in polypropylene cages after this period were weighed, sacrificed by cervical dislocation and underwent surgical incision that extends from the chest to the abdomen for withdrawal of the following column organs: kidneys, liver, lung, spleen and testicles . The organs were weighed, washed and fixed in formaldehyde 4% for 24 hours, washed with distilled water and processed in increasing concentrations of alcohol (70%, 80%, 90% and 100%) water, embedded in paraffin and stained for technique Hematocilina-eosin (HE) for subsequent microscopic analysis [22,23].

Microscopic analyzes were performed on binocular microscope brand Kinon® model L1000b-AC, and photographs of histological sections conducted with digital camera in the Samsung® model PL120 14.2MP brand with 5X Optical Zoom.

2.6 Statistical Analysis

The mean and standard deviation were evaluated by analysis of variance (ANOVA) using the "t" Student considering significant values for a value of $p < 0.05$ [24] test. The variation between the metabolic rates as a function of dose was assessed by regression analysis of the Excel program, version 2010 of Microsoft.

3 RESULTS

3.1. Evaluation of acute toxicity intraperitoneal

As shown in Table 2, treatment with hydroalcoholic extract of *C. taxifolia* when administered intraperitoneally had various clinical signs of toxicity being more pronounced the effect of excitation of the central nervous system (CNS).

In the first minutes the animals showed stimulating effects as circular movements, flight reaction, piloerection and spasms, then immediately began presenting acrobatic jumps, reflux, aggression, movement disorders, tremor, loss of coordination, ebriosa gait, spasticity, (1000 mg / kg) are among the most frequent. At doses from 1500 to 2000 mg / kg remained catatonic state. Generalized and partial seizures were present at doses from 1000 to 2000 mg / kg.

The animals alternated behavior, between excitement and aggression, reflux, facial tremors, diuresis, executing jumps and tumbling, and circular movements, sometimes inhibitory such as static posture, prostration and drowsiness, which continued until the end of the experiment. The dose of 1000 mg / kg / ip took one animal died during the observation period and other animals remained reactive. Other signals were also detected, among them stood out visual changes photophobia, lacrimation, miosis, conjunctival irritation after 24 h. Among the respiratory signs are:

dyspnea and apnea at higher doses; the skin was noticed edema and cyanosis, it is worth noting here the manifestation of increased libido in 100 % of animals undergoing treatment. In gastrointestinal signals that drew the most attention was the sudden increase in fecal excretion and diuresis at doses from 750 mg / kg / ip, becoming more frequent after 24 hours of administration. Twitching and writhing were also checked.

Table 2 – Table dose response of the hydroalcoholic extract of *C. taxifolia* administered intraperitoneally in albino mice (*Mus musculus*).

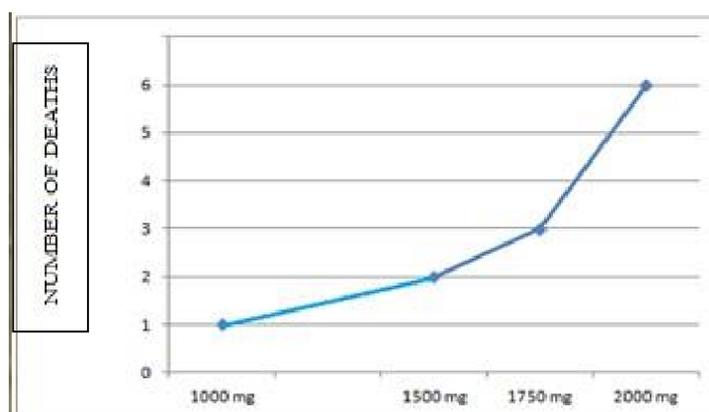
	250 mg /kg	500 mg/kg	750 mg /kg	950 mg/kg	1000 mg/kg	1500 mg/kg	1750 mg/kg	2000 mg/kg
Circular motion	+	++	++	+++	+++	++++	++++	++++
Swelling of the muzzle	+	+	+	+	+	+	+	+
Straub tail	+	+	++	++	++	+++	+++	+++
Flight reaction	+	+	++	++	+++	+++	++++	++++
Stereotyped movement	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++
fecal excretion	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++
Static posture	+	+	+	+	++	++	++	+++
Posture claw	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Movement tail	+	+	+	+	++	++	+++	+++
Heels	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++
Vasodilation	+	+	+	+	+	+	+	+
Increased libido	+	+	++	++	++	+++	+++	+++
Esplasticos movement	+	+	+	+	++	++	++	++
Aggressiveness	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++
Expansion of the pinna auricular	+	+	+	+	+	+	+	+
Cyanosis	+	+	+	+	+	+	+	+
Attack Posture	-	+	+	++	++	+++	+++	+++
Laterality	-	+	+	++	++	+++	+++	+++
Turn around	-	+	+	++	++	+++	+++	+++
Exophthalmos	-	+	+	+	+	+	+	+
Bloating	-	+	+	+	+	+	+	+
Coarse tremors	-	+	+	++	+++	+++	+++	+++
Reactivity	-	+	+	+	+	+	+	+
Diuresis	-	+	+	-	-	-	-	-
Death	-	-	-	-	+	++	++	+++

(+) = Minimal effect observed; (++) = Moderate effect; (+++) = Severe effect; (-) = Effect not observed [25].

At doses of 1500 mg / kg / ip and 1750 mg / kg / ip two and three animals died, respectively, but in the interstium of days fourteen other animals remained alive and reactive. At the dose of 2000 mg / kg / ip all animals died before completing 24 hours of experiment. There was no evidence of record death at doses up to 950 mg / kg / ip.

The mortality rate of the animals increased progressively with increasing doses of the extract (Figure 1): the death rate of 0 % at 950 mg / kg was elevated gradually to 100 % at 2000 mg / kg, the highest dose studied. The dose at which no adverse effect level (NOAEL) was observed was 950 mg / kg, while the lowest dose that showed adverse effects (LOAEL) was 1000 mg / kg. From the obtained data, the LD₅₀ was calculated, which resulted in 1750 mg / kg of body weight.

The toxicity of a substance can be connected to the exposure condition, i.e., involves the dose administered and the route, time and frequency of exposure [26,27]. The exhibition, in turn, is related to the dose or concentration of the chemical agent involved in the body, as well as its interaction with the body, the effect may reflect a cellular or tissue level [26,27,28].



Graph 1 - Dose response curve: number of deaths in relation to dose of crude hydroalcoholic extract of *Caulerpa taxifolia* intraperitoneally.

3.2 Histopathological ratings

3.2.1 Macroscopic analysis

When compared with control animals treated animals with less than 1000 mg / kg / ip doses showed no changes that could be considered significant. At the dose of 1000 mg / kg / ip was observed a slight increase in volume in the liver, kidneys, spleen, lungs and heart, but the volume increase was not considered statistically significant when analyzed (Figure 2).

With more than 1000 mg / kg / ip doses was observed that the lungs had a reddish purple color and the spleen met with spleen and liver was a significant increase in its volume, and in some ischemic areas in the cortical region the pith and the presence of bleeding points was observed.



Figure 2. Features observed in the organs of animals treated with hydroalcoholic extract of *Caulerpa taxifolia* in the dose of 1000 mg / kg / ip. (A) lung is visualized in red purple color, (B) spleen hypertrophy and (C) points of hypertrophic and liver ischemia.

A Were observed in these analyzes that the bowel of the animals treated with doses greater than **B C** 1000 mg / kg / ip were inflated. Hypertrophy in the stomach, appendix and kidney was observed (Figure 3).



Figure 3. Aspects observed macroscopically in the organs treated animals hydroalcoholic *Caulerpa taxifolia* extract, at a dose of 1000 mg / kg / ip. (A) Hypertrophic Stomach, (B) kidney and adrenal hyperplasia, (C) inflated bowel.

3.2.2 Microscopic analyzes

The liver histology in animals treated with hydroalcoholic extract at a dose of 1000 mg/kg/ip demonstrated that the central vein (1) and sinusoids (2) are congested. Apparently preserved hepatocytes (3), but with hemorrhages (4), mainly in the medullary region (Figure 4).

Portal hypertension is related to obstruction of the main portal vein, which causes ascites formation of systemic anastomotic channels, splenomegaly, hepatic encephalopathy secondary (metabolic) entry portal blood into the systemic circulation before its detoxification in the liver.

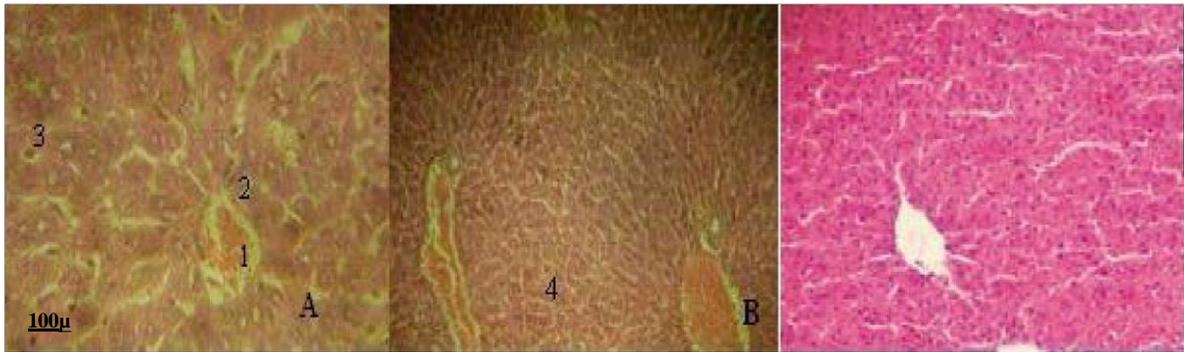
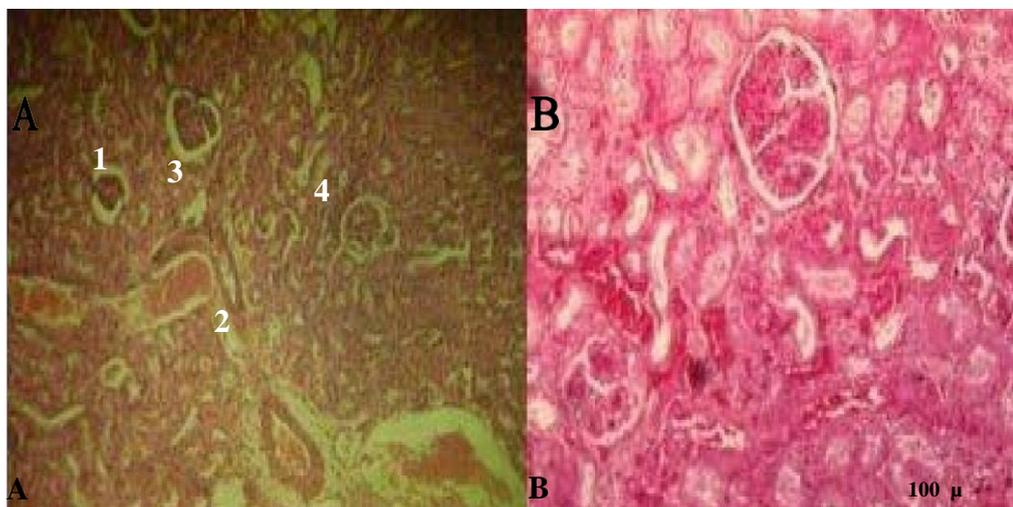


Figure 4 - photomicrograph of a liver of the animals treated with hydroalcoholic at a dose of 1000 mg/ kg/ip (A and B), 1 central artery and 2 - liver sinusoids were congested, 3 -hepatócitos apparently preserved, 4 - bleeding points vascular congestion is observed, (C) control with estruras seemingly preserved. HE staining. 40x Obj.

The morphology of the tests in the treated group showed preserved to some of the seminiferous tubule (1) level in the interstitial tissue and the Leydig cells (2). Differentiated primordial germ cells had disordered between Sertoli cells (3). The extent of damage of the reproductive system was also seen in the epididymis, with little preserved morphology (4). Perhaps this modified arrangement might indirectly reach the spermatozoa (Figure 5).

Figure 5 - Photomicrograph of mouse testis showing light seminiferous tubule (1) interstitial tissue and the Leydig cells (2) apparently preserved disorganization of germ cells from which they were between the Sertoli cell (3), seminiferous tubules totally disorganized (4) the group treated with hydroalcoholic extract of *C. taxifolia* at a dose of 1000 mg / kg / ip, stained with HE. Obj. 10x.



Although the kidneys and adrenals, macroscopically, were increased in volume, the renal cells showed apparently normal in the microscopic study (Figure 6).

Figure 6 - Renal Fotomicrografia: (A) Animals treated with hydroalcoholic *Caulerpa taxifolia* at a dose of 1000 mg / kg / ip. Kidney tissue morphology apparently conserved both as peripheral cortical region was observed in the distal convoluted tubules (1) and proximal (2). Glomeruli (3) and macula densa (4) preserved. (B) estuturas the control group had apparently preserved. HE staining. Obj.40X.

The microscopic structure of the spleen in the group treated with the extract did not change, lymph node, consisting of lymphocytes, involving the central artery of the pulp had become white and possibly with perivascular lymphatic aggregates and cell cables venous sinusoids (Figure 7).

Through photomicrograph of the lungs (Figure - 8) in animals treated with a dose of 1000 mg / kg / ip, areas of edema and a large concentration of inflammatory infiltrates around the bronchi and lung parenchyma bronquíolos. Great disorganization were evident, very committed but with some conserved structures, the presence of congested vessels and areas of fibrosis. The control group showed all structures of the preserved lungs

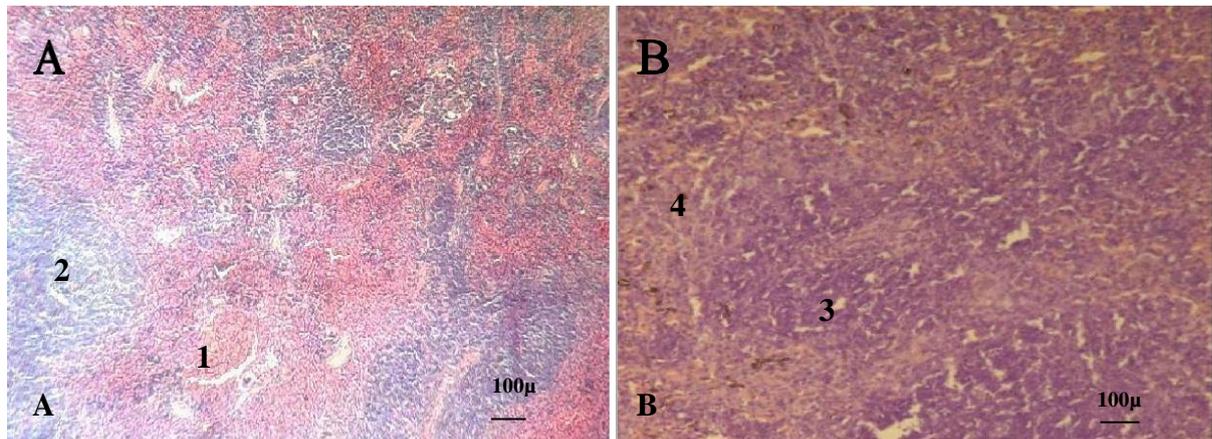


Figure 7 - Photomicrograph of the spleen: (A) animals treated with hydroalcoholic *Caulerpa taxifolia* at a dose of 1000 mg / kg / ip. 1 - Cells of the red pulp and 2 - cells in the white pulp of the spleen apparently preserved; (B) 3 - cells of the red pulp and 4 - Cells white pulp of the spleen apparently preserved in the control group. HE staining Obj. 40x.

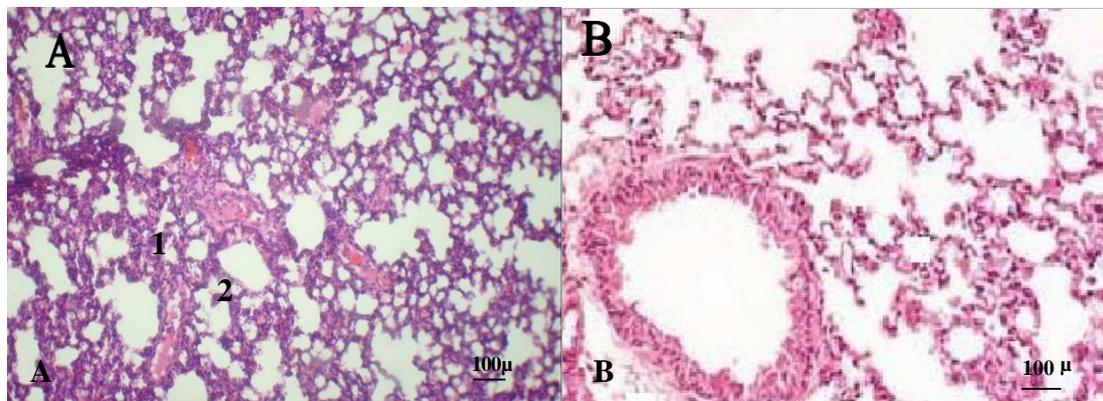


Figure 8 - Photomicrograph of the lungs: (A) Condensation of inflammatory cells around the bronchi and bronchioles, the bronchial epithelium and bronchial changed in the animals treated with hydroalcoholic *Caulerpa taxifolia* at a dose of 1000 mg / kg / ip; (B) Structures morphologically preserved in the control group. (A) 1

Pulmonary artery, 2 respiratory epithelium apparently preserved,(B) structures apparently preserved in the control group. HE staining. Obj.40x.

4. DISCUSSION

4.1 Assessments of acute intraperitoneal toxicity

The results demonstrated that the acute administration of the hydroalcoholic extract of *C. taxifolia* produced toxicity in albino adult Swiss mice, since clinical signs of toxicity were observed and is characterized according to the methodology proposed by [21] moderately toxic, since the drastic effects were not considered viewed from the dose of 1000 mg / kg. The LD₅₀ for the particular strain of animals used in this study was 1750 mg / kg intraperitoneally.

The drastic effects found for the high doses of the extract studied appear to be characteristic of derivatives of indole alkaloids, such as indomethacin and phenylbutazone, because according to [21,29] such substances cause adverse gastrointestinal disorders, edema, liver damage, asthma, reduction in attention and sensory disturbances. According to [30] the genus *Caulerpa* presents as chlorodesmina diterpenoids isolated from *C. fastigiada*, related sesquiterpenoids and diterpenoids, plus an indole alkaloid, derived from tryptophan, which has been isolated from "toxic" species of the genus.

4.2 Histopathological ratings

4.2.1 Macroscopic Analysis

At higher doses ($\geq 1,000$ mg / kg) the hydroalcoholic extract of *C. taxifolia* was capable of producing increased volume of organs such as spleen, kidney, lung, testis. In addition to the increase in liver volume was checked on an ascites formation in the hepatic portal vein, and vascular congestion with a clot in the artery and central vein. According to [31,32] the accumulation of fluid in the hepatic artery and booo door system with congestion of vessels may trigger a portal hypertension, where high production of ADH triggers the pituitary. For a pressure drop caused by frames of bleeding can lead to a high production of ADH.

Splenomegaly is attributed to prolonged congestion in the spleen. A series of hematological abnormalities that may arise secondary to enlargement of the spleen, including anemia, leukopenia and thrombocytopenia. With portal hypertension and a seizure of a large volume of blood, there is a reduction of this fluid in the kidneys, which establishes sodium retention. Furthermore, there is an increased secretion of aldosterone and antidiuretic hormone (ADH), further increasing the retention of sodium and water since these hormones are metabolized in the liver, their high liver levels increase leading to changes even distribution most serious [30,32].

4.2.2 Microscopic analyzes

According to the analysis of histological sections were verified significant alterations in the liver, testes and lungs.

Tests were observed disorganization of germ cells, and in light of the seminiferous tubule which concentrates fully formed sperm, but has not been verified changes in interstitial tissue and Leydig cells.

In histological sections lungs revealed the presence of inflammatory infiltrate surrounding the bronchi and bronchioles, but the respiratory epithelium showed up seemingly preserved. According to [32], the presence of acute inflammatory infiltrate is a response to invasion by chemical, physical or biological agents in the body.

The changes seen in the liver, such as vascular congestion and hemorrhages suggest that to achieve this body that the one responsible for metabolism, hydroalcoholic extract of *Caulerpa taxifolia* possibly exert their action at the very first pass mechanism. These data show that toxins present in *C. taxifolia* would be changing animals metabolic regulation. according to [33, 34] The liver is an organ capable of metabolizing circulating drugs before they reach the systemic circulation.

However the extract was able to overcome this skill and reached target organs.

5. CONCLUSION

The hydroalcoholic extract of *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817) when administered intraperitoneally produces characteristic effects of stimulants central and peripheral nervous system and these increase as the dose increases.

The hydroalcoholic extract *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817) when administered at doses greater than 1000 mg / kg (vip) can cause death of animals and presents LD50 1750 mg / kg.

The hydroalcoholic extract *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817) changed the macroscopic morphology of the kidneys, lungs, liver, spleen and testicles of animals when administered at 1000 mg / kg (vip) doses.

The hydroalcoholic extract *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817) altered the microscopic morphology of the lungs, liver, and testes of animals when administered at 1000 mg / kg (vip) doses.

ACKNOWLEDGMENTS

I would like to acknowledge CNPq of the for her assistance with the investigators in the project.

I would like to acknowledge Capes

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES AND NOTES

- 1- SARDESAI, V.M. Nutritional role of polyunsaturated fatty acids. **J Nutr Biochem** 3: (1992) 154-166.
- 2- MATSUKAWA,R.;DUBINSKY,Z.;KISHIMOTO,E.;MASAKKI,K.;MASUDA,Y.;TAKEUCHI, T.A. comparison of screening methods for antioxidants activity in seaweeds. **J. appl.Phycol.**,v.9,1997,p.29-35.
- 3- OLIVEIRA, E. C. The seaweed resources of Brazil. In: CRITCHLEY, A. T., OHNO, M. eds. Seaweed Resources of the World. Yokosuka: Japan International Cooperation Agency. 1998. p. 367-371.
- 4- OLIVEIRA, R.B.; CUNHA, L.C.; VALADARES, M.C.; FILHO, M.J.P.; ARAÚJO, D.M.;PAULA, J.R.; BASTOS, M.A. 2005. Toxicidade aguda de látex e extrato etanólico de folhas de *Synadenium umbellatum* em camundongos. **Rev Eletr Farm** 2: 143145.
- 5- ORLANDO, S.C. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Caville (Barbatimão) [dissertação].Franca (SP): Universidade de Franca;2005
- 6- BLUNT, J.W.; COOP, B. R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Nat Prod. Rep**, v.22, p. 15-61. 2005.
- 7- BLUNT, J.W.; COOP, B. R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Nat Prod. Rep.**, v.23, p. 26-78. 2006.
- 8- HAY, M.E.; FENICAL.W, Marine plant-herbivore interactions. The ecology of Chemical defense, **Ann. Ver. Ecol. Syst**,19(1), p. 111-145,1988.
- 9- FENICAL W, PAUL VJ. Antimicrobial and cytotoxic terpenoids from tropical green algae of the family Udoteaceae. **Hydrobiologia** 116/117, p135-170,1984.

VIDAL, J.P.; LAURENT, D.; KABORE, S. A.; RECHENCQ, E.; BOUCARD, M.; GIRAND, J.P.; ESCALE, R.; ROSSI, J.C. **Bot.Mar.** (1984), 27,533.

- 10- NAPRALERT. Disponível em: <www.napralert.org> Acesso em: 12 agosto de 2014.
- 11- BELSHER, T. & MEINESZ, A. Deep-water dispersal of the tropical alga *Caulerpa taxifolia* introduced into the Mediterranean. **Aquatic Botany** 51, 163p, 1995.
- 12- LONGEPIERRE, S., ROBERT, A., LEVI, F., FRANCOUR, P., 2005. How an invasive alga species (*Caulerpa taxifolia*) induces changes in foraging strategies of the benthivorous fish *Mullus surmuletus* in coastal Mediterranean ecosystems. **Biodiv. Conserv.** 14, 2005. P.365–376.
- 13- PESANDO D, LEMEE R, FERRUA C, AMADE P, GIRARD JP (1996) Effects of caulerpenyne, the major toxin from *Caulerpa taxifolia* on mechanisms related to sea urchin egg cleavage. **Aquat Toxicol** 35:139-155.
- 14- PAUL VJ, FENICAL W. Chemical defense in tropical green algae, order Caulerpales. **Marine Ecology Progress Series** 34: (1986) 157-169.
- 15- JOLY, Carlos A. et al. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. Revista USP, n. 89, p. 114-133, 2011.
- 16- MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**, Viçosa, MG: UFV, 1994. p.220.
- 17- MATOS, F.J.A.; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham. **Rev. Bras. Farmacognosia**. v.79, p.84-87. 1998.
- 18- FERRI, P.H. **Química de produtos naturais: métodos gerais**. In: DI STASI, L.C. Plantas medicinais: arte e ciência. São Paulo: Editora da Unesp; 1996. p. 129-56.
- 19- KARBER, G.; BEHRENS, B. **Estatistical Methods in Biological Assays**. London: Ed. Griffin and Co., 1964.
- 20- SILVA, P. **Farmacologia**, ed.8ª, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p.1352.
- 21- BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro. p. 230, 1976.

- 22- DALE, M.M.; RANG, H.P.; RITTER, J.M.;FLOWER,R.J. **Farmacologia**, 6º edição: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p.829.
- 23- MORETTIN,L.G. **Estatística Básica**: Probabilidade e Inferência.n.1.v.1.São Paulo:Pearson Prentice Hall,2010.p.376.
- 24- MALONE, M. H. **Natural Products & Plants Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activit**.1977.
- 25- SOMANI, R.B., INGLE, R.W., AND WANJARI, S.S. Variability in *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn causing grain mold in sorghum. *Sorghum and Millets Newsletter* 35: (1994)106–107.
- 26- AMDUR, M. O.; DOULL, J.; KLASSEN, C. D. Casarett and Doull's, **Toxicology: The Basis Science of Poisons**. 6ª Edition. New York. In Macmillan Publishing. 2001.
- 27- ORGANIZATION UNITED NATIONS, 1994, Official Statistics: Principles and Practices, Organization and Management. Disponível em: <<http://unstats.un.org/unsD/methods/statorg/default.htm>>. acesso em: 23 Dez. 2013.
- 28- ROBBINS, S.L.; ANGELL,M.; KUMAR,V. 1984, **Patologia básica**, Editora da Universidade de São Paulo, 16: 577-625.
- 29- ROBBINS, S.L.;COTRAN,R.S. **Patologia**: Bases – Patologicas das doenças, ed.Elsevier,Rio de Janeiro, v.7, 2000, p.1592.
- 30- LIEBER, C.S. Metabolism of alcohol. *Clinics in Liver Disease* 9:1–35, 2005.
- 31- NAVARRO, V.J.; SENIOR,J.R.; Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2006; 354:731-9.
- 32- GOLAN,D.E. et al. **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiológica da Farmacoterapia**. 2º edição: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012, p.952.
- 33- AGUILAR-SANTOS, G.J.; CHEM.SOC. C., Chemical studies on three species of marine algal genus *Caulerpa*. In. Froedenthal, H.D. (ed.) *Drugs from the sea*. **Marine Technology Society**, p. 173-176. 1970.

5. Artigo 2

**Artigo submetido ao International Journal of
Clinical and Experimental Pathology**



ANTITUMOR ACTIVITY of EXTRACTS of *Caulerpa taxifolia* in the SARCOMA 180 TUMOR TREATMENT.

Evandro Valentim da Silva^{1,2}, Gabriela Cavalcante da Silva²; José Ferreira Silva Neto³, George Chaves Jimenez³,
Fálba Bernadete Ramos dos Anjos¹, Ivone Antonia de Souza²

¹Department of Hstology and Embryology Universidad Federal of Pernambuco, Brazil; ²Department of Antibiotics Universidad Federal of Pernambuco, Brazil; ³ Fisiology and Pharmacology Animal of Universidad Federal Rural of Pernambuco, Brazil;

Running title: Antitumor activity of *Caulerpa taxifolia*

Abstract word count: 191

Tables: 2

Color figures: 4

Black and white figures: 0

Acknowledgement: This work was partly supported by operating research grants from the Canadian Cancer Society and the Alberta Cancer Foundation awarded to RL.

Abstract

Cancer is a disease characterized by the multiplication and spread out of control in the form of anomalous cells. A normal cell becomes cancerous cells as a result of one or more mutations of DNA. Marine algae are a rich source of bioactive compounds, some of which are precursors of pharmacological tools and potentially useful substances for the development of new drugs. The present study aims to evaluate the antitumor activity of *Caulerpa taxifolia* front of Sarcoma 180 in albino mice (*Mus musculus*). The transplanted animals with sarcoma 180 (n = 24), were divided into four groups (n = 6) treated with two extracts: the MeOH extract (T1) and from hydroalcoholic *C. taxifolia* (T2) at a dose of 50 mg/kg ip. The control group (S1) received saline for the same route of administration. The default group (S2) received the reference drug to the tumor lineage. The data revealed that the S3 and S4 group responded to treatment with reduction of 63.6 and 42, 0 % respectively, as compared to EN/PA, when compared with the control group. The activities of extracts were higher than those of the reference drug for the Sarcoma 180.

Keywords: phytotherapy, bioassay, bioactivity.

Introduction

Cancer cells manifest to varying degrees, with four features that distinguish them from normal cells: uncontrolled proliferation, differentiation and loss of function, invasion and metastasis of power [1]. The growth of the malignant tumor is the result of the imbalance between proliferation capacity of your cells and the body's reaction to stop him [1-3].

Cancer is characterized by the uncontrolled multiplication and dissemination of abnormal forms of the body's own cells [4]. i.e. the existence of cells that undergo changes in the control mechanisms that regulate the ability of differentiation and cellular proliferation, tissue penetration, the compression of blood vessels and migrate to other places in the body where these uncontrolled cells can maintain their ability to proliferation and growth [2,5].

The term tumor is used to describe a volume increase of organ or tissue; already the word cancer is intended to describe an invasive neoplasm. Neoplasm and tumor can refer to benign and malignant growths, while the term always cancer refers to malignant growth. The benign neoplasms, commonly, do not invade surrounding tissue or spread to other organs, are able to be treated and is unlikely to lead the patient to death. On the other hand, the evil, when not treated, invade and spread throughout the body through the Mets, with a high chance of getting the patient to death [2.3]. Currently, in the United States of America, one in every four deaths by diseases is due to cancer [6]. This being considered the second leading cause of death in the world, behind only of deaths due to cardiovascular problems [5].

The malignant neoplasms are among the leading causes of mortality, corresponding to the second most common cause of death from natural causes. According to the data of records of cancer in Brazil, the most frequent are tumors of the prostate, lung, stomach, colon, rectum and oesophagus in the male population. Women breast cancer predominates, followed by cancers of the cervix, colon and rectum, lung and stomach [3,7,8].

In Brazil, the mortality from neoplasms has been growing considerably over the last few decades. In 2008, according to the information of mortality, according to the Group of causes (ICD10), neoplasms (tumors) represented the second most common cause of death in the population (except the "Other causes set"), which represents more than 14.6% of total deaths in the country [3].

Marine algae are a rich source of bioactive compounds potentially useful for the development of new drugs [9]. *Caulerpa taxifolia* are rich in caulerpine, which presents a broad spectrum of biological activities, such as the antioxidant and antitumor activity [10,11]. In the face of the present study aims to evaluate the antitumor activity of seaweed *C. taxifolia* in Swiss albino mice (*Mus musculus*) patients with sarcoma 180.

Materials and methods

Obtaining the extracts

Samples of seaweeds *C. taxifolia* has been collected at the beach of Barra do Sirinhaém, municipality of Sirinhaém, State of Pernambuco, Brazil. Were stored in polyethylene bags being conducted at the laboratory of cellular communication-UFPE. The extraction procedures used in this study were designed according to methodology of [12, 13].

Samples of biological material after cleaning procedures and accommodation were pounded into mechanical mill, later being the material made available to the extraction procedures. Then, a sample of 500 g of this material has been added to a volume of one litre of ethanolic solution to 50%, getting in maceration at room temperature for a period of one week. After this step, the material was filtered on filters and route paper evaporated in At low pressure model 4000 rpm the Laborota Heidolph®.

In addition, a 500 g sample of the biological material, properly processed and crushed in similar conditions in relation to previous extract was added to a volume of one litre of methanol for subsequent maceration at room temperature for a period of one week. After this step, the material has been filtered with paper filters, and evaporated in rotaevaporator model 4000 rpm the Laborota Heidolph®.

Experimental animals

The animals used in this activity were albino Swiss mice (*Mus musculus*), with approximately 60 days of born weighing between 25 and 30, kept under controlled conditions of illumination (cycle of 12 hours dark/light) and temperature ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), in polypropylene cages getting specific feed and water ad libitum.

