



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA**



FLÁVIA MENEZES FERRAZ

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DO
POLISSACARÍDEO OBTIDO A PARTIR DA LEVEDURA
*Rhodotorula oryzzicola***

FLÁVIA MENEZES FERRAZ

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DO
POLISSACARÍDEO OBTIDO A PARTIR DA LEVEDURA
*Rhodotorula oryzzicola***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flávia Oliveira de Lima

Feira de Santana, BA
2017

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

F433a Ferraz, Flávia Menezes

Avaliação do potencial antinociceptivo do polissacarídeo obtido a partir da levedura *Rhodororula oryziicola* / Flávia Menezes Ferraz.– 2017.

64 f.: il.

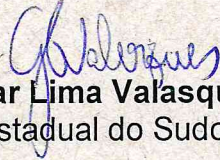
Orientadora: Flávia Oliveira de Lima

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2017.

1. *Rhodororula oryziicola* – Tipo de fungo 2. Polissacarídeos. 3. Dor. I. Lima, Flávia Oliveira de, orient. II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 631.466

BANCA EXAMINADORA



Dr. Gildomar Lima Valasques Júnior
(Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia)



Dr. Manoelito Coelho dos Santos Júnior
(Universidade Estadual de Feira de Santana)



Dra. Flávia Oliveira de Lima
(Universidade Estadual de Feira de Santana)
Orientadora e Presidente da Banca

Feira de Santana – BA
2017

AGRADECIMENTOS

Após dois anos de muito trabalho, dedicação e estudo, tenho a satisfação de concluir esta fase importante da minha vida. Porém, esta conquista não foi apenas minha, e por isso venho agradecer a todos que contribuíram direta ou indiretamente neste resultado.

À **Deus** pela minha vida e saúde, por me mostrar os bons caminhos e por ter colocado grandes pessoas ao meu redor.

À toda minha família, em especial aos meus pais **Jorge e Jaci** e ao meu irmão **Fabio** pelo amor, força e cuidado que tem por mim.

Ao meu namorado **Diêgo** pelo amor, cumplicidade, apoio e incentivo, até nos momentos mais difíceis.

À professora **Flávia Oliveira de Lima** por aceitar esta orientação e ter me incentivado durante toda esta jornada.

À professora **Sandra Aparecida de Assis** pela co-orientação e pelo fornecimento do polissacarídeo para realização desse trabalho.

Aos meus amigos que estiveram sempre presente, me apoiando e ouvindo minhas vivências de laboratório, em especial a **Bia e Alana**.

Aos amigos que fiz durante este período, em especial **Clêisiane Lima, Luilma Freitas, Bruno Cerqueira, Fernando Gasmann, Renata Freitas, Joice Sena e Thiago Vilas Boas** pela ajuda, força e companheirismo.

Aos funcionários do Biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana, em especial a **Júnior e Bete**, que contribuíram muito para a realização deste trabalho.

Aos **professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia** pelo ensinamento prestado, assim como ao secretário **Helton Ricardo Carneiro Júnior** pela assistência administrativa, sendo sempre gentil e prestativo.

À **CAPES** pelo apoio financeiro.

À todos, muito obrigada!

“Você não sabe
o quanto eu caminhei
pra chegar até aqui.”

Toni Garrido, Da Gama e Bino Farias

RESUMO

As leveduras são constituídas por diferentes macromoléculas, dentre elas os polissacarídeos. A indústria farmacêutica tem utilizado os polissacarídeos como uma importante matéria-prima para o desenvolvimento de novos medicamentos, uma vez que estes apresentam diversas atividades farmacológicas, a exemplo das atividades antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória, antinociceptiva e imunomoduladora. A levedura *Rhodotorula oryziicola*, presente no semiárido baiano, merece destaque visto que ainda é pouco explorada em relação a seu potencial biotecnológico. O presente trabalho analisou o possível efeito antinociceptivo do polissacarídeo obtido a partir da levedura *R. oryziicola*, através de modelos de dor em camundongos. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Feira de Santana (06/2013). A administração intraperitoneal do polissacarídeo (9 e 27 mg/kg) apresentou uma inibição de modo dose-dependente do número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. No teste de formalina, o pré-tratamento com o polissacarídeo (27 mg/kg) apresentou atividade antinociceptiva apenas na segunda fase do teste. Observou-se que o polissacarídeo (9, 27 e 81 mg/kg) alterou o limiar de resposta ao estímulo térmico utilizado no teste de retirada de cauda, indicando assim uma possível presença de ação central. No modelo da hipernocicepção mecânica induzida por CFA, o pré-tratamento com o polissacarídeo (27 e 81 mg/kg) inibiu a hipernocicepção induzida pelo CFA. Ratificando a especificidade da ação antinociceptiva, o polissacarídeo (27 mg/kg) não alterou o comportamento motor dos animais nos modelos do cilindro giratório e do campo aberto. A caracterização estrutural mostrou resíduos de manosil envolvidos em ligação do tipo α -3,6, sugerindo que a amostra seja uma manana. Os resultados comprovam que o polissacarídeo apresenta uma eficiente atividade antinociceptiva, indicando o desenvolvimento deste para o tratamento de condições de dor inflamatória.

Palavras-chave: *Rhodotorula oryziicola*. Dor. Antinocicepção. Polissacarídeo.

ABSTRACT

The yeasts are constituted by different macromolecules, among them the polysaccharides. The pharmaceutical industry has used polysaccharides as an important raw material for the development of new drugs, since they present several pharmacological activities, such as antitumor, antioxidant, anti-inflammatory, antinociceptive and immunomodulatory activities. The yeast *Rhodotorula oryziicola*, present in the semi-arid region of Bahia, deserves to be highlighted, since it is still little explored in relation to its biotechnological potential. The present study analyzed the possible antinociceptive effect of the polysaccharide obtained from yeast *R. oryziicola*, through pain models in mice. This study was approved by the Commission of Ethics in the Use of Animals of the State University of Feira de Santana (06/2013). Intraperitoneal administration of the polysaccharide (9 and 27 mg/kg) showed dose-dependent inhibition of the number of abdominal writhes induced by acetic acid. In the formalin test, pre-treatment with the polysaccharide (27 mg/kg) showed antinociceptive activity only in the second phase of the test. It was observed that the polysaccharide (9, 27 and 81 mg/kg) altered the thermal stimulus response threshold used in the tail withdrawal test, thus indicating a possible central action presence. In the model of mechanical hypernociception induced by CFA, pre-treatment with the polysaccharide (27 and 81 mg/kg) inhibited CFA-induced hypernociception. Ratifying the specificity of the antinociceptive action, the polysaccharide (27 mg/kg) did not change the motor behavior of the animals in the rota rod and open field models. The structural characterization showed mannosyl residues involved in α -3,6-type binding, suggesting that the sample is a mannan. The results demonstrate that the polysaccharide has an efficient antinociceptive activity, indicating its development for the treatment of inflammatory pain conditions.

Keywords: *Rhodotorula oryziicola*. Pain. Antinociception. Polysaccharide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Avaliação do comportamento nociceptivo através do modelo de contorções induzidas por ácido acético.	28
Figura 2: Avaliação do comportamento nociceptivo através da administração de formalina (2,5%).	29
Figura 3: Avaliação do comportamento hipernociceptivo induzido pelo CFA (A) utilizando o aparelho do Von Frey eletrônico (B).	30
Figura 4: Avaliação do comportamento nociceptivo através do teste de retirada de cauda.	31
Figura 5: Avaliação do comportamento exploratório através do teste do campo aberto.	32
Figura 6: Avaliação do comportamento motor no teste do cilindro giratório.	33
Figura 7: Efeitos do tratamento com o polissacarídeo no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.	36
Figura 8: Efeitos do tratamento com o polissacarídeo sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos.	38
Figura 9: Efeitos do tratamento com o polissacarídeo sobre a hipernocicepção mecânica induzida por CFA em camundongos.	40
Figura 10: Efeitos do tratamento com o polissacarídeo no teste da retirada da cauda em camundongos.	42
Figura 11: Efeitos do tratamento com o polissacarídeo no teste do campo aberto em camundongos.	44
Figura 12: Efeitos do tratamento com o polissacarídeo no teste do cilindro giratório em camundongos.	46