Antitumor activity

Tumor cells lineage ascites sarcoma 180, with eight days after implantation, were sucked from the peritoneal cavity of mice and implanted subcutaneously (0.2 mL- 25×10^6 cells/mL), in subaxilar region of experimental animals (n = 6). The 24 hours after implantation, the extract was solubilized in tween 80 (Sigma-Aldrich®) (5%) and administered by intraperitoneal route for seven days, in doses of 50 and 100 mg/kg. Cyclophosphamide (10 mg/kg) was used as positive control. The negative control group was administered a solution of Tween 80 (MONTENEGRO, 2008), still used a fifth group (sound control), the animals (n = 6) remained under the same experimental conditions of treated and control groups, but have not been transplanted with the tumor cells (sarcoma 180) on the ninth day all the animals were euthanized and the tumors excised, weighed and fixed in formaldehyde (10%). Tumor inhibition was calculated according to the formula:

$$\text{TWI (\%)} = (C-T) \times 100/C \text{ Where:}$$

TWI = percentage of inhibition of the tumor weight

C = average of the weights of the tumors in the control group T = average of the weights of the tumors of the treated group.

The tests were carried out according to the methodology described by [15].

Biochemical and hematological parameters evaluation

On the ninth day of the experiment, after fasting for 6 hours, the animals were anesthetized with sodium thiopental (Thiopentax®, crystal clear) and blood samples were collected by the orbital Plexus with a heparinized needle.

For the analysis of biochemical and Hematological parameters (glucose, urea, creatinine, bilirubin, AST and ALT) blood was subjected to centrifugation for 10 minutes at 3500 rpm for obtaining plasma. These parameters were determined using specific kits for the automatic biochemical Analyzer Cobas Mira Plus® (Roche Diagnostic System).

Analyze histological

The animals were euthanized and the organs and tumors removed, heavy and fixed in 10% formaldehyde for 24 hours, washed with distilled water and processed in increasing concentrations of alcohol (70%, 80%, 90% and 100%), soaked in paraffin and stained to the technique Hematocilin-eosin (HE) for subsequent microscopic analysis [16].

Microscopic analyses were conducted binocular microscope model AC-L1000b Kinon® brand, and photographs of histological sections held with digital camera in Samsung® brand model PL120 14.2 MP 5 x Optical Zoom.

Statistical analysis

For the three experiments were carried out tests in triplicate. The results obtained in the experiments were analyzed employing – if the test analysis of variance (ANOVA) one way, followed by the *Tukey* test where the values are expressed as mean \pm standard error of media (e.p.m), and the results considered significant when $p < 0.05$. [17].

Results

On the relationship between the tumor weight and the weight of the animal (EN/PA) of animals with Sarcoma 180 groups showed that the treated group 1 (S3) showed an average of 0.0376 (table 1) and when compared with the Control Group's average value (S1), which was the Group S3 0.1032 presented a 63.6 % lower value than the control group. Compared treated group 2 (S4), which featured an average of 0.0599, and the control group, the S4 group presented an average 42.0 % smaller in proportion to PT/PA. The average value of the default group, which was when 0.0700 related to the control group, presented 32.2 % average less than this.

The serum values of glucose, urea, bilirubin, SGOT and SGPT to all groups studied were within the reference levels for mice, as can be seen in table 2; the creatinine levels were higher than those of reference were. Both the MeOH extract as the hidroalcoholic extract showed significant reduction in tumor mass, when compared to control groups, with results superior to that achieved with the recommended dose of the drug for sarcoma. Several works involving preclinical in vivo studies of natural products, using biochemical parameters to evaluate possible signs of toxicity [18, 19, 20, 21, 22, 23].

Pharmacological/toxicological studies these after exposure to drugs, are analyzed the parameters to assess possible changes in liver function as through the levels of TGP and TGO, kidney function as urea and creatinine.

Analysis of hepatic and renal tissues present preserved morphology (Figure 1). The hepatocytes and liver sinusoids with preserved architecture, however was observed the presence of bleeding points in the fabric. The renal system does not seem to be affected by the extract (Group T1), not being observed changes in cortical and Medullary regions of these individuals, structures like the contorted twitch of the proximal and distal tubules clusters showed normal anatomy.

The microscopic Anatomy of the gonads of the treated animals was viewed Sertoli cell and spermatocytes, as well as interstitial tissue and Leydig cells without morphological change (Figure 2 - A). The lungs and the pulmonary artery branches within the standard of normality. It was viewed that the structure of the respiratory epithelium (Figure 2 - B).

Spleen presenting cells of the white pulp red pulp, trabecula, corona, germinal Center and arterioles of preserved morphology (Figure 3 - A), heart tissue showing interleaved disk, mononucleated with core compatible with normality (Figure 3 - B).

Discussion

According to the results, we can suggest that the extract used in Group T1 presented in front of the Sarcoma 180 antitumor activity with 95 % higher than the activity presented by reference drug to the tumor lineage. When compared to the activity of the drug administered to the default group (S2) and extract administered in Group T2, this presented an activity 31 % higher than the reference drug on tumor lineage.

The values of glucose, urea, bilirubin, SGOT and SGPT to all groups studied were within the reference levels for laboratory animals, as can be seen in table 2, creatinine levels already showed higher values of reference. The biochemical parameters such: glucose, urea, creatinine and bilirubin of the treated group showed similar values to the control groups and default, which became one of the reference values for mice.

TGO levels already and TGP suffered a significant reduction in the group treated with hidroalcoholic extract, which showed a significant reduction in tumor mass, when compared to control groups, having better results than achieved with the recommended doses of the drugs. Several works involving preclinical in vivo studies of natural products, using biochemical parameters to evaluate possible signs of toxicity [18, 19, 20, 21, 22, 23]. Pharmacological/toxicological studies these after exposure to drugs, are analyzed the parameters to assess possible changes in liver function as through the levels of TGP and TGO, kidney function as urea and creatinine.

In analysis of antitumor activity, in this study, it was a better performance of the MeOH extract of *C. taxifolia*, front line of Sarcoma 180, that reduction of 63.6 % in PT/PA relationship, while the hidroalcoholic 42.0 % reduction extract, and this may be the activities of secondary metabolites present in the extract, being the MeOH extract what drag as many secondary metabolites contained in the plant. The MeOH extract crude

indicated the presence of alkaloids, terpenoids, steroids and saponins [24]. Alkaloids that have anticancer activity belong to a new class of bisindolic's derivatives, which may suggest that the anticancer activity of *C. taxifolia* relates the alkaloids present in the extract [25]. An indolic alkaloid derived from tryptophan, off isolated from species of the genus *Caulerpa* considered toxic. Morphological changes were not observed in animals treated with studied extracts, which can characterize the secondary metabolites contained in the extracts at studied, have little or no side effects [26,27].

References

- [1] Goodman LS, Gilman AG. As bases farmacológicas da terapêutica. edited by Guanabara, Rio de Janeiro, RJ: McGrawHill, 2012,pp.85-123.
- [2] INCA - Instituto Nacional de Cancer, Rio de Janeiro, 2012, 2ª edição revista e atualizada. Disponível em:<http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/ABC_do_cancer_2ed.pdf>. Acesso em: 10 de maio de 2014.
- [3] INCA. Fisiopatologia do câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf>> .Acesso em: 16 de junho de 2014.
- [4] Silva AER, Fiori ATM, Matsumoto C, Cruz A, Silva NMO, Bernardes ACA, Carvalho RP, Mazzola PG. Levantamento bibliográfico de antineoplásicos padronizados no Hospital da Mulher – Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti (CAISM) UNICAMP In: Congresso dos Profissionais das Universidades de São Paulo, São Paulo: USP, Unicamp e Unesp, 2011.
- [5] Oliveira JS, Costa-Lotufo LV, Bezerra DP, Alencar NM, Marinho-Filho JD, Figueiredo IS, Moraes MO, Pessoa C, Alves AP, Ramos MV. In vivo growth inhibition of Sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2010; 382(2):139-49.
- [6] Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.*2007; 57(1):39-43.
- [7] Guerra MR, Gallo CVM, Mendonça G. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Revista Brasileira de Cancerologia*.2005; 51(3):227-34.
- [8] Santos 2011
- [9] Natali ALC. Ação inotrópica positiva do extrato metanólico de *Bryopsis pennata* (CHLOROPHYTA CAULERPALES). Dissertação (Mestrado em Biociência) Universidade de São Paulo. 2007.
- [10] Hay ME, Fenical W. Marine plant-herbivore interactions. The ecology of Chemical defense. *Ecol. Syst*, 1988; 19(1):111-45.
- [11] Solè-Cava AM, Kelecom A. Diálogo químico dos mares, *Ciência Hoje*. 1988; 8(46):18-29.
- [12] Matos FJA, Oliveira F. *Lippia sidoides* Cham. *Rev. Bras. Farmacognosia*. 1998;79(1):84-87.
- [13] Di Stasi LC: Plantas medicinais: arte e ciência. Edited by Unesp. São Paulo, 1996,pp.129-56.
- [14] Geran RI, Greenberg NH, McDonald MM, Schumacher AM, Abbot BJ. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemoth.*1972; 33(1):1-103.
- [15] Geran RI, Greenberg NH, McDonald MM, Schumacher AM, Abbot BJ. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemoth.*1972; 33(1):1-103.
- [16] Robbins SL, Angell M, Kumar V. *Patologia básica*, Editora da Universidade de São Paulo.1984 Nov; 16(1):577-625.
- [17] Morettin LG. *Estatística Básica: Probabilidade e Inferência*. São Paulo:Pearson Prentice Hall.2010; 1(1): pp1-376.
- [18] Bezerra D P, Castro FO, Alves AP, Pessoa AC, Moraes MO, Silveira ER, Lima, MA, Elmiro FJ, Alencar NM, Mesquita RO, Lima MW, Costa-Lotufo LV. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. *Journal of Applied Toxicology*. 2008; 28(2):156-63.
- [19] Bezerra DP, Marinho-Filho, FD, Alves AP, Pessoa C, Moraes MO, Pessoa OD, Torres MC, Torres MC, Silveira ER, VIANA FA, Costa-Lotufo LV. Antitumor activity of the essential oil from the leaves of *Croton regelianus* and its component ascaridole. *Chemistry & Biodiversity*.2009; 6(8):1224-31.
- [20] Gonzaga ML, Bezerra DP, Alves AP. In vivo growth of Sarcoma 180 by alpha-(14)- glucan(16)- glucan-protein complex polyccharide obtained from *Agaricus blazei* Murrill. *J.Nat.Med.* 2009; 63(1):32-40.
- [21] Lins KO, Bezerra DP, Alves AP, Alencar NM, Lima MW, Torres VM, Pessoa C, Moraes, MO, Costa-Lotufo LV. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). *Jornal of Applied Toxicology*.2009;29(1):20-6.
- [22] Magalhães HI, Ferreira PM, Moura ES, Torroes MR, Alves AP, Pessa OD, Costa-Lotufo LV, Moraes, MO, Pessoa C. In vitro and in vivo antiproliferative activity of *Calotropis procera* stem extracts. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2010; 82(2):407-16.
- [23] Oliveira-Júnior RJ. Análises citogenéticas e expressão da telomerase em Sarcoma 180. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, MG. 2008.
- [24] Moura CA, Silva EV, Cavalcanti KPS, Anjos FBR, Jimenez GC, Oliveira SF, Souza IA. Perfil Fitoquímico da Macroalgas Marinha *Caulerpa taxifolia* (VAHL) C.AGARDH, 1817 (caulerpaceae) Congresso Brasileiro de Oceanografia, Rio de Janeiro, Nov. 2012.
- [25] Robbins SL, Cotran RS. *Patologia: Bases – Patológicas das doenças*, ed.Elsevier,Rio de Janeiro, 2000, 7:1592.
- [26] Aguilar-Santos G, Chem J, SOC C. Chemical studies on three species of marine algal genus *Caulerpa*. In. Froedenthal, H.D. (ed.) *Drugs from the sea*. Marine Technology Society.1970; 84(2) :173-76.
- [27] Maiti BC, Thamson RH, Mahendran M. The structure of caulerpina, a pigment from *Caulerpa* algae. *J. Chem.* 1978 May; 34(5):126-27.

Table 1. Averages and standard deviations of the animals' weights ratio (PA) (*Mus musculus*) of Sarcoma 180 (EN) and PT/PA relations of control groups (S1) (control with saline 0.9 via ip), standard (S2) 10 mg/kg/Cyclophosphamide ip, treated with meoh extract of *c. taxifolia* at a dose of 50 mg/kg/ip (S3), hydroalcoholic extract of *C. taxifolia* at a dose of 50 mg/kg/ip (S4).

Grupos	PA	PT	PT/PA
S1 – Control	32,0 ± 0,2	3,305 ± 0,002	0,1032 ± 0,05
S2 – Padrão	35,0 ± 0,03	2,452 ± 0,002	0,0700 ± 0,01
S3- Treated 1	34,72 ± 0,3	1,305 ± 0,002	0,0376** ± 0,001
S4 – Treated 2	30,3 ± 0,4	1,814* ± 0,002	0,0599** ± 0,002

Significant difference relative to the control (ANOVA followed by Tukey test **).

Table 2. The averages and standard deviations of reason between the biochemical and Hematological data obtained by colorimetric method described in Frankel and Reitman (1957) (*Mus musculus*) in groups with Sarcoma 180 of control groups (S1) (control with saline solution 0.9 via ip), standard (S2) 10 mg/kg/Cyclophosphamide ip, treated with meoh extract of *c. taxifolia* at a dose of 50 mg/kg/ip (S3) hydroalcoholic extract of *C. taxifolia* at a dose of 50 mg/kg/ip (S4).

Grups	Glucose	Urea	Creatinine	Bilirubin	TGO	TGP
S1 – Control	106,3 ± 4,6	45,9 ± 2,3	0,58 ± 0,02	1,3 ± 0,2	84,6 ± 4,4	50,6 ± 6,7
S2 – Padrão	103, ± 2,4	49,0 ± 1,3	0,61 ± 0,06	1,2 ± 0,3	77,3 ± 5,8	51,9 ± 4,6
S3 – Treated 1	99,6 ± 5,2	42,5 ± 3,5	0,79 ± 0,04	1,2 ± 0,3	73,6 ± 3,6	49,3 ± 10,5
S4 Treated 2	102,1 ± 3,2	48,4 ± 4,2	0,68 ± 0,08	1,3 ± 0,4	82,6 ± 3,8	47,4 ± 4,3

The reference value for mice: glucose = 100; Urea = 48.0; creatinine = 0.5 IU; Bilirubin = 0.9; TGO = 80 IU; TGP = 50 IU (DANTAS et al., 2006).

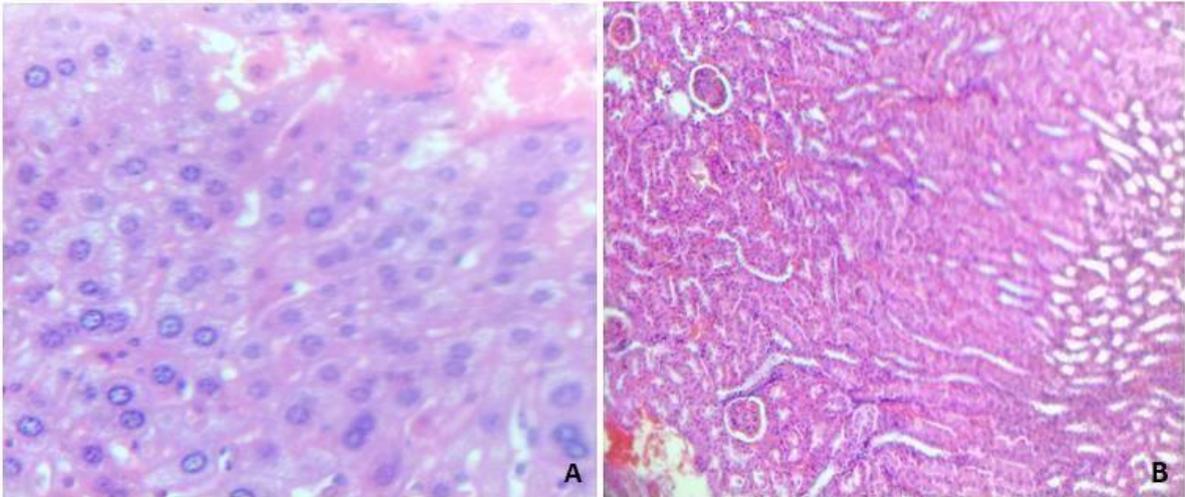


Figure 1. Hepatic Tissue (A) and (B) renal Tissue stained in HE observed in optical microscope 10 x.

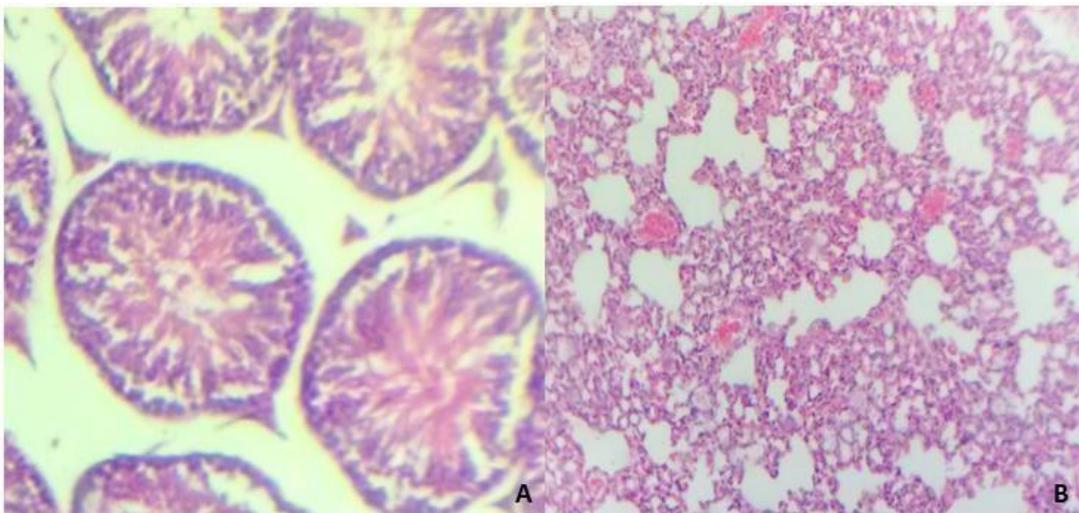


Figure 2. Histological Cut of the testis and lung (B) stained in HE observed in optical microscope 10 x.

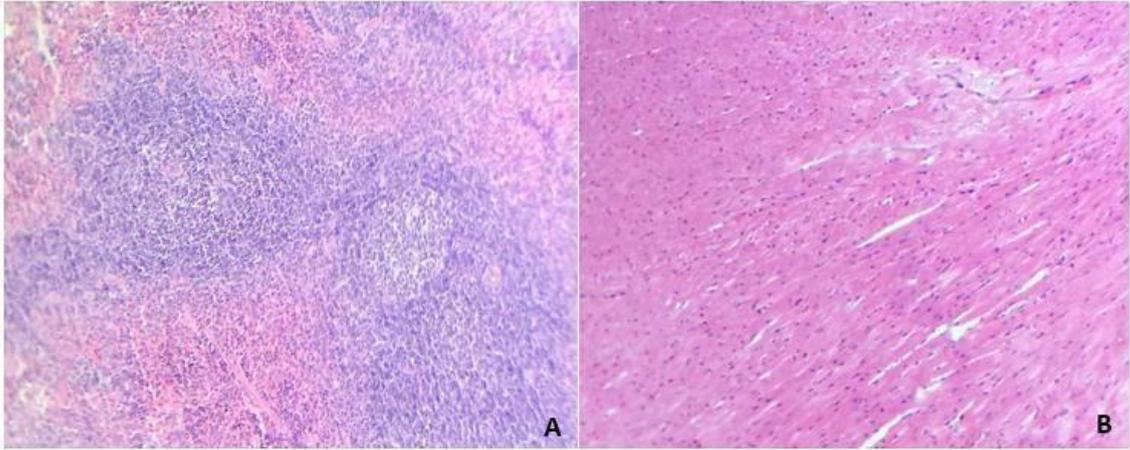


Figure 3. Histological Cut of splenic tissue (A) and (B) heart stained in HE observed in optical microscope 10 x.

6. Artigo 3

Artigo a ser submetido ao Cancer Science Journal



ATIVIDADE ANTITUMORAL DE EXTRATO DE *Caulerpa taxifolia* NO TRATAMENTO DE CARCINOMA DE ERHLICH

EVANDRO VALENTIM DA SILVA; JOSÉ FERREIRA SILVA NETO; GEORGE CHAVES JIMENEZ; FÁLBA BERNADETE RAMOS DOS ANJOS; IVONE ANTONIA DE SOUZA

RESUMO

O presente estudo teve o objetivo de avaliar a atividade antitumoral da macroalga marinha *C. taxifolia* em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) portadores de carcinoma. Células tumorais ascíticas da linhagem carcinoma de Ehrlich foram implantada na região subaxilar dos animais, e após 48 horas foi iniciado o tratamento com extrato hidroetanólico (50 mg/kg) e metanólico (50 mg/kg) foi solubilizado em tween 80, ao controle positivo foi administrado Metotrexato (10 mg/kg) e o controle negativo só o tween 80. Após 8 dias de tratamento foi coletado sangue dos animais para teste bioquímicos, e os animais depois de eutanasiados onde o tumor e órgãos vitais removidos, pesados e submetido a cortes histológicos, com posterior análise histopatológica. Os animais dos grupos tratados e padrão foram comparados com o grupo controle, desta relação obteve-se os percentuais de inibição do crescimento tumoral. Ambos os grupos tratados apresentaram redução significativa da massa tumoral, sendo a redução apresentada pelo extrato hidroetanólico ligeiramente maior que o extrato metanólico e fármaco de referência. A diferença entre estes dois grupos não foi considerada significativa estatisticamente. Foi verificado que os extratos não causaram alteração significativa dos dados bioquímicos avaliados e também não causou danos a nível tecidual ou celular nos órgãos vitais dos grupos estudados.

Palavra Chaves: Algas Marinhas. Carcinoma de Ehrlich. *Caulerpa taxifolia*. Terapia Anticâncer.

ABSTRACT

This study aims to evaluate the antitumor activity of seaweed *C. taxifolia* in Swiss albino mice (*Mus musculus*) carriers of carcinoma. Ascites tumor cells of Ehrlich carcinoma line was implanted in subaxilar region of the animals, and after 48 hours to yield the beginning of treatment, where the hydroetanolic extract (50 mg / kg) and methanol (50 mg / kg) was solubilized in Tween 80 and the positive control was administered methotrexate (10 mg / kg) and negative control only Tween 80. After 8 days of treatment, blood was collected for biochemical test animals, and the animals were euthanized after the tumors and vital organs removed, weighed and subjected to histological sections, with subsequent histopathologic analysis. Animal standard and treated groups were compared with the control group, this relationship was obtained the percentage of inhibition of tumor growth. Both treatment groups showed significant reduction in tumor mass, the reduction presented by hydroetanóolic extract slightly larger than the methanol extract and reference drug. The difference between these two groups was not statistically significant. It was found that the extracts did not cause significant change in the Biochemical data and caused no damage to tissue or cellular level in vital organs of the groups studied.

Key word: Seaweed. Ehrlich carcinoma. *Caulerpa taxifolia*. Anticancer Therapy.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado pela multiplicação e disseminação descontroladas de formas anômalas de células do próprio corpo (SILVA et al., 2011) ou seja, pela existência de células que sofrem alterações nos mecanismos de controle que regulam a capacidade de diferenciação e proliferação celular, ocorrendo a penetração em

tecidos, a compressão de vasos e migração para outros locais do organismo, nos quais essas células descontroladas conseguem manter sua capacidade de proliferação e crescimento (OLIVEIRA, 2010; INCA, 2012).

As células cancerosas manifestam-se em graus variáveis, com quatro características que as distingue das células normais: proliferação descontrolada, perda de diferenciação e da função, poder de invasão e metástases (GILMAN, 2012). O crescimento do tumor maligno é resultado do desequilíbrio entre a capacidade de proliferação de suas células e a reação do organismo para detê-lo (GILMAN, 2012; INCA, 2012; INCA, 2013).

O termo tumor é utilizado para descrever um aumento de volume do órgão ou tecido; já a palavra câncer destina-se a descrever uma neoplasia invasiva. Neoplasia e tumor podem referir-se a crescimentos benignos e malignos, enquanto o termo câncer sempre se refere a crescimento maligno. As neoplasias benignas, comumente, não invadem tecidos adjacentes nem se disseminam para outros órgãos, têm possibilidade de ser tratadas e dificilmente levam o paciente a óbito. Em contrapartida, as malignas, quando não tratadas, invadem e disseminam-se por todo o organismo por meio das metástases, com elevada chance de levar o paciente a óbito (INCA, 2012; INCA, 2014). Atualmente, nos Estados Unidos da América, uma em cada quatro mortes por doenças é decorrente de câncer (JEMAL, 2007). Sendo está considerada a segunda maior causa de morte no mundo, ficando atrás apenas de mortes decorrentes de problemas cardiovasculares (OLIVEIRA, 2011;).

No Brasil, a mortalidade por neoplasias vem crescendo consideravelmente ao longo das últimas décadas, ao mesmo tempo em que diminuíram as mortes por doenças infecto parasitárias. Em 2008, de acordo com as informações de mortalidade, segundo o grupo de causas (CID10), as neoplasias (tumores) representaram a segunda causa de óbito na população (exceto as “Demais causas definidas”), o que representa mais de 14,6 % do total de mortes ocorridas no país.

As algas marinhas representam uma rica fonte de compostos bioativos potencialmente úteis para o desenvolvimento de novos fármacos (NATALI, 2007). *Caulerpa taxifolia* são ricas em caulerpina, que apresenta um amplo espectro de atividades biológicas como, por exemplo, a atividade antioxidante e antitumoral (HAY; FENICAL, 1988; SOLÉ-CAVA; KELECOM, 1988). Diante do exposto o presente estudo tem o objetivo de avaliar a atividade antitumoral da macroalga marinha *C. taxifolia* em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL BOTÂNICO

Amostras de macroalgas marinhas *C. taxifolia* foram coletados na praia de Barra do Sirinhaém, município de Sirinhaém, estado de Pernambuco, Brasil. Foram armazenadas em sacos de polietileno sendo conduzidas ao Laboratório de comunicação celular (Departamento de Embriologia e Histologia – UFPE)

2.2 OBTERÇÃO DOS EXTRATOS

Os procedimentos de extração utilizados no presente trabalho foram idealizados segundo metodologia de Martins (1994); Ferri (1996); Matos; Oliveira (1998).

As amostras de material foram trituradas em moinho mecânico, e posteriormente o material disponibilizado para os procedimentos de extração. Em seguida, uma amostra de 3,0 kg deste material foi adicionada a um volume de um litro de solução etanólica a 50 %, com maceração em temperatura ambiente por um período de uma semana. Após esta etapa o material foi filtrado e rota evaporado em Rotaevaporador modelo Laborota 4000 rpm da Heidolph.

Paralelamente, outra amostra de 3,0 kg do material, foi processada e triturada em condições semelhantes em relação ao extrato anterior, foi adicionada a um volume de um litro de metanol para posterior maceração à temperatura ambiente, por um período de uma semana. Após esta etapa, o material foi filtrado, e rota evaporado em Rotaevaporador modelo Laborota 4000 rpm da Heidolph.

Amostras condensadas de ambos os procedimentos de extração foram devidamente ajustadas para os bioensaios, como serão descritos a seguir, para a atividade antitumoral.

2.3 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Os animais utilizados nesta experimento foram camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), com aproximadamente 60 dias de nascidos com pesos entre 25 e 30 g, mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo de 12 horas claro/escuro) e temperatura (22 ± 2 °C), em gaiolas de polipropileno recebendo alimentação específica e água *ad libitum*.

2.4 ATIVIDADE ANTITUMORAL

Células tumorais ascíticas da linhagem carcinoma de Ehrlich, com oito dias após implante, foram aspiradas da cavidade peritoneal de camundongos e

implantadas por via subcutânea (0,2 mL – 25×10^6 células /mL), na região subaxilar dos animais experimentais (n=6). Após 48 horas da implantação, o extrato hidroetanólico e metanólico foi solubilizado em tween 80 (Sigma-Aldrich®) (5 %) e administrado por via intraperitoneal durante sete dias, na dose de 50 mg/kg. Metotrexato (10 mg/kg) foi usada como padrão. Ao grupo controle foi administrado uma solução de Tween 80 (MONTENEGRO, 2008), Ao termino do tratamento de 8 dias todos os animais foram eutanasiados e os tumores extirpados, pesados e fixados em formaldeído (10 %). A inibição tumoral foi calculada segundo a fórmula:

$$TWI (\%) = (C-T) / C \times 100$$

Onde:

TWI = Percentual de inibição do peso do tumor C = Média dos pesos dos tumores do grupo controle T = Média dos pesos dos tumores do grupo tratado.

Os ensaios foram realizados conforme a metodologia descrita por GERAN et al. (1972).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A média e o desvio padrão foram avaliados por análise de variância (ANOVA) mediante o teste “t” de Student, considerando-se significativo os valores para um valor $p < 0,05$ (MORETTIN, 2010). A variação entre as taxas metabólicas em função da dose foi avaliada por análise de regressão do programa Excel®, versão 2010, da Microsoft®.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os valores descritos na Tabela 1, a relação entre o peso dos tumores dos grupos tratado 1 (C3) e controle (C1) foi observada que os animais do grupo tratado apresentou tumores 10,8 % menores que os animais do grupo controle. Quando relacionado o grupo tratado 2 (C4) ao grupo controle, o grupo C4 apresentou tumores 15,3 % menores que os animais do grupo controle. Enquanto a redução apresentada pelo fármaco de referência foi de 9,5 %.

Quando comparada a relação peso do tumor/peso do animal (PT/PA), os animais do grupo C3, que apresentou média de 0,0293, e grupo controle, com média de 0,033, os animais do grupo C3 apresentou uma relação 11,3 % inferior ao grupo controle. O que indicou que o extrato administrado neste grupo pode ter reduzido o crescimento da massa tumoral.

Quando comparada a relação PT/PA dos grupos C4, com média de 0,0272, e controle, os animais do grupo C4 tratado com extrato hidroalcolico, apresentaram uma relação 17,6 % inferior ao grupo controle.

Tabela 1 - Médias e desvios padrões da razão entre pesos dos animais (PA) (*Mus musculus*), dos Carcinoma de Ehrlich (PT) e das relações PT/PA dos grupos C1 (grupo controle) recebeu solução salina 0,9 via ip, o grupo C2 (grupo padrão) foi tratado com Metotrexato 10 mg/kg/ip, o grupo C3 recebeu o Extrato metanólico de *C. taxifolia* (grupo tratado 1) na dose de 50 mg/kg/ip, e ao grupo C4 foi administrado o extrato hidroalcoólico de *C. taxifolia* (grupo tratado 2) na dose de 50 mg/kg/ip.

Grupos (n=6)	Doses	PA	PT	PT/PA
C1 – Controle	-	30,8 ± 0,064	1,035 ± 0,002	0,033 ± 0,002
C2 – Padrão	10 mg/kg	29,4 ± 0,04	0,936 ± 0,002	0,032 ± 0,001
C3- Tratado 1	50 mg/kg	31,5 ± 0,08	0,923* ± 0,008	0,0293** ± 0,001
C4 – Tratado 2	50 mg/kg	32,2 ± 0,05	0,876* ± 0,002	0,0272** ± 0,001

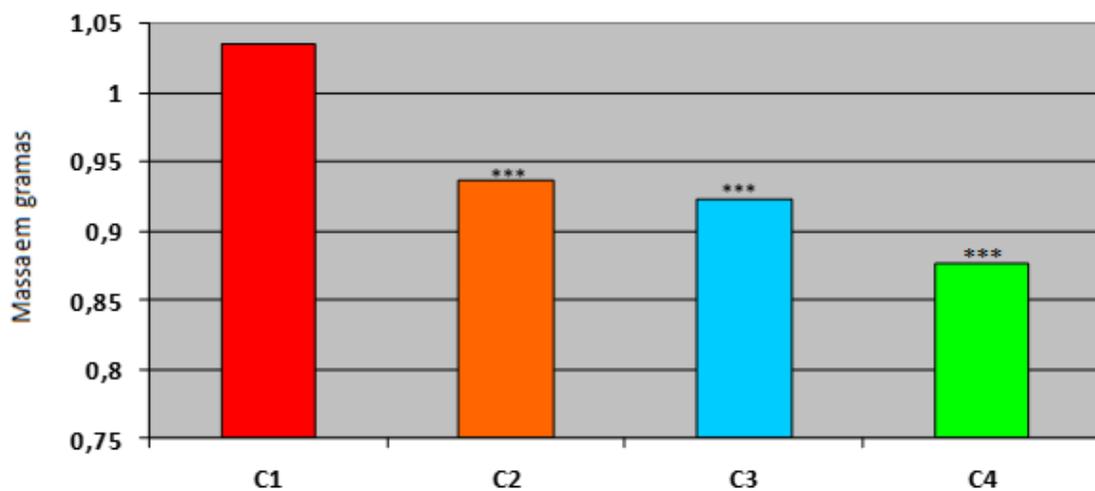
Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisados por ANOVA seguido de teste t de Student. $p > 0,05$ comparado ao grupo controle. *Diferença significativa em relação ao controle (*ANOVA seguido de Teste "t" de Student; ** ANOVA).

Na tabela 2, encontram-se os valores referentes à média e desvio padrão da taxa metabólica específica (TXM), em $O_2 \cdot 1 \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$, do tumor (TXM_{TC}) como do corpo dos animais portadores de carcinoma de Ehrlich. Uma razão entre as taxas metabólicas do tumor e do animal também foi obtida (TXM_{TC}/TXM_{AC}). Observou-se um aumento significativo da taxa metabólica dos animais dos grupos tratados com os extratos, e ligeira redução na razão entre TXM_{TC}/TXM_{AC}, o que pode indicar uma redução de atividade mitótica destes grupos.

Tabela 2: Média \pm erro padrão da média das Taxas metabólicas específicas dos animais (TXM_{AC}), dos tumores Carcinoma de Ehrlich (TXM_{TC}), e da razão entre TXM_{AC} / TXM_{TC} dos grupos controle, padrão e tratados com o extrato hidroetanólico e tratados com o extrato metanólico de *C. taxifolia*.

Grupos (n=6)	Doses	TXM_{AC}	TXM_{TC}	TXM_{AC} / TXM_{TC}
C1 – Controle	-	1,60 \pm 0, 05	0,676 \pm 0,001	0,42 \pm 0,002
C2 – Padrão	10 mg/Kg	1,57 \pm 0, 03	1,00 \pm 0,001	0,43 \pm 0,001
C3- Tratado 1	50 mg/Kg	2,37 \pm 0,01	0,98* \pm 0,002	0,41* \pm 0,001
C4 – Tratado 2	50 mg/Kg	2,38 \pm 0, 03	0, 97* \pm 0,002	0,40** \pm 0,001

Figura 1 – Média da massa tumoral (em gramas) dos animais dos grupos (n=6) Controle, padrão, tratado 1, e tratado 2. Portadores de Carcinoma de Ehrlich.



Legenda – C1 grupo controle, C2 grupo padrão, C3 tratado com extrato metanólico, C4 tratado com extrato hidroalcoólico. * Significativo $p > 0,05$; ** Significativo $p > 0,01$ *** Significativo $p > 0,001$

Tabela 3 – Médias e desvios padrões dos dados bioquímicos obtidos pelo método colorimétrico descrito em Frankel e Reitman (1957) dos animais portadores de Carcinoma de Ehrlich dos grupos controle (C1) (controle com solução salina 0,9 via ip), padrão (C2) (padrão com Metotrexato 10 mg/kg/ip), tratado com extrato metanólico na dose de 50 mg/kg/ip (C3), tratado com extrato hidroalcoólico na dose de 50 mg/kg/ip (C4).

Grupos	Glicose	Uréia	Creatinina	Bilirrubina	TGO	TGP
C1 – Controle	98,25 ± 4,64	67 ± 18,93	0,76 ± 0,32	1,9 ± 0,04	139 ± 25	53,5 ± 2,47
C2 – Padrão	127,6 ± 9,39	52,4 ± 6,22	0,66 ± 0,11	1,8 ± 0,19	127,6 ± 10,8	55,6 ± 8,02
C3 – Tratado1	93,5 ± 61,5	44,0 ± 1,52	0,6 ± 0,2	1,6 ± 0,6	45,33 ± 3,28**	74,23 ± 2,2
C4-Tratado 2	96,8 ± 16,2	45,3 ± 2,3	0,65 ± 0,4	1,7 ± 0,3	48,5 ± 2,6	71,8 ± 3,1

Valor de referência para camundongos: glicose = 100; Ureia = 48,0; creatinina = 0,5 UI; TGO = 80 UI; TGP = 50 UI (DANTAS et al., 2006).

Os valores de glicose do grupo controle, e dos grupos tratados com o extrato encontram-se de acordo com os de referência para camundongos, já o grupo padrão apresentou-se elevados, os níveis de ureia dos grupos tratados apresentou valores compatíveis com a normalidade, mas o mesmo não foi observado quando comparados aos grupos controle e padrão, que apresentaram-se superiores, a creatinina, para todos os grupos, apresentaram valores próximos ao normal.

Os valores de bilirrubina dos grupos estudados se mantiveram dentro dos níveis de referência para a linhagem de camundongos utilizada no estudo. Os grupos controle e padrão apresentaram valores de transaminase glutâmica oxalacética (TGO) superiores aos de referência, o que pode indicar um dano hepático nestes organismos, com possível necrose de células hepáticas. Os grupos tratados com os extratos T1 e T2 apresentaram níveis inferiores aos de referência, mas os valores de transaminase glutâmica pirúvica (TGP) de ambos os grupos apresentaram-se elevados o que pode indicar um quadro de hepatopatia crônica não muito grave e lesões focais. Entretanto estes valores ainda são muito inferiores aos que se apresentaram em quadros de hepatopatias tóxicas ou induzidas por drogas. Os parâmetros bioquímicos tais como: glicose, ureia, creatina e bilirrubina do grupo tratado apresentaram valores similares ao dos grupos controle e padrão, que ficaram dentro dos valores de referência para camundongos.

Inúmeros trabalhos envolvendo estudos pré-clínicos “*in vivo*” de produtos naturais, utilizam parâmetros bioquímicos para avaliar possíveis sinais de toxicidade

(BEZERRA et al., 2008; BEZERRA et al., 2009; GONZAGA et al., 2009; LINS et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2008). Nestes estudos farmacológicos/toxicológicos após a exposição às drogas, foram analisados os parâmetros que avaliaram as possíveis alterações na função hepática como através dos níveis da TGP e TGO, função renal como ureia e creatinina.

Os grupos tratados (Figuras 2 e 3) apresentaram fígado com ducto bilífero, ramos das veia porta, hepatócitos preservados, assim como, tecido renal com túbulos contorcidos distais e proximais, mácula densa e polo vascular dentro da normalidade. Baço apresentou cápsula, trabéculas, coronas, centros germinativos, células das polpas branca e vermelha de aspecto normal. Nos pulmão, brônquios, bronquíolos, nódulos de músculo liso também com histologia normal. No grupo padrão e controle foram verificadas lesões a nível celular e tecidual, entretanto o fígado e o rins são os órgãos com danos mais evidentes, como alguns pontos hemorrágicos, e presença de infiltrado inflamatório crônico.

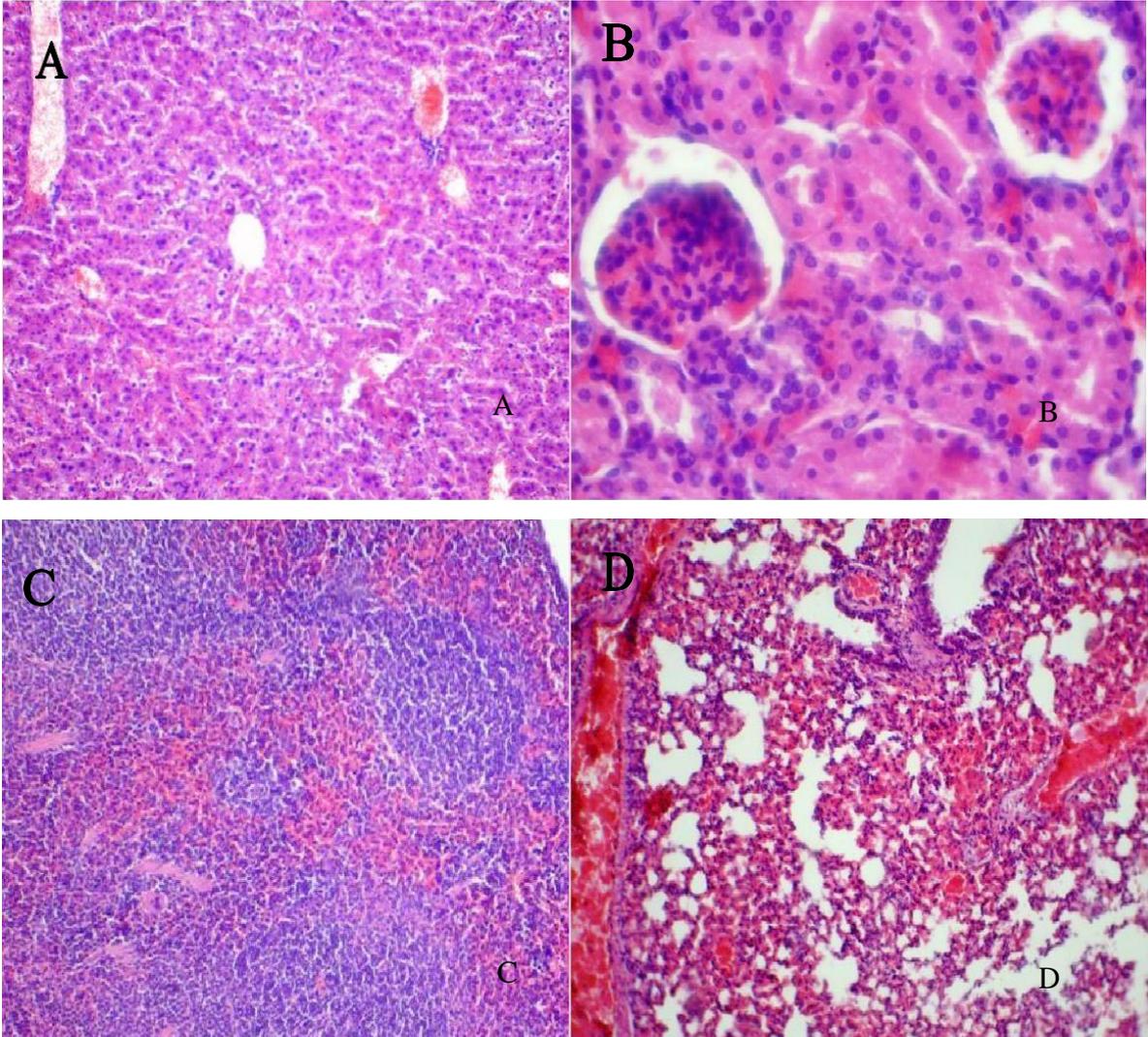


Figura 2: A- fígado animal portador de carcinoma Ehrlich tratado com o estrato hidroetanólico; B- rim; C- baço; D- pulmão.

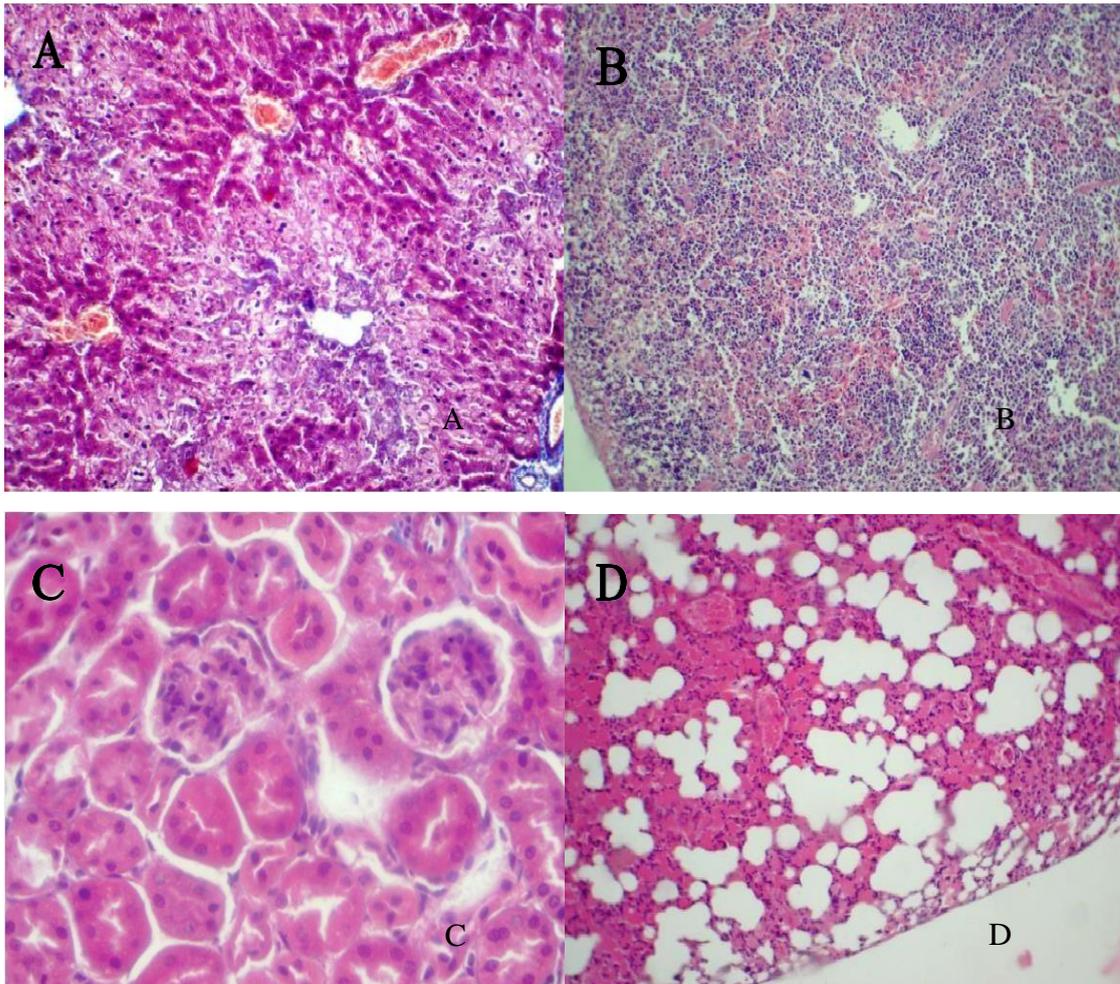


Figura 3: A- Fígado, baço, rim e pulmão de animais portadores de carcinoma de Ehrlich tratados com extrato metanólico de *C. taxifolia* na dose de 50 mg/kg.

Os efeitos dos extratos hidroetanólico e metanólico apresentaram redução significativa do tumor observado, isso talvez se deva as atividades dos metabólitos secundários presentes nos extratos, estando de acordo com estudos realizados por Moura et al., (2012). O extrato metanólico bruto indicou a presença de alcalóides, terpenóides, esteróides e saponinas. Segundo Robbers (1997), alcalóides que têm atividade antineoplásica pertencem a uma nova classe de derivados bisindólicos, o que pode sugerir que a atividade antineoplásica de *C. taxifolia* esteja relacionada a alcalóides presentes no extrato.

De acordo com Aguilar-Santos (1970) e Maitti (1977) um alcaloide indólico derivado do triptofano, fora isolado de espécies do gênero *Caulerpa* consideradas tóxicas. Para Vidal (1984) o alcaloide caulerpina, amplamente distribuído neste grupo de organismos marinhos, possui atividade antimicrobiana e antitumoral importantes.

REFERÊNCIAS

- BEZERRA, D. P. et al. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **Journal of Applied Toxicology**, v.28, n.2, p.156-63. 2008.
- BEZERRA, D. P. et al. Antitumor activity of the essential oil from the leaves of *Croton regelianus* and its component ascaridole. **Chemistry & Biodiversity**, v.6, n.8, p. 1224-31, 2009.
- FERRI, P.H. **Química de produtos naturais**: métodos gerais. In: DI STASI, L.C. Plantas medicinais: arte e ciência. São Paulo: Editora da Unesp; 1996. p. 129-56.
- GERAN, R.I. et al. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. **Cancer Chemoth. Rep.** 33: p.1-17.1972.
- GUERRA M.R.; GALLO C.V.M.; MENDONÇA G. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.51, n.3, p. 227-234, 2005.
- GILMAN, A.G. et al. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 12° ed. Rio de Janeiro, 2012.
- GONZAGA, M. et al. In vivo growth of Sarcoma 180 by alpha-(14)- glucan(1 6)-glucan-protein complex polyccharide obtained from *Agaricus blazei* Murrill. **J.Nat.Med.**, v.63, p.32-40,2009.
- HAY, M.E.; FENICAL, W. Marine plant-herbivore interactions. The ecology of Chemical defense. **Ann. Rev. Ecol. Syst**, v.19, n.1, p. 111-145, 1988.
- INCA – Instituto Nacional de Cancer, Rio de Janeiro, 2012, 2ª edição revista e atualizada. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/ABC_do_cancer_2ed.pdf>. Acesso em: 10 de maio de 2014.
- INCA – Instituto Nacional de Cancer. Disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_a_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014>. Rio de Janeiro, acesso em 11 de maio de 2013.
- INCA. Estatísticas do Câncer. Vigilância do Câncer e de Fatores de Risco. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>>. Acesso em: 20 de maio de 2014.
- INCA. Fisiopatologia do câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf>> .Acesso em: 16 de junho de 2014.
- JEMAL, A.; et al. Cancer statistics, 2007. **CA Cancer J Clin** v.57, p.43, 2007.

JOLY, C. A. et al. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista USP**, n. 89, p. 114-133, 2011.

KARBER, G.; BEHRENS, B. **Statistical Methods in Biological Assays**. London: Ed. Griffin Ch. And C., 1964.

KOMIYAMA, K. & FUNAYAMA, S. Antitumor agents. In: OMURA, S. (edt). **The search for bioactive compounds from microorganisms**. New York: Spriger-Verlag, 1992. p. 79-97.

LINS, K.O. et. al. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). **Journal of Applied Toxicology**, v.29, n.1, p.20-26, 2009.

MAGALHÃES, H.I. et. al. In vitro and in vivo antiproliferative activity of *Calotropis procera* stem extracts. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.82, n.2, p.407-416, 2010.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**, Viçosa, MG:UFV, 1994. p.220

MORETTIN, L.G. **Estatística Básica: Probabilidade e Inferência**. n.1.v.1. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2010. p.376.

MOURA, C.A. et al. **Perfil Fitoquímico da Macroalga Marinha *Caulerpa toxifolia* (VAHL)** C.AGARDH, 1817 (caulerpaceae) Congresso Brasileiro de Oceanografia, Rio de Janeiro, Novembro 2012.

NATALI, A. L. C. **Ação inotrópica positiva do extrato metanólico de *Bryopsis pennata* (CHLOROPHYTA CAULERPALES)**. Dissertação (Mestrado em Biociência) Universidade de São Paulo. 2007.

OLIVEIRA JÚNIOR, R.J. Análises citogenéticas e expressão da telomerase em **Sarcoma 180**. 2008. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, MG. 2008

OLIVEIRA, J.S.; COSTALOTUFO, L.V.; BEZERRA, D.P.; ALENCAR, N.M.; MARINHO FILHO, J.D.; FIGUEIREDO, I.S. MORAES, M.O.; PESSOA, C.; ALVES, A.P.; RAMOS, M.V In vivo growth inhibition of sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.382, n.2, p.139-149, 2010.

RAYMUNDO, M.S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 40, p. 495-503, 2004.

RAVIRS, B. **Biologia e Filogenia das algas**, Porto Alegre, Artmed, 2006. p.280.

REITMAN, S. FRANKEL, S . **Am.J.clin. Path.** 1957, p. 28-56

SILVA, A. E. R. et al. **Levantamento bibliografico de antineoplásicos padronizados no Hospital da Mulher – Prof.Dr.José Aristodemo Pinotti (CAISM) UNICAMP** In: Congresso dos Profissionais das Universidades de São Paulo, São Paulo:USP, Unicamp e Unesp, 2011.

SOLÈ-CAVA, A.M.; KELECOM, A. Dialogo quimico dos mares, **Ciência Hoje** , v. 8, n. 46, p.18-29. 1988.

STOCK, C.C.; CLARCK, D. A.; PHILIPS, F. S. Sarcoma 180 – inhibitor screening date. **Cancer Research**, n. 2, p.2-3, 1955.

7. *Artigo 4*

Artigo publicado na Revista African
Journal Pharmacy and Pharmacology



ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E CICATRIZANTE DE EXTRATOS METANÓLICO E HIDROETANÓLICO DE *Caulerpa taxifolia* EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO.

Evandro Valentim da Silva¹ *, Gabriela Cavalcanti da Silva¹ , Carla Andrea de Moura¹ , Jefferson de Lima¹ , Marcia Raquel Cedrin Vieira² , Laureana de Andrade Lima² , Danielle Maria Bastos de Souza³ , José Ferreira Silva Neto³ , George Chaves Jimenez³ , Fálba Bernadete Ramos dos Anjos¹ and Ivone Antonia de Souza¹

1- Universidade Federal de Pernambuco

2- Faculdade do norte do Parana

3- Universidade Federal Rural de Pernambuco

Resumo

A cicatrização de feridas é um processo de reparo que se segue após injúria da pele e outros tecidos moles, e abrange uma série complexa de interações entre diferentes tipos celulares, mediadores inflamatórios e matriz extracelular, as fases da cicatrização. A diversidade da flora marinha brasileira favorece a descoberta de agentes farmacológicos na prevenção e no tratamento de doenças. Polissacarídeos Sulfatados e as proteínas solúveis são encontrados em grandes concentrações e com propriedades biológicas interessantes. O gênero *Caulerpa* apresenta esteróis que diferem na estrutura química do colesterol. Foi identificado em *Caulerpa taxifolia* a presença de metabólitos secundários como: alcalóides, terpenos, esteroides e saponinas. O presente estudo teve por objetivo avaliar a ação cicatrizante e analgésica dos extrato metanólico e hidroalcoólico de *C. taxifolia*, assim como verificar o percentual de proteínas solúveis disponível no extrato deste vegetal. A macroalga marinha foi coletada na praia de Barra do Sirinhaém – PE, processada para a realização dos testes. Os animais utilizados no teste de contorções abdominais foram camundongos Swiss, da espécie *Mus musculus*. Para a atividade de cicatrização e análise histopatológica foram usados os ratos albinos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, e ainda foi determinado o teor de proteínas do extrato bruto de *C. taxifolia*. Os dados revelaram que a média de contorções abdominais visualizadas nos animais grupo controle foi 13,86, no grupo padrão foi 7,83; no grupo tratado com extrato hidroalcoólico *C. taxifolia* na dose de 50 mg/kg apresentou 8,83 e na dose de 100 mg/kg foi 6,5. Nos grupos tratados com extrato metanólico na dose de 100 mg/kg o

valor médio de contorção de 7,67 e na dose de 50 mg/kg apresentou 9,26 contorções como valor médio. O teor de proteínas do extrato da *C. taxifolia* foi 6,6 sendo considerado significativo. Foi evidenciado que tanto com o extrato hidroalcoólico quanto com o metanólico apresentaram início de cicatrização com o tecido epitelizado e queratinizado com a tendência a reepitelização com reestruturação dos anexos da pele, ao longo do tratamento e sem a presença de crosta. Os dados demonstram que ambos os extratos reduziram as contorções abdominais nos camundongos com as duas doses testadas, sugerindo a inibição da síntese de prostaglandinas pela via da ciclooxigenase. No processo de reparo tecidual, em condições fisiológicas, os fibroblastos são estimulados a migrar para a área da lesão e a produzir fibras colágenas para efetivar esse evento. A fase denominada de proliferativa, possui duração de 12 a 14 dias, e caracteriza-se pelo reparo, granulação e repitelização. No processo de reparo, por volta do segundo e terceiro dias após a lesão, os fibroblastos produtores de colágeno são recrutados das margens da injúria e induzem a síntese

proteica, através da fibroplasia. Palavras-chaves: cicatrização, macroalga, extrato metanólico e hidroalcoólico

INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas é um processo de reparo que se segue após injúria da pele e outros tecidos moles, e abrange uma série complexa de interações entre diferentes tipos celulares, mediadores inflamatórios e matriz extracelular, as fase da cicatrização, envolvendo hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação; e cada fase é distinta, embora o processo seja contínuo (RIELLA et al., 2012). Sendo que a primeira ocorre nas primeiras horas (hemostasia), neste processo ocorre à ativação das plaquetas, com conseqüente agregação plaquetária e cascata de coagulação. Na segunda fase, que ocorre em dias, o processo inflamatório está presente, sendo que há o recrutamento de neutrófilos e macrófagos, que dentre outras coisas auxiliam a degradar o tecido desvitalizado e os macrófagos estimulam o crescimento de tecido novo (IRION et al., 2005).

O tratamento de feridas busca o fechamento o mais rápido possível da lesão de forma a se obter uma cicatriz funcional e esteticamente satisfatória. Medicamentos obtidos exclusivamente de matéria prima de origem vegetal, denominados fitoterápicos, proporcionam princípios ativos com aplicações anti-inflamatórias e cicatrizantes (MICHELIN et al., 2005; LIMA et al., 2006).

Entre os produtos de interesse dermatológico, merecem particular destaque, os de ação tópica incorporados nas formas farmacêuticas, estes por sua vez podem permitir a recuperação da integridade da pele posterior a possíveis agressões. Para o restabelecimento das condições normais, o processo de cicatrização é de fundamental importância. Neste contexto, a migração de células inflamatórias, a síntese de tecido de granulação, a deposição de colágeno e de proteoglicanos e a maturação da cicatriz, estão associados à intensa remodelação. Assim sendo, a medicina complementar funciona como ferramenta para este tratamento (SANTOS et al., 2002; MENDONÇA, 2006; ROCHA JÚNIOR et al., 2006).

Diversos medicamentos para a cicatrização tecidual, em sua maioria, têm origem em produtos naturais (SEGUNDO et al., 2007). Estes biomateriais consistem de elementos interativos capazes de estabelecer afinidade adequada com o tecido vizinho, sem, contudo induzir resposta adversa do hospedeiro (RATNER; BRYANT,

2004). Dentre os biomateriais, os polissacarídeos estimulam o sistema imune *in vitro* e *in vivo* a fim de favorecer o processo cicatricial (DIALLO et al., 2001; KWEON et al., 2003; SENEL; MCCLURE, 2004, VITORINO FILHO, 2011).

A diversidade da flora marinha brasileira favorece a descoberta de agentes farmacológicos na prevenção e no tratamento de doenças (RODRIGUES et al., 2010). Polissacarídeos Sulfatados (PS) e as proteínas solúveis são encontrados nestes representantes, em grandes concentrações e com propriedades biológicas interessantes (RODRIGUES et al., 2009).

Estes compostos apresentam complexidade estrutural devido às muitas possibilidades entre os monossacarídeos e a distribuição de grupamentos sulfato, que variam de espécie para espécie e, às vezes, em diferentes partes da planta (ALVES, 2000; HAROUN-BOUHEDJA et al., 2000).

A presença de sulfatos em polissacarídeos pode promover alteração das atividades biológicas, uma vez que modifica a conformação da sua cadeia; tornar substâncias apolares em hidrossolúveis e ainda promove interações com proteínas catiônicas (SHANMUGAN; MODY, 2000; LIU et al., 2009).

Alguns PS presentes em algas verdes se encontram ligados covalentemente a proteínas, sendo classificados como proteoglicanos (AQUINO et al., 2005; ROPELATTO et al., 2011).

Neste grupo de organismos, a que o gênero *Caulerpa* pertence, apresentam-se esteróis que diferem na estrutura química do colesterol. Os compostos são biologicamente importante como hormônios, vitaminas e componentes estruturais das biomembranas (GHOSH et al., 2004; LEE et al., 2004; SHEVCHENKO et al., 2009). Abordagem fitoquímica de *Caulerpa taxifolia* indicou a presença de metabólitos secundários como: alcalóides, terpenos, esteroides e saponinas (MOURA et al., 2012). O alcalóide caulerpenina isolado de *C. taxifolia* apresentou atividade em modelo de estudo de enterocolites para camundongos (LIMA et al., 2014). O presente estudo teve por objetivo avaliar a ação cicatrizante e analgésica dos extrato metanólico e hidroalcoólico de *C. taxifolia*, assim como verificar o percentual de proteínas solúveis disponível no extrato deste vegetal.

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA DO MATERIAL VEGETAL

A macroalga marinha *C. taxifolia* foi coletada na praia de Barra do Sirinhaém, município do Sirinhaém – PE. Em seguida foram acondicionadas em sacos plásticos

com água do mar e transportadas ao laboratório de Cancerologia Experimental da UFPE, onde se deu os processos de lavagem do material em água destilada e secagem em estufa com temperatura de 25 °C, que posteriormente foi pesado e triturado em liquidificador (Arno®) e posto para maceração em recipiente de vidro com solução hidroetanólica 50 % (uma primeira porção) , e uma outra porção em solução metanólica 100 %, após 7 dias de maceração o material foi rotaevaporado e acondicionado até o dia em que se procedeu os testes.

ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Os animais utilizados no teste de contorções abdominais foram camundongos Swiss, da espécie *Mus musculus*, machos com aproximadamente 60 dias de nascidos pesando entre 25 e 30 g, mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo de 12 horas claro/escuro) e temperatura (22 ± 2 °C), em gaiolas de polipropileno recebendo alimentação específica e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos em jejum por 12 h antes da realização do estudo.

Para a atividade de cicatrização os animais utilizados foram os ratos albinos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, machos com 120 dias de nascidos pesando de entre 180-200 g, mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo de 12 horas claro/escuro) e temperatura (22 ± 2 °C), em gaiolas de polipropileno recebendo alimentação específica e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos em jejum 12 h antes da realização dos procedimentos cirúrgicos.

TESTE DE CONTORÇÕES

O teste de contorções abdominais em camundongos foi realizado de acordo com KOSTER; ANDERSON; DE BEER, 1959. Os extratos metanólico e etanólicos de *C. taxifolia* foi solubilizado em dimetilsulfóxido: Tween 80 (1:1) 1 % (v/v) em soro fisiológico e administrado por via oral 1 hora antes da aplicação do ácido acético 0,6 %. O grupo controle (grupo1) recebeu 0,3 mL/30 g de dimetilsulfóxido: Tween 80 (1:1) 1 % em salina por via oral (v.o.). A indometacina (10 mg/kg) foi o fármaco de referência administrado por via oral nos camundongos do grupo controle positivo (grupo 2). Aos grupos 3 e 4 foram administradas doses de 50 e 100 mg/kg do extrato hidroetanólico de *C. taxifolia*, respectivamente, 50 e 100 mg/kg do extrato metanólico de *C. taxifolia* para os grupos 5 e 6, respectivamente, peso de camundongo (n = 10). Uma hora após o tratamento, 10 mL/kg de ácido acético 0,6 % foram administrados

intraperitonealmente em cada camundongo e o nº de contorções abdominais foi contado dentro de um intervalo de 10 e 30 minutos após este procedimento.

O percentual de inibição das contorções abdominais foi calculada pela fórmula: % Inibição = [(N.C. controle – N.C.tratado) ÷ N.C. Controle] × 100 sendo: N.C. Controle: número de contorções do grupo controle; N.C.tratado: número de contorções do grupo tratado.

OBTENÇÃO DO CREME

O creme para o tratamento dos animais utilizados no experimento de cicatrização foi obtido através da adição e solubilização dos extratos ao creme base, manipulado na farmácia de manipulação GLOBO®. Constituintes do creme base: água 34,5 %, glicerina 6,0 %, álcool cetosteárico 5,0 %, monoestearato de glicerina 3,0 %, lauril éster sulfato de sódio 1,5 %. (BATISTA et al.,2011).

TESTE DE CICATRIZAÇÃO

Para o teste de cicatrização foram selecionados 60 animais dos quais foram divididos em 12 grupos (n= 5), onde a três grupos foi tratado topicamente com creme contendo extrato metanólico de *C. taxifolia*, 3 grupos extrato etanólico de *C. taxifolia*, 3 grupos creme base, e 3 grupos bepantol creme. Durante o tratamento houve remoção do tecido de cicatrização de um dos três grupos com 7, 14 e 21 dias.

AValiação HISTOPATOLÓGICA

Todas as amostras foram fixadas em formol a 10 %, embebidas em parafina, cortadas com 5 mm e coradas com hematoxilina-eosina (HE). Estas seções foram então examinadas sob um microscópio de luz para detecção de alterações histológicas por um histopatologista cego para os grupos. As lâminas foram pontuadas para a presença de vascularização, edema, e graus de inflamação aguda e crônica.

ANALISE MORFOLÓGICA

A análise morfométrica foi realizada em seções histológicas coradas pelo HE. Cada lâmina foi medida por um campo de alta potência ampliado 400x incluindo a área de cicatrização da incisão; a média do número de feixes de colágeno de cada grupo foi calculado.

ANALISE DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS

O método Bradford (1976), foi empregado para determinar o teor de proteínas do extrato bruto de *C taxifolia*. O reagente foi preparado pela solubilização de 50 mg de Coomassie em 25 mL de etanol (95 %), com posterior adição de 100 mL de solução de ácido fosfórico (85 % m/v). As concentrações finais (m/v) do reagente foram de 0,01 % de Coomassie, 4,7 % de etanol e 8,5 % de ácido fosfórico. Foram preparadas soluções padrão de albumina nas concentrações crescentes de 1,0 a 0,1 mg/mL, a partir de diluições da solução estoque (5 mg/mL).

Amostra vegetal foram processadas cortada em pedaços (5mm) e 200mg foi pesada e macerado em 10 mL de etanol a 80 %. Uma alíquota do extrato bruto foi centrifugada por 5 minutos a 2.000 g; uma alíquota de 3 mL do sobrenadante foi transferida para um tubo de ensaio, e acrescentado a este, 6mL de clorofórmio; esta mistura foi mantida em agitador por dois minutos sob agitação suave e posteriormente em repouso de 10 minutos, para que ocorresse a separação das duas fases (orgânica e aquosa); a fração aquosa (incolor) foi recolhida para um Eppendorf e mantido em congelador ate o momento do desenvolvimento da cor.

Para desenvolvimento da cor pipetou-se 200 µL das soluções padrões e dos extratos das amostras, acrescentou-se 4 mL do reagente Coomassie Brilliant blue, os tubos, submetidas a agitação suave ficando em repouso por 5 minutos. Em seguida foram realizadas as leituras em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 595 nm, sendo os valores do conteúdo de proteína solúvel, expressos em termos de mg de proteína solúvel por grama de tecido vegetal fresco. (BRADFORD, 1976).