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α - Alfa
 β - Beta
 δ - Gama
°C - graus centígrados
= - igual
 \pm - mais ou menos
< - menor que
% - por cento
1^a - primeira
2^a - segunda
4^a - quarta
AINES - anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA- Análise de Variância
BA - Bahia
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CFA- Adjuvante Completo de Freund
cm - centímetros
COX- cicloxigenase
E.P.M - erro padrão da média
EPS - exopolissacarídeo
g - grama
g/L - grama por litro
H - Hidrogênio
IA - Índice de Antinocicepção
IASP - Associação Internacional de Estudos da Dor
IL-1 - interleucina - 1
IL-1 β - interleucina - 1 beta
IL-6 - interleucina - 6
IL-8 - interleucina - 8
i.p. - intraperitoneal
i.pl - intraplantar
K₂HPO₄ - fosfato de potássio hidrogenado
KH₂PO₄- fosfato monopotássico
LAEN - Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações
M - Molar
m/s - metro por segundo
MgSO₄ - sulfato de magnésio
mg/kg - miligrama por quilo
min - minuto
mL- mililitro
mL/kg - mililitro por quilo
 μ L - microlitro
n - número
n^o - número
NaOH - hidróxido de sódio
NGF - Fator de Crescimento Nervoso
p - probabilidade de significância
PG - Prostaglandina
PGE₂- Prostaglandina E₂
PIB - produto interno bruto
PLS - fração de polissacarídeos sulfatados

RMN - Ressonância Magnética Nuclear
rpm - rotação por segundo
SBED – Sociedade Brasileira para Estudos da Dor
s.c. – subcutâneo
SNC - Sistema Nervoso Central
TNF α - fator de necrose tumoral alfa
UEFS - Universidade Estadual de Feira de Santana
UFC/mL - Unidade Formadora de Colônia por mililitro
UFG - Universidade Federal de Goiás

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	DOR: ASPECTOS GERAIS	14
2.2	INFLAMAÇÃO E DOR INFLAMATÓRIA	16
2.3	CLASSIFICAÇÃO DA DOR	17
2.4	EPIDEMIOLOGIA DA DOR	18
2.5	TRATAMENTO FARMACOLÓGICO PARA DOR	19
2.6	PRODUTOS NATURAIS COMO FONTES DE FÁRMACOS	21
2.6.1	Potencial biotecnológico das leveduras	22
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVO GERAL	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	OBTENÇÃO DO POLISSACARÍDEO A PARTIR DA LEVEDURA <i>Rhodotorula oryzzicola</i>	26
4.2	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	26
4.3	DROGAS E DILUENTES	27
4.4	ENSAIOS FARMACOLÓGICOS	27
4.4.1	Modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético	27
4.4.2	Teste de formalina	28
4.4.3	Hipernocicepção mecânica induzida pelo adjuvante completo de Freund (CFA)	29
4.4.4	Teste de retirada da cauda (Tail Flick)	30
4.4.5	Teste do campo aberto (Open Field)	32
4.4.6	Teste do cilindro giratório (Rota Rod)	33
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5	RESULTADOS	35
5.1	ENSAIOS FARMACOLÓGICOS	35
5.1.1	Efeito do pré-tratamento com o polissacarídeo no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético	35
5.1.2	Efeito do pré-tratamento com o polissacarídeo no teste de formalina	37
5.1.3	Efeito do pré-tratamento com o polissacarídeo na hipernocicepção mecânica induzida pelo adjuvante complexo de Freund (CFA)	39
5.1.4	Efeito do pré-tratamento com o polissacarídeo no teste de retirada da cauda	41
5.1.5	Efeito do pré-tratamento com o polissacarídeo no teste do campo aberto	43
5.1.6	Efeito do pré-tratamento com o polissacarídeo no teste do cilindro giratório	45

6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS	53
	ANEXOS	63

1 INTRODUÇÃO

Doenças que apresentam o sintoma da dor são consideradas um problema cada vez mais presente na vida do ser humano, gerando em muitos casos uma limitação na realização das atividades diárias. A dor geralmente aparece como resultado de uma lesão tecidual real ou potencial, que se não for controlada, ocasiona uma baixa qualidade de vida, além de estar interligada a um maior gasto econômico (CORREA, 2007).

A dor está presente em mais de 70% dos pacientes que procuram consultórios médicos no Brasil, sendo considerada a maior causa de afastamento ao trabalho (ROCHA *et al.*, 2007). Segundo a Sociedade Brasileira para Estudo da Dor (SBED), a dor afeta pelo menos 30% dos indivíduos durante algum momento da sua vida e em até 40% tem duração superior a um dia. Devido à presença constante da dor na rotina dos indivíduos, a descoberta de novos fármacos se faz necessária, buscando assim, diminuir as limitações ao uso dos medicamentos existentes como: presença de efeitos indesejados, pacientes refratários à terapia e tolerância (SBDE, 2016; SHU, 1998; STEINMEYER, 2000; TAKANO *et al.*, 2012).

A indústria farmacêutica tem retornado com o interesse pela química de produtos naturais como fonte de descoberta de novos medicamentos (PIMENTEL *et al.*, 2015). Plantas, fungos, organismos marinhos e bactérias são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Depois da descoberta do primeiro antibiótico produzido a partir do fungo do gênero *Penicillium*, a indústria farmacêutica já descobriu muitos efeitos farmacológicos gerados a partir da utilização destes micro-organismos, uma vez que eles apresentam uma rica fonte de macromoléculas e metabólitos secundários, com várias estruturas químicas. Dentre estas estruturas, é possível destacar os polissacarídeos, a exemplo das glucanas, mananas e galactanas, que possuem diversas propriedades biológicas, como os efeitos anti-inflamatório, antiviral, antinociceptivo e antitumoral (ANANTHI *et al.*, 2010; GHOSH *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006; VALASQUES JUNIOR *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2011).

A levedura *Rhodotorula oryzzicola*, espécie isolada do semiárido baiano, ainda é pouco explorada em relação as suas propriedades farmacológicas. Neste contexto, devido a necessidade de novas opções terapêuticas no controle da dor, investigou-

se a atividade antinociceptiva do polissacarídeo obtido a partir da levedura *R. oryzoicola*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOR: ASPECTOS GERAIS

A dor é uma experiência sensorial e multidimensional, muitas vezes com etiologia indefinida que resulta em incapacidades e inabilidades. Atualmente a Associação Internacional de Estudos da Dor (IASP) define a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, ou descrita em termos de tal dano.” (IASP, 2012; LOESER; MELZACK, 1999). Portanto, a dor envolve tanto a transdução e percepção dos estímulos nocivos pelo sistema nervoso central quando receptores sensoriais são ativados, quanto à presença de um componente emocional e afetivo.

De acordo com Almeida e colaboradores (2004), enquanto o componente sensorial perceptivo-discriminativo permite a localização espacial e temporal, a avaliação física e a quantificação de intensidade do estímulo nocivo, o componente cognitivo-afetivo atribui emoção à experiência, sendo responsável pela resposta comportamental à dor.

Devido à existência desse componente emocional e afetivo, torna-se difícil a definição de dor em animais. Então, o termo nocicepção é utilizado, uma vez que este é definido pelo reconhecimento de sinais dolorosos pelo sistema nervoso central (SNC), a partir da ativação de receptores sensoriais especializados, chamados nociceptores, que formulam informações relacionadas à lesão (FEIN, 2012; KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

Quando um estímulo nocivo com grande intensidade ou persistência causa mudanças nos limiares nociceptivos, ocorrem os fenômenos denominados de alodinia, que é a dor proveniente de um estímulo normalmente inócuo; e hiperalgesia que é o aumento da amplitude da resposta à dor devido a um estímulo que provoca dor (DICKENSON, 2013; IASP, 2012). Devido a controvérsias na literatura para a utilização destes termos na experimentação animal, uma vez que a percepção da dor em animais não é óbvia, foi sugerido o termo hipernocicepção para determinar o aumento da resposta nociceptiva comportamental em animais (PARADA *et al.*, 2003).

A sensação dolorosa é o resultado da ativação periférica de receptores fisiológicos, os nociceptores, os quais estão associados a neurônios sensoriais primários. Estes são especializados em transferir informações da periferia, onde são projetados para detectar estímulos intensos ou nocivos, para o sistema nervoso central, especialmente para a medula espinhal (WOOLF, 2000). Este sistema sensorial especializado é encontrado na maioria dos tecidos do corpo, incluindo pele, músculos, articulações e vísceras (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004; BRIDGESTOCK; RAE, 2013).

Os nociceptores correspondem a terminações nervosas livres e representam a parte mais distal dos neurônios sensoriais aferentes, que são neurônios pseudo-unipolares amielinizados (fibras C) ou pouco mielinizados (fibras A δ), cujos corpos celulares são encontrados nos gânglios das raízes dorsais e nos gânglios trigeminais (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004; JULIUS; BASBAUM, 2001; MILLAN, 1999).

As fibras C polimodais são o tipo mais numeroso e respondem a uma diversidade de estímulos nociceptivos mecânicos, térmicos e químicos. Possuem pequeno diâmetro, com velocidade de condução baixa (< 3 m/s), sendo associadas a dor aguda e rápida. Já as fibras A δ apresentam uma maior velocidade de condução (5-30 m/s), geralmente respondem a estímulos nociceptivos mecânicos e térmicos, sendo associadas a dor difusa, geralmente secundária à dor aguda (BRIDGESTOCK; RAE, 2013; JULIUS; BASBAUM, 2001). Outra classe de nociceptores, denominada de “silenciosos” ou “dormentes”, está sendo descrita. Em condições fisiológicas, estes nociceptores não são ativados, tornando-se ativos sob condições inflamatórias (BESSION, 1999; MILLAN, 1999; SERPELL; MAKIN; HARVEY, 1998).

O estímulo nociceptivo ativa os nociceptores, gerando potenciais de ação que são conduzidos pelas fibras dos neurônios sensoriais primários aos neurônios de segunda ordem localizados na medula espinhal (BASBAUM *et al.*, 2009; BRIDGESTOCK; RAE, 2013; MILLAN, 1999; STEEDS, 2013). Os neurônios de segunda ordem ascendem à região cerebral através dos tratos espinotalâmico e espinoreticular, que estão localizados na região ântero-lateral da medula espinhal (GUYTON; HALL, 2002; STEEDS, 2013) e transmitem os impulsos de dor para o tálamo e tronco encefálico, respectivamente. O primeiro trato é particularmente

relevante para a sensação da dor aguda e bem localizada, enquanto que o segundo pode ser mais relevante para dores difusas (BASBAUM *et al.*, 2009).

A partir destas regiões, o impulso nervoso chega às estruturas corticais, onde a dor é percebida (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004; BASBAUM *et al.*, 2009; BRIDGESTOCK E RAE, 2013). A percepção da dor parece ser induzida através da estimulação de um ou mais tipos de canais iônicos periféricos presentes nas fibras nociceptivas, principalmente os canais de sódio e cálcio dependentes de voltagem (DUCHARME, 2000).

Além do processo de transmissão e processamento da dor realizado pelas vias ascendentes, a dor pode ser modulada através das vias descendentes. Este sistema é composto por regiões medulares, como a substância cinzenta periaquedutal e o núcleo magno da rafe; assim como pela região supraespinal. A liberação de endorfinas e encefalinas nessas regiões inibe a criação de potenciais de ação. Assim, estas vias são responsáveis tanto por inibir quanto por facilitar a transmissão nociceptiva, ou seja, estão envolvidas no processo de analgesia endógeno e contraditoriamente, na manutenção da dor crônica (BRIDGESTOCK, RAE, 2013; JULIUS; BASBAUM, 2001; POSSO; ASHMAWI, 2014; STEEDS, 2013).

2.2 INFLAMAÇÃO E DOR INFLAMATÓRIA

A inflamação é um processo que consiste em uma complexa rede de respostas a lesão tecidual e infecção, tendo como característica a presença dos cinco sinais clínicos: rubor, calor, dor, tumor e perda da função (ARMSTRONG; KLICKSTEIN, 2016; TASLEEM *et al.*, 2014). A dor de origem inflamatória é resultado da interação entre o tecido danificado e os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos por meio da participação de mediadores inflamatórios, sendo que alguns destes mediadores sensibilizam apenas a resposta nociceptiva (CHEN; YANG; GROSSER, 2013; FERREIRA *et al.*, 2009). Uma vez que ocorreu um dano tecidual, estes mediadores são liberados a partir do tecido e de células migratórias, levando ao processo da sensibilização neuronal (BASBAUM *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2009; TASLEEM *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2015).

De acordo com a hierarquia temporal de liberação e ação, os mediadores inflamatórios liberados podem ser divididos em dois grupos: os mediadores intermediários e os mediadores finais. Os primeiros são liberados no início e durante a inflamação, sendo responsáveis pela liberação de outros mediadores químicos, enquanto que os últimos agem nos receptores periféricos dos neurônios aferentes primários, modificando-os a nível molecular, com consequente sensibilização (FERREIRA *et al.*, 2009).

As citocinas são as principais representantes dos mediadores intermediários, onde sua presença é de fundamental importância para o fenômeno de dor inflamatória. Dentre as citocinas destacam-se a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α). O TNF- α é responsável pela redução do limiar para a ativação de fibras nervosas periféricas do tipo C relativas a estímulos mecânicos, através de extravasamento de plasma, gerando alodinia mecânica. Já a IL-1 é responsável por liberar as prostaglandinas (PGs), componente dos mediadores finais (BASBAUM *et al.*, 2009; CHEN; YANG; GROSSER, 2013; COSTA *et al.*, 2013). As prostaglandinas (como o PGE₂) são atuantes em determinados receptores, encontrados nas membranas dos neurônios nociceptivos, e sua ativação estimula as vias de sinalização intracelular, levando ao desenvolvimento da sensibilização neuronal (CHEN; YANG; GROSSER, 2013; FERREIRA *et al.*, 2009).

Algumas características específicas dos processos patológicos (como persistência ou resistência) podem levar a cronicidade da dor inflamatória, ocasionando assim, a sensibilização de neurônios centrais ou até de neurônios presentes na percepção da dor, causando uma amplificação no estímulo periférico (FERREIRA *et al.*, 2009).

2.3 CLASSIFICAÇÃO DA DOR

A dor pode ser classificada de acordo com um critério temporal em dor transitória, a qual é provocada pela ativação de nociceptores na pele e em outros tecidos na ausência de qualquer lesão tecidual. Provavelmente, a dor transitória evoluiu para proteger o ser humano dos danos físicos causados pelo ambiente ou

pelo excesso de estresse dos tecidos corporais; sendo assim onipresente na vida cotidiana.

A dor aguda tem uma função protetora, advertindo o ser humano contra uma lesão existente ou iminente ao corpo, provocando respostas que a minimizem. Apresenta início comumente súbito, de fácil localização, relacionada temporalmente à lesão causadora, e deve desaparecer antes mesmo da remoção da causa ou reparo do dano tecidual.

Diferentemente, a dor crônica é comumente desencadeada por uma lesão tecidual ou doença que excede a capacidade do organismo de reverter o quadro, podendo persistir até mesmo após o desaparecimento do trauma inicial. A distinção entre a dor aguda e a crônica não deve ser feita a partir do tempo de duração, mas pela incapacidade do corpo para restaurar suas funções fisiológicas para os níveis homeostáticos normais (FEIN, 2012; LOESER; MELZACK, 1999; SBED, 2016).

2.4 EPIDEMIOLOGIA DA DOR

A dor é um sintoma que cada vez mais está presente na vida do ser humano, resultando muitas vezes na limitação da realização das atividades cotidianas. A ocorrência de dor é crescente, provavelmente devido aos novos hábitos de vida, das modificações ambientais, do prolongamento da sobrevida da população em geral, assim como dos enfermos com afecções clínicas naturalmente fatais, além da diminuição da tolerância ao sofrimento (IASP, 1986; MERSKEY, 1983). Esse sintoma se não for controlado adequadamente resulta numa redução da qualidade de vida, além de estar associado a altos custos econômicos (TEIXEIRA *et al.*, 2001).

A dor aguda, com raríssimas exceções, é de ocorrência universal, representando um grande problema clínico, social e econômico em todas as idades. Uma estimativa da prevalência mensal da dor realizada por Henschke e colaboradores (2015) mostrou uma variação de 1,0% para mais de 60,0%. Além disso, as condições de dor parecem ter um grande impacto negativo na qualidade de vida em comparação com outros problemas de saúde. Na economia, o sintoma da dor gera um impacto enorme, com o custo total estimado em até 3,0% do PIB. O custo anual da dor é maior do que o custo de doença cardíaca ou câncer.

A incidência de dor crônica é de aproximadamente 20% e está associada a um enorme fardo psicológico e social (GREEN, 2013). Na cidade de Salvador - BA, 41,4% da população apresentou dor crônica (SÁ *et al.*, 2008), colocando o Brasil como um dos países mais acometidos por esse problema (HARSTALL; OSPINA, 2003). Além disso, a dor é uma das mais frequentes razões de consultas médicas. No Brasil e em outros países, 10% a 50% dos indivíduos procuram clínicas gerais devido à dor. A dor está presente em mais de 70% dos pacientes que buscam os consultórios brasileiros por motivos diversos, sendo a razão de consultas médicas em um terço dos casos (ROCHA *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 1995). Portanto, a dor é considerada um grave problema de saúde pública, ocasionando sérias implicações socioeconômicas e psicológicas.

2.5 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO PARA DOR

O tratamento ideal da dor deve se basear na identificação e atuação sobre os mecanismos precisos da dor que operam em determinado paciente (GRIFFIN; WOOLF, 2016). Atualmente, existem muitos fármacos que são utilizados no combate a dor, entre eles estão os anti-inflamatórios, opióides, anestésicos locais, antidepressivos e antiepiléticos.

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) estão entre os medicamentos mais prescritos em todo o mundo (BATLOUNI, 2010). Atuam na competição direta com o ácido araquidônico, ligando-se ao sítio da enzima ciclo-oxigenase (COX) e inibindo desse modo a produção de prostaglandinas e tromboxanos, mediadores da resposta inflamatória e hiperalgesia (HEBBES; LAMBERT, 2013; RANG; DALE, 2016).