O concentração de proteínas solúveis foi calculada pela formula: $Concetra = [(Absbranco - Absamostra) \div Absbranco] \times 100$ sendo: Absbranco: absorbância mensurada para o branco; Absamostra: absorbância mensurada para as amostras.

ANALISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foi realizada utilizando o Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versão 17.0 para Windows. Para os escores e as variáveis sem distribuição normal a comparação entre os grupos foi feita pelos testes de MannWhitney e Kruskal Wallis. Os resultados foram expressos como mediana (mínimomaximo). Um valor de $p > 0,05$, após a correção de Bonferroni ($p > 0,0125$) foi considerado significativo.

Para o teste das contorções abdominais foi considerado significativos para valores de $***p < 0,001$, após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Student Newman-Keuls quando comparados ao grupo controle.

RESULTADOS

ATIVIDADE NOCICEPTIVA

A média de contorções abdominais visualizadas nos animais grupo controle foi 13,86, o grupo padrão apresentou como valor médio 7,83; o grupo tratado com extrato hidroetanólico *C. taxifolia* na dose de 50 mg/kg apresentou 8,83; o grupo tratado com extrato hidroetanólico *C. taxifolia* na dose de 100 mg/kg apresentou o valor médio de contorção de 6,5 como valor médio de contorções. Nos grupos tratado com extrato metanólico *C. taxifolia* na dose de 100 mg/kg apresentou o valor médio de contorção de 7,67 e o grupo tratado com extrato metanólico da macroalga na dose de 50 mg/kg apresentou 9,26 contorções como valor médio.

Tabela 1. Efeito do extrato hidroetanólico e metanólico de *C. taxifolia* sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético (n = 6).

Grupos	Doses (mg/kg)	Número de Contorções	Inibição (%)
Controle	Salina	13,86 ± 1,37	-
Extrato metanólico	50	9,26±1,26***	33,18
	100	7,67± 1,12***	44,66
Extrato hidroetanólico	50	8,83± 0,98***	36,29 53,1
	100	6,5 ± 0,85***	
Indometacina	10	7,83± 1,21***	43,5

***p < 0,001. Significativos após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de *Student Newman-Keuls* quando comparados ao controle.

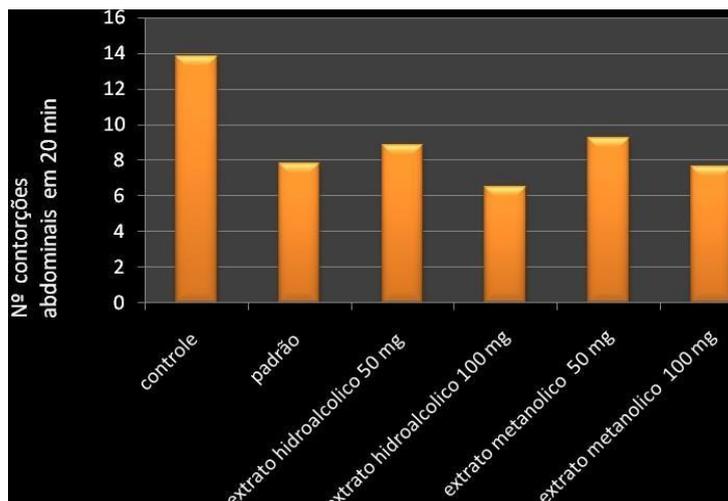


Figura 1- Contorções abdominais apresentada pelos animais durante o tratamento.

Em relação ao grupo controle o grupo extrato hidroetanólico 50 mg/kg apresentou uma redução de 36,3 % de redução de contorções abdominais. O extrato hidroalcolico na dose de 100 mg/kg a redução das contorções abdominais foi de 53,1 %. Com o extrato metanólico nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg obteve-se redução de 33,2 % e 44,7 % respectivamente.

PROTEINAS SOLÚVEIS

Na quantificação espectrofotométrica das amostras em octoplicata quanto a concentração de proteínas solúveis presentes no extrato de *C. taxifolia* foi realizada as leituras e empregou-se a formula de acordo com o descrito por Bradford (1976), o que foi expressos em valores médios \pm o erro padrão da média, sendo o resultado $6,67 \pm 1,32 \mu\text{g}/\text{mg}$.

ATIVIDADE CICATRIZANTE

Foi evidenciado que tanto com o extrato hidroalcolico quanto com o metanólico apresentaram início de cicatrização com o tecido epitelizado e queratinizado com a tendência a reepitelização com reestruturação dos anexos da pele, ao longo do tratamento e sem a presença de crosta (Figura 2 e 3). Contudo, o os animais do tratados com o extrato orgânico (21 dias) apresentaram infiltrado inflamatório (**) e um número expressivo de fibroblastos (***), quando comparado com os tratamentos dos 7 e 14 dias (Figura 3).

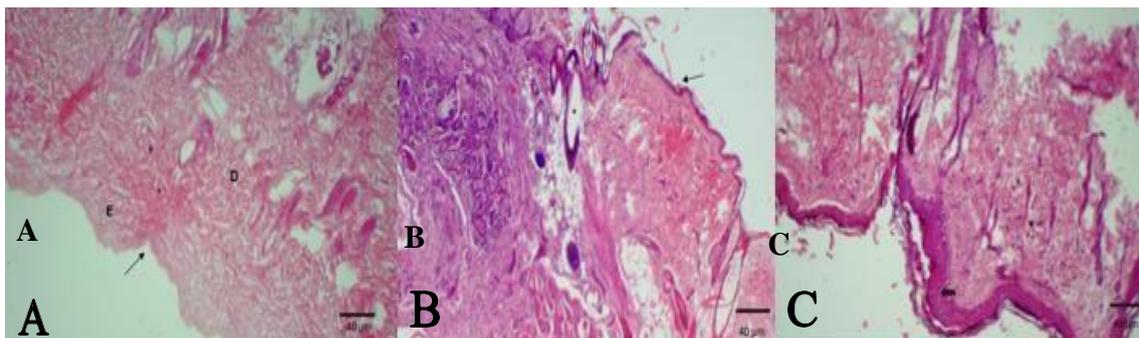


Figura 2 - Fotomicrografia de cicatrização cutânea de animais. Grupo tratado com extrato hidroalcoólico durante 7 (A); 14 (B) e 21 dias (C). Coloração de Hematoxilina-Eosina 40 x.

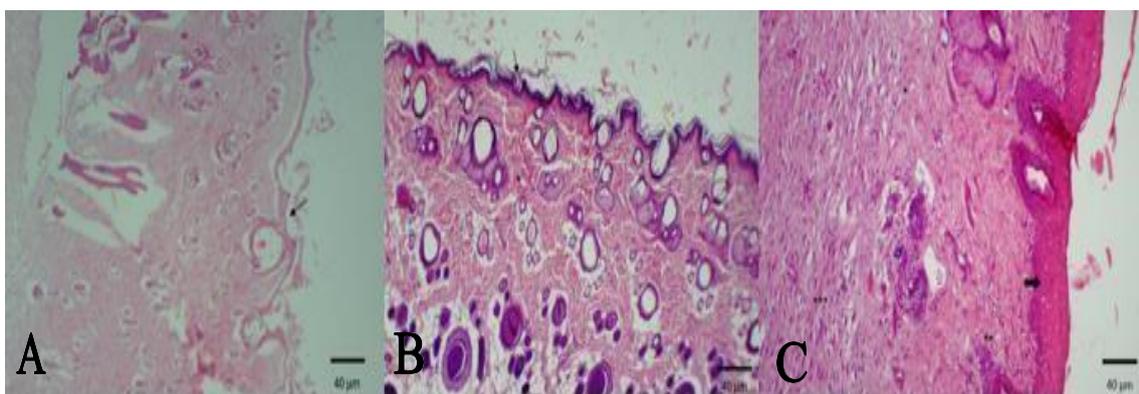


Figura 3 - Fotomicrografia de cicatrização cutânea de animais. Grupo tratado com extrato metanólico durante 7 (A); 14 (B) e 21 dias (C). Coloração de Hematoxilina-Eosina 40 x.

DISCUSSÃO

Os dados demonstram que ambos os extratos reduziram as contorções abdominais nos camundongos com as duas doses testadas, sugerindo a inibição da síntese de prostaglandinas pela via da ciclooxigenase, pois a indometacina, controle positivo do teste, tem como mecanismo de ação a inibição desta enzima (DUARTE et al., 1992). A inibição das contorções foram bastante significativas com as doses testadas, sendo mais evidentes com o extrato hidroetanólico na dose de 100 mg/kg.

O teste de contorções abdominais é um modelo químico de nocicepção que se baseia na contagem das contorções da parede abdominal seguidas de torção do tronco e extensão dos membros posteriores, como resposta reflexa à irritação peritoneal e à peritonite produzidas pela injeção intraperitoneal de uma solução de ácido acético 0,9 % (WHITTLE, 1964). Este teste é sensível à avaliação de drogas analgésicas, no entanto, pode ser visto como um modelo geral, não seletivo, para estudos de drogas antinociceptivas (COUTO et al., 2011).

Para Julius; Basbaum (2001) os prótons oriundos da dissociação do ácido acético podem ativar diretamente os canais de cátions não seletivos localizados nas

vias aferentes primárias. Uma vez que a irritação local, produzida pela injeção intraperitoneal do ácido acético provoca a liberação de uma variedade de mediadores, tais como a substância P, bradicininas, prostaglandinas, bem como das citocinas próinflamatórias tais como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α (PINHEIRO et al., 2011). Verma et al. (2005) comentam que têm se associado este método com a liberação de prostanoídes, em geral, níveis elevados de PGE2 e PGF2 α , bem como produtos da lipoxigenase em fluidos peritoneais.

Os extratos de *C. taxifolia* (metanólico e hidroetanólico) apresentaram atividade antinociceptiva no modelo induzido por ácido acético, as respostas foram significativas com ambas as doses de cada extrato e o percentual de inibição aumentou com o aumento da dose, e isto, pode estar relacionado com a síntese de prostaglandinas pela via da ciclooxigenase, assim como, a indometacina (SOUSA, et al., 2009).

A substância P e a bradicinina estão envolvidas na primeira fase, enquanto histamina, serotonina, prostaglandina e bradicinina participam na resposta da segunda fase (SHIBATA et al., 1989). O que para Morrow e Roberts II (2001); Costa-e-Sousa (2010) pode indicar que o teste das contorções abdominais envolvem mecanismos antiinflamatórios.

No processo de reparo tecidual, em condições fisiológicas, os fibroblastos são estimulados a migrar para a área da lesão e a produzir fibras colágenas para efetivar esse processo (HONORIO-FRANÇA et al., 2008; MENDONÇA; COUTINHO NETTO, 2009; DIAS, 2012). Em lesões cutâneas, é possível avaliar a etapa da lesão tecidual em que se encontra o processo de reparo tecidual pela análise histológica, qualitativa e quantitativa, das principais características que evidenciam a evolução desse processo, tais como número de células inflamatórias, de fibroblastos, e de novos vasos sanguíneos formados pelos processo de angiogênese (BATISTA et al., 2010; OLIVEIRA; SOARES; ROCHA, 2010).

Além disso, os macrófagos estimulam o crescimento de tecido novo, como é observado nos animais do 7º dia, pela presença de pequenas fibras de colágeno. O terceiro estágio da cicatrização, que ocorre em torno de dias a semanas, temos o processo de reepitelização mais intensificado e contínua a formação de tecido de granulação, tal fato pode ser percebido nos animais relacionados ao 14º dia. A presença de macrófagos nesta fase estimula a produção interna de fibroblastos e deposição de tecido conjuntivo frouxo, enquanto que os fibroblastos migratórios produzem colágeno. Percebeu-se que no grupo dos animais do 21º dia, o terceiro

estágio continuou presente, isso se explica pela profundidade da lesão, que pode ser fator limitante para a evolução da cicatrização (IRION, 2005).

De acordo com Kathiraven (2014) o extrato de *C. taxifolia* é capaz de produzir nano-partículas de Ag extracelularmente e estas, são bastante estáveis em solução provavelmente devido ao nivelamento por proteínas presentes no extrato. Ainda segundo o autor há uma interação entre as nano-partículas e as proteínas solúveis o que pode resultar em compostos com atividades microbianas e este potencial se estende a patógenos humanos como *P. mirabilis* e *S. aureus*.

Os extratos parece agir na cicatrização dos animais tratados promovendo a epitelização. Segundo Modolin; Bevilacqua (1985), no final da fase proliferativa, ocorre a reepitelização da lesão, que é controlada pela chalone, um complexo glicoprotéico que estimula a atividade mitótica epitelial.

Segundo Rubin; Farber (2002); Stevens; Lowe (2002) a fase denominada de proliferativa, possui duração de 12 a 14 dias, e caracteriza-se pelo reparo do tecido conjuntivo com formação de tecido de granulação e consecutiva repitelização. O processo de reparo se inicia com a inflamação e, se em torno de 24 horas após a lesão não houver resolução, os fibroblastos e as células endoteliais vasculares iniciam a proliferação constituindo o tecido cicatricial, isto é a granulação. Histologicamente caracterizado como vasculogênese e aumento do número de fibroblasto.

Agnol (2008) comenta ainda que no processo de reparo, por volta do segundo e terceiro dias após a lesão, os fibroblastos produtores de colágeno são recrutados das margens da injúria e induzem a síntese proteica, através da fibroplasia. Consequentemente, o fibrinogênio presente no exsudato inflamatório se transforma em fibrina, que servirá para a adesão e multiplicação dos fibroblastos, que secretará tecido cicatricial.

Portanto, as nano-partículas de prata encontradas em vegetais como *Caulerpa taxifolia*, possivelmente age potencializando em combinação com seu potencial antibióticos podendo ser responsável pelo efeito cicatrizante uma vez que, com o controle da microbiota local o mecanismo desenvolvido para cicatrização não sofrera interferências.

REFERÊNCIAS

ALVES, L.G. Polissacarídeo ácidos presentes no folíolo, talo e flutuador da alga marinha sargassum vulgare. 2000. 86f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em

Bioquímica) – Departamento de Bioquímica – Universidade Federal do Rio Grande do Norte- UFRN, NATAL, 2000.

AQUINO, R.S.; LANDEIRA-FERNANDEZ, A.M.; VALENTE, A.P.; ANDRADE, L.R. ; MOURÃO,P.A.S. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implicatios. *Glycobiology*, v.15, p.11-20, 2005.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the qualification of microgram quantities of protein utlizy the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, v.7, p.248-254. 1976.

COUTO VM, VILELA FC, DIAS DF, SANTOS MH, SONCINI R, NASCIMENTO CG, GIUSTI-PAIVA A. Antinociceptive effect of extract of Emilia sonchifolia in mice. *J Ethnopharmacol* 134(2): 348 – 353, 2011.

DERE, K.; SEN, H.; TEKSOZ, E. et al. The comparison of the effects of different doses of levobupivacaine infiltration on wound healing. *J Invest Surg*, 2009; v22, p.112-116.

DIALLO, D. et.al. Polysaccharides from the roots of Entata africana Guill. Et Perr Mimosaceae, with complement fixing activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.74, p.159-171, 2001.

DUARTE IDG, FERREIRA-ALVES DL, NAKAMURA-CRAIG M. Possible participation of endogenous opioid peptides on the mechanism involved in analgesia by vouacapan. *Life Sci*. 1992; 50:891-7.

HAROUN-BOUHEDJA, F.; MOSTAFA,E. SINKUIN,C. BOISSON-VIDAL,C. Relation between sulfate group and biological activities of fucans. *Thromb. Res*. V.100, p.453459. 2000.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 143:203210, 2001.

KATHIRAVEN, T.; SUNDARAMANICKAM, A.; SHANMUGAM,N.; BALASUBRAMANIAN,T. Green synthesis of silver nanoparticles using marine algae *Caulerpa racemosa* and their antibacterial activity against some human pathogens, 2015; v5, p.499–504.

KOSTER, R; ANDERSON, M.; BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceedings*, v.18, p. 412-21, 1959.

KWEON, D. K. et al. Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and application as wound healing accelerator. *Biomaterials*, v.24, n.9, p.1595-1601, 2003.

LIU, Y.; LIU, C.; TAN, H.; ZHAO, T.; CAO, J.; WANG, F. Sulfation of a polysaccharide obtained from *Phellinus ribis* and potential biological activities of the sulfated derivatives. *Carbohydrate polymers*, v. 77, p. 370-375, 2009.

MODOLIN, M.; BEVILACQUA, R.G. Cicatrização de feridas. Síntese das aquisições recentes. *Rev Bras de Clín e Terap*, v.14, p.208-13, 1985.

PERCIVAL, E.; MACDOWELL, R.H. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. New York: Academic Press, 1967.

PINHEIRO B, SILVA A, SOUZA G, FIGUEIREDO J, CUNHA F, LAHLOU S, DA SILVA JK, MAIA JG, SOUSA PJ. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. *J Ethnopharmacol* 188: 479–486, 2011.

RODRIGUES, J.A.G.; SOUZA JUNIOR, J.; LOURENÇO, J.A.; LIMA, P.C.W.C.; FARIAS, W.R.L. Cultivation of shrimps treated with sulfated polysaccharides of *Halymenia pseudofloresia* rhodophyceae through a prophylactic strategy. *Rev. ciencia Agrônômica*, v.40, n.1 p.71-78, jan-mar, 2009.

ROPELATTO, J. – Estrutura química e atividade antitumoral de heteroramnanas sulfatadas e seus produtos de degradação parcial obtidos da macroalga verde *Gayralia oxysperma*. UFPA, Curitiba, 2011.

SEGUNDO, A.S. et al. Influência do aloe vera e própolis na contração de feridas em dorso de ratos. *Periodontia*, v.17, n.1, p.5-10, 2007.

SENEL, S.; McCLURE, S.J. Potencial applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Review*, v.56, p.1467-1480, 2004.

SHANMUGAM, M; MODY, K.H. Heparinoid-active sulphated sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. *Current science*, v. 79, 2000.

SOUSA, O.V.; FIORAVANTE, I.A.; DEL-VECHIO-VIEIRA,G.; CANESCHI,C.A. Ivestigação das atividades antinociceptiva e antiedematogenica do extrato etanólico das folhas de *Joannesia princeps* Vellozo.Rev Ciên Farm Básica Apl.2009;30 (1):91-97.

VASSEUR, P.B.; PAUL, H.A.; DYBDAL, N.; CRUMLEY, L.; – Effects of local anesthetics on healing of abdominal wounds in rabbits. Am J Vet Res, 1984; v.45, p.2385-2388.

VERMA PR, JOHARAPURKAR AA, CHATPALLIWAR VA, ASNANI A. Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R. Br. in mice. J Ethnopharmacol 102: 298–301, 2005.

VITORINO FILHO, R.N.L – Uso de polissacarídeo extraído do exsudato de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) na terapêutica tópica de feridas. WHITTLE BA. Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. J Neuropharmacol 3: 369 – 378, 1964.

S. Artigo 5

Artigo a ser submetido a Revista Brasileira de Farmácia



Avaliação da atividade antioxidante de extratos obtidos a partir da macroalga marinha *Caulerpa taxifolia*

Evandro Valentim da Silva^{1*}, Romário Correia dos Santos², Jose Ferreira Silva Neto³, George Chaves Jimenez⁴, Ivone Antônia de Souza⁵ & Fálba Bernadete Ramos dos Anjos⁶

- 1 - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco UFPE;
- 2 - Graduando do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE.
- 3 - Programa de Pós-Graduação em Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco UFPE;
- 4 - Professor de Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE;
- 5 - Professora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE;
- 6 - Professora do Departamento de Histologia e Embriologia - UFPE

*email:evandrovalentimblack@yahoo.com.br; endereço: Rua Amambaí, n°246, BL 06 ap. 301, Candeias, Jaboatão dos Guararapes – Pe; telefone: (81) 987250054.

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade antioxidante de extratos obtidos da macroalga marinha *Caulerpa taxifolia* por dois métodos de estudo de atividade antioxidante. A atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólico e metanólico foi avaliada de acordo com Mitsuda (1967). A habilidade dos extratos em sequestrar peróxido de hidrogênio foi determinada pelo método de Ruch (1989). Das análises realizadas através da leitura das amostras em octoplicata em espectrofotômetro, foi possível calcular as atividades antioxidante e sequestradora do peróxido de hidrogênio dos extratos. A atividade antioxidante apresentada pelos três extratos obtidos a partir de *C. taxifolia* pelo método do tiocianeto férrico variaram entre si, mostrando o extrato metanólico uma atividade maior que ao extratos hidro alcoólico e aquoso, talvez se deva a presença de metabolitos secundários como terpenoides. O poder sequestrador do peróxido de hidrogênio dos extratos de *Caulerpa taxifolia* apresentou valores significativos quando comparados a droga de referência.

Palavras – chave: Algas verdes, Tiocianeto férrico, Peróxido de hidrogênio.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the antioxidant activity of the extracts of marine seaweed *Caulerpa taxifolia* by two methods of study of antioxidant activity. The antioxidant activity of the extracts hidroalcolico, methanol and hidroalcolico was evaluated according to Mitsuda (1967). The ability of the extracts to kidnap hydrogen peroxide was determined by Ruch method (1989). The analysis carried out by reading the samples in octoplicata in spectrophotometer, it was possible to calculate the antioxidant and scavenging activities of the extracts hydrogen peroxide. The antioxidant activity presented by the three extracts from *C. taxifolia* by the ferric thiocyanate method varied each other, showing the methanol extract greater activity than the alcohol and aqueous extracts hydro, may be due to the presence of secondary metabolites like terpenoids. The kidnapper power of hydrogen peroxide of *Caulerpa taxifolia* strata known significant values when compared to the reference drug.

Keywords: Green algae, Ferric thiocyanate, Hydrogen peroxide.

INTRODUÇÃO

Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser captados por outro antioxidantes (ANDRADE et al, 2007). Radicais livres e outros oxidantes induzem danos oxidativos em biomoléculas e têm sido associado ao envelhecimento e desenvolvimento de muitas doenças crônicas e degenerativas como o câncer, doenças cardiovasculares aterosclerose, Alzheimer, Parkinson (ROESLER et al., 2007; SOUZA et al., 2007).

Os produtos naturais tem sido uma alternativa aos danos oxidativos em nível celular, e os compostos fenólicos são conhecidos por possuírem atividade antioxidante devido, principalmente, as suas propriedades redutoras e estrutura química (SOUSA et al., 2007;

YESILYURT, 2008). Estes compostos são bem distribuídos pelo reino vegetal, sendo encontrado em plantas terrestres, aquáticas e algas marinhas.

As algas verdes possuem diversos compostos de grande interesse para as indústrias farmacêuticas, de alimentos e cosméticos. A adição de antioxidantes confere proteção não somente aos alimentos, mas também aos organismos animais, uma vez que, os antioxidantes são ingeridos, combatem radicais livres e suas repercussões contribui para redução do risco de patologias (VULCAIN et al., 2005).

O gênero *Caulerpa* é constituído por algas marinhas verdes bentônicas e seus representantes dotadas de um talo rastejante formado por uma porção rizomatosa que se expande ao longo do substrato, fixando-se através de estruturas denominadas rizóides muitas espécies deste gênero são encontradas no litoral brasileiro (SZE, 1998; JOLY, 2005). E alguns trabalhos relatam propriedades biológicas, tais como antiviral e anticoagulante (MATSUBARA et al., 2001; GHOSH et al., 2004; RODRIGUES; FARIAS, 2005)

A espécie *C. taxifolia* apresenta fronde similar a uma folha composta dos vegetais superiores, com o limbo dividido que lembra a folha de uma samambaia, um talo com aparência de um caule tipo estolão e rizoides que são estruturas utilizadas para sua fixação no substrato (REVIERS, 2006). Sendo identificado uma serie de metabolitos secundários neste vegetal que talvez seja uma alternativa para o desenvolvimento de produtos e medicamentos, que possa trazer melhorias para o tratamento de patologias (MOURA, et al., 2012). O presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade antioxidante de extratos obtidos da macroalga marinha *C. taxifolia* por dois métodos de estudo de atividade antioxidante.

MATERIAL E METODOS

O respectivo trabalho configura-se do tipo quantitativo e foi desenvolvido no laboratório de Fisiologia e Farmacologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A macroalga marinha *Caulerpa taxifolia* muito comum, nativa, para o oceano índico, foi recolhida

para o presente estudo na praia dos “Carneiros”, litoral Sul do Estado de Pernambuco, de coordenadas geográficas: -8.703570 e -35.079224, latitude e longitude respectivamente, está a 113 km da capital Recife. A espécie coletada a fim de produzir uma exsicata onde foi depositada no Herbário Geraldo Mariz, da Universidade Federal de Pernambuco, está registrada com o número: 68.863, identificada pela Curadora Marlene Barbosa.

Avaliação da atividade antioxidante pelo método do Tiocianato Férrico

A atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólico, metanólico e hidroalcoólico foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Mitsuda et al. (1967). Mistura contendo 1 mL do extrato algal, 1,1 mL de ácido linoléico 2,51 % (p/v) em etanol (99,0 % v/v), 2 mL de tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0) e 0,9 mL de água destilada foi colocada num frasco de vidro âmbar com tampa rosqueável e estocada em estufa com circulação de ar forçada, a $50,0 \pm 0,5$ °C. Para 0,1 mL desta solução foram adicionados 5 mL de etanol 75 % (v/v), 0,1 mL de tiocianato de amônio 30 % (p/v) e 0,1 mL de cloreto ferroso 0,02 M. Após, exatamente, 3 minutos de reação à temperatura ambiente ($25,0 \pm 0,5$ °C), foi realizada leitura da absorbância a 500 nm, em espectrofotômetro Hewlet Pakard modelo 8452A UV-VISIVEL, o que se repetiu a cada 24 horas, até que a cor púrpura do controle alcançasse um valor máximo. A concentração dos extratos e do antioxidante sintético hidroxibutilanisol (BHA) foi de 0,01 % (p/v). A porcentagem de inibição na oxidação lipídica foi calculada de acordo com a expressão algébrica: % inibição = {[abs. média final do controle - abs. média final da amostra] / abs. média final do controle} x100.

Avaliação do poder sequestrador do peróxido de hidrogênio

A habilidade dos extratos em sequestrar peróxido de hidrogênio foi determinada de acordo com o método de Ruch et al. (1989). Uma solução (4 mM) de peróxido de hidrogênio foi preparada em tampão fosfato (pH 7,4). A concentração de peróxido de hidrogênio foi determinada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 230 nm, usando absortividade molar de

81-1 cm⁻¹ (BEERS; SIZER, APUD YEN; CHEN, 1995). Ao extrato (10400 mL, em 4 mL de água destilada) adicionou-se solução de peróxido de hidrogênio (0,6 mL). Após 10 minutos de reação, à temperatura ambiente (25,0 ± 0,5 °C), realizou-se leitura contra solução branco contendo o extrato em tampão sem peróxido de hidrogênio.

RESULTADOS

Avaliação da atividade antioxidante pelo método do Tiocianato Férrico

Os valores médios de absorvância apresentados pelo extrato hidroalcoólico de *C. taxifolia* (Gráfico 1) permitiu obter o percentual de atividade antioxidante de acordo com a fórmula citada em materiais e métodos, onde foi obtido os valores expressos na tabela 1.

Valores médios de absorvância das amostras contendo extrato hidro alcoólico de *C. taxifolia* (0,01 %) obtidos no teste do tiocianato férrico nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas.

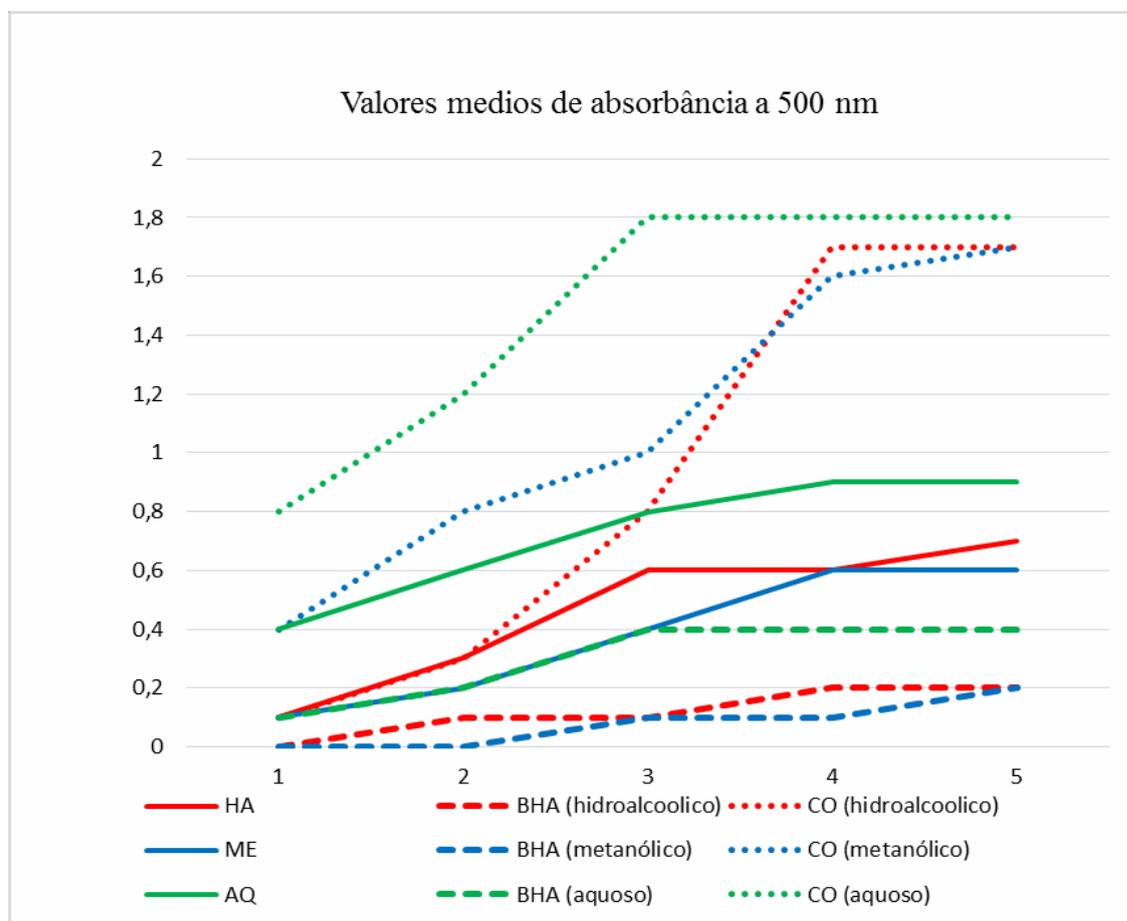


Gráfico 1 – valores médios de absorvância a 500 nm do extrato hidroalcoólico, extrato metanólico, e do extrato aquoso da macroalga *C. taxifolia*.

Tabela 1 – Percentuais de atividade antioxidante pelo método do Tiocianato Férrico expressos pelo extrato hidro alcoólico, extrato metanólico, e do extrato aquoso da de *C. taxifolia*.

Extrato/ Tempo	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
HA	0,00 % ± 0,000**	0,00 % ± 0,000**	25,00 % ± 0,003**	64,7 % 0,006**	58,82 % 0,007**
BHA (hidroalcoólico)	0,00 % ± 0,000**	66,00% ± 0,002**	87,50 % ± 0,001**	88,23 % ± 0,002**	88,23 % ± 0,003**
ME	75,00 % ± 0,001**	75,00 % ± 0,009**	60,00 % ± 0,005**	62,5 % ± 0,004**	64,7 % ± 0,003**
BHA (metanólico)	100,00 % ± 0,003**	100,00 % ± 0,001**	90,00 % ± 0,007**	93,75 ± 0,002**	88,23 ± 0,001**
AQ SIGLAS	50,00 % ± 0,002**	50,00 % ± 0,000**	55,55 % ± 0,001**	50,00 % ± 0,001**	50,00 % ± 0,000**
BHA (extrato aquoso)	87,5 % ± 0,002**	83,33 % ± 0,003**	77,77 ± 0,004**	77,77 ± 0,006**	77,77 ± 0,003**

* significativo para valores de $p \geq 0,05$, ** significativo para valores de $p \geq 0,01$ (ANOVA).

No gráfico 1 encontram-se os valores médios de absorvância para as amostras do extrato metanólico de *C. taxifolia* que serviram de base para os cálculos dos percentuais de atividade antioxidante apresentados na tabela 1 acerca do extrato metanólico. Valores médios de absorvância das amostras contendo extrato metanólico de *C. taxifolia* (0,01 %) obtidos no teste do tiocianato férrico nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas.

Avaliação do poder sequestrador do peróxido de hidrogênio dos extratos metanólicos

Das análises realizadas através da leitura das amostras em triplicata em espectrofotômetro com o comprimento de onda $\lambda = 230$ nm, foi possível calcular os valores médios expressos na tabela 2, e com estes dados foi possível aplicar a fórmula para aferir a atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólico, metanólico e aquoso de *C. taxifolia* cujos percentuais encontram-se expressos no gráfico 2.

Tabela 2– valores de absorvância apresentado pelas amostras

Amostras	HA	Me	AQ	PA	CO
Absorvância	0,07	0,02	0,25	0,09	1,2

* significativo para valores de $p \geq 0,05$, ** significativo para valores de $p \geq 0,01$ (ANOVA).



Gráfico 2 – Potencial antioxidante apresentado pelos extratos de *Caulerpa taxifolia* para sequestrar o peróxido de hidrogênio.