A COX apresenta duas isoformas comuns: a COX-1 e a COX-2. A COX-1 é uma enzima expressa de forma constante na maioria dos tecidos, inclusive nas plaquetas, estando envolvida, geralmente, em funções de homeostasia tecidual, como citoproteção gástrica, agregação plaquetária e funções pulmonares, do

sistema nervoso central, cardiovasculares e reprodutivas¹ (BATLOUNI, 2010; RANG; DALE, 2016). Em contrapartida, a COX-2 é induzida pelas células inflamatórias, sendo produzida em resposta ao dano tecidual, facilitando assim a resposta inflamatória. (KONETI; JONES, 2013; RANG; DALE, 2016).

Estudos tem demonstrado a existência de outra isoforma da ciclo-oxigenase. A COX-3, possivelmente uma variante da COX-1, é encontrada principalmente no córtex cerebral, medula espinhal e coração, tendo função semelhante à COX-2 na produção de prostaglandinas no processo inflamatório (BERENBAUM, 2004; CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002).

Assim, a inibição da síntese de prostaglandinas produz analgesia, uma vez que a liberação desses mediadores inflamatórios sensibiliza os receptores nociceptivos, com consequente diminuição do limiar nociceptivo e aumento da capacidade de resposta à dor.

Os opióides, potentes analgésicos de ação central e periférica, são a base do tratamento de dor de intensidade moderada a forte. Produzem analgesia por meio de sua ação sobre os receptores opióides μ . Entretanto, estes podem provocar graves efeitos adversos, como sonolência, constipação e depressão respiratória, podendo levar a tolerância e dependência (GRIFFIN; WOOLF, 2016; POSSO; ASHMAWI, 2014).

Os anestésicos locais atuam no bloqueio dos canais de sódio, impedindo o início e propagação dos potenciais de ação dos nociceptores (GRIFFIN; WOOLF, 2016; RANG; DALE, 2016). Assim, o processo de transmissão do impulso nervoso é inibido. A toxicidade ocorre após administração de uma dose incorretamente calculada, injeção intravenosa acidental ou absorção rápida de uma dose normalmente segura, podendo ser local ou sistêmica e afetando os sistemas nervoso central ou cardiovascular. (BARANIDHARAN; BRIGGS, 2017; KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008; RANG; DALE, 2016).

Outras classes de fármacos que são utilizados para fins analgésicos, como tratamento adjuvante no manejo da dor, sobretudo para as condições de dor crônica, são os antidepressivos tricíclicos e antiepiléticos. Acredita-se que os antidepressivos tricíclicos, como a amitriptilina, nortriptilina e imipramina, produzem analgesia

¹ Devido a produção de prostaglandinas nestes órgãos, a inibição da COX-1 pelos AINEs causa graves efeitos colaterais, em especial aos idosos, que são mais vulneráveis; e as pessoas que fazem uso por um tempo prolongado (RANG; DALE, 2016).

através do bloqueio dos canais de sódio e do aumento da atividade das projeções noradrenérgicas e serotoninérgicas antinociceptivas que descem do cérebro para a medula espinhal. Enquanto isso, os antiepiléticos, como a gabapentina, liga-se à subunidade $\alpha 2\delta$ dos canais de cálcio dependentes de voltagem; e a carbamazepina atua através do bloqueio dos canais de sódio, inibindo assim a transmissão da dor. Ambas as classes de fármacos geram efeitos adversos como tontura, sonolência, confusão, ataxia, náusea, vômito, visão turva, dentre outros. (GRIFFIN; WOOLF, 2016; MILES; ROTH, 2016).

2.6 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTES DE FÁRMACOS

A utilização dos produtos naturais como recurso terapêutico é tão antiga quanto à civilização humana e, por muito tempo, produtos minerais, vegetais e animais constituíram o arsenal terapêutico (RATES, 2001). Ao longo dos anos, cerca de 80% dos medicamentos produzidos foram derivados diretamente ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais. Dados ressaltam que dentre os novos medicamentos introduzidos entre 1981 e 2002, 28% dos 868 novos compostos químicos eram produtos naturais ou derivados de produtos naturais. (HARVEY, 2007).

Entretanto, a indústria farmacêutica vem sofrendo com a queda da produtividade da pesquisa e desenvolvimento, expressa através da redução do número de novas moléculas registradas anualmente. Este fenômeno pode ser explicado devido à mudança das metodologias empregadas para descoberta de novos fármacos utilizando a química combinatória, em detrimento do uso dos compostos naturais (PIMENTEL *et al.*, 2015).

O aprimoramento mútuo de ambas as técnicas tem sido uma opção para melhorar o desenvolvimento de novos fármacos. Os produtos naturais podem ser usados como modelos para a química combinatória, estabelecendo o elo entre sua conformação espacial e a habilidade da química combinatória de gerar um grande número de análogos. Mais recentemente, as bibliotecas obtidas por meio da química combinatória têm sido alteradas, na tentativa de imitar as características estruturais dos produtos naturais (KINGSTON, 2011; PIMENTEL *et al.*, 2015).

A biodiversidade do Brasil é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas. Estimativas apontam que o país hospeda entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial, sendo classificado como o maior do planeta em número de espécies (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Devido à presença desta riqueza biológica, o interesse em associar o estudo dos produtos naturais às técnicas modernas de *screening* de drogas, vem sendo explorada extensivamente pelos pesquisadores brasileiros e indústria farmacêutica, interessada em desenvolver novos medicamentos (CALIXTO; SIQUEIRA JUNIOR, 2008; PIMENTEL *et al.*, 2015).

Até a descoberta da penicilina em 1928, a maioria das drogas era obtida através de plantas. O sucesso na utilização da penicilina como antibacteriano foi o ponto prioritário no interesse do setor farmacêutico na utilização dos micro-organismos para o desenvolvimento de novos fármacos, tendo os fungos e leveduras um importante papel nesta descoberta (BARREIRO; BOLZANI, 2009; CALIXTO; SIQUEIRA JUNIOR, 2008; SINGH; BARRETT, 2006).

Os micro-organismos apresentam diversas substâncias bioativas, sendo matérias-primas de uma gama de antibióticos incluindo as penicilinas, cefalosporinas, cloranfenicol, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrólidos, glicopéptidos e estreptograminas (SINGH; BARRETT, 2006). Além disso, metabólitos oriundos de micro-organismos são comercializados para diferentes fins terapêuticos como: agentes anticancerígenos (daunorubicina e doxorubicina); agentes anti-helmínticos (ivermectina-B1), vasoconstritores (ergotamina), agentes redutores do colesterol (orlistat e mevastatina), dentre outros (BARREIRO; BOLZANI, 2009; BUTLER, 2005; LAM, 2007).

2.6.1 Potencial biotecnológico das leveduras

A biotecnologia consiste no uso de sistemas celulares para desenvolvimento de processos e produtos de interesse econômico ou social. Entre os sistemas celulares, os fungos são de grande interesse biotecnológico. (SILVA; MALTA, 2016 apud AZEVEDO, 2011).

Os fungos são micro-organismos eucariontes, heterotróficos, unicelulares ou pluricelulares que conseguem obter sua energia pela ruptura de moléculas orgânicas, podendo ocupar vários nichos ecológicos, atuando como parasitas, sapróbios ou ainda estabelecendo relações simbióticas. Dentre a divisão dos fungos, as leveduras apresentam um importante potencial biotecnológico. A utilização desses micro-organismos para diversas finalidades pode ser através do seu material celular (biomassa) ou das macromoléculas isoladas (FUKUDA *et al.*, 2009; MAIA; CARVALHO JUNIOR, 2010; SILVA *et al.*, 2006).

Existe uma grande tendência em se explorar comercialmente a biomassa de fungos e leveduras, uma vez que estes micro-organismos apresentam uma grande quantidade de polissacarídeos (glucanas, mananas e galactanas), que são substâncias possuintes de atividade biológica e de interesse biotecnológico tendo, conseqüentemente, um grande valor agregado (FUKUDA *et al.*, 2009). As propriedades físicas e fisiológicas dos polissacarídeos são determinadas pelas diferenças químicas tais como: tipo de ligação glicosídica, grau de ramificação e composição monossacarídica (BARBOSA *et al.*, 2004).

Os exopolissacarídeos (EPS) são macromoléculas extracelulares, produzidos por alguns fungos e bactérias, sendo encontrados ligados à superfície celular ou são excretados para o meio extracelular. São constituídas por longas e ramificadas cadeias de unidades repetidas de carboidratos e outros constituintes e são produzidas em condição de estresse do micro-organismo, representando assim uma estratégia metabólica para sua sobrevivência e crescimento. A presença do EPS nos fungos é alta, formando uma importante porcentagem da biomassa, participando como mais de 75% dos polissacarídeos constituintes da parede da hifa (ANDRADE *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2004).

Diversos estudos a partir de experimentos *in vitro* e *in vivo* mostraram algumas propriedades biológicas de polissacarídeos extraídos de fungos, como por exemplo: atividade antitumoral (ZHANG *et al.*, 2011; REN; PERERA; HEMAR, 2012), antioxidante (LIU *et al.*, 2014, NANDI *et al.*, 2014), anti-inflamatória (GUERRA DORE *et al.*, 2007; SMIDERLE *et al.*, 2008; RUTHES *et al.*, 2013a,b), antinociceptiva (SMIDERLE *et al.*, 2008; RUTHES *et al.*, 2013b) e imunomoduladora (LULL; WICHERS; SAVELKOUL, 2005; ROY *et al.*, 2009; SMIDERLE *et al.*, 2013).

Pesquisas recentes apontam atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de polissacarídeos presentes em fungos. O composto (1→3) (1→6) β-glucana isolado

de *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel. apresentou atividade antinociceptiva, inibindo receptores ionotrópicos de glutamato e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β), responsáveis por desencadear a dor aguda e manter a dor crônica (BAGGIO *et al.*, 2010). Ruthes e colaboradores (2013a) isolaram dois polissacarídeos a partir dos corpos de frutificação da *Amanita muscaria* e estes foram avaliados quanto aos seus potenciais efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios, produzindo uma potente inibição de dor inflamatória.

Outro estudo mostrou que a fração de polissacarídeos sulfatados (PLS) extraída das algas vermelhas marinhas da espécie *Agardhiella ramosissima* também possui atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias, podendo eventualmente atuar através da inibição de mediadores inflamatórios (BATISTA *et al.*, 2014). Valasques Junior e colaboradores (2014) mostraram que o polissacarídeo (1 \rightarrow 3)- β -D-glucana isolado da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* demonstrou atividade antinociceptiva periférica, provavelmente através da inibição de mediadores inflamatórios.

Dentre a grande variedade de fungos encontradas no solo do semiárido da Bahia, pode-se destacar a levedura *Rhodotorula oryziicola*. Na literatura atual, há poucos relatos de pesquisa com esta espécie. Devido a sua composição química rica em polissacarídeos, existe um grande interesse biotecnológico na exploração dos compostos presentes, assim como explorar a microbiota do semiárido baiano. Por isso, devido à busca de novas opções terapêuticas para o tratamento da dor, investigou-se a atividade antinociceptiva do polissacarídeo obtido a partir da *R. oryziicola*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar, *in vivo*, o potencial antinociceptivo do polissacarídeo obtido a partir da levedura *Rhodotorula oryzoicola*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, através de ensaios farmacológicos, a atividade antinociceptiva do polissacarídeo em modelos de dor, comparando com analgésicos clássicos;
- Verificar se a atividade antinociceptiva do polissacarídeo decorre de ação central e/ou periférica;
- Investigar as possíveis interferências do polissacarídeo na atividade motora dos animais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO POLISSACARÍDEO A PARTIR DA LEVEDURA *Rhodotorula oryzzicola*

A levedura *Rhodotorula oryzzicola* foi utilizada e esta é pertencente à Coleção de Micro-organismos do Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações (LAEN). Inicialmente a levedura foi inoculada em placas contendo meio de cultura Agar YM, onde foram incubadas em temperatura de 28 °C (± 1) por 24 horas. Este procedimento foi repetido por três vezes consecutivas, com o objetivo de reativar o metabolismo celular. Após reativação celular, foi realizado o cultivo da *R. oryzzicola* em 100 mL do meio líquido YM (Extrato de levedura: 3,2 g/L, Extrato de malte: 3,0 g/L, Peptona de carne: 5,0 g/L, Glicose: 10,0 g/L, K₂HPO₄: 2,0 g/L, MgSO₄: 2,7 g/L, KH₂PO₄: 13,62 g/L), utilizando inóculos que foram padronizados em solução salina estéril (0,45%) e continham em média $3,28 \times 10^7$ UFC/mL da levedura. Este cultivo foi incubado em um agitador rotativo (100 rpm, 28 °C) por 5 dias.

Após o processo fermentativo, o caldo obtido foi centrifugado (Centrífuga 5804R - Eppendorf, São Paulo, Brasil) em 10.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Na biomassa gerada foi adicionado 10 volumes de NaOH (0,1 M). Após este procedimento, otimizou-se a produção do polissacarídeo seguindo o modelo experimental Doehlert (ANEXO A). A análise estatística foi realizada utilizando o software Statistica®version 7.

A caracterização estrutural do polissacarídeo estudado foi realizada através da técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de acordo com a metodologia descrita por Valasques Junior e colaboradores (2014). (ANEXO B)

4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Todo o protocolo experimental foi realizado utilizando camundongos machos Swiss Webster (20 a 30 g) adquiridos do biotério da Universidade Estadual de Feira

de Santana (UEFS), sob condições de temperatura constante (22 ± 1 °C), ciclo claro/escuro de 12 horas e acesso à água e ração *ad libitum*.

A pesquisa foi submetida e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEFS) sob protocolo nº 06/2013. Todos os procedimentos de uso, manejo e acondicionamento dos animais foram realizados seguindo o protocolo da IASP para estudos da dor em animais experimentais (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais e a intensidade dos estímulos foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos.

4.3 DROGAS E DILUENTES

As drogas foram adquiridas da Sigma® (Adjuvante completo de Freund); Casa da Química® (ácido acético); QEEL® (formol); Cristália® (morfina); Hipolabor® (diazepam). Todas as drogas foram dissolvidas em solução salina fisiológica.

4.4 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

4.4.1 Modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

Inicialmente os animais foram separados em grupos ($n = 6$) e a realização do pré-tratamento foi feita, utilizando morfina (5 mg/kg s.c.; diluída em solução salina), como controle positivo; solução salina (10 mL/kg i.p.) como controle negativo e o polissacarídeo (3, 9 e 27 mg/kg i.p.).

O modelo consiste na injeção de ácido acético (0,8%, 10 mL/kg) na região intraperitoneal dos camundongos após 30 minutos (ou 40 minutos, no caso da morfina) da aplicação do pré-tratamento. A intensidade do comportamento nociceptivo foi quantificada através da contagem do número de contorções (rotação do corpo com o estiramento de uma ou ambas as patas traseiras) que ocorreram

entre 0 e 30 minutos após a injeção do estímulo nocivo (COLLIER *et al.*, 1968) (Figura 1).



Figura 1: Avaliação do comportamento nociceptivo através do modelo de contorções induzidas por ácido acético.

4.4.2 Teste de formalina

Inicialmente os animais foram separados em grupos ($n = 6$) e foram colocados em caixas espelhadas por 10 minutos para ambientação. A realização do pré-tratamento foi feita, utilizando morfina (5 mg/kg s.c.; diluída em solução salina), como controle positivo; solução salina (10 mL/kg i.p.) como controle negativo e o polissacarídeo (3, 9 e 27 mg/kg i.p.) O teste consiste na administração subcutânea de formalina (2,5%, 20 μ L por pata) na pata traseira direita, após 30 minutos (ou 40 minutos, no caso da morfina) da aplicação do pré-tratamento, e logo após, os animais retornam às caixas espelhadas (Figura 2). Os camundongos são observados de 0 a 5 minutos (fase inicial) e de 15 a 30 minutos (fase tardia). O nível

de nocicepção foi determinado pela contagem do tempo que o animal permanece lambendo ou mordendo a pata ou realizando *flinchs* durante o tempo de observação (DUBUISSON; DENNIS, 1977).



Figura 2: Avaliação do comportamento nociceptivo através da administração de formalina (2,5%).

4.4.3 Hipernocicepção mecânica induzida pelo adjuvante completo de Freund (CFA)

A avaliação da hipernocicepção mecânica induzida pelo adjuvante completo de Freund (CFA) foi realizada utilizando o Von Frey eletrônico. Primeiramente, os grupos de camundongos separados ($n = 6$) foram colocados em caixas de acrílico com pavimento de metal na forma de grade vazada por 20 minutos (Figura 3) para ambientação. Os animais foram pré-tratados com o controle positivo, morfina (5 mg/kg s.c.; diluída em solução salina), o controle negativo, salina (10 mL/kg i.p.) e o polissacarídeo nas doses de 9, 27 e 81 mg/kg (i.p.). Depois, os mesmos receberam 10 μ L (i.pl.) do CFA na superfície plantar da pata direita traseira, após 30 minutos (ou 40 minutos, no caso da morfina) da aplicação do pré-tratamento. As análises foram realizadas no limiar nociceptivo anterior ao pré-tratamento (basal) e nos

tempos de 1, 2, 4, 6 e 24 horas após a aplicação do CFA (Figura 3). (QUINTÃO *et al.*, 2005).