DISCUSSÃO

Avaliação da atividade antioxidante pelo método do Tiocianato Férrico

A atividade antioxidante apresentada pelo extrato hidroalcoólico foi inferior aos valores apresentados pelo BHA, onde a atividade deste variou de 23,53 a 66,00 % superior ao extrato hidroalcoólico, e com o extrato metanólico a superioridade do BHA variou de 23,53 a 31,25 %, quando comparado com o extrato aquoso a diferença de atividade oscilou entre 22,77 a 37,50 %. Mesmo os valores encontrados para os referidos extratos sendo bastante inferior aos valores encontrados com a substância utilizada como referência, a atividade antioxidante dos extratos de *C. taxifolia* foram superiores aos valores de atividades apresentadas pelas espécies de algas verde marinhas testadas por Raymundo (2004) e de vegetais superiores testados por Negri (2009).

A atividade antioxidante apresentada pelos três extratos obtidos a partir deste organismo pelo método do tiocianeto férrico variaram entre si, mostrando o extrato metanólico uma atividade maior que ao extratos hidroalcoólico e aquoso, talvez isto se deva a composição de metabolitos secundários presentes no extrato o que pode sugerir que a atividade antioxidante de *C. taxifolia* talvez se deva a presença de compostos fenólicos, uma vez que estes compostos são mais facilmente extraídos de material vegetal com extração a metanol. A investigação de algas marinhas já resultou no isolamento de diversos compostos terpenóides, e esta alga tropical é um desses exemplos. Ela ficou conhecida pelos seus danos ao ecossistema, devido a liberação de um sesquiterpeno tóxico chamado caulerpenina (MOZZACHIODI et al., 2001). A caulerpenina (1,4diacetoxibuta-1,3-dieno; segundo a IUPAC) é um composto acíclico e em sua estrutura encontramos 3 grupos acetoxi (AMICO et al., 2009).

Os organismos marinhos também são fonte consideráveis de terpenos. Estruturalmente esta classe de compostos orgânicos é formada por unidades de isoprenos insaturadas ligadas, e o número de unidades de carbono sevem de classificação para estes compostos: moterpenos (10 Carbonos), sesquiterpenos (15 Carbonos), diterpenos (20 Carbonos) (ABAD; BERMEJO, 2007). As macroalgas marinhas estão sempre submetidas a rápidas variações de intensidade de luz e concentrações de O₂ e CO₂ ao longo da coluna de água e, assim, sua sobrevivência depende de uma resposta eficiente ao estresse oxidativo. Por essa razão, esses organismos podem representar uma importante fonte de substâncias antioxidantes naturais tanto para as Indústrias Alimentícias como para as Farmacêuticas (MATSUKAWA et al., 1997).

Avaliação do poder sequestrador do peróxido de hidrogênio

Quando considerada a dose de 200 mg o extrato aquoso apresentou valores bastante inferiores ao apresentados pelo peróxido de hidrogênio, sendo a eficiência do extrato aproximadamente 14 % inferior ao apresentado pela solução de referência para tal atividade. A efetividade antioxidante de fontes naturais foi atribuída, por diversos autores, aos compostos

fenólicos, que ocorrem naturalmente em plantas terrestres e aquáticas (HAYASE; KATO, 1984). Seriam esses compostos os principais responsáveis pela atividade antioxidante de plantas, desempenhando papel fundamental na inibição da auto oxidação em óleos (RAMARATHNAM et al., 1986).

O metabolismo do oxigênio nas células vivas, além de levar a produção de energia necessária para as atividades das células, ocasiona também a formação de radicais (ROESLER et al., 2007). Compostos fenólicos agem como antioxidantes, não somente por sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídios. Carotenoides são constituídos de cadeias de polienos, em um longo sistema de duplas ligações conjugadas, rico em elétrons, responsável pela atividade antioxidante desses compostos: tanto na absorção do oxigênio singlet quanto de radicais livres, para interromper as reações em cadeia onde eles estão envolvidos.

A ocorrência natural de fenóis substituídos e polifenóis em algas vêm sendo cientificamente divulgada e ampliada ao longo dos anos (PEDERSEN, 1978). Embora essa classe de compostos inclua antioxidantes efetivos (DENISOV, 2009)

O processo respiratório e diversas reações oxidativas das células aeróbicas levam à formação de radicais livres, que contribuem para o aparecimento de diversas doenças. As células humanas dependem de sua capacidade antioxidante para fornecer proteção contra os efeitos prejudiciais de radicais livres e espécies reativas do oxigênio, que são consequências inevitáveis da vida aeróbica. Vários estudos epidemiológicos indicam que a alta ingestão de produtos vegetais está associada com uma redução no risco de uma variedade de doenças crônicas como aterosclerose e câncer, efeitos que têm sido particularmente atribuídos aos compostos que possuem atividade antioxidante nos vegetais: vitaminas C e E, os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides, e os carotenoides.

CONCLUSÃO

As algas marinhas representa uma fonte alternativa bastante promissora, pois apresentaram atividades biológicas importantes, que pode contribuir nas investigações de novas terapias medicamentosas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a CAPES pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARTEEL, G.E., SIES, H., 2001. The biochemistry of selenium and glutathione system. *Environ Toxicol Pharmacol.* 10: 153–8.
- AMICO, G.C., RODRÍGUEZ-CABAL, MA. and AIZEN, MA., 2009. The potential key seed-dispersing role of the arboreal marsupial *Dromiciops gliroides*. *Acta Oecologica*, vol. 35, p. 8-13.
- ANDRADE S.F.; LEMOS M.; COMUNELLO E.; NOLDIN V.F.; CECHINEL-FILHO V.; NIERO R. 2007. Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models. *J. Ethnopharmacol* 113: 252-257.
- ABAD, M.J.; BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): a review uptade. *Arkivoc*, v.7, p.76-96, 2007.
- BLUNT, J.W.; COOP, B. R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. *Nat Prod. Rep.*, v.22, p. 15-61, 2005.
- BLUNT, J.W.; COOP, B. R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. *Nat Prod. Rep.*, v.23, p. 26-78, 2006.
- DENISOV, E.; DENISOVA, T. (2009). The Reactivity of Natural Phenols. *Russ. Chem. Rev.*, Vol. 78, No. 11, 1047-1073.
- JOLY, A.B. *Botânica: introdução a taxonomia vegetal*. 13ª edição, São Paulo companhia editora Nacional, volume 4, 420-428p.2005.
- GHOSH, P.; ADHIKARI, U., GHOSH, P.K., PUJOL, C.A., CARLUCCI, M.J., DAMONTE, E.B.; RAY, B. (2004). *In vitro* anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. *Phytochem.* 65 (23): 3151-3157
- MATSUKAWA,R.; DUBINSKY,Z.; KISHIMOTO,E.; MASAKKI,K.; MASUDA,Y.; TAKEUCHI,T.A. Comparison of screening methods for antioxidants activity in seaweeds. *J. appl.Phycol*, v. 9, p.29-35, 1997.
- MITSUUDA,H., YAMAMOTO.A., AND KUSANO,T. (1967). *Agric.biol.chem.* 31,115-118

MOURA, C.A. ; SILVA, E. V. ; CAVALCANTI, K.P.S. ; ANJOS, F. B. R. ; JIMENEZ, G. C.; OLIVEIRA, S.F. ; SOUZA, I.A. Perfil Fitoquímico da Macroalga Marinha *Caulerpa taxifolia* (M.VAHL) C. AGARDH, 1817 (CAULERPACEAE). In: Congresso Brasileiro de Oceanografia, 2012, Rio de Janeiro. Congresso Brasileiro de Oceanografia. Rio de Janeiro: UERJ, 2012. v.)1. p. 01-01.

MOZZACHIODI, R. et al. (2001) Caulerpenyne, a toxin from the seaweed *Caulerpa taxifolia*, depresses after polarization in invertebrate neurons Neuroscience.107, 519-526.

NEGRI, M.L.S.; POSSAMAI, J.C.; KAKASHIMA, T. atividade antioxidante das folhas de espinheira –santa- *Mayteunus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. Secas em diferentes temperaturas. Rev.bras. farm. 19(2B):553-556, Abr.jun.2009.

OLIVEIRA, E.C. The seaweed resources of Brazil. In: CRITCHLEY, A.T.; OHNO, M., eds. Seaweed resources of the world. Yokosuka: Japan International Cooperation Agency, 1998. p.367-371.

KAHARAMAN, A., ERKASAP, N., KOKEN, T., SERTESER, M., AKTEPE, F., ERKASAP, S., 2003. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanolinduced gastric lesions. Toxicology 183, 133–142.

RUCH, R.J., CHENG, S.J., AND KLAUNIG, J.E. (1989) Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. Carcinogenesis, 10, pp. 1003-1008.

RAMARATHNAM, N. OSAWA, T.; NAMIKI, M.; TASHIRO, T. Studies on the relationship between antioxidative activity of Rice hull and germination ability of rice seeds. J. Sci. Food Agric., v. 37, p.719-726, 1986.

RAMARATHNAM, N. OSAWA, T. OCHI, H. KAWAKISHI, S. The contribution of plant food antioxidants to human health. Trends Food Sci. Technol., v.6, p.75-82, 1995.

RAVEN P.H., EVERT R.F.; EICHHORN S.E. 2007. Biologia Vegetal. 7ª ed. Guanabara Koogan, RJ.

REVIERS, B. de. 2006. Biologia e Filogenia das Algas. 1ª ed. Editora Artmed, Porto Alegre.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUZA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade Antioxidante de frutas do cerrado. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v.27, n.1, p.53-60, jan.-mar., 2007.

MAITI, B.C., THAMSON, R.H., MAHENDRAN M.1978.The structure of caulerpina, a pigment from *Caulerpa* algae. J. Chem.Res. (S) 1978: 126-127.

MATSUBARA, K., MATSUURA, Y., BASIC, A., LIAO, M.L., HORI, K.; MIYAZAWA, K.

(2001). Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. *Biol. Macromol.* 28(5): 395-399.

SCHWEDE, J.G, CARDELLINA, II J.H., GRODE, S.H, JAMES Jr., T.R, BLACKMAN, A. J. 1987. Distribution of the pigment caulerpin in species of the green alga *Caulerpa*. *Phytochem.* 26: 155-158.

VEST, S.E, DAWES, C.J, AND ROMEO, J.T. 1983. Distribution of caulerpin and caulerpicin in eight species of the green algae *Caulerpa* (Caulerpales). *Bot. Mar.* 26:313-316.

VULCAI, N.E.; GOUPY, P.; CARIN-VEYRAT, C.; DANGLES, O. (2005) inhibition of the metmyoglobin induced peroxidation in linoleic acid by dietary antioxidant: action in the aqueous phase vs. lipid phase. *Free radical research*, 35, p.547-563.

HAYASE, F.; KATO, H. Antioxidative components of sweet potatoes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, v.30, p.37-46, 1984.

HAYME; FENICAL.W, 1988; Marine plant-herbivore interactions. The ecology of Chemical defense, *Ann. Ver. Ecol. Syst.* n° 19, pp. 111-145.

RAYMUNDO, M.S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante in vitro de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 40, p. 495-503, 2004. 60.

RODRIGUES, J.A.G.; FARIAS, W.R.L. (2005). Extração, fracionamento, purificação e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (Caulerpales, Chlorophyta). In: Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca (pp. 1693-1701). Fortaleza: CD-Room do CONBEP, 14.

REN, X, YANG, L, LIU, J, SU, D, YOU, D, LIU, C., 2001. A novel glutathione peroxidase mimic with antioxidant activity. *Arch Biochem Biophys.*, 25: 250.

SOLÈ-CAV, A.M.; KELECOM. A ,1988, Dialogo quimico dos mares, *Ciência Hoje* , n° 46, vol. 8, pp.18-29.

SOUZA, T.M.; SEVERI, J.A.; SILVA, V.Y.A; SANTOS, E.; PIETRO, L.C.L.R. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Strtphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae – Mimosoidae). *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v.28, n.2, p.221-226, 2007.

SZE, P. (1997). *A biology to the algae*. New York: McGraw-Hill.

XUE, C-H, YU G, HIRATA, T, TERAQ, J, LIN, H. 1998. Antioxidative activities of several marine polysaccharides evaluated in a phosphatidylcholine-liposomal suspension and organic solvents. *Biosci Biotech Bioch* 62: 206-209.

XUE, C-H, FANG, Y, LIN, H, CHEN, L, LI, Z-J, DENG, D, LU, C-X. 2001. Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*. *J Appl Phycol* 13: 67-70.

YESILYURT, V. et al. Antioxidant potential and phenolic constituents of *Salvia cedronella*.
Food Chemistry, v. 108, p. 31-39, 2008.

9. Artigo 6

Artigo a ser submetido a Revista Brasileira de Farmácia



BIOATIVIDADE DE *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817) NO METABOLISMO E NA VASCULOGÊNSE DE CÉLULAS TUMORAIS.

Evandro Valentim da Silva^{1*}, Eunice Ribeiro², Wagner Mateus Vaz da Silva¹, Dazziane Farias Santos¹, Renê Rodrigues Melo², Márcia Raquel Cedrim Vieira², Danielle Maria Bastos de Souza³, José Ferreira Silva Neto³, George Chaves Jimenez³, Ivone Antonia de Souza¹ and Fálba Bernadete Ramos dos Anjos¹. Federal University of Pernambuco¹, Universitaria City, Recife, PE, Brazil. Northern College of Parana, Brazil². University Federal Rural of Pernambuco, Brazil³.

1. INTRODUÇÃO

O processo de progressão de uma célula normal para a malignidade envolve, dentre muitos mecanismos, a capacidade de estimular a Angiogênese, através do aumento da secreção de fatores vaso-indutores e diminuição dos inibidores, no qual a hipóxia é um importante sinalizador para o desencadeamento da liberação de citocinas angiogênicas, influenciando na progressão tumoral e metástase (GRAÇA, 2004).

A Angiogênese constitui um importante mecanismo no desenvolvimento tumoral, sendo responsável pelo aporte nutricional às células neoplásicas em proliferação e estabelecendo condições favoráveis para a disseminação metastática. É um processo complexo com vários estágios que envolvem o remodelamento da matriz extracelular, migração e proliferação das células endoteliais, diferenciação capilar e anastomose (SOUZA et al., 2007; CAPP et al., 2009, STOCKMANN et al., 2014).

Fatores de crescimento são mediadores constitutivos que modulam o reparo do tecido através da produção de proteínas, a síntese e a renovação da matriz extracelular (MEC). Eles se ligam a receptores (glicoproteínas transmembranas) e ainda, ativam a autofosforilação intrínseca tirosino-quinase do receptor no domínio citosólico e as reações fosforilativas intracelulares (BROUGHTON et al., 2006; SANT'ANA, 2008).

O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), é uma das moléculas mais expressiva na estimulação da angiogênese direta e indiretamente, aumenta a expressão celular de metaloproteinases, degradando a matriz extracelular e facilitando a penetração dos neovasos no tecido (HIRATSUKA et al., 2002; TAMMELA et al., 2005;

KOWANETZ; FERRARA, 2006; SANT'ANA, 2008), ao mesmo tempo em que diminui a expressão endotelial dos inibidores de metaloproteinases (HIRATSUKA et al., 2002), possui efeito pró-inflamatório (SAKURAI et al., 2003; USUI et al., 2004), neuroprotetor (STORKEBAUM; CARMELIET, 2004), e participa na estabilização e na remodelação vasculares (BENJAMIN, 1998).

O gênero *Caulerpa* é constituído por algas marinhas verdes bentônicas presentes no mar mediterrâneo. Muitas espécies deste gênero são encontradas no litoral brasileiro (SZE, 1998; JOLY, 2005), e apresenta propriedades biológicas, tais como antiviral e anticoagulante (GHOSH et al., 2004; RODRIGUES; FARIAS, 2005).

Entre outros compostos químicos presentes neste gênero, destacam-se o alcaloide indólico caulerpina, ácido caulerpínico, a mistura de amidas denominadas caulerpicina, os terpenos caulerpina e trifarina e os esteroides: colesterol, β -sitosterol e colesteno (NAPRALERT, 2014).

A *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817) é uma espécie nativa de águas tropicais. A abordagem fitoquímica do extrato bruto metanólico desta espécie foi identificada a presença de alcalóides, terpenos, esteróides e saponinas (MOURA et al. 2012).

Este trabalho objetivou estudar o metabolismo energético em embriões tratados com *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817), assim como, evidenciar a atividade da vasculogênese e angiogênese.

2. Material e Métodos

Estudo do Metabolismo Energético de *Caulerpa taxifolia*

Foram utilizados 270 ovos (30 para cada grupo tratado e controle sem tumor e enriquecidos com ω -3 com e sem tumor) de casca fertilizáveis, acondicionados em embalagens de polietileno, com mesma data de envasamento. Após a identificação, eles foram armazenados em temperatura ambiente (25 °C) por 120 dias. As variáveis analisadas foram peso do ovo, peso da casca e espessura da casca (HAMILTON, 1982, STALDEMEN; COTTERILL, 1990).

Modelo Animal Experimental

EHA e ME – descrever as siglas ovos vermelhos da raça Rhode Island Red de quatro lotes, foram incubados a 37° C, com viragem automática, para o estudo do

metabolismo energético e da Angiogênese. Os grupos foram distribuídos em grupos controle, tratados EHA (50 µg/mL) e ME (50 µg/mL), e controle enriquecidos com ω-3, com e sem tumor, e tumorados tratados com metotrexato (10 mg/mL). No estágio de idade de 288 horas, o desenvolvimento foi interrompido. Os vasos foram quantificados e caracterizados morfológicamente e os embriões fotografados, fixados e processados.

Atividade Antitumoral

Em ovos foram transplantadas células tumorais do Carcinoma de Ehrlich doadas (0,2 mL – 25 x 10⁶ células /mL) nos grupos: controle, padrão tratado com metotrexato fármaco de referência (10 mg/mL), tratado com EHA e ME e tratado com ω-3. A quimioterapia experimental foi iniciada 48 horas após o transplante dos tumores. Após o término do tratamento, todos os embriões foram pesados e sacrificados, e os tumores foram retirados, dissecados e pesados. A inibição tumoral foi calculada segundo a metodologia adaptada de Geran et al. (1972).

Estudo da Embriogênese

Os ovos foram incubados a 37,5 °C, com umidade atmosférica mantida e constante renovação do ar. Vinte quatro horas depois foram administradas concentração de 50 µg/mL dos extratos hidroalcolico (EHA), metanólico (EM), ω-3 e metotrexato (10 mg/mL) nos grupos experimentais. O grupo controle recebeu solução salina (0,9 %) durante o mesmo período de tempo (horas). O desenvolvimento foi interrompido com 288 horas para realização das análises (MAGALDI, 1974; MARQUES, 1986).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos ensaios do estudo do metabolismo energético indicaram que não houve diferença significativa entre os grupos controle não tumorado, tratado normal e tumorado, que receberam os extratos EHA e ME, bem como, com o grupo que recebeu suplementação com ω-3. Contudo, em relação a deformidade na casca durante o desenvolvimento, o grupo controle tumorado apresentou um quadro que sugestiva deficiência na composição estrutural destes ovos (Tabela 1).

Tabela 1 – Percentual e anomalias da casca de ovos (n= 30 por grupo) de *Gallus gallus domesticus* L., com idade de 288 horas mostrado dos Grupos Controle (0,9 %); Tratado EHA (50 µg/mL); Tratado ME (50 µg/mL) e Tratado ω-3 Tratados, Controle Tumorado (0,9 %); Tratado EHA Tumorado (50 µg/mL), Tratado ME Tumorado (50 µg/mL), Tratado ω-3 Tumorado, (T TEHA/50 µg/mL), Tratado Metotrexato Tumoral (T TEHA/50 µg/mL).

GRUPO (n=30)	Percentual da Casca (%)	Erro Padrão	Deformidades da Casca
C	9,01	0,05	---
T EHA	8,87	0,01	---
T ME	8,90	0,01	---
T ω-3	9,00	0,00	---
C T	7,87	0,01	rugosa, áspera, mole
T EHA T	8,15	0,02	---
T ME T	8,21	0,01	---
T MEX T	8,13	0,01	---
T ω-3 T	8,07	0,00	---

Médias e Erro Padrão (p≤ 0,05).

A casca do ovo oferece proteção contra a invasão microbiana, controla a troca de água e gases através dos poros e constitui a fonte de cálcio para o embrião durante seu desenvolvimento. Esta estrutura também ameniza as flutuações de temperatura entre os componentes do ovo e seu ambiente externo, que está intimamente a composição estrutural (ROMANOFF; ROMANOFF, 1949; RAHN et al., 1981; NYS et al., 1999).

Segundo Bunk; Balloun (1978) e Solomon (1991), as variações na camada mamilar, deposição de carbonato de cálcio, foram associadas às alterações na resistência da casca. Hunton (1995) citou que a densidade da camada mamilar confere grande característica de resistência à casca, sendo que quanto mais largo os botões, maior a probabilidade de ocorrerem fraturas nos espaços intermamilares. Talvez as células tumorais tenham promovido um desarranjo na conformação espacial da casca do grupo controle tumorado, o que favoreceu ao desenvolvimento destas deformidades.

A avaliação da vasculogênese apontou uma redução significativa (p≤ 0,05) entre os grupos controles, tratados com extratos EHA (50 µg/mL) e ME (50 µg/mL) e tratados com ω-3, com e sem tumor (Gráfico 1).

Carmo; Correia (2009) mencionaram que os ácidos graxos ω-3 são importantes, pois estão envolvidos com a supressão da biossíntese dos eicosanoides derivados do ácido araquidônico, modificando a resposta imunológica às células

tumorais e modulação da inflamação. Estas respostas impactam a proliferação celular, a apoptose, a disseminação de metástases e na Angiogênese.

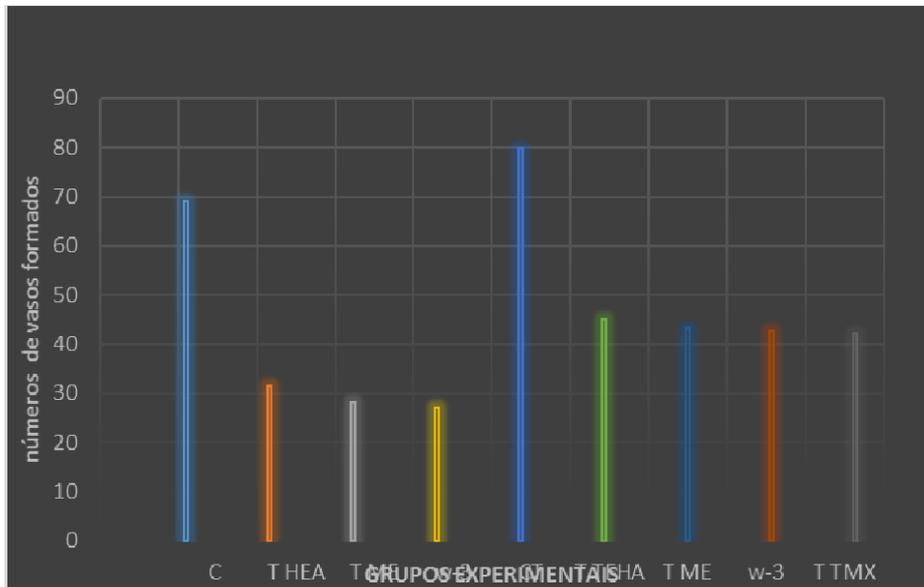


Gráfico 1 – Média (\bar{x}) das quantificações dos vasos, no processo da Vasculogênese dos embriões de *Gallus gallus domesticus* L. com idade de 288 horas dos Grupo Controle (C/ 0,9 % se solução salina); Tratado EHA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$); Tratado ME (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e Tratado ω -3 Tratados, Controle Tumorado (CT/0,9 % se solução salina); Tratado EHA Tumorado (TTEHA/50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Tratado ME Tumorado (TTME/ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Tratado ω -3 Tumorado (TT ω -3), Tratado Metotrexato Tumoral (T TEHA/50 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Nos ensaios do estudo da Angiogênese, com os extratos EHA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e ME (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), foi observado que houve inibição significativa ($p \leq 0,05$), da neovascularização principalmente entre os grupos com e sem tumor (Gráfico 2).

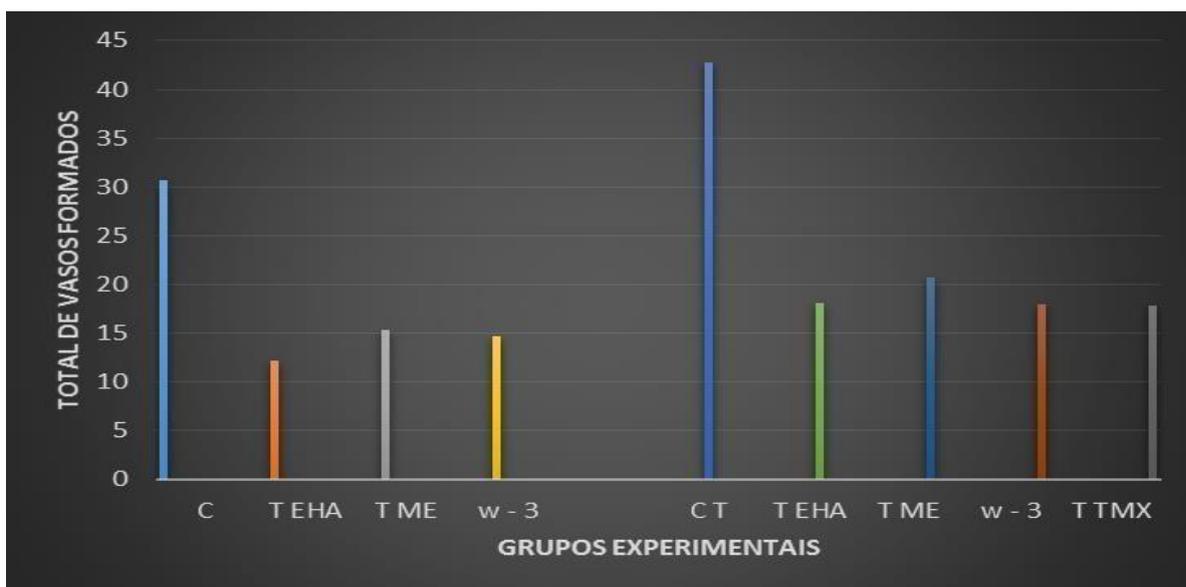


Gráfico 2 – Média (x) das medidas dos vasos: Angiogênese dos embriões de *Gallus gallus domesticus* L. com idade de 288 horas dos Grupo Controle (C/0,9 % de solução salina); Tratado EHA (50 µg/mL); Tratado ME (50 µg/mL) e Tratado ω-3 Tratados, Controle Tumorado (CT/0,9 % de solução salina); Tratado EHA Tumorado (T TEHA/50 µg/mL), Tratado ME Tumorado (T TME//50 µg/mL), Tradado ω-3 Tumorado (T T ω-3), Tratado MTX T (T TEHA/50 µg/mL).

A Angiogênese é um processo constituído de novos vasos sanguíneos fruto de um ramo vascular pré-existente (STOCKMANN et al., 2014). No humano adulto a taxa de proliferação das células endoteliais é muito lenta comparada a outros tipos celulares, mas existem ocasiões especiais onde ocorre a expressão controlada de indutores deste evento, como no processo de cicatrização de feridas (POLVERINI, 2002; SHIBUYA, 2014). Vale ressaltar que os extratos poderiam funcionar como uma estratégia de inibição da formação dos vasos.

Em relação a Vasculogênese e Angiogênese, a macroscopia revelou que houve redução significativa ($p \leq 0,05$) do número de vasos entre grupos normais e tumorados tratados com EHA (50 µg/mL) e ME (50 µg/mL) (Figura 1). Ficou evidenciado que o calibre também sofreu modificação frente ao tratamento.

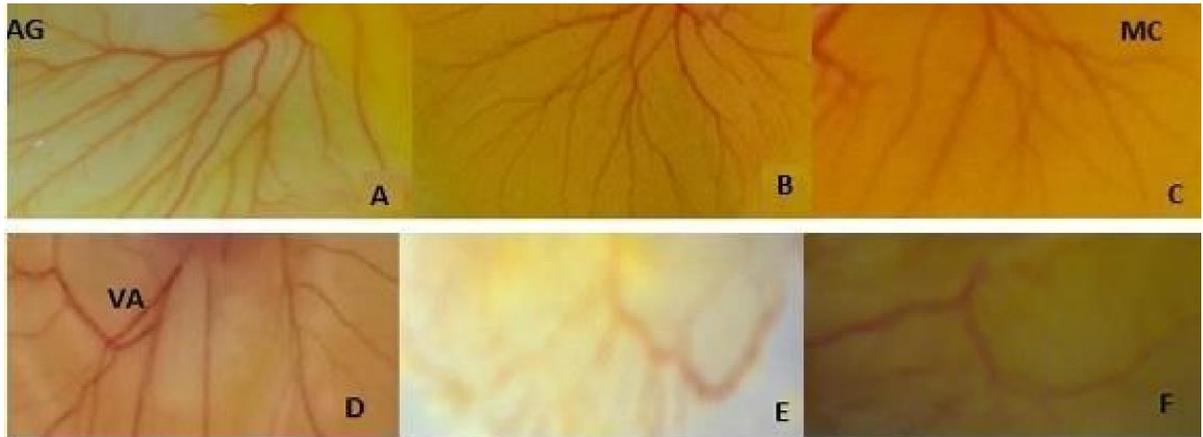


Figura 1 – Fotomicrografias dos vasos de embrião com 288 horas de desenvolvimento evidenciando Membrana Corioalantóica (MC); Vasculogênese (VA) e Angiogênese. **A** – Grupo controle tratado com solução salina (0,9 %). **B** – Grupo tratado com EHA (50 µg/mL). **C** - Grupo Tratado com extrato ME (50 µg/mL). **D** - Grupo Controle Tumorado tratado com solução salina (0,9 %). **E** - Grupo Tumorado Tratado com EHA (50 µg/mL). **F** - Grupo Tumorado tratado com ME (50 µg/mL). 400 x.

O aspecto microscópico da membrana corioalantóica dos organismos controle tratado com solução salina (0,9 %) e tratados com o EHA (50 µg/mL) e ME (50 µg/mL), com e sem tumor, mantiveram a morfologia preservada de estrutura (Figura 2).

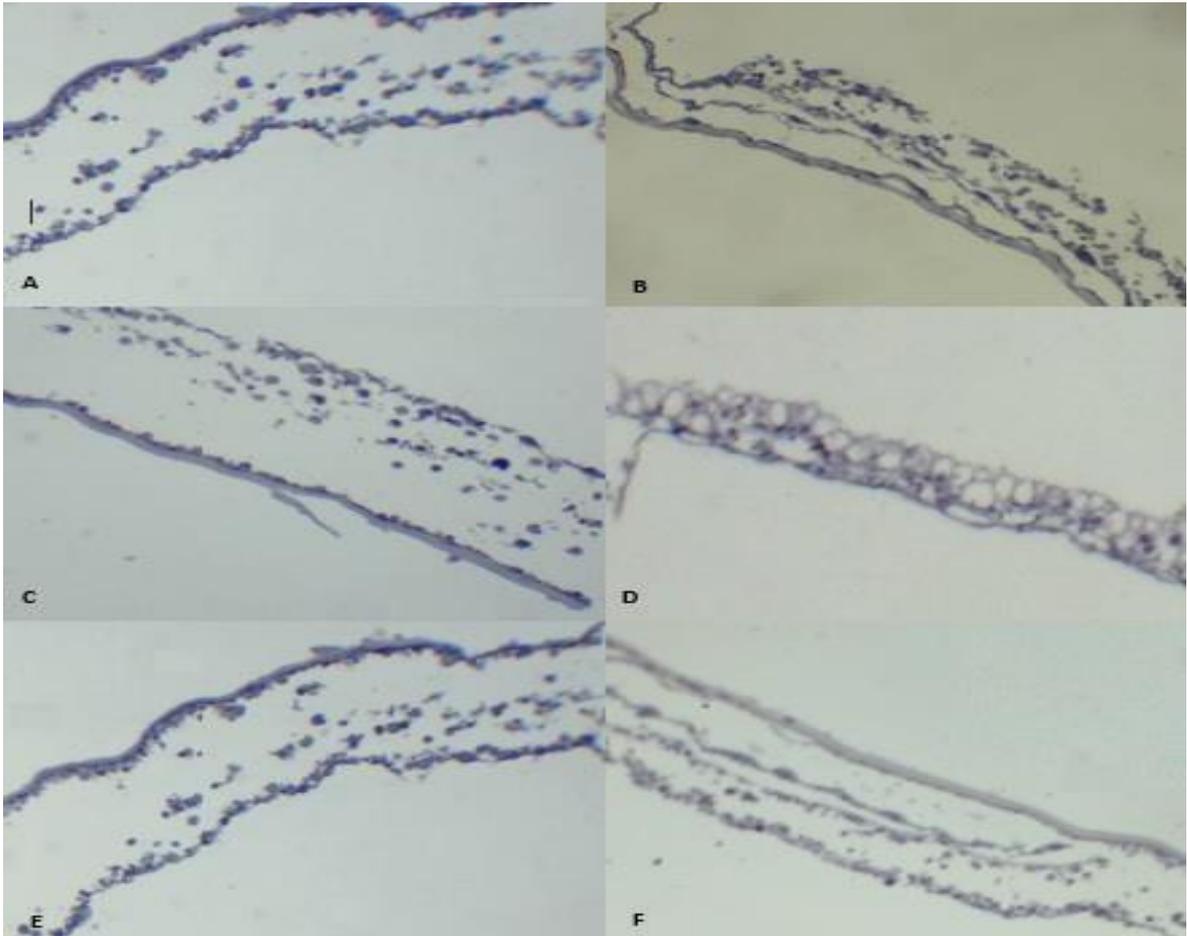


Figura 2 – Fotomicrografias de cortes transversais da membrana do epitélio amniótico corado com hematoxilina-eosina (HE) de embriões de *Gallus gallus domesticus* L. com idade de 288 horas grupos experimentais. **A** - Grupo controle tratado com solução salina (0,9 %). **B** – Grupo tratado com EHA (50 µg/mL). **C** – Grupo tratado com ME (50 µg/mL). **D** – Grupo controle tumorado tratado solução salina (0,9 %). **E** - Grupo tumorado tratado EHA (50 µg/mL). **F** - Grupo tumorado tratado com ME (50 µg/mL).