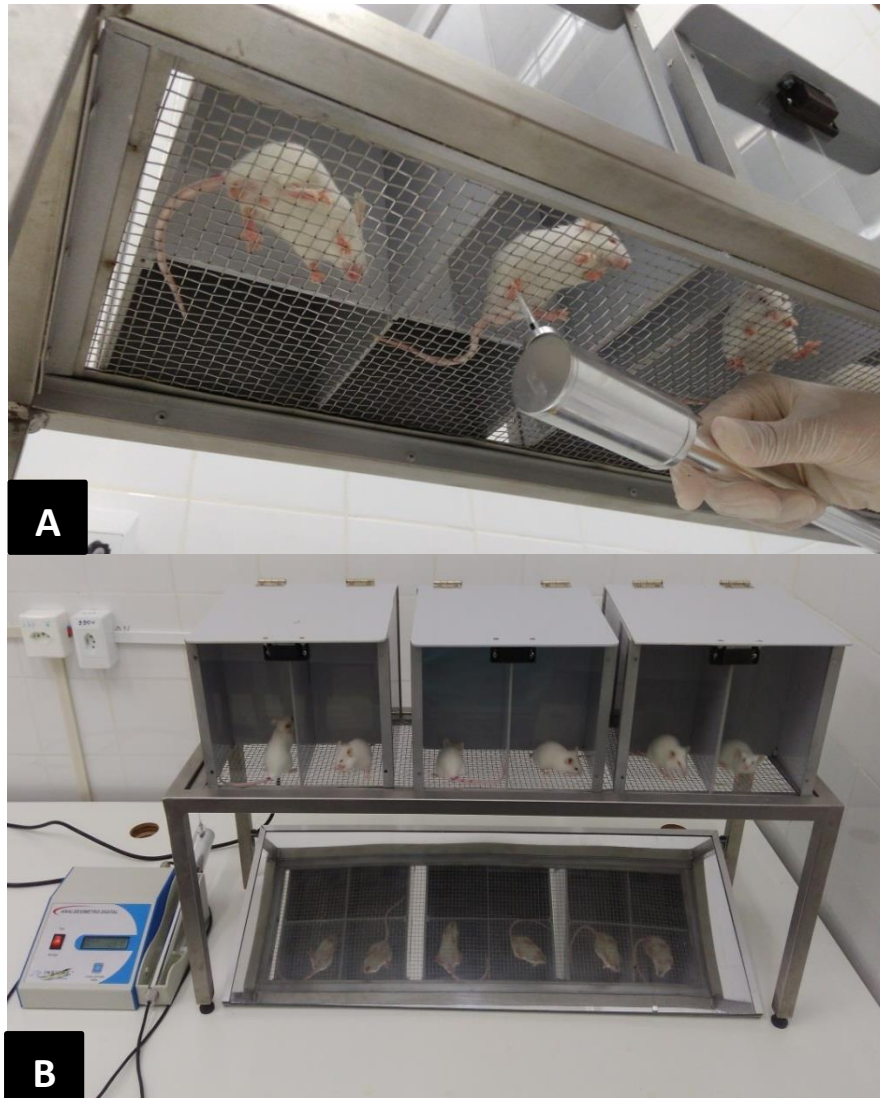


Figura 3: Avaliação do comportamento hipernociceptivo induzido pelo CFA (A) utilizando o aparelho do Von Frey eletrônico (B).

4.4.4 Teste de retirada da cauda (Tail Flick)

O teste de retirada de cauda em camundongos foi realizado como descrito por Sewell e Spencer (1976), com algumas modificações. Grupos de camundongos ($n = 6$) foram ambientados em cilindros de contenção durante 5 dias consecutivos (20 minutos/dia). Com o objetivo de medir a latência da retirada da cauda, no quinto dia,

os animais foram recolocados nos cilindros, onde a ponta da cauda (2 cm da extremidade) ficou imersa em um banho de água com temperatura de 48 °C ($\pm 0,5$ °C). (Figura 4). O pré-tratamento dos animais consistiu na administração do controle positivo (morfina 5 mg/kg s.c.; diluída em solução salina), controle negativo (salina 10 mL/kg i.p.) e o polissacarídeo (9, 27 e 81 mg/kg i.p.). O limiar nociceptivo anterior ao pré-tratamento (basal)² e nos tempos de 30 minutos, 1, 3 e 5 horas foi mensurado a partir do movimento brusco de retirada da cauda, sendo estabelecido um tempo de corte de 10 segundos para minimizar a probabilidade de dano tecidual. A atividade antinociceptiva foi quantificada pelo aumento do Índice de Antinocicepção (IA) de cada animal, calculada pela fórmula:

Índice de Antinocicepção = $[(\text{latência do teste} - \text{latência do basal}) / 10 - \text{latência do basal}] \times 100$



Figura 4: Avaliação do comportamento nociceptivo através do teste de retirada de cauda.

² A mensuração do basal foi realizada durante dois dias: no dia anterior ao teste e antes da administração das drogas.

4.4.5 Teste do campo aberto (Open Field)

Para avaliar possíveis alterações no comportamento motor, exploratório e hiperatividade, os camundongos foram submetidos ao teste de campo aberto (HALL, 1934). Grupos de animais (n= 6) foram tratados com o benzodiazepínico diazepam (10 mg/kg i.p.; diluído em solução salina), sendo o controle positivo; salina (10 mL/kg i.p.), como controle negativo e o polissacarídeo (81 mg/kg i.p.). Um aparato de acrílico medindo 50 cm X 60 cm X 45 cm, com demarcação de 12 quadrados foi utilizado para observar o comportamento dos animais após o tratamento. Os animais foram colocados sempre no mesmo quadrado quando o teste era iniciado, e então, foi contado o número de quadrados percorridos com as quatro patas (CAPAZ *et al.*, 1981) no tempo de 180 segundos (Figura 5). O resultado final foi expresso em média da quantidade de quadrados percorridos por animal.

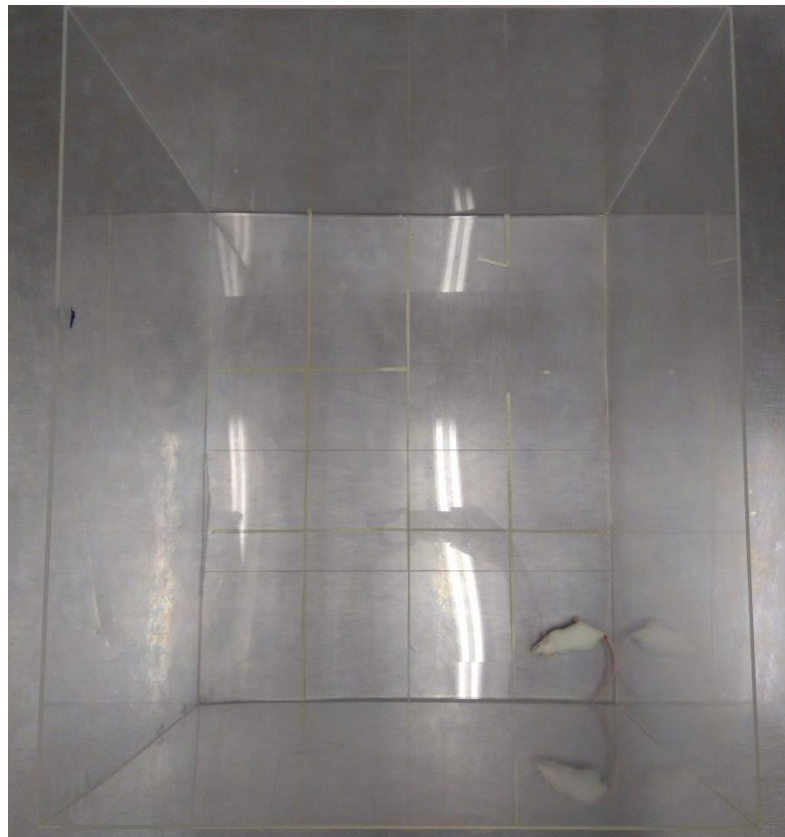


Figura 5: Avaliação do comportamento exploratório através do teste do campo aberto.

4.4.6 Teste do cilindro giratório (Rota Rod)

Para este teste, foi utilizado o aparelho de rota rod regulado para o modo constante (16 rpm) como descrito por Kuribara *et al.*, 1977. O aparelho consiste de um cilindro que gira à velocidade constante. Para manter-se no cilindro, é preciso que o animal se locomova e a capacidade locomotora é então quantificada pelo registro do tempo de permanência no aparelho. O teste foi iniciado no dia anterior ao experimento, para habituação e aprendizado, sendo selecionados aqueles capazes de permanecer no cilindro durante 120 segundos, por três tentativas. A partir disto, os animais foram tratados com o diazepam (10 mg/kg i.p.; diluído em solução salina), sendo o controle negativo; salina (10 mL/kg i.p.) e o polissacarídeo (81 mg/kg i.p.). A contagem do tempo de permanência no aparelho de rota rod foi feita até 120 segundos (Figura 6).