Existe uma relação entre a membrana corioalantóide e a respiração embrionária. É através dela, que o embrião tem acesso ao oxigênio, o que sustenta a oxidação de ácidos graxos da gema, essencial para o desenvolvimento embrionário (SATO et al., 2006). Através dela o fluxo de O₂ vindo do ambiente externo entra em contato com a hemoglobina dos vasos capilares promovendo o aumento progressivo da capacidade de difusão entre a corioalantóide e os vasos capilares (TAZAWA; WHITTOW, 2000; WAGNER-AMOS et al., 2003).

É possível que os extratos utilizados no tratamento dos embriões interferiram nos mecanismos respiratórios dos embriões tratados com os extratos, ou seja, possivelmente não modificou a demanda de oxigênio, o que preservou a mecânica respiratório do indivíduo.

A avaliação do tecido cardíaco dos embriões dos grupos controles, tratados com extratos EHA (50 µg/mL) e ME (50 µg/mL) e tratados com ω-3, com e sem tumor, demonstrou que diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. Entretanto cerca de 37 % dos embriões tumorados apresentaram pontos hemorrágicos na parede do coração e congestão no lúmen do vaso, e ainda a fragilidade do tecido durante o manuseio, que não foi registrado nos demais grupos.

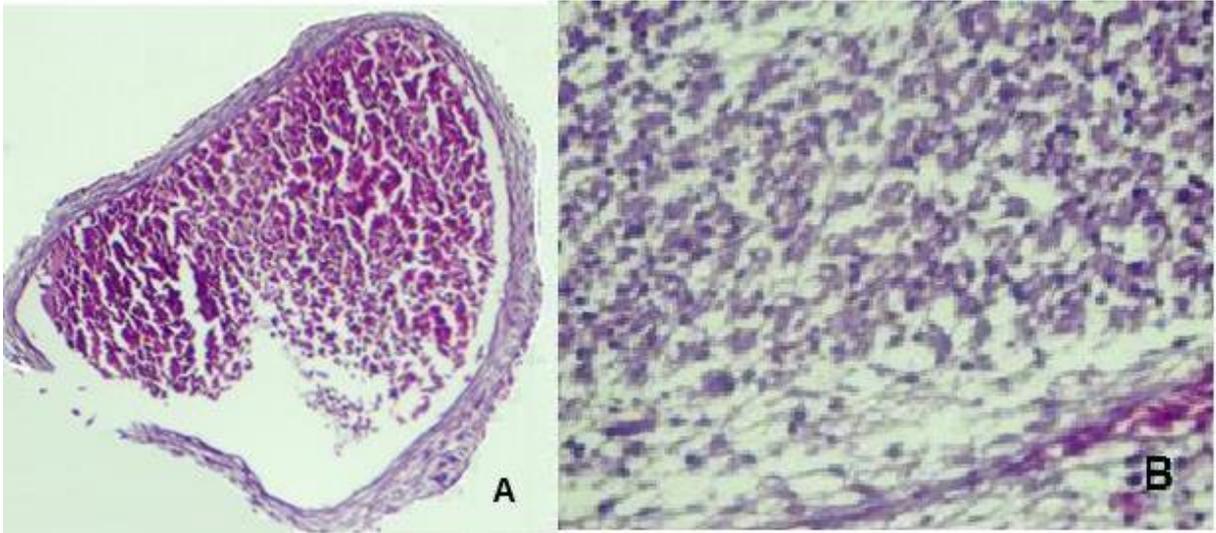


Figura 3 – Fotomicrografia do corte frontal do coração corado com hematoxilina-eosina (HE) de embrião de *Gallus gallus domesticus* L., com idade de 288 horas do grupo controle tumorado tratado com solução salina (0,9 %). **A** – Visão geral. **B** – Detalhe da parede do coração. Coloração Hematoxilina-Eosina. 200 (A), 400 (B) x

A anatomia microscópica dos tecidos cardíacos demonstrou que o grupo controle tumorado, apresentou fibras ondulares que perderam os núcleos (*), talvez com cariólise (**), presença de infiltrado sanguíneo e extravasamento entre as fibras, provavelmente com células inflamatórias (***) (Figura 4).

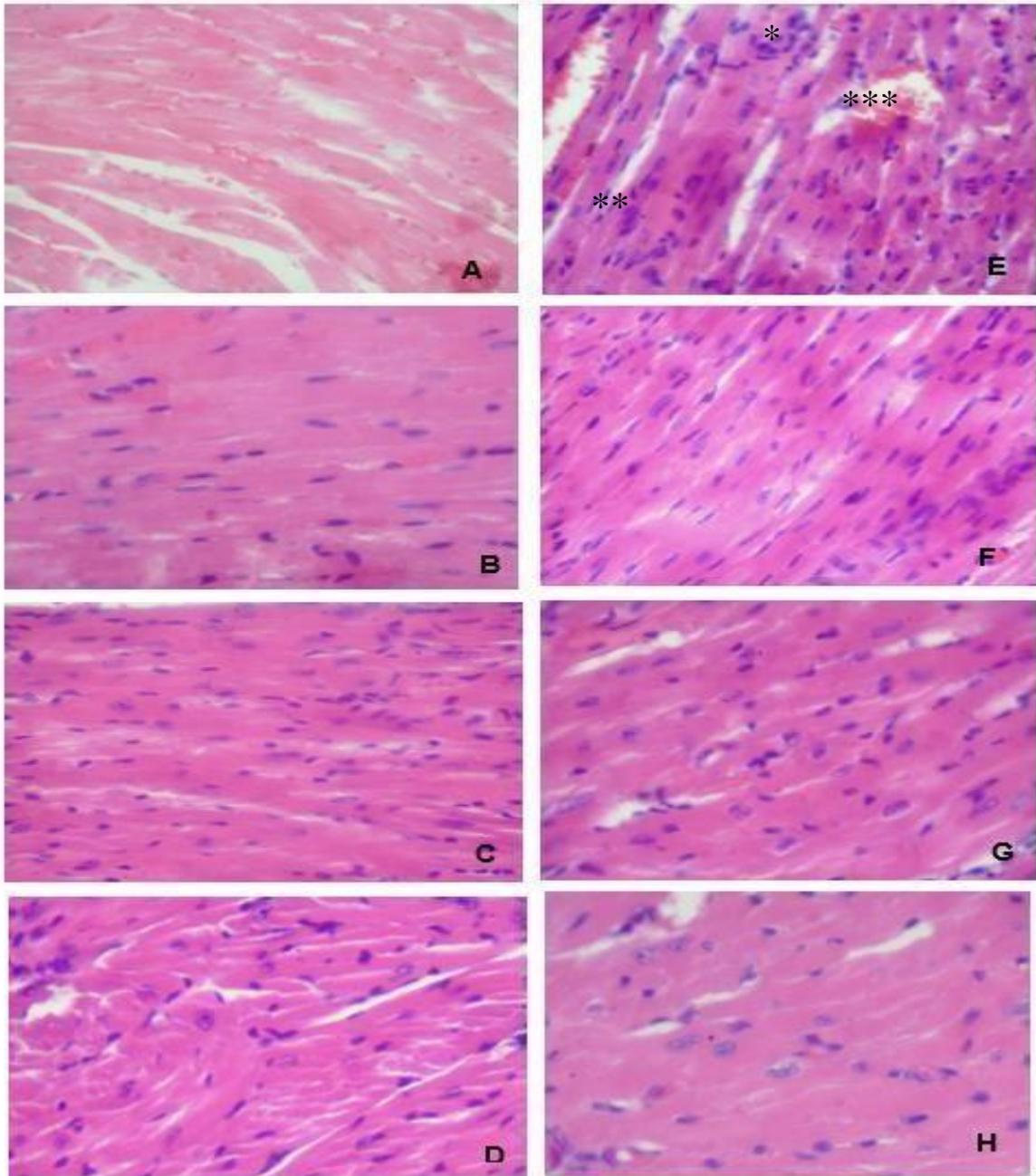


Figura 4 – Fotomicrografia de cortes transversais do tecido cardíaco corado com hematoxilinaeosina (HE) de *Gallus gallus domesticus* L. com idade de 288 horas. **A** - Grupo Controle (0,9 % se solução salina). **B** - Tratado EHA (50 µg/mL). **C** - Tratado ME (50 µg/mL). **D** - Tratado ω-3 Tratados. **E** - Controle Tumorado (0,9 % se solução salina) **F** - Tratado EHA Tumorado (50 µg/mL). **G** - Tratado ME Tumorado (50 µg/mL). **H** - Tratado ω-3 Tumorado.

Em relação ao padrão do desenvolvimento corporal, as medidas realizadas da região cefálica-cervical-caudal demonstraram que não diferença significativa entre os grupos controle e tratados sem tumor. Porém ao se analisar o grupo com tumor, foi evidenciado a interferência entre eles. Contudo, a resposta ao crescimento entre os grupos normais e tumorados. Vale ressaltar que o grupo controle tumoral, teve uma depleção nutricional variando significativa ($p < 0,05$) (Gráfico 3).

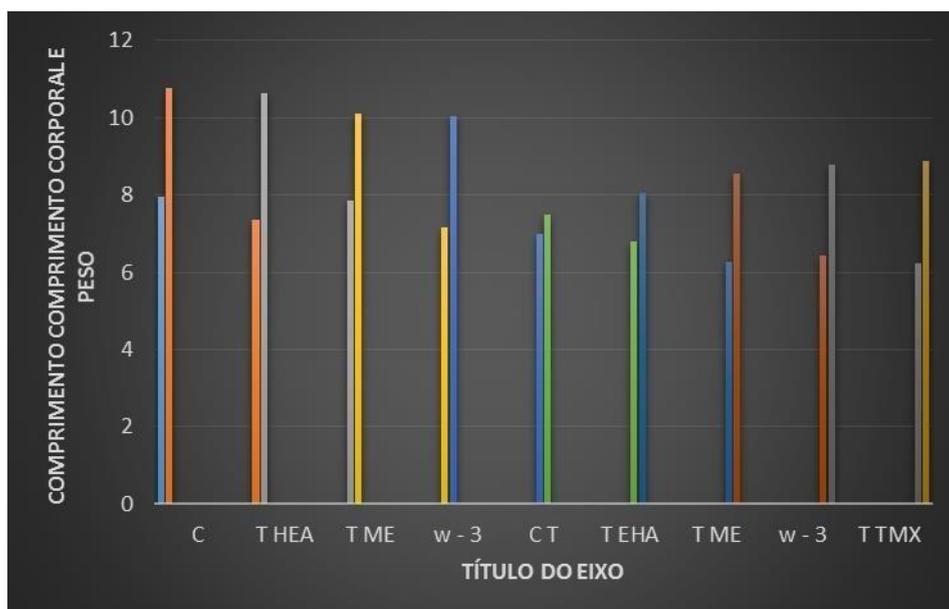


Gráfico 3 – Média (x) e erro padrão (sd) do comprimento corporal total (cefálico-cervical-caudal) (cm) (e do peso (g) dos embriões de *Gallus gallus domesticus* L. com idade de 288 horas dos Grupo Controle (C); Tratado EHA; Tratado ME e Tratado ω -3 Tratados, Controle Tumorado (CT); Tratado EHA Tumorado (TTEHA), Tratado ME Tumorado (TTME), Tradado ω -3 Tumorado (TT ω -3) e Tratado com Metotrexato (10 mg/mL).

Courneya; Friedenreich (1997) referiram que paciente com câncer pode desenvolver uma síndrome metabólica complexa. Ela se caracteriza pela perda progressiva de peso, anorexia, astenia, anemia, náusea crônica, imunossupressão, depressão, diminuição da capacidade aeróbica, fadiga, diminuição da força muscular e flexibilidade, atrofia muscular e acentuada perda de massa muscular. Para Camps et al. (2006) perda de peso está essencialmente relacionada com diminuição da massa muscular, promovendo posteriormente alteração nas funções cardíacas e respiratórias (TISDALE, 2000).

A demanda catabólica e energética é o aumento da quebra de gordura em detrimento da liberação de glicerol e ácidos graxos, em consequência da inibição de lipase proteica e aumento da atividade da lipase hormônio sensível (HLS). Ocorre ainda, a inibição do transporte de glicose para os tecidos e da capacidade de síntese “de novo” de ácido graxo, devido a menor atividade de enzimas chave do processo (acetil-Coa carboxilase e AG sintase) (ARGILÉS; BUSQUETS; LOPES-SORIANO, 2005). Os tratados com extratos EHA e ME parece que atenuou as alterações metabólicas do tumor, como foi evidenciado no grupo tratado com o ω -3, que funcionou como um suplemento.

A anatomia microscópica da medula espinhal dos embriões tratados e controle durante o desenvolvimento embrionário demonstrou que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos normais e tumorados (Figura 5).

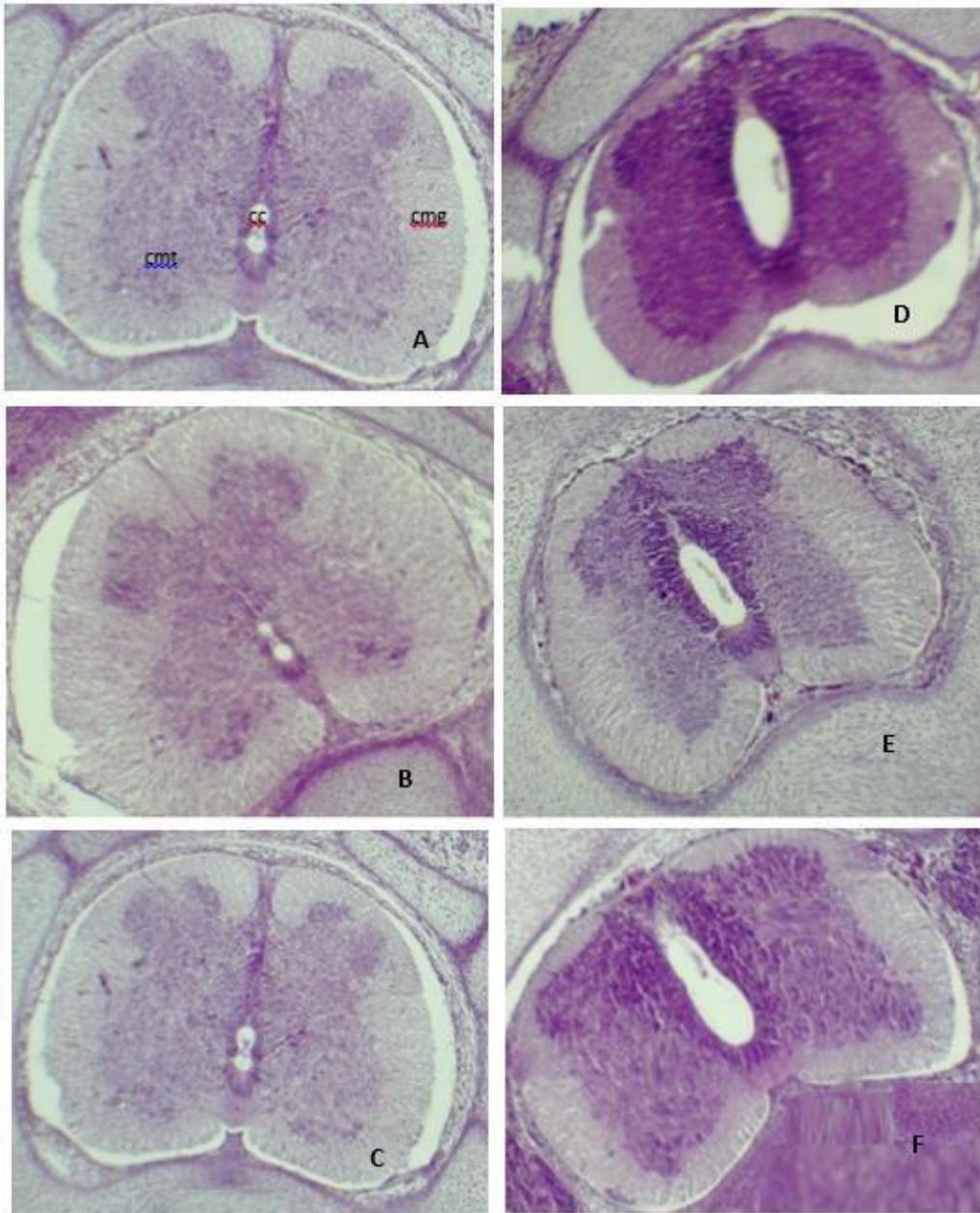


Figura 5 – Fotomicrografia de corte transversal da medula espinhal (me) corado com hematoxilina-eosina (HE) de embrião de *Gallus gallus domesticus* L. com idade 288 horas, evidenciando a camada marginal (cmg); camada do manto (cmt) e canal central (cc). A - Controle Tratado com solução salina (0,9 %). B - Tratado EHA. C - Tratado ME. D - Controle Tumorado (CT). E - Tratado EHA Tumorado (T TEHA). F - Tratado ME Tumorado (T TME). Coloração Hematoxilina-Eosina. 200 x.

O estudo histológico da medula dos grupos investigados mostrou que o tecido se manteve preservada, bem como, os vasos e neurônios. Entretanto, o grupo controle tumorado apresentou discretos pontos hemorrágicos (*) no tecido avaliado (Figura 6).

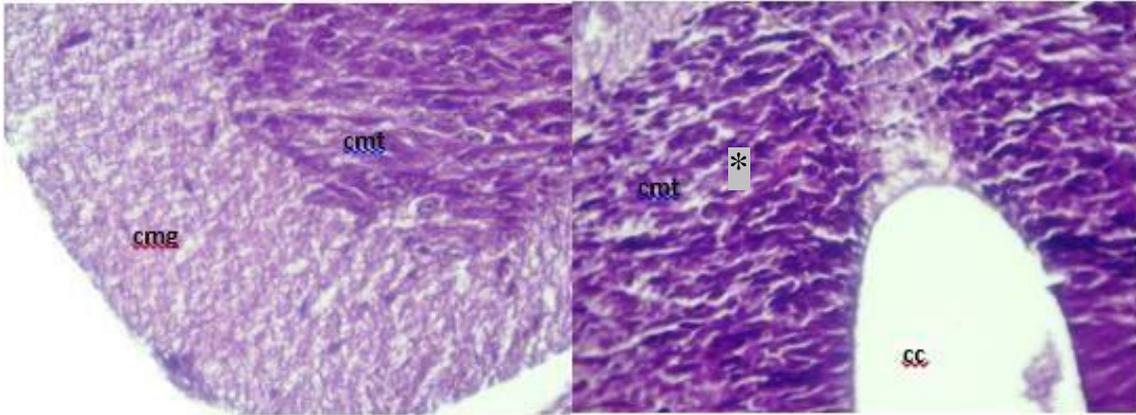


Figura 6 – Fotomicrografia de corte transversal da medula espinhal (me) corado com hematoxilina-eosina (HE) de embrião de *Gallus gallus domesticus* L. com idade 288 horas, do grupo controle tumorado com solução salina (0,9 %), evidenciando a camada marginal (cmg) e do manto (cmt) e canal central (cc) e camada do manto (cmt). Coloração Hematoxilina-Eosina. 400 x.

Os padrões morfométricos da medula e encéfalo dos embriões apresentaram comportamento linear entre os grupos controle e tratado com EHA, ME, ω -3 e metotrexato (Tabela 2, 3 e 4). No entanto o grupo controle tumorado, respondeu de maneira diferenciada.

Tabela 2 – Parâmetros morfométricos do diâmetro, altura e camadas do manto e marginal da medula espinhal de embriões (n= 30 por grupo), de *Gallus gallus domesticus* L., com idade de 288 horas dos Grupos Controle (C); Tratado EHA; Tratado ME e Tratado ω -3 Tratados, Controle Tumorado (CT); Tratado EHA Tumorado (T TEHA), Tratado ME Tumorado (T TME), Tradado ω -3 Tumorado (T T ω -3), Tratado com Metotrexato (10 mg/mL).

GRUPOS	DIÂMETRO (mm)	ERRO PADRÃO	ALTURA (mm)	ERRO PADRÃO	MARGINAL (mm)	ERRO PADRÃO	MANTO (mm)	ERRO PADRÃO
C	9,32	0,01	9,00	0,02	3,10	0,00	1,50	0,00
T EHA	9,13	0,02	8,70	0,05	3,06	0,00	1,78	0,01
T ME	9,20	0,04	8,75	0,01	3,09	0,01	1,84	0,01
T ω -3	9,00	0,01	8,70	0,03	3,10	0,01	1,96	0,01
C T	7,40	0,02	6,30	0,01	1,89	0,03	2,00	0,00
T EHA T	7,80	0,00	7,00	0,00	2,03	0,02	2,13	0,00
T ME T	7,65	0,02	6,80	0,00	1,98	0,02	2,15	0,00
T ω -3 T	7,55	0,01	7,06	0,01	2,00	0,00	2,11	0,00
T MEX T	7,70	0,00	6,89	0,02	2,01	0,02	2,09	0,01

Médias e Erro Padrão ($p \leq 0,05$)

Tabela 3 – Parâmetros morfométricos do diâmetro e altura do canal central espinhal, espaço direito e esquerdo da medula espinhal de embriões (n= 30 por grupo), de *Gallus gallus domesticus* L., com idade de 288 horas mostrado dos Grupos dos Grupos Controle (C); Tratado EHA; Tratado ME e Tratado ω -3 Tratados, Controle Tumorado (CT); Tratado EHA Tumorado (T TEHA), Tratado ME Tumorado (T TME), Tradado ω -3 Tumorado e Tratado com Metotrexato (10 mg/mL) (T T ω -3).

GRUPOS	DIÂMETRO (mm)	ERRO PADRÃO	ALTURA (mm)	ERRO PADRÃO
C	1,94	0,01	3,07	0,01
T EHA	1,93	0,00	2,95	0,01
T ME	1,95	0,00	2,76	0,00
T ω -3	1,90	0,01	2,80	0,00
C T	0,53	0,01	0,90	0,00
T EHA T	0,68	0,01	0,87	0,02
T ME T	0,65	0,02	0,80	0,02
T ω -3	0,67	0,02	0,81	0,00
T MEX	0,66	0,01	0,82	0,01

Médias e Erro Padrão ($p \leq 0,05$)

Tabela 4 – Parâmetros morfométricos do diâmetro da cabeça e diâmetro e altura do encéfalo de embriões (n= 30 por grupo), de *Gallus gallus domesticus* L., com idade de 288 horas mostrados dos Grupos dos Grupos Controle (C); Tratado EHA; Tratado ME e Tratado ω -3 Tratados, Controle Tumorado (CT); Tratado EHA Tumorado (T TEHA), Tratado ME Tumorado (T TME), Tratado ω -3 Tumorado (T T ω 3) e Tratado com Metotrexato (10 mg/mL).

GRUPO	CABEÇA (mm)	ERRO PADRAO	DIAMETRO (mm)	ERRO PADRAO	ALTURA (mm)	ERRO PADRÃO
C	2,17	0,01	0,89	0,01	1,35	0,00
T EHA	2,05	0,00	0,90	0,01	1,30	0,01
T ME	2,14	0,02	0,89	0,00	1,32	0,01
T ω -3	2,08	0,00	0,91	0,00	1,34	0,00
CT	2,13	0,01	0,70	0,00	1,13	0,00
T EHA T	2,20	0,01	0,80	0,02	1,20	0,00
T ME T	2,20	0,01	0,90	0,02	1,27	0,00
T ω -3 T	2,13	0,02	0,89	0,01	1,22	0,00
TMEX	2,10	0,03	0,87	0,02	1,15	0,01

Médias e Desvio Padrão ($p \leq 0,05$).

ACOBSON (1991) comenta que organização do tubo neural ocorre diferente na medula espinhal no encéfalo. No encéfalo, os processos de migração, proliferação, diferenciação e morte celular produzem modificação na formação das camadas distintas, devido a fisiologia das suas diversas regiões. Borgart; Ort (2008) mencionam que durante o desenvolvimento embrionário, a luz central do tubo neural se estreita, permitindo o extenso desenvolvimento do manto e das zonas marginais, evoluindo a canal central. Em relação a formação estrutural do grupo controle tumorado, possivelmente sofreu interferência das células tumorais.

A medula espinhal transporta sinais sensitivos para o Sistema Nervoso Central (KANDEL et al., 2006). Sendo assim, várias moléculas indutoras participam fomentando a diferenciação do tubo neural primitivo, como da notocorda, dos neurônios sensitivos e dos oligodendrócitos na medula espinhal (HIB, 2007).

Klaassen (2003) comenta que os metabólitos de algumas substâncias químicas são responsáveis, por seus efeitos tóxicos. Segundo ele, os efeitos tóxicos sistêmicos dependem da absorção e da distribuição do composto, o que afeta um ou alguns órgãos, sendo o sistema nervoso central (SNC) afetado.

Diante do presente exposto, conclui-se que os compostos em solução presentes nos extratos de *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817) pode ser considerada um potencial agente antitumoral de origem marinha, que talvez atue nos mecanismos intrínsecos relacionados com a matriz extracelular, estabilizando e remodelando a estrutura vascular e a capacidade de indução da neovasculogênese.

Referências

ARGILÉS, J.M.; BUSQUETS, S.; LOPES-SORIANO, F.J. The pivotal role of cytokines in muscle wasting during cancer. *The Int. J. of Biochemistry & Cell Biology*. 37: 2036–2046, 2005.

Wound Healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117, 12S – 34S, 2006.

BROUILLARD, P.; VIKKULA, M. Vascular malformations: localized defects in vascular morphogenesis. *Clin Genet*, v. 63, 340 – 351, 2003.

CAMPS, C., IRANZO, V., BREMNES, R.M., SIRERA, R. Anorexia-cachexia syndrome in cancer: implications of the ubiquitin-proteasome pathway. *Support Care Cancer* 14: 1173-1183, 2006.

CAPP, c., ZENNIG, N., WAJNER, S., MAIA, a. I. Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireoide the role of vascular endothelial growth factor in tumor. *Rev. HCPA* 2009;29(1):51-59.

COURNEYA, K., FRIEDENREICH, C.M. Relationship between exercise pattern across the cancer experience and current quality of life in colorectal cancer survivors. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 3: 215–226, 1997.

GRAÇA, B., LUNET, C., COELHO, A. S., MONTEIRO, G.; FREIRE, P., SPEIDEL, A., CARVALHO, L. ANGIOGÉNESE E CANCRO da biopatologia à terapêutica. Instituto de Anatomia Patológica. Faculdade de Medicina de Coimbra - Coimbra. *ACTA MÉDICA PORTUGUESA* 2004; 17: 76-93.

HIRATSUKA S, NAKAMURA K, IWAI S, MURAKAMI M, ITOH T, KIJIMA H, et al. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell*. 2002;2 (4):289-300.

KOWANETZ, M.; FERRARA, N. Vascular Endothelial Growth Factor Signaling Pathways: Therapeutic Perspective. *Clinical Cancer Research*, 12 (17), 5018 – 5022, 2006.

POLVERINI, P. J. Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of Dental Education*, Washington, v. 66, n. 8, p. 962-975, 2002.

RAVI D, RAMADAS K, MATHEW BS, NALINAKUMARI KR, NAIR MK, PILLAI MR. Angiogenesis during tumor progression in the oral cavity is related to reduce apoptosis and high tumor cell proliferation. *Oral Oncol* 1998; 34(6):543-8.

RODRIGUES, E. B.; ROSSI, E. E.; GRUMANN JUNIOR, A.; MEYER, C. H.; HO, A. C. Tratamento da forma neovascular de degeneração macular relacionada à idade com drogas antangiogênicas. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 5, 756 – 765, 2006.

SAKURAI E, ANAND A, AMBATI BK, VAN ROOIJEN N, AMBATI J. Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(8):3578-85.

SANT'ANA, E. M.C. Estudo do efeito da Alternagina-C, uma desintegrina do veneno de *Bothrops alternatus* e de um peptídeo sintético derivado de sua estrutura, sobre a expressão de fatores de crescimento, angiogênese e cicatrização de lesão em pele de rato. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

SATO, M.; TACHIBANA, T.; FURUSE, M. Heat production and lipid metabolism in broiler and layer chickens during embryonic development. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.143, p.382-388, 2006.

SHIBUYA, M. VEGF-VEGFR Signals in Health and Disease. *Biomolecules and Therapeutics*, Seoul, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2014.

SOUZA GFM, FREITAS RA, MIRANDA JL. Angiogênese em carcinoma de células escamosas de língua e lábio inferior. *Cienc Odontol Bras* 2007;10(1):12-8.

SOUZA, W. F.; ARAÚJO, W. M.; de-FREITAS-JÚNIOR, J. C. M.; MORGADO-DÍAZ, J.A. Sinalização celular em câncer. *Cienc. Cult.* 66 (1), 30 – 33, 2014.

STOCKMANN, C.; SCHADENDORF, D.; KLOSE, R.; HELFRICH, I. The Impact of the Immune System on Tumor: Angiogenesis and Vascular Remodeling. *Frontiers in Oncology*, Lausanne, v. 4, n. p. 69, 2014.

STORKEBAUM E, CARMELIET P. VEGF: a critical player in neurodegeneration. *J Clin Invest.* 2004;113(1):14-8.

TAMMELA, T.; ENHOLM, B.; ALITALO, K. PAAVONEM The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovascular Research*, 65, 550 – 563, 2005.

TAZAWA, H.; WHITTOW, G. C. *Incubation physiology*. In: WHITTOW, G. C. *Sturkie's Avian Physiology*. 2000. Cap. 24, p.617-634.

TISDALE, M.J. Protein loss in cancer cachexia. *Science* 289:2293-2295, 2000.

USUI T, ISHIDA S, YAMASHIRO K, KAJI Y, POULAKI V, MOORE J, et al. VEGF164(165) as the pathological isoform: differential leukocyte and endothelial responses through VEGFR1 and VEGFR2. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(2):36874.

ZETTER, B.R. "Angiogenesis and tumor metastasis". Annual review of medicine. Palo Alto. 49:407-24, 1998.

10. Conclusão



CONCLUSÕES

- O extrato hidroalcoólico de *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817) apresentou atividade estimulante do sistema nervoso central e periférico, mas em alguns momentos foram observados efeitos depressores destes mesmos sistemas;
- Os extratos hidroalcoólico e metanólico de *Caulerpa taxifolia* (Vahl) Agardh (1817) apresentaram atividade antinociceptiva no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético;
- O extrato hidroalcoólico e metanólico de *Caulerpa taxifolia* (Vahl) não interferiu no padrão morfométrico de desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domésticos*;
- Os extratos hidroalcoólico e metanólico de *Caulerpa taxifolia* (Vahl) nas doses de 50 mg/Kg e 100 mg/Kg apresentaram atividade biológica significativa frente as linhages de carcinoma de Erlich e Sarcoma 180;
- O extrato hidroalcoólico e metanólico de *Caulerpa taxifolia* (Vahl) inibiu a vasculogênese e angiogênese durante o desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domésticus*;
- O extrato hidroalcoólico e metanólico de *Caulerpa taxifolia* (Vahl) não alterou o metabolismo durante o desenvolvimento embrionário de *Gallus gallus domésticos*.

Referências



REFERÊNCIAS

- ABAD, M.J.; BERMEJO, P. Baccharis (Compositae): a review update. *Arkivoc*, v.7, p.76-96, 2007.
- AGUILAR-SANTOS, G.J.; CHEM.SOC. C., Chemical studies on three species of marine algal genus *Caulerpa*. In. Froedenthal, H.D. (ed.) Drugs from the sea. **Marine Technology Society**, p. 173-176. 1970.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York : Garland Science, 2002.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, v.28, n.1, p.118129, 2005.
- ALVES, L.G. Polissacarídeo ácidos presentes no folíolo, talo e flutuador da alga marinha sargassum vulgare. 2000. 86f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica – Universidade Federal do Rio Grande do Norte- UFRN, NATAL, 2000.
- AMADE, P.; LEMÉE, R. Chemical defence of the mediterranean alga *Caulerpa taxifolia*: variations in caulerpenyne production. *Aquatic Toxicology* v.43, p.287-300. 1998.
- AMDUR, M. O.; DOULL, J.; KLASSEN, C. D. Casarett and Doull's, **Toxicology: The Basis Science of Poisons**. 6ª Edition. New York. In Macmillan Publishing. 2001.
- AMICO, G.C., RODRÍGUEZ-CABAL, MA. and AIZEN, MA., 2009. The potential key seed-dispersing role of the arboreal marsupial *Dromiciops gliroides*. *Acta Oecologica*, vol. 35, p. 8-13.
- ANDRADE S.F.; LEMOS M.; COMUNELLO E.; NOLDIN V.F.; CECHINEL-FILHO V.; NIERO R. 2007. Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models. *J. Ethnopharmacol* 113: 252-257.
- AQUINO, R.S.; LANDEIRA-FERNANDEZ, A.M.; VALENTE, A.P.; ANDRADE, L.R. ; MOURÃO,P.A.S. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implicatios. *Glycobiology*, v.15, p.11-20, 2005.
- ARGILÉS, J.M.; BUSQUETS, S.; LOPES-SORIANO, F.J. The pivotal role of cytokines in muscle wasting during cancer. *The Int. J. of Biochemistry & Cell Biology*. 37: 2036– 2046, 2005.