Figura 6: Avaliação do comportamento motor no teste do cilindro giratório.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados utilizando o GraphPadPrism versão 5.01 (GraphPad Inc., San Diego, CA) e representados como média \pm erro padrão da média (EPM) de medidas feitas com 6 animais por grupo, sendo os grupos experimentais comparados pelo teste one-way ANOVA, seguido do teste Bonferroni. Em estudos de medidas repetidas foi utilizado o teste two-way ANOVA, seguido do teste Bonferroni. Em todos os testes, o nível de significância considerado foi no valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

5.1.1 Efeito do pré-tratamento com o polissacarídeo no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

A atividade antinociceptiva do polissacarídeo foi primeiramente avaliada pelo modelo de contorções. A administração intraperitoneal (i.p.) do polissacarídeo nas doses de 9 e 27 mg/kg, 30 minutos antes da injeção de ácido acético, produziu uma inibição significativa do número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético ($p < 0,05$ e $p < 0,0001$). A morfina (5 mg/kg s.c.), utilizada como controle positivo, obteve também um resultado significativo ($p < 0,0001$) na inibição do número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (Figura 7).

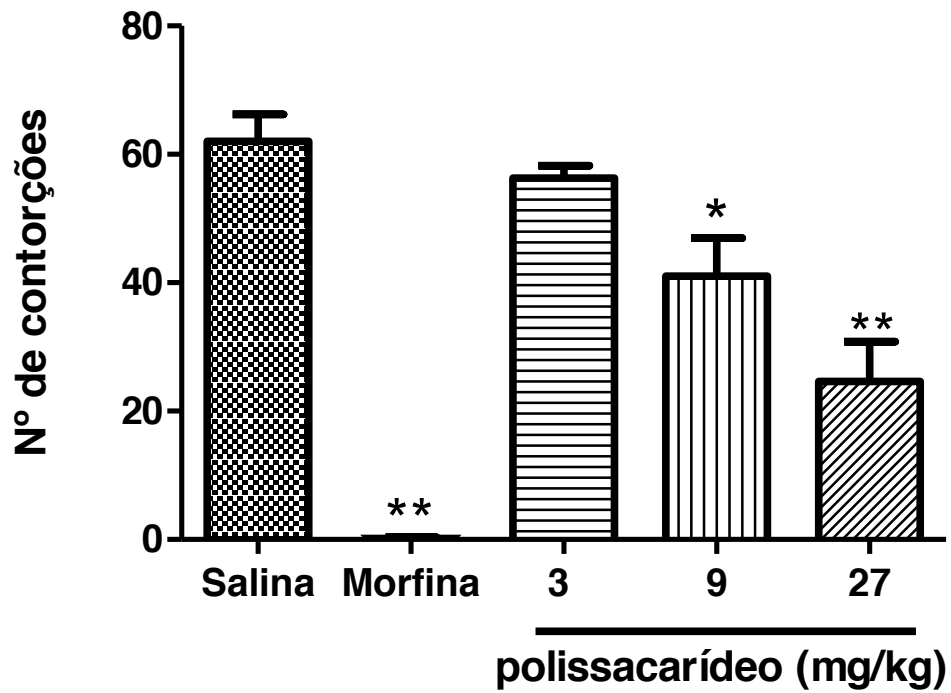


Figura 7: Efeitos do tratamento com o polissacarídeo no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.

Camundongos foram tratados inicialmente com o polissacarídeo (3-27 mg/kg) ou salina por via intraperitoneal 30 minutos antes da aplicação do ácido acético a 0,8%. Morfina (5 mg/kg s.c.) foi o fármaco padrão. Dados foram expressos como médias \pm E.P.M.; n=6 camundongos por grupo. *Significativamente diferente em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$), **Significativamente diferente em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,0001$) foi determinada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni.

5.1.2 Efeito do pré-tratamento com o polissacarídeo no teste de formalina

A propriedade antinociceptiva do polissacarídeo foi confirmada com o teste de formalina. A injeção de formalina nos animais provoca uma resposta com duas fases, sendo a primeira uma fase inicial de 0 a 5 minutos e uma segunda fase tardia de 15 a 30 minutos após a injeção (HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985). O pré-tratamento com o polissacarídeo (27 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da administração de formalina causou inibição do comportamento nociceptivo induzido por formalina ($p < 0,05$) na fase tardia, porém não na fase inicial (Figura 8). A morfina (5 mg/kg s.c.), o fármaco de referência, causou efeito antinociceptivo em ambas as fases do teste de formalina ($p < 0,0001$).

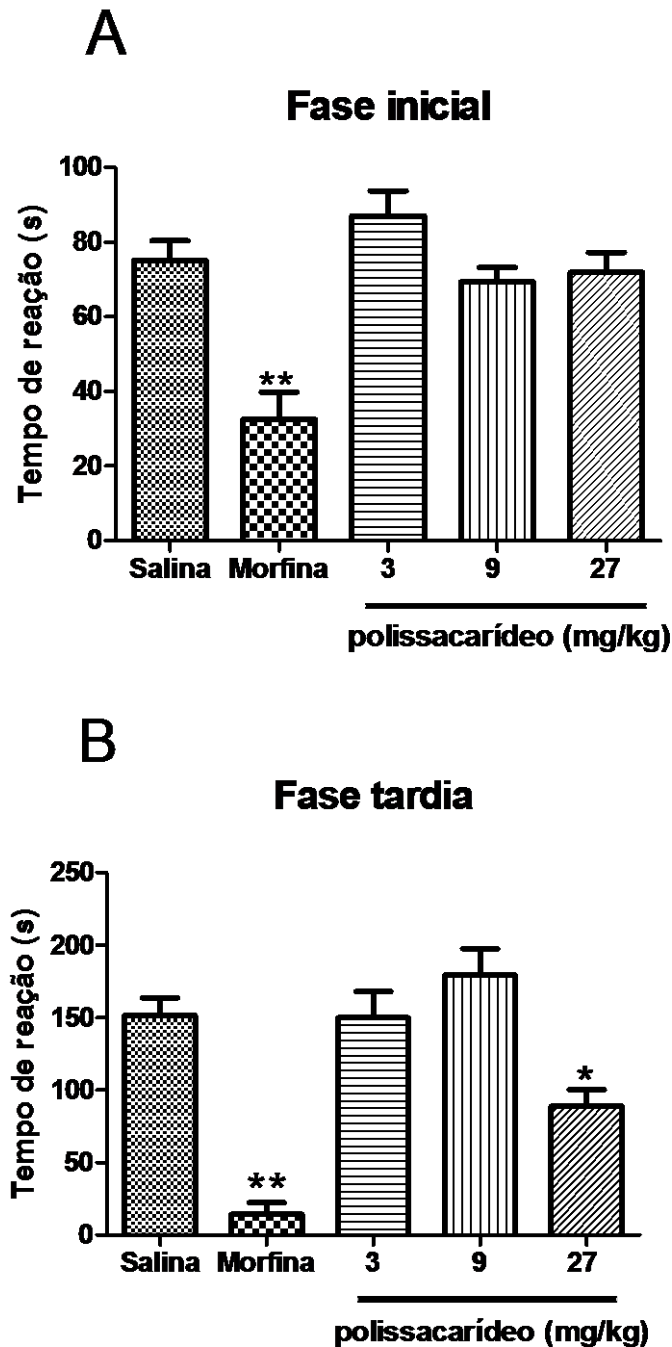


Figura 8: Efeitos do tratamento com o polissacarídeo sobre a nociceção induzida por formalina em camundongos.

Camundongos foram tratados inicialmente com o polissacarídeo (3-27 mg/kg) ou salina por via intraperitoneal 30 minutos antes da aplicação da formalina a 2,5%. Morfina (5 mg/kg s.c.) foi o fármaco padrão. (A) – Resposta da fase inicial (0-5 min); (B) – Resposta da fase tardia (15-30 min). Dados foram expressos como médias \pm E.P.M.; n=6 camundongos por grupo. *Significativamente diferente em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$), **Significativamente diferente em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,0001$) foi determinada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni.

5.1.3 Efeito do pré-tratamento com o polissacarídeo na hipernocicepção mecânica induzida pelo adjuvante complexo de Freund (CFA)

Neste modelo, a injeção do CFA consegue induzir uma resposta inflamatória persistente, onde o limiar mecânico produzido pelo tratamento com o polissacarídeo é mensurado através do Von Frey eletrônico. Os animais que foram pré-tratados com o polissacarídeo nas doses de 27 e 81 mg/kg aumentaram significativamente o limiar nociceptivo em relação ao grupo controle negativo após a 1^a e 2^a horas da aplicação do CFA ($p < 0,0001$), resultado semelhante ao apresentado pela droga de referência utilizada (morfina; 5 mg/kg s.c.). A dose de 81 mg/kg conseguiu estender o aumento antinociceptivo até a 4^a hora ($p < 0,01$). Entretanto, a dose de 9 mg/kg não inibiu a hipernocicepção em relação ao controle negativo (Figura 9).