ARTEEL, G.E., SIES, H., 2001. The biochemistry of selenium and glutathione system.

Environ Toxicol Pharmacol. 10: 153–8.

BALUNAS, M.J.; SU,B.; BRWGGEMUR, R.W.; KINGHAM, A.P.Natural product as aromatase inhibilors, anticancer agents med chem,v.8,n.6 p. 646-682. 2008.

BEÇAK, W.; PAULETE,J. **Técnicas de citologia e histologia**. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro. p. 230,1976.

BELSHER, T. & MEINESZ, A. Deep-water dispersal of the tropical alga *Caulerpa taxifolia* introduced into the Mediterranean. **Aquatic Botany** 51, 163p, 1995.

BEZERRA D P, CASTRO FO, ALVES AP, PESSOA AC, MORAES MO, SILVEIRA ER, LIMA, MA, ELMIRO FJ, ALENCAR NM, MESQUITA RO, LIMA MW, COSTA-LOTUFO LV. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. *Journal of Applied Toxicology*. 2008; 28(2):156-63.

BEZERRA DP, MARINHO-FILHO, FD, ALVES AP, PESSOA C, MORAES MO, PESSOA OD, TORRES MC, TORRES MC, SILVEIRA ER, VIANA FA, COSTA-LOTUFO LV. Antitumor activity of the essential oil from the leaves of *Croton regelianus* and its component ascaridole. *Chemistry & Biodiverity*.2009; 6(8):1224-31.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. Introdução as Algas do Brasil. Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 49-60, v. 1, 2010.

BLUNT, J.W.; COOP, B. R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Nat Prod. Rep**, v.22, p. 15-61. 2005.

BELLAIRS, R.; OSMOND, M. The Atlas of Chick Development. 2. ed. San Diego: Elsevier, 2005.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. Introdução as Algas do Brasil. Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 49-60, v. 1, 2010.

BOYD, M.; PAULL, K. Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Development Research*, v. 34, p. 91-109, 1995.

BRANDÃO, H.N.; DAVID,J.P.; COUTO,R.D.; NASCIMENTO, J.A.P. DAVID,J.M.

Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*, v.33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine Natural products. *Nat. Prod. Rep.*, v. 29, p. 144–222, 2012.

BLUNT, J.W.; COOP, B. R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Nat Prod. Rep.**, v.23, p. 26-78. 2006.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the qualification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, v.7, p.248-254. 1976.

BROUILLARD, P.; VIKKULA, M. Vascular malformations: localized defects in vascular morphogenesis. *Clin Genet*, v. 63, 340 – 351, 2003.

CAIRNS, J. The origin of human cancers. *Nature*, v.289, n.5796, p.353-357, 1981.

CALUX, N. M. DE C. T.; RIBALTA, J. C. L.; STÁVALE, J. N.; FOCCHI, J.; BARACAT, E. C.; DE LIMA, G. R. Angiogenesis in squamous cervical neoplasia: comparative study of two endothelial cells. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v.23, n.5, p.313-319, 2001.

CAMPS, C., IRANZO, V., BREMNES, R.M., SIRERA, R. Anorexia-cachexia syndrome in cancer: implications of the ubiquitin-proteasome pathway. *Support Care Cancer* 14: 1173-1183, 2006.

CAPP, C., ZENNIG, N., WAJNER, S., MAIA, A. I. Papel do fator de crescimento endotelial vascular nos carcinomas de tireoide the role of vascular endothelial growth factor in tumor. *Rev. HCPA* 2009;29(1):51-59.

CARDOZO, K. H. M. GURATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R. TONON, A. P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A.O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 146, p. 60–78, 2007.

CARMELIET, P.; RAKESH, K. J. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, v.407, p.249-257, 2000.

CHOW T.Y., ALAOUJ-JAMALI M., YEH C., YUEN L., GRILLER D. (2004) The DNA double-stranded break repair protein endo-exonuclease as a therapeutic target for cancer. *Mol Cancer Ther* 3, 911-919.

COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; ALVES, A.P.N.N.; MADEIRA, S. V.F.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O.A. Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudo no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Revista Virtual Química*, v.2,n.1,p.47-58,2010.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. Neuropathic pain: a maladaptative response of the nervous system to damage. *Annual Review of Neuroscience*, vol 32, p.1-32, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1830, n.6, p.3670-3695, 2013.

COURNEYA, K., FRIEDENREICH, C.M. Relationship between exercise pattern across the cancer experience and current quality of life in colorectal cancer survivors. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 3: 215–226, 1997.

COUTO VM, VILELA FC, DIAS DF, SANTOS MH, SONCINI R, NASCIMENTO CG, GIUSTI-PAIVA A. Antinociceptive effect of extract of *Emilia sonchifolia* in mice. *J Ethnopharmacol* 134(2): 348 – 353, 2011.

DALE, M.M.; RANG, H.P.; RITTER, J.M.;FLOWER,R.J. **Farmacologia**, 6º edição: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p.829.

DENISOV, E.; DENISOVA, T. (2009). The Reactivity of Natural Phenols. *Russ. Chem. Rev.*, Vol. 78, No. 11, 1047-1073.

DERE, K.; SEN, H.; TEKSOZ, E. et al. The comparison of the effects of different doses of levobupivacaine infiltration on wound healing. *J Invest Surg*, 2009; v22, p.112-116.

DEWITT, J. C.; MEYER, E. B.; HENSHEL, D. S. Environmental toxicity studies using chickens as surrogates for wildlife: effects of injection day. *Archives of environmental contamination and toxicology*, v. 48, n. 2, p. 270–7, 2005.

DIALLO, D. et.al. Polysaccharides from the roots of *Entata africana* Guill. Et Perr Mimosaceae, with complement fixing activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.74, p.159-171, 2001.

DI STASI L.C: *Plantas medicinais: arte e ciência*. Edited by Unesp. São Paulo, 1996,pp.129-56.

DOI, T.; PURI, P.; MCCANN, A.; BANNIGAN, J.; THOMPSON, J. Epigenetic effect of cadmium on global de novo DNA hypomethylation in the cadmium-induced ventral body wall defect (VBWD) in the chick model. *Toxicological Sciences*, v. 120, n. 2, p. 475–480, 2011.

DUARTE IDG, FERREIRA-ALVES DL, NAKAMURA-CRAIG M. Possible participation of endogenous opioid peptides on the mechanism involved in analgesia by vouacapan. *Life Sci*. 1992; 50:891-7.

DREWES, C. C., DIAS, R.Y.S., HEBEDA, C.B., SIMONS, S.M., BARRETO, S.A., FERREIRA JUNIOR, J.M., CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M., FARSKY, S.H.P. (2012) Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. *Toxicon* 60, 333–340.

FENICAL W, PAUL VJ. Antimicrobial and cytotoxic terpenoids from tropical green algae of the family Udoteaceae. *Hydrobiologia* 116/117, p135-170,1984.

FENICAL, W.; PAUL,V; *Hydrobiologia*,v. ,n. p.116-135.1984.

FEINBERG, A.P.; OHLSSON, R.; HENIKOFF, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature Reviews Genetics*, v.7, n.1, p.21-33, 2006.

FERRI, P.H. **Química de produtos naturais: métodos gerais.** In: DI STASI, L.C. *Plantas medicinais: arte e ciência.* São Paulo: Editora da Unesp; 1996. p. 129-56.

FERRI, P.H. *Química de produtos naturais: métodos gerais.* In: DI STASI, L.C. *Plantas medicinais: arte e ciência.* São Paulo: Editora da Unesp; p.129-56. 1996.

FISCHEL, J.L.; LEMEE, R.; FORMENTO, P.; CALDANI, C.; MOLL, J.L.; PESANDO, D.; MEINESZ, A.; GRELIER, P.; PIETRA, P.; GUERRIERO, A. Cell growth inhibitory effects of caulerpenyne, a sesquiterpenoid from the marine algae *Caulerpa taxifolia*. Centre Antoine Lacassagne, Nice, France. *Rev. Europe PubMed Central*.1995.

GERAN R.I, GREENBERG N.H, MCDONALD M.M, SCHUMACHER A.M, ABBOT B.J. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemoth.*1972; 33(1):1-103.

GHOSH, P.; ADHIKARI, U., GHOSH, P.K., PUJOL, C.A., CARLUCCI, M.J., DAMONTE, E.B.; RAY, B. (2004). *In vitro* anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. *Phytochem.* 65 (23): 3151-3157.

GILBERT, S. F. *Biologia do Desenvolvimento.* 5. ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2003.

GILMAN, A.G. et al. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 12° ed. Rio de Janeiro, 2012.

GHOSH, T.; PETERSON, B.; TOMASEVIC, N.; PECULIS, B.A. Xenopus U8 sno RNA binding protein is a conserved nuclear decapping enzyme. *Mol Cell.* v.13, n.6, p.817828, mar.2004.

GLASBY T.M.; CONNELL S.D.;HOLLOWAY,M.G. HEWITT,C.L. Nonindigenous on artificial structures: could habitat creation facilitate biological invasion. *Mar Biol*, n.151, p.887-895, 2007.

GOLAN,D.E. et al. *Princípios de Farmacologia: A Base Fisiológica da Farmacoterapia.* 2° edição: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012, p.952.

GONZAGA M.L, BEZERRA D.P, ALVES A.P. In vivo growth of Sarcoma 180 by alpha-(14)- glucan(16)- glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murrill. *J.Nat.Med.* 2009; 63(1):32-40.

GOODMAN L.S, GILMAN A.G. *As bases farmacológicas da terapêutica.* edited by Guanabara, Rio de Janeiro, RJ: McGrawHill, 2012,pp.85-123.

GONZAGA, M. et al. In vivo growth of Sarcoma 180 by alpha-(14)- glucan(16)- glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murrill. *J.Nat.Med.*, v.63, p.32-40,2009.

GRAÇA, B., LUNET, C., COELHO, A. S., MONTEIRO, G.; FREIRE, P., SPEIDEL, A., CARVALHO, L. ANGIOGÉNESE E CANCRO da biopatologia à terapêutica. Instituto de Anatomia Patológica. Faculdade de Medicina de Coimbra - Coimbra. ACTA MÉDICA PORTUGUESA 2004; 17: 76-93.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, v.140, n.6, p.883-899, 2010.

GUERRA M.R.; GALLO C.V.M.; MENDONÇA G. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.51, n.3, p. 227-234, 2005.

HAMILTON, H; HAMBURGER, V. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, v.88, p.49-92, 1951.

HARBONE, J.B. *Phytochemical methods*. 3 ed., London: Chapman & Hall, p.228, 1998.

HAROUN-BOUHEDJA, F.; MOSTAFA, E. SINQUIN, C. BOISSON-VIDAL, C. Relation between sulfate group and biological activities of fucans. *Thromb. Res.* V.100, p.453-459. 2000.

HAY M.E, FENICAL W. Marine plant-herbivore interactions. The ecology of Chemical defense. *Ecol. Syst*, 1988; 19(1):111-45.

HIRATSUKA S, NAKAMURA K, IWAI S, MURAKAMI M, ITOH T, KIJIMA H, et al. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell*. 2002;2 (4):289-300.

HILDEBRANDT, E., BOYKIN, D., KUMAR, A., TIDWELL, R.R., DYKSTRA, C.C. (1998) Identification and characterization of an endo/exonuclease in *Pneumocystis carinii* that is inhibited by dicationic diarylfurans with efficacy against *Pneumocystis pneumonia*. *J Eukaryot Microbiol* 45, 112-121.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P. J.; Lee, C. C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*, v. 42, n.4, p.377-387, 2007.

HAYASE, F.; KATO, H. Antioxidative components of sweet potatoes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, v.30, p.37-46, 1984.

HAYM.E; FENICAL.W, 1988; Marine plant-herbivore interactions. The ecology of Chemical defense, *Ann. Ver. Ecol. Syst.* n° 19, pp. 111-145.

HAY, M.E.; FENICAL, W. Marine plant-herbivore interactions. The ecology of Chemical defense. **Ann. Rev. Ecol. Syst**, v.19,n.1, p. 111-145, 1988.

INCA – Instituto Nacional de Cancer, Rio de Janeiro, 2012, 2ª edição revista e atualizada. Disponível em:<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/ABC_do_cancer_2ed.pdf>.

Acesso em: 10 de maio de 2014.

INCA – Instituto Nacional de Cancer. Disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_mi_nisterio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014>.Rio de Janeiro, acesso em 11 de maio de 2013.

INCA. Estatísticas do Câncer. Vigilância do Câncer e de Fatores de Risco. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>>. Acesso em: 20 de maio de 2014.

INCA. Fisiopatologia do câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf>> .Acesso em: 16 de junho de 2014.

INCA – Instituto Nacional de Cancer, Rio de Janeiro, 2012, 2ª edição revista e atualizada. Disponível em:<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/ABC_do_cancer_2ed.pdf>. Acesso em: 10 de maio de 2014.

INCA. Fisiopatologia do câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf>> .Acesso em: 16 de junho de 2014.

JAHNKE, L. S., WHITE, A. L. Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *J. Plant Physiol.*, v.160: p.1193-1202.2003.

JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, MURRAY T, XU J, THUN MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.*2007; 57(1):39-43.

JEMAL, A.; et al. Cancer statistics, 2007. **CA Cancer J Clin** v.57, p.43, 2007.

JOLY, A.B. Botânica: introdução a taxonomia vegetal. 13ª edição, São Paulo companhia editora Nacional, volume 4, 420-428p.2005.

JOLY, C. A. et al. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista USP**, n. 89, p. 114-133, 2011.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 143:203210, 2001.

KAHARAMAN, A., ERKASAP, N., KOKEN, T., SERTESER, M., AKTEPE, F., ERKASAP, S., 2003. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanolinduced gastric lesions. *Toxicology* 183, 133–142.

KAMER, K., FONG, P. A fluctuating salinity regime mitigates the negative effects of reduced salinity on the estuarine macroalga, *Enteromorpha intestinalis* (L.) link. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* v254, p.53-69. 2000.

KARBER, G.; BEHRENS, B. *Estatistical Methods in Biological Assays*. London: Ed. Griffin Ch. And C., 1964.

KATHIRAVEN, T.; SUNDARAMANICKAM, A.; SHANMUGAM,N.; BALASUBRAMANIAN,T. Green synthesis of silver nanoparticles using marine algae *Caulerpa racemosa* and their antibacterial activity against some human pathogens, 2015; v5, p.499–504.

KOBAYASHI, J., KATO, A., Ota1, Y., Ohba1, R., Komatsu, K. (2010) Bisbenzamidine derivative, pentamidine represses DNA damage response through inhibition of histone H2A acetylation. *Molecular Cancer* 9:34.

KOMIYAMA, K. & FUNAYAMA, S. Antitumor agents. In: OMURA, S. (edt). *The search for bioactive compounds from microorganisms*. New York: Spriger-Verlag, 1992. p. 79-97.

KOSTER, R; ANDERSON, M.; BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceedings*, v.18, p. 412-21, 1959.

KUMAR, V.; ABBAS, ABUL, K.; FAUSTO, N. ROBBINS & COTRAN. *Patologia – Bases Patológicas das Doenças*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

KWEON, D. K. et al. Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and application as wound healing accelerator. *Biomaterials*, v.24, n.9, p.1595-1601, 2003.

KOWANETZ, M.; FERRARA, N. Vascular Endothelial Growth Factor Signaling Pathways: Therapeutic Perspective. *Clinical Cancer Research*, 12 (17), 5018 – 5022, 2006.

LEE O.O.; YANG L.H.; LI X.; PAWLIK J.R.; QIAN P-Y. Surface bacterial community, fatty acid profile, and antifouling activity of two congeneric sponges from Hong Kong and the Bahamas. *Marine Ecology Progress Series* v.33 n.9: p.25-40, 2007.

LIEBER, C.S. Metabolism of alcohol. *Clinics in Liver Disease* 9:1–35, 2005.

LIMA, A. P.; PEREIRA, F. C.; VILANOVA-COSTA, C. A. S. T.; RIBEIRO, A. S. B. B.; SILVEIRA-LACERDA, E. P. Avaliação da atividade antitumoral e citotóxica da planta *Siolmatra brasiliensis* *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.3, n.2, p.10-12, 2006.

LINLEY, J. E.; ROSE, K.; OOI, L.; GAMPER, N. Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. *European Journal Physiology*, vol 459, p.657-669, 2010.

LING,R. Foto tirada em 2011:Caulerpa taxifolia Disponível em: <WWW.rling.com> acessado em : 20 julho 2014.

- LINS K.O.; BEZERRA D.P.; ALVES A.P.; ALENCAR N.M.;LIMA M.W.; TORRES V.M.; PESSOA C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO L.V. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). *Jornal of Applied Toxicology*.2009;29(1):20-6.
- LIU, Y.; LIU, C.; TAN, H.; ZHAO, T.; CAO, J. WANG, F. Sulfation of a polysaccharide obtained from *Phellinus ribis* and potential biological activities of the sulfated derivatives. *Carbohydrate polymers*, v. 77, p. 370-375, 2009.
- LONGEPIERRE, S., ROBERT, A., LEVI, F., FRANCOUR, P., 2005. How an invasive alga species (*Caulerpa taxifolia*) induces changes in foraging strategies of the benthivorous fish *Mullus surmuletus* in coastal Mediterranean ecosystems. **Biodiv. Conserv.**14, 2005. P.365–376.
- MAGALHÃES, F. I. E. Atividade Antitumoral (in vitro e in vivo) das fisalinas B e D isoladas da *Physalis angulata* LIN. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Ceará, 2005.
- MAGALHÃES H.I.; FERREIRA P.M.; MOURA E.S.; TORROES M.R.; ALVES A.P.; PESSO O.D.; COSTA-LOTUFO L.V.; MORAES, M.O.; PESSOA.C. In vitro and in vivo antiproliferative activity of *Calotropis procera* stem extracts. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2010; 82(2):407-16.
- MAITI, B.C.; THAMSON, R.H.; MAHENDRAN M.1978.The structure of caulerpina, a pigment from *Caulerpa* algae. *J. Chem.Res. (S)* 1978: 126-127.
- MALONE, M. H. **Natural Products & Plants Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activit.**1977.
- MARTINS,E.R.;CASTRO,D.M.;CASTELLANI,D.C.;DIAS,J.E. **Plantas medicinais**, Viçosa,MG:UFV,1994.p.220.
- MATOS F.J.A.; OLIVEIRA F. *Lippia sidoides* Cham. *Rev. Bras. Farmacognosia*. 1998;79(1):84-87.
- MATSUKAWA,R.; DUBINSKY,Z.; KISHIMOTO,E.; MASAKKI,K.; MASUDA,Y.; TAKEUCHI,T.A. Comparison of screening methods for antioxidants activity in seaweeds. *J. appl.Phycol*, v. 9, p.29-35,1997.
- MATSUBARA, K.; MATSUURA, Y.; BASIC, A.; LIAO, M.L.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. (2001). Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. *Biol. Macrom.* 28(5): 395-399.

MEINESZ, A., COTTALORDA, J. M., CHIAVERINI, D., BRAUN, M. et al. Survi de l' invasion de l' algue tropicale *Caulerpa taxifolia* devant lês cotes françaises de la Méditerranée. Situation au 31 décembre 1996. Lab. Environ. Mar. Lit., Université de Nice-Sophia Antipolis, France. 1997.

MELO, J. G.; SANTOS, A. G.; AMORIM, E. L. C.; NASCIMENTO, S. C. D.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v.2011, article ID 365359, p.14, 2011.

MITSUMA, H., YAMAMOTO, A., AND KUSANO, T. (1967). Agric. biol. chem. 31, 115-118.

MODOLIN, M.; BEVILACQUA, R. G. Cicatrização de feridas. Síntese das aquisições recentes. Rev Bras de Clín e Terap, v.14, p.208-13, 1985.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. Embriologia Clínica. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015

MORETTIN, L. G. **Estatística Básica: Probabilidade e Inferência.** n.1. v.1. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2010. p.376.

MOURA C.A.; SILVA E.V.; CAVALCANTI K.P.S.; ANJOS F.B.R.; JIMENEZ G.C.; OLIVEIRA S.F.; SOUZA I.A. Perfil Fitoquímico da Macroalgas Marinha *Caulerpa taxifolia* (VAHL) C. AGARDH, 1817 (caulerpaceae) Congresso Brasileiro de Oceanografia, Rio de Janeiro, Nov. 2012.

MOURA, C.A. et al. **Perfil Fitoquímico da Macroalgas Marinha *Caulerpa taxifolia* (VAHL) C. AGARDH, 1817 (caulerpaceae)** Congresso Brasileiro de Oceanografia, Rio de Janeiro, Novembro 2012.

MOURA, C.A. ; SILVA, E. V. ; CAVALCANTI, K.P.S. ; ANJOS, F. B. R. ; JIMENEZ, G. C.; OLIVEIRA, S.F. ; SOUZA, I.A. Perfil Fitoquímico da Macroalga Marinha *Caulerpa taxifolia* (M. VAHL) C. AGARDH, 1817 (CAULERPACEAE). In: Congresso Brasileiro de Oceanografia, 2012, Rio de Janeiro. Congresso Brasileiro de Oceanografia. Rio de Janeiro: UERJ, 2012. v.)1. p. 01-01.

MOZZACHIODI, R. et al. (2001) *Caulerpenyne*, a toxin from the seaweed *Caulerpa taxifolia*, depresses after polarization in invertebrate neurons Neuroscience. 107, 519-526.

MORETTIN L.G. **Estatística Básica: Probabilidade e Inferência.** São Paulo: Pearson Prentice Hall. 2010; 1(1): pp1-376.

NATALI, A. L. C. **Ação inotrópica positiva do extrato metanólico de *Bryopsis pennata* (CHLOROPHYTA CAULERPACES).** Dissertação (Mestrado em Biociência) Universidade de São Paulo. 2007.

NASH, A.D.; BACA, M.; WRIGHT, C.; SCOTNEY, P.C. The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B). *Pulm Pharmacol Ther.* 2006; 19 (1): 61-9.

NAPRALERT. Disponível em: <www.napralert.org> Acesso em: 12 agosto de 2014.

NAVARRO, V.J.; SENIOR, J.R.; Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2006; 354:731-9.

NEGRI, M.L.S.; POSSAMAI, J.C.; KAKASHIMA, T. atividade antioxidante das folhas de espinheira –santa- *Mayteunus ilicifolia* Mart. Ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. *Rev. bras. farm.* 19(2B):553-556, Abr.jun.2009.

OLIVEIRA, E.C. The seaweed resources of Brazil. In: CRITCHLEY, A.T.; OHNO, M., eds. *Seaweed resources of the world*. Yokosuka: Japan International Cooperation Agency, 1998. p.367-371.

OLIVEIRA JÚNIOR, R.J. Análises citogenéticas e expressão da telomerase em **Sarcoma 180**. 2008. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, MG. 2008

OLIVEIRA J.S.; COSTA-LOTUFO L.V.; BEZERRA D.P.; ALENCAR N.M.; MARINHO-FILHO J.D.; FIGUEIREDO I.S.; MORAES M.O.; PESSOA C.; ALVES A.P.; RAMOS M.V. In vivo growth inhibition of Sarcoma 180 by latex proteins from *Calotropis procera*. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2010; 382(2):139-49.

ORLANDO, S.C. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Caville (Barbatimão) [dissertação]. Franca (SP): Universidade de Franca; 2005.

ORGANIZATION UNITED NATIONS, 1994, *Official Statistics: Principles and Practices, Organization and Management*. Disponível em: <<http://unstats.un.org/unsd/methods/statorg/default.htm>>. acesso em: 23 Dez. 2013.

PAUL VJ, FENICAL W. Chemical defense in tropical green algae, order Cauleriales.

Marine Ecology Progress Series 34: (1986) 157-169.

PATTEN, B. M. *Early embryology of the chick*. 5. ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 1971.

PERCIVAL, E.; MACDOWELL, R.H. *Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides*. New York: Academic Press, 1967.

PEREIRA, L. A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds. In: *Seaweed: Ecology Nutrient Composition of Selected Edible Seaweeds*. Nova Science Publishers, Inc, v. 2 p. 15-47, 2011.

PESANDO D, LEMEE R, FERRUA C, AMADE P, GIRARD JP (1996) Effects of caulerpenyne, the major toxin from *Caulerpa taxifolia* on mechanisms related to sea urchin egg cleavage. **Aquat Toxicol** 35:139-155.

POLVERINI, P. J. Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of Dental Education*, Washington, v. 66, n. 8, p. 962-975, 2002.

PINHEIRO B, SILVA A, SOUZA G, FIGUEIREDO J, CUNHA F, LAHLOU S, DA SILVA JK, MAIA JG, SOUSA PJ. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. *J Ethnopharmacol* 188: 479–486, 2011.

PINTEUS, SUSETE FILIPA GONÇALVES. Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana em algas da costa de Peniche (Portugal): identificação de compostos bioactivos com elevado potencial biotecnológico. Dissertação (Mestrado em Biologia de Recursos Marinhos). Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria, 2011.

PLATE, K. H.; BREIER, G.; MILLAUER, B.; ULLRICH, A.; RISAU, W. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Research*, v.53, n.23, p.5822-5827, 1993.

PINTO, A. C.; SIQUEIRA, S. D. H.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. *Química Nova*, v.25, n.1, p.4561, 2002.

POLVERINI, P. J. Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of Dental Education*, Washington, v. 66, n. 8, p. 962-975, 2002.

PRATHEESHKUMAR, P.; BUDHRAJA, A.; SON, Y. O.; WANG, X.; ZHANG, Z.; DING, S.; WANG, L.; HITRON, A.; LEE, J. C.; XU, M.; CHEN, G.; LUO, J.; SHI, X. Quercetin Inhibits Angiogenesis Mediated Human Prostate Tumor Growth by Targeting VEGFR-2 Regulated AKT/mTOR/P70S6K Signaling Pathways. *PloS one*, San Francisco, v. 7, n. 10, p. e47516, 2012.

- RAMARATHNAM, N. OSAWA, T.; NAMIKI, M.; TASHIRO, T. Studies on the relationship between antioxidative activity of Rice hull and germination ability of rice seeds. *J. Sci. Food Agric.*, v. 37, p.719-726, 1986.
- RAMARATHNAM, N. OSAWA, T. OCHI, H. KAWAKISHI, S. The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends Food Sci. Technol.*, v.6, p.75-82, 1995.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. *Farmacologia*. Elsevier, 5. ed, p. 434-449, 2004.
- RAO, A.S., RAO, M.U. Interaction of salinity and photon flux density on the growth of six marine algae. *Seaweed Resour. Util.* v.21, p.41-47, 1999.
- RAO, Y.K.; FANG, SHIH-HUA; TZENG, YEW-MIN. Antiinflammatory activities of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima*. *Journal of Ethnopharmacology* v.100, p. 249–253. 2005.
- RAVEN P.H., EVERT R.F.; EICHHORN S.E. 2007. *Biologia Vegetal*. 7ª ed. Guanabara Koogan, RJ.
- RAVID, RAMADAS K, MATHEW BS, NALINAKUMARI KR, NAIR MK, PILLAI MR. Angiogenesis during tumor progression in the oral cavity is related to reduce apoptosis and high tumor cell proliferation. *Oral Oncol* 1998; 34(6):543-8.
- RAYMUNDO, M.S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante in vitro de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 40, p. 495-503, 2004. 60.
- RUCH, R.J., CHENG, S.J., AND KLAUNIG, J.E. (1989) Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10, pp. 1003-1008.
- RODRIGUES, J.A.G.; FARIAS, W.R.L. (2005). Extração, fracionamento, purificação e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (Caulerpaceae, Chlorophyta). In: Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca (pp. 1693-1701). Fortaleza: CD-Room do CONBEP, 14.
- REN, X, YANG, L, LIU, J, SU, D, YOU, D, LIU, C., 2001. A novel glutathione peroxidase mimic with antioxidant activity. *Arch Biochem Biophys.*, 25: 250.
- REVIERS, B. de. 2006. *Biologia e Filogenia das Algas*. 1ª ed. Editora Artmed, Porto Alegre.
- REITMAN, S. FRANKEL, S. *Am.J.clin. Path.* 1957, p. 28-56
- ROBBINS S.L.; ANGELL M.; KUMAR V. *Patologia básica*, Editora da Universidade de São Paulo. 1984 Nov; 16(1):577-625.

ROBBINS S.L.; COTRAN R.S. Patologia: Bases – Patológicas das doenças, ed.Elsevier,Rio de Janeiro, 2000, 7:1592.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUZA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade Antioxidante de frutas do cerrado. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v.27, n.1, p.53-60, jan.-mar., 2007.

RODRIGUES, E. B.; ROSSI, E. E.; GRUMANN JUNIOR, A.; MEYER, C. H.; HO, A. C. Tratamento da forma neovascular de degeneração macular relacionada à idade com drogas antiangiogênicas. Arquivos Brasileiros de Oftalmologia 5, 756 – 765, 2006.

RODRIGUES, J.A.G.; SOUZA JUNIOR, J.; LOURENÇO, J.A.; LIMA, P.C.W.C.; FARIAS, W.R.L. Cultivation of shrimps treated with sulfated polysaccharides of *Halymenia pseudofloresia* rhodophyceae through a prophylactic strategy. Rev. ciencia Agrônômica, v.40, n.1 p.71-78, jan-mar, 2009.

ROPELATTO, J. – Estrutura química e atividade antitumoral de heteroramnanas sulfatadas e seus produtos de degradação parcial obtidos da macroalga verde *Gayralia oxysperma*. UFPA, Curitiba, 2011.

RIBEIRO, N. A.; ABREU, T. M.; CHAVES, H. V.; BEZERRA, M. M.; MONTEIRO, H. S. A.; JORGE, R. J. B.; BENEVIDES, N. M. B. Sulfated polysaccharides isolated from the green seaweed *Caulerpa racemosa* plays antinociceptive and anti-inflammatory activities in a way dependent on HO-1 pathway activation. Inflammation Research, 2014.

RODRIGUES, J.A.G.; FARIAS, W.R.L. Extração, fracionamento, purificação e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (*Caulerpales*, Chlorophyta). In: Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca (PP.1693-1701). Fortaleza: CD-Room do CONBEP,14. 2005.

ROUHI, A. M.; WASHINGTON, C. Rediscovering natural products. Chemical & Engineering News, v.81, n.41, p.77-91, 2003.

SAKURAI E, ANAND A, AMBATI BK, VAN ROOIJEN N, AMBATI J. Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003;44(8):3578-85.

SANT'ANA, E. M.C. Estudo do efeito da Alternagina-C, uma desintegrina do veneno de *Bothrops alternatus* e de um peptídeo sintético derivado de sua estrutura, sobre a expressão de fatores de crescimento, angiogênese e cicatrização de lesão em pele de rato. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

SARDESAI, V.M. Nutritional role of polyunsaturated fatty acids. **J Nutr Biochem** 3: (1992) 154-166.

SATO, M.; TACHIBANA, T.; FURUSE, M. Heat production and lipid metabolism in broiler and layer chickens during embryonic development. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.143, p.382-388, 2006.

SCHWEDE, J.G, CARDELLINA, II J.H., GRODE, S.H, JAMES Jr., T.R, BLACKMAN, A. J. 1987. Distribution of the pigment caulerpin in species of the green alga *Caulerpa*. *Phytochem.* 26: 155-158.

SEGUNDO, A.S.et al. Influência do aloe vera e própolis na contração de feridas em dorso de ratos. *Periodontia*, v.17, n.1, p.5-10,2007.

SHIBUYA, M. VEGF-VEGFR Signals in Health and Disease. *Biomolecules and Therapeutics*, Seoul, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2014.

SILVA, A. E. R. et al. **Levantamento bibliográfico de antineoplásicos padronizados no Hospital da Mulher – Prof.Dr.José Aristodemo Pinotti (CAISM) UNICAMP** In: Congresso dos Profissionais das Universidades de São Paulo,São Paulo:USP, Unicamp e Unesp, 2011.

SILVA A.E.R.; FIORI A.T.M.; MATSUMOTO C., CRUZ A.; SILVA N.M.O.; BERNARDES A.C.A.; CARVALHO R.P.; MAZZOLA P.G. Levantamento bibliográfico de antineoplásicos padronizados no Hospital da Mulher – Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti (CAISM) UNICAMP In: Congresso dos Profissionais das Universidades de São Paulo, São Paulo: USP, Unicamp e Unesp, 2011.

SOUZA G.F.M.; FREITAS R.A.; MIRANDA J.L. Angiogênese em carcinoma de células escamosas de língua e lábio inferior. *Cienc Odontol Bras* 2007;10(1):12-8.

SOUZA, W. F.; ARAÚJO, W. M.; de-FREITAS-JÚNIOR, J. C. M.; MORGADO-DÍAZ, J.A. Sinalização celular em câncer. *Cienc. Cult.* 66 (1), 30 – 33, 2014.

.SOLE-CAVA, A.M.; KELECOM, A. Dialogo quimico dos mares, **Ciência Hoje** , v. 8, n. 46, p.18-29. 1988.

SOUZA, T.M.; SEVERI, J.A.; SILVA, V.Y.A; SANTOS, E.; PIETRO, L.C.L.R. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Strtphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae – Mimosoidae). *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v.28, n.2, p.221-226, 2007.

STOCKMANN, C.; SCHADENDORF, D.; KLOSE, R.; HELFRICH, I. The Impact of the Immune System on Tumor: Angiogenesis and Vascular Remodeling. *Frontiers in Oncology*, Lausanne, v. 4, n. p. 69, 2014.

STORKEBAUM E, CARMELIET P. VEGF: a critical player in neurodegeneration. *J Clin Invest.* 2004;113(1):14-8.

STOCK, C.C.; CLARCK, D. A.; PHILIPS, F. S. Sarcoma 180 – inhibitor screening date. **Cancer Research**, n. 2, p.2-3, 1955.

SENEL, S.; McCLURE, S.J. Potencial applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Review*, v.56, p.1467-1480, 2004.

SHANMUGAM, M; MODY, K.H. Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. *Current science*, v. 79, 2000.

SHIBUYA, M. VEGF-VEGFR Signals in Health and Disease. *Biomolecules and Therapeutics*, Seoul, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2014.

SILVA, P. **Farmacologia**, ed.8ª, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.p.1352.

SOMANI, R.B., INGLE, R.W., AND WANJARI, S.S. Variability in *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn causing grain mold in sorghum. *Sorghum and Millets Newsletter* 35: (1994)106–107.

SOUSA, O.V.; FIORAVANTE, I.A.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; CANESCHI, C.A. Investigação das atividades antinociceptiva e antiedematog nica do extrato etanólico das folhas de *Joannesia princeps* Vellozo. *Rev Ciên Farm Básica Apl.* 2009;30 (1):91-97.

STOCKMANN, C.; SCHADENDORF, D.; KLOSE, R.; HELFRICH, I. The Impact of the Immune System on Tumor: Angiogenesis and Vascular Remodeling. *Frontiers in Oncology*, Lausanne, v. 4, n. p. 69, 2014.

STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. A. The cancer genome. *Nature*, v.45, n.8, p.719-24, 2009.

SUDATTI, D. B. Influência de fatores abi ticos e bi ticos na química defensiva da macroalga marinha *Laurencia dendroidea* J. Agardh (Ceramiales: Rhodophyta), Tese da Universidade Fluminense, 2010.

SUREKHA, K. L.; WAGHCHOUDE, M.; GHASKADBI, S. Enhancement of angiogenesis by a 27 kDa lectin from perivitelline fluid of horseshoe crab embryos through upregulation of VEGF and its receptor. *Journal of Natural Products*, Cincinnati, v. 76, n. 1, p. 117-120, 2013.

SZE, P. *A biology to the algae*. New York: McGraw-Hill. 1998, p.278.

TAMMELA, T.; ENHOLM, B.; ALITALO, K. PAAVONEN The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovascular Research*, 65, 550 – 563, 2005.

TAZAWA, H.; WHITTOW, G. C. *Incubation physiology*. In: WHITTOW, G. C. *Sturkie's Avian Physiology*. 2000. Cap. 24, p.617-634.

THIEL M.;MACAYA,E.C.; ACAÑA,E. et al. The Humboldt Current system of Northern and Central Chile oceanographic processes, ecological interactions and socioeconomic feedback. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review* v.45, p.195-344. 2007.

THOMPSON, J.; DOI, T.; POWER, E.; BALASUBRAMAN, I.; PURI, P.; BANNIGAN, J. Evidence against a direct role for oxidative stress in cadmium-induced axial malformation in the chick embryo. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 243, n. 3, p. 390– 8, 2010.

TISDALE, M.J. Protein loss in cancer cachexia. *Science* 289:2293-2295, 2000. USUI T, ISHIDA S, YAMASHIRO K, KAJI Y, POULAKI V, MOORE J, et al. VEGF164(165) as the pathological isoform: differential leukocyte and endothelial responses through VEGFR1 and VEGFR2. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(2):36874.

VASSEUR, P.B.; PAUL, H.A.; DYBDAL, N.; CRUMLEY, L.; – Effects of local anesthetics on healing of abdominal wounds in rabbits. *Am J Vet Res*, 1984; v.45, p.2385-2388.

VERMA PR, JOHARAPURKAR AA, CHATPALLIWAR VA, ASNANI A. Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R. Br. in mice. *J Ethnopharmacol* 102: 298–301, 2005.

VEST, S.E, DAWES, C.J, AND ROMEO, J.T. 1983. Distribution of caulerpin and caulerpicin in eight species of the green algae *Caulerpa* (*Caulerpales*). *Bot. Mar.* 26:313-316.

VITORINO FILHO, R.N.L – Uso de polissacarídeo extraído do exsudato de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) na terapêutica tópica de feridas. WHITTLE BA. Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. *J Neuropharmacol* 3: 369 – 378, 1964.

VIDAL, J.P.; LAURENT, D.; KABORE, S. A.; RECHENCQ, E.; BOUCARD,M.; GIRAND, J.P.; ESCALE,R.; ROSSI, J.C. **Bot.Mar.** (1984), 27,533.

VIDAL,A. Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, p. 509-600, 2006.

VULCAI, N.E.; GOUPY, P.; CARIN-VEYRAT, C.; DANGLES, O. (2005) inhibition of the metmyoglobin induced peroxidation in linoleic acid by dietary antioxydant: action in the aqueous phase vs. lipid phase. *Free radical research*, 35, p.547-563.

WAGNER,H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis – A thin layer chromatography atlas*. 2nd. ed. Berlin: Springer-Verlag; 1996.

WANG, T. JONSDOTTIR, R. LIU, H. GU, L. KRISTINSSON, H. G. RAGHAVAN, S. OLAFSDOTTIR, G. Antioxidant Capacities of phlorotannins extracted from the brown algae *Enteromorpha flexilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, p. 5874-5883, 2012

- WEST, E. P.; BARNES, J.; WRIGHT.; A. DAVIS. Anchors aweigh: Fragment generation of invasive *Caulerpa taxifolia* by boat anchors and its resistance to desiccation. *Aquatic Botany* 87(3), 2007, p.196–202.
- WESTPHALEN, G.; COLLINGS, G.; ROWLING, K.; THEIL, M.; CHESHIRE, A. Port river and Barker Inlet *Caulerpa taxifolia* (Vahl) C.Agardh distribution and eradication. Milestone report to PIRSA Biosecurity. SARDI. Aquatic Sciences Pub. RD02/0161, 2004.
- WHO - World Health Organization. World Cancer Day: Global action to avert 8 million cancer-related deaths by 2015. Genebra, 2006. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2006/pr06/en/index.html>
- WILTSHIRE,K. *Caulerpa taxifolia* - Survey of current distribution and high risk areas, and summary of distribution patterns 2003-2010.SARDI aquatic sciences, 2010.
- WOLPERT, L.; JESSELL, T.; LAWRENCE, P.; MEYEROWITZ, E.; ROBERTSON, E.; SMITH, KIM. Princípios de biologia do desenvolvimento. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- Wound Healing. *Plastic and Reconstructive Sugery*, 117, 12S – 34S, 2006.
- XUE, C-H, YU G, HIRATA, T, TERAQ, J, LIN, H. 1998. Antioxidative activities of several marine polysaccharides evaluated in a phosphatidylcholine-liposomal suspension and organic solvents. *Biosci Biotech Bioch* 62: 206-209.
- XUE, C-H, FANG, Y, LIN, H, CHEN, L, LI, Z-J, DENG, D, LU, C-X. 2001. Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*. *J Appl Phycol* 13: 67-70.
- ZETTER, B.R. “Angiogenesis and tumor metastasis”. *Annual review of medicine*. Palo Alto. 49:407-24, 1998.
- ZULJEVIC A.;ANTOLIC B., Synchronous release of male gametes of *Caulerpa taxifolia* (*Caulerpales*, Chlorophyta) in the Mediterranean Sea. *Phycologia* v.39,n.2. p.157-159, 2000.
- YESILYURT, V. et al. Antioxidant potential and phenolic constituents of *Salvia cedronella*. *Food Chemistry*, v. 108, p. 31-39, 2008.

Anexos



Full Length Research Paper

Antinociceptive and healing activity of the methanolic and hydroethanolic extracts of *Caulerpa taxifolia*

Evandro Valentim da Silva^{1*}, Gabriela Cavalcanti da Silva¹, Carla Andrea de Moura¹, Jefferson de Lima¹, Marcia Raquel Cedrin Vieira², Laureana de Andrade Lima², Danielle Maria Bastos de Souza³, José Ferreira Silva Neto³, George Chaves Jimenez³, Fálba Bernadete Ramos dos Anjos¹ and Ivone Antonia de Souza¹

¹Antibiotics Department, Federal University of Pernambuco, Universitaria City, Recife, PE, Brazil.

²Northern College of Parana, Brazil.

³University Federal Rural of Pernambuco, Brazil.

Received 15 January, 2016; Accepted 28 June, 2016

This study aimed to evaluate the healing and analgesic action of methanolic extract and hydroalcoholic of *C. taxifolia*, and check the percentage of soluble proteins available in the extract of this vegetable. The collection of *C. taxifolia* occurred on the beach of Barra do Sirinhaém - PE, processed for testing. The animals used in the test were Swiss mice, and *Mus musculus* of species. For healing activity and histopathological analysis, albino rats *Rattus norvegicus* species, linnhagem Wistar were used. The protein content of the crude extract of *C. Taxifolia* has not yet been determined. The data revealed that the average displaying writhing in animal control group was 13.86. The standard group was 7.83; the group treated with hydroethanolic extract of *C. taxifolia* at a dose of 50 mg/kg was 8.83 and those treated with 100 mg/kg was 6.5. In the groups treated with the methanol extract of 100 mg/kg, the average value of writhing was 7.67, while 50 mg/kg resulted in 9.26 average value. It was shown that hydroethanolic and methanol extract led to early healing of wound with epithelialized keratinized tissue and re-epithelialization; involving the restructuring of the skin appendages, during treatment and in the absence of crust.

Key words: Healing, seaweed, protein, repair.

INTRODUCTION

Wound healing is a process of repair that follows after injury of the skin and other soft tissues, and encompasses a complex series of interactions between different cell types, inflammatory mediators, and extracellular matrix. It is the phase of wound healing involving hemostasis,

inflammation, proliferation and remodeling; and each phase is different, although the process is continuous (Riella et al., 2012). Since the first occurs in the first hours (hemostasis), this process occurs in platelet activation and consequent aggregation fibrin and coagulation

*Corresponding author. E-mail: evandrovalentimblack@yahoo.com.br. Tel: 55 (81) 98725-0054.

Author(s) agree that this article remain permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0 International license](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

cascade. In the second stage, which occurs in days, the inflammatory process is present, and there is the recruitment of neutrophils and macrophages, which among other things help to degrade the devitalized tissue; and macrophages stimulate the growth of new tissue (Irion et al., 2005). Treatment of wound closeses quickly as possible the lesion in order to obtain a functional and aesthetically satisfactory scar. Medicinal products obtained exclusively from raw materials of vegetable origin called herbspovide active ingredients with anti-inflammatory and wound healing applications (Micheln et al., 2005; Lima et al., 2006).

Among the products of dermatological interest, particular attention deserves the action incorporated into the topical dosage forms. This can in turn allow recovery of intact posterior skin to possible attacks. For the restoration of normal conditions, the healing process is very important. In this context, the migration of inflammatory cells in granulation tissue synthesis, deposition of collagen and proteoglycans and maturation of the scar, are associated with severe reshaping. Thus, the complementary medicine works as a tool for this treatment (Santos et al., 2002; Mendonça, 2006; Rocha et al., 2006).

Several medicines for tissue healing mostly originate in natural products (Segundo et al., 2007). These biomaterials consist of interactive elements that are able to establish adequate affinity with the surrounding tissue, without however inducing adverse response of the host (Ratner and Bryant, 2004). Among the biomaterials, polysaccharides stimulate the immune system *in vitro* and *in vivo* in order to facilitate the healing process (Diallo et al., 2001; Kweon et al., 2003; Senel and Meclure, 2004; Vitorino Filho, 2011).

The diversity of Brazilian marine flora favors the discovery of pharmacological agents in the prevention and treatment of diseases (Rodrigues et al., 2019). Sulphated polysaccharides (PS), and soluble proteins are found in these agents, in large concentrations and with interesting biological properties (Rodrigues et al., 2009).

These compounds have structural complexity due to the many possibilities of monosaccharides and distribution of sulfate groups, which vary from species to species, and sometimes in different parts of the plant (Ahves, 2000; Haroun-Bouhedja et al., 2000).

The presence of polysaccharide sulfates can promote change in biological activity, since it modifies the conformation of its chain; makes nonpolar substances in water-soluble and also promotes interactions with cationic proteins (Sharmugam and Mody, 2000; Liu et al., 2009).

Some PS present in green algae are covalently bound to proteins, being classified as proteoglycans (Aquino et al., 2005; Ropelatto et al., 2011).

This group of organisms, which belongs to the genus *Caulerpa*, appears to differ sterols on cholesterol chemical structure. The compounds are biologically important as hormones, vitamins and structural

components of biomembranes (Ghosh et al., 2004; Lee et al., 2004; Shevchenko et al., 2009). Phytochemical approach to *Caulerpa taxifolia* indicated the presence of secondary metabolites such as alkaloids, terpenes, sterols and saponins (Moura et al., 2012). The caulerpina isolated alkaloid *C. taxifolia* was active in enterocolitis study model for mice (Lima et al., 2014). For Kathiravan et al. (2014), species of this genus can produce Ag nanoparticles and these extracellularly (nanoparticles) are quite stable in solution, likely due to leveling proteins present in the extract. This study aimed to evaluate the healing and analgesic action of methanolic extract and hydroethanolic of *C. taxifolia*, and check the percentage of soluble proteins available in the extract of this vegetable.

MATERIALS AND METHODS

Collection of vegetable material

Marine macroalgae *C. taxifolia* was collected on the beach of Srinheim Bar, county Srinheim - PE. Then it was placed in plastic bags with seawater and transported to the Experimental Oncology Laboratory, UFPE, where it was washed in distilled water and dried in an oven at 25°C temperature. It was later weighed and crushed in blender (Arnold) for macerating. It was put in a glass container with 50% hydroethanolic solution (a first portion) and another portion of methanolic solution of 100%. After 7 days of soaking the material was placed in rotatory evaporator and stored until the day of the test. The performance of hydroethanolic and methanolic extract were 11.5 and 8.8% respectively.

Laboratory animals

The animals used in the test of writhings were Swiss mice of the *Mus musculus* species; they were males of approximately 80 days old. They weighed 25 to 30 g after birth. They were kept in light controlled conditions (12-hour light / dark cycle) and temperature of 22 ± 2°C in polypropylene cages, where they received specific food and water *ad libitum*. 12 h prior to the study, the animals were fasted.

For the activity of healing, the animals used were the albino rats of the species *Rattus norvegicus*, Linnaeus Water, of 120 days; weighing between 180-200 g. They were kept in controlled lighting conditions (12 h light / dark cycle) and temperature of 22 ± 2°C in polypropylene cages, where they received specific food and water *ad libitum*. 12 h before the surgical procedures, the animals were fasted. The present study was approved by the research ethics committee in animals of the Federal University of Pernambuco, being registered under the protocol number 17904.

Nociceptive activity

The writhing test in mice was carried out according to Koeler et al. (1959). The methanolic and hydroethanolic extracts of *C. taxifolia* were solubilized in dimethyl sulfoxide: Tween 80 (1: 1) 1% (v / v) in saline and administered orally 1 hour before the application of 0.6% acetic acid. The control group (group 1) received 0.3 ml / 30 g of dimethyl sulfoxide: Tween 80 (1: 1) 1% in saline orally (po). Indomethacin (10 mg/kg) was the reference drug administered

orally to mice in the positive control group (group 2). Groups 3 and 4 were administered doses of 50 and 100 mg/kg of hydroethanolic extract of *C. taxifolia* respectively; 50 and 100 mg/kg of methanolic extract of *C. taxifolia* were given to Groups 5 and 6, respectively; rat weight ($n=10$). One hour after treatment, 10 mg/kg of 0.5% acetic acid was administered intraperitoneally in each mouse and the number of writhings was counted within a range of 10 and 30 min after this procedure.

The percentage inhibition of writhing was calculated by the formula: % Inhibition = $[(NC \text{ control} - NC \text{ treaty}) / NC \text{ control}] \times 100$ where: NC control: number of writhes in the control group; NC treaty: writhing number of the treated group.

Getting cream

The cream for the treatment of animals used in the healing experiment was obtained by adding extracts and solubilization of the cream base, in GLOBOD manipulated manipulation pharmacy. Constituents of base cream are: Water, 34.5%; Glycerin, 8.0, 5.0% cetearyl alcohol; 3.0% glyceryl monostearate; sodium lauryl sulfate ester, 1.5% (Batista et al., 2011).

Healing test

For the healing test 60 animals were selected which were divided into 12 groups ($n = 5$), where three groups each were treated topically with methanolic extract of *C. taxifolia*; hydroethanolic extract of *C. taxifolia*, cream base, and Bepantol cream. During the treatment there was removal of scar tissue of one of the three groups at 7, 14 and 21 days.

Histopathological evaluation

All samples were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, cut in 5 mm and stained with hematoxylin-eosin (HE). These sections were then examined under a light microscope to detect histological changes by a histopathologist who did not know the groups. Slides were scored for the presence of vascularization, edema, and degree of acute and chronic inflammation.

Morphological analysis

The morphometric analysis was performed on histological sections stained by HE. Each slide was measured by a high-power field magnified 400x including the healing of the incision area; the average number of collagen bundles in each group was calculated.

Protein soluble analysis

The Bradford method (1976) was employed to determine the protein content of the crude extract of *C. taxifolia*. The reagent was prepared by solubilizing 50 mg Coomassie in 25 mL of ethanol (95%), with further addition of 100 ml of phosphoric acid (85% w/v). The final concentrations (w/v) of the reagent was 0.01% Coomassie, 4.7% ethanol and 8.5% phosphoric acid. Standard albumin solutions were prepared in increasing concentrations of 1.0 to 0.1 mg/mL, from dilutions of the stock solution (5 mg/mL).

Vegetable processed samples were cut into pieces (5 mm) and 200 mg was weighed and homogenized in 10 ml of 80% ethanol. An aliquot of the crude extract was centrifuged for 5 min at 2,000 g; an aliquot of 3 ml of the supernatant was transferred to a test tube, and 8 ml of chloroform was added to it. This mixture was stirred continuously for two minutes gently and then left unaltered for

10 min. So, there were two phases (organic and aqueous). The aqueous fraction (colorless) was collected in an eppendorf and kept in freezer until the time of color development.

For color development, pipetted 200 μ L of standard solutions and sample extracts were added to 4 mL of the Coomassie brilliant blue reagent. The tubes were subjected to gentle agitation for 5 min at rest. Then the readings were performed in a spectrophotometer at a wavelength of 595 nm; the amounts of soluble protein content were expressed in terms of mg of soluble protein per gram of fresh plant tissue (Bradford, 1976).

The concentration of soluble proteins was calculated by the formula: Focussa = $[(White \text{ Abs} - Abs \text{ sample}) / white \text{ Abs}] \times 100$ where: Abs blank: absorbance measured for white; Abs sample: absorbance measured for the samples.

Statistical analysis

The test of writhing was considered significant for values $^{***} p < 0.001$, after analysis of variance (ANOVA) followed by Student Newman-Kuels test when compared to the control group.

RESULTS

Noiceptive activity

The average displaying writhing in animal control group was 13.86; the standard group average was 7.83. The group treated with hydroethanolic extract of *C. taxifolia* at a dose of 50 mg/kg had 8.83; the group treated with hydroethanolic extract of *C. taxifolia* at a dose of 100 mg/kg showed an average value of 6.5. The groups treated with methanolic extract of *C. taxifolia* at a dose of 100 mg/kg had an average value of 7.67 and the twisted group treated with methanolic extract of seaweed at a dose of 50 mg/kg had 9.28 contortions as mean value (Table 1).

The control group treated with 50 mg/kg hydroethanolic extract had 36.3% decrease in writhing. T100 mg/kg hydroethanolic extract reduced writhing by 53.1%. With the methanolic extract of 50 and 100 mg/kg, there was a reduction of 33.2 and 44.7% respectively.

Soluble proteins

In the spectrophotometric quantification of octoplicata-samples as soluble protein present in extract of *C. taxifolia*, readings were done according to the formula described by Bradford (1976), which was expressed as the mean \pm standard error of the mean. The result was $6.67 \pm 1.32 \mu\text{g/lmg}$.

Healing activity

It was shown that both the inorganic and organic extracts showed early wound healing with epithelialized keratinized tissue; with restructuring of the skin appendages, during the treatment and in the absence of crust (Figures 1 and

Table 1. Hydroethanolic and methanolic extract effect *C. taribola* on the writhing induced by acetic acid (n = 6).

Groups	Doses (mg/kg)	Number of contortions	Inhibition (%)
Control	Saline	13.80 ± 1.37	-
Methanolic extract	50	9.26 ± 1.26***	33.18
	100	7.67 ± 1.12***	44.66
Hydroethanolic extract	50	8.83 ± 0.98***	36.29
	100	6.5 ± 0.85***	53.1
Indomethacin	10	7.83 ± 1.21***	43.5

*** p < 0.001. Significant after analysis of variance (ANOVA) followed by Student Newman-Keuls test when compared to the control.

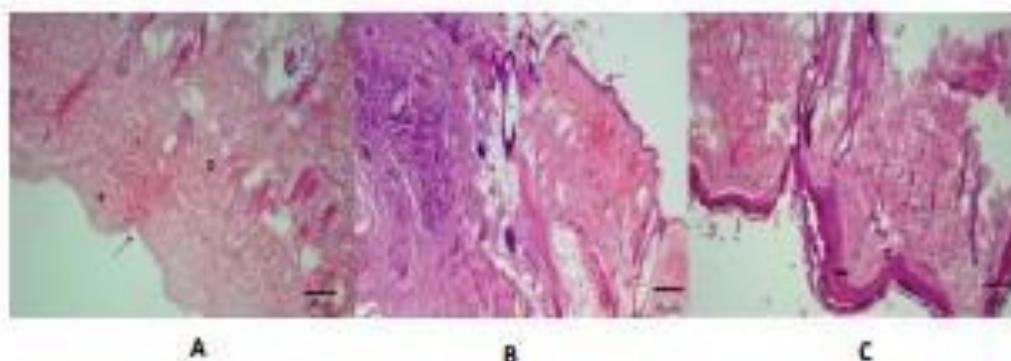


Figure 1. Photomicrography of skin healing animals. Treated group hydroethanolic extract for (A) 7, (B) 14 and (C) 21 days. Staining hematoxylin-eosin $\times 40$.

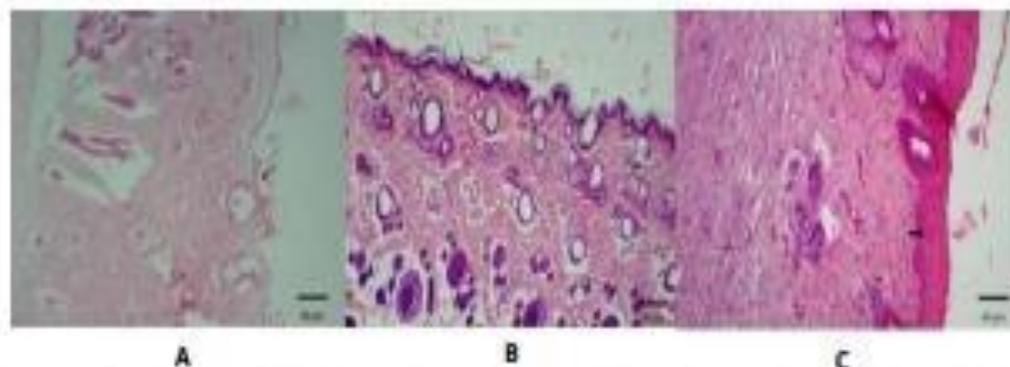


Figure 2. Photomicrograph of skin healing animals. Group treated with methanol extract for (A) 7, (B) 14 and (C) 21 days. Hematoxylin-eosin staining $\times 40$.

2). However, the animals treated with the organic extract (21 days) showed inflammatory infiltrates (**) and a significant number of fibroblasts (***) when compared to treatments of 7 and 14 days.

DISCUSSION

The data demonstrate that both extracts reduced writhing in mice with two doses tested, suggesting inhibition of

prostaglandin synthesis via cyclooxygenase, as well as indomethacin. Positive control test has the mechanism of inhibiting this enzyme (Duarte et al., 1992). The inhibition of contortions were quite significant at the tested doses, most apparent with the hydroethanolic extract of 100 mg/kg.

The test of writhings is a chemical model of nociception that is based on counting the contortions of the abdominal wall followed by the trunk torsion, and extension of the hind limbs, such as reflex response to peritoneal irritation and peritonitis produced by intraperitoneal injection of a solution of 0.9% acetic acid (Whittle, 1964). This test is sensitive to the evaluation of analgesic drugs; however, it can be seen as a general model, non-selective, for studies of antinociceptive drugs (Couto et al., 2011).

Para Julius and Basbaum (2001) protons coming from the dissociation of acetic acid can directly activate the nonselective cation channels located in primary afferent pathways. The local irritation produced by intraperitoneal injection of acetic acid causes the release of a variety of mediators such as substance P, bradykinin, prostaglandins, as well as the pro-inflammatory cytokines such as IL-1, IL-6, IL-8 and TNF- α (Pinheiro et al., 2011). Verma et al. (2005) comment that this method is associated with the release of prostanoids, in general, high levels of PGE2 and PGF2 α and lipoxygenase products in peritoneal fluid.

The extracts of *C. taxifolia* (hydroethanolic and methanol) exhibited antinociceptive activity in the model induced by acetic acid. The responses were significant at both doses of extract, and the percentage of inhibition increased with increasing dose. This can be related with the synthesis of prostaglandins via cyclooxygenase as well as indomethacin (Sousa, et al., 2009).

The substance P and bradykinin are involved in the first phase, while histamine, serotonin, prostaglandins and bradykinin participate in the second phase of the response (Shibata et al., 1989). Morrow and Roberts II (2001) and Costa-and-Sousa (2010) indicate that the test of writhings involves anti-inflammatory mechanisms. In the process of tissue repair, under physiological conditions, fibroblasts are encouraged to migrate to the area of injury and produce collagen fibers to effect this process (Honorio-França et al., 2008; Mendonça; Coutinho Netto, 2009; Dias, 2012). In skin lesions, it is possible to assess the stage of tissue damage by histological analysis (qualitative and quantitative) of the main features that show the evolution of this process, such as the number of inflammatory cells, fibroblasts, and of new blood vessels formed by angiogenesis process (Batista et al., 2010; Oliveira et al., 2010).

Moreover, macrophages stimulate the growth of new tissue, as observed in animals in the 7th day, as well as the presence of small collagen fibers. The third stage of healing that occurs around days to weeks, was more intensified and there was continuous reepithelization of

the formation of granulation tissue. This fact can be seen in animals related to the 14th day. The presence of macrophages at this stage stimulates production of fibroblasts and deposition of loose connective tissue; whereas the collagen produces fibroblast migration. It was noticed that in the group of animals on the 21st day, the third stage was still present. This is explained by the depth of the lesion, which can be a limiting factor for the evolution of healing (Itron, 2005).

The extracts appear to have acted in the healing of treated animals promoting epithelization. According to Modolin and Bevilacqua (1985), at the end of the proliferative phase is re-epithelization of the lesion, which is controlled by chalone, a glycoprotein complex that stimulates epithelial mitotic activity.

Rubin and Farber (2002), Stevens and Lowe (2002) say proliferative phase lasts for 12 to 14 days, and is characterized by repairing the connective tissue with granulation tissue formation and consecutive reepithelização. The repair process begins with inflammation and around 24 h after injury there is no resolution; fibroblasts and vascular endothelial cells initiate proliferation forming scar tissue, that is, granulation. It is histologically characterized as vasculogenesis and has increased numbers of fibroblasts.

Agnol (2008) further notes that in the repair process, by the second and third day after injury, the collagen-producing fibroblasts are recruited from the shores of injury and induce protein synthesis by fibroplasia. Consequently, the fibrinogen present in the inflammatory exudate turns into fibrin, which will serve for adhesion and proliferation of fibroblasts, which secrete scar tissue.

Therefore, the silver nanoparticles found in *Caulerpa taxifolia* possibly leveraging (in conjunction with) their potential antibiotics may be responsible for the healing effect since, with the control of the local microbiota developed, the mechanism for healing does not suffer interference.

Conflicts of Interests

The authors have not declared any conflict of interest.

REFERENCES

- Alex LG, (2000). Polissacarídeos ácidos presentes no folículo, talo e flutuador de alga marinha *Sargassum vulgare*. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica – Universidade Federal do Rio Grande do Norte- UFRN, NATAL.
- Aquino RS, Landeira-Fernandez AM, Valente AP, Andrade LR, Mourão PAS (2005). Occurrence of sulfated galactans in marine angloperms: evolutionary implications. *Glycobiology* 15:11-20.
- Batista JS, Olinchi RG, Medeiros VB, Rodrigues CMF, Oliveira AF, Paiva ES, Freitas CIA, Medeiros AC (2011). Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de burti *Mauritia flexuosa* L. *Genés Rural, Santa Maria*.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the qualification of

- microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 7:248-254.
- Couto VM, Villela FC, Dias DF, Santos MH, Sonchi R, Nascimento CG, Guast-Palva A (2011). Antinociceptive effect of extract of *Emilia sonchifolia* in mice. *J. Ethnopharmacol.* 134(2):348-353.
- Diallo D, Paulsen BS, Liljeblök TH, Michaelsen TE (2001). Polysaccharides from the roots of *Eriaria africana* Guill. Et Perr Mimosaaceae, with complement fixing activity. *J. Ethnopharmacol.* 74:159-171.
- Duanis IDG, Ferreira-Alves DL, Nakamura-Craig M (1992). Possible participation of endogenous opioid peptides on the mechanism involved in analgesia by voucaçapan. *Life. Sci.* 50:891-897.
- Haroun-Scoutcha F, Moolata E, Singun C, Boleau-Vidal C (2000). Relation between sulfate group and biological activities of lucans. *Thromb. Res.* 100:453-456.
- Julus D, Basbaum AI (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 410:203-210.
- Koster R, Anderson M, Beer EJ (1959). Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proceed.* 18:413-21.
- Kwon DK, Song SB, Park YY (2003). Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and application as wound healing accelerator. *Biomaterials* 24(9):1595-601.
- Liu Y, Liu C, Tan H, Zhao T, Cao J, Wang F (2009). Sulfation of a polysaccharides obtained from *Phellinus nidis* and potential biological activities of the sulfated derivatives. *Carbohydrate Polymers* 77:370-375.
- Modolin M, Bevilacqua RG (1985). Cicatrização de feridas. Síntese das aquisições recentes. *Rev. Bras. Clin. Terap* 14:208-213.
- Pinheiro B, Silva A, Sousa G, Figueiredo J, Cunha F, Leitão S, Da Silva JK, Maia JG, Sousa PJ (2011). Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. *J. Ethnopharmacol.* 138:479-486.
- Rodrigues JAG, Sousa Junior J, Lourenço JÁ, Lima PCWC, Farias WRL (2006) Cultivation of shrimp treated with sulfated polysaccharides of *Hallymenia pseudoflorensia rhodophysosa* through a prophylactic strategy. *Rev. Cienc. Agron.* 40(1):71-78.
- Ropelato J (2011). Estrutura química e atividade antitumoral de heteroramanas sulfatadas e seus produtos de degradação parcial obtidos da macroalga verde *Gracilaria coriacea*. UFPA, Curitiba.
- Segundo SA, Maia CD, Ribeiro RV, Aguiar EHO, Recatto GGD, Cirilo DM, Sanyta LB, Semenov TADV (2007). Influência do Aloe vera e própolis na contração de feridas em dorso de ratos. *Periodontia* 17(1):23-38.
- Senel S, McClure SJ (2004). Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56(10):1467-1488.
- Sharmagan M, Mody KH (2000). Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents. *Cur. Sci.* 79(12):1672-1683.
- Souza DV, Fioravante IA, Del-Vechio-Vieira G, Canaschi CA (2009). Investigação das atividades antinociceptiva e anti-edematogênica do extrato etanólico das folhas de *Joazeiro principis* Vellozo. *Rev. Cienc. Farm. Básica Appl.* 30(1):91-97.
- Verma PR, Joharapurkar AA, Chaitanyalekar VA, Anant A (2005). Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R. Br. in mice. *J. Ethnopharmacol.* 100:298-301.
- Vitorino-Filho RNL (2011). Uso de polissacarídeos extraído do equidulo de caqueiro (*Anacardium occidentale* L.) na terapêutica tópica de feridas (Doctoral dissertation, Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-Universidade Federal do Piauí, Teresina).
- White BA (1964). Release of a toxin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. *J. Neuropharmacol.* 3:369-378.