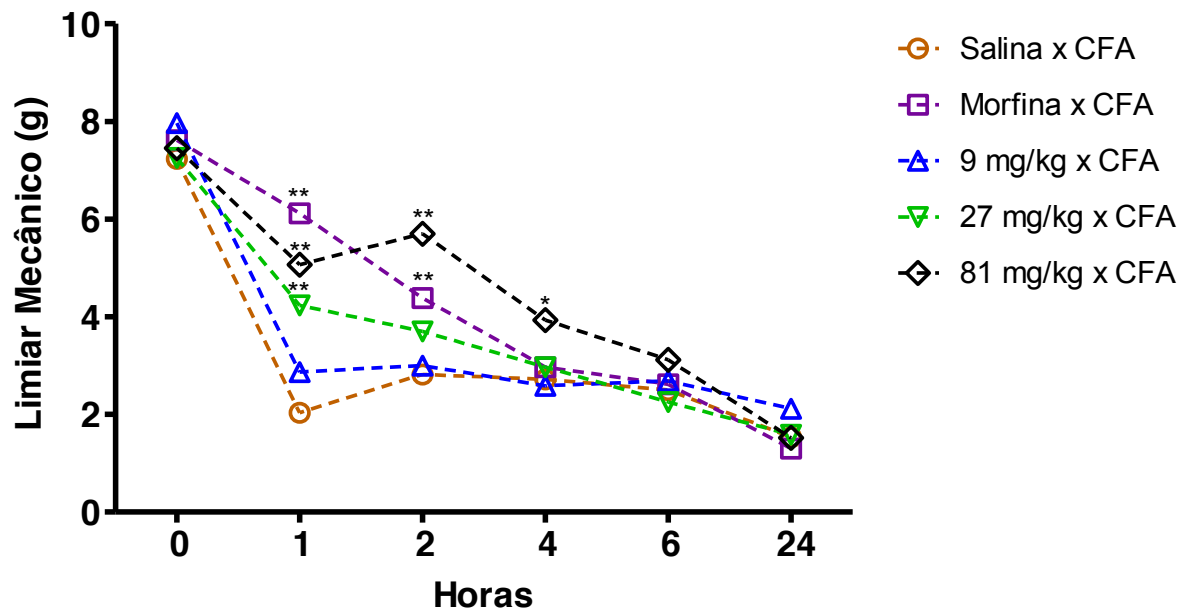


Figura 9: Efeitos do tratamento com o polissacarídeo sobre a hipernocicepção mecânica induzida por CFA em camundongos.

Camundongos foram tratados inicialmente com o polissacarídeo (9-81 mg/kg) ou salina por via intraperitoneal 30 minutos antes da aplicação do CFA. Morfina (5 mg/kg s.c.) foi o fármaco padrão. Dados foram expressos como médias \pm E.P.M.; n= 6 camundongos por grupo. *Significativamente diferente em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,01$), **Significativamente diferente em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,0001$) foi determinada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni.

5.1.4 Efeito do pré-tratamento com o polissacarídeo no teste de retirada da cauda

Este teste teve por finalidade avaliar um possível efeito antinociceptivo central do polissacarídeo. O pré-tratamento em todas as doses proporcionou uma capacidade de alterar o tempo de latência de resposta ao estímulo térmico no teste de imersão da cauda em relação ao controle negativo, sendo que as doses de 9 e 27 mg/kg apresentaram inibição no tempo de 0,5 horas ($p < 0,01$) e as doses de 27 e 81 mg/kg inibiram no tempo de 1 hora ($p < 0,05$). O mesmo foi observado em relação ao fármaco padrão, a morfina (5 mg/kg s.c.), onde também houve um aumento significativo no tempo de latência de 0,5 e 1 hora após a administração ($p < 0,001$). (Figura 10).

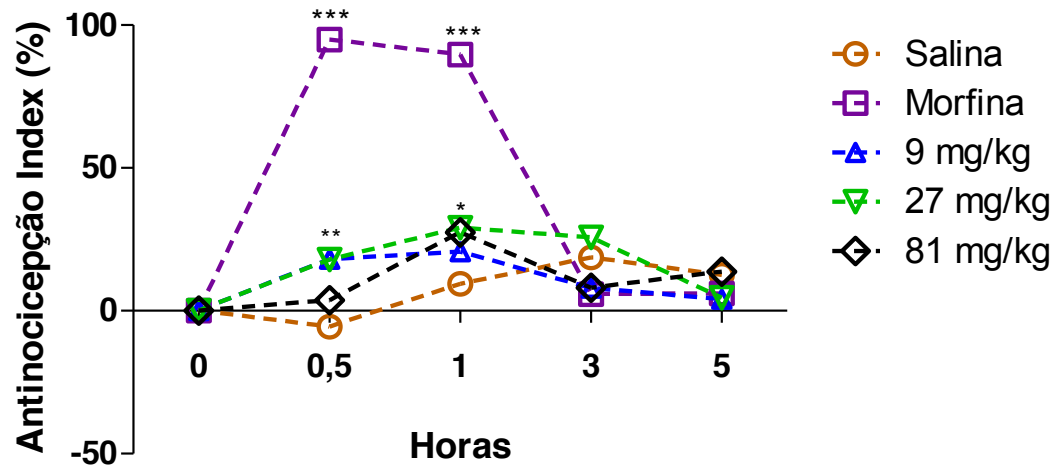


Figura 10: Efeitos do tratamento com o polissacarídeo no teste da retirada da cauda em camundongos.

Camundongos foram tratados inicialmente com o polissacarídeo (9-81 mg/kg) ou salina por via intraperitoneal 30 minutos antes do da imersão da cauda em um estímulo térmico. Morfina (5 mg/kg s.c.) foi o fármaco padrão. Dados foram expressos como médias \pm E.P.M.; n= 6 camundongos por grupo. *Significativamente diferente em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$), **Significativamente diferente em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,01$), ***Significativamente diferente em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,001$) foi determinada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni.

5.1.5 Efeito do pré-tratamento com o polissacarídeo no teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi realizado para avaliar possíveis alterações no sistema locomotor e capacidade exploratória dos animais após o pré-tratamento com o polissacarídeo. A administração via intraperitoneal do polissacarídeo (81 mg/kg) não alterou de forma significativa a quantidade de quadrados percorridos em relação ao grupo controle, tratado com salina. Entretanto, houve alteração significativa ($p < 0,05$) no grupo tratado com o diazepam (10 mg/kg i.p.; diluído em solução salina). (Figura 11).

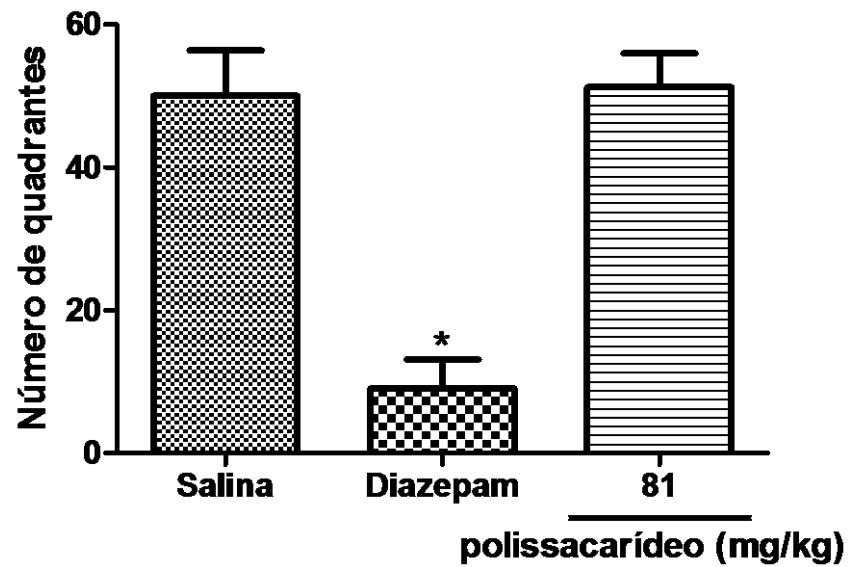


Figura 11: Efeitos do tratamento com o polissacarídeo no teste do campo aberto em camundongos.

Camundongos foram tratados inicialmente com o polissacarídeo (81 mg/kg) ou salina por via intraperitoneal. Diazepam (10 mg/kg i.p.; diluído em solução salina) foi o fármaco padrão. Dados foram expressos como médias \pm E.P.M.; n= 6 camundongos por grupo. *Significativamente diferente em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$) foi determinada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni.

5.1.6 Efeito do pré-tratamento com o polissacarídeo no teste do cilindro giratório

Assim como no teste anterior, a função motora dos camundongos foi avaliada a partir do tempo de permanência no cilindro giratório após a administração do polissacarídeo na maior dose utilizada nos testes comportamentais nociceptivos (81 mg/kg i.p.). Em relação ao controle negativo, tratado com salina, a administração do polissacarídeo não alterou de forma significativa o tempo de permanência dos camundongos no cilindro. Diferentemente, no controle negativo (diazepam, 10 mg/kg i.p.; diluído em solução salina) foi possível observar uma redução expressiva no tempo de permanência dos animais no cilindro giratório ($p < 0,05$) (Figura 12).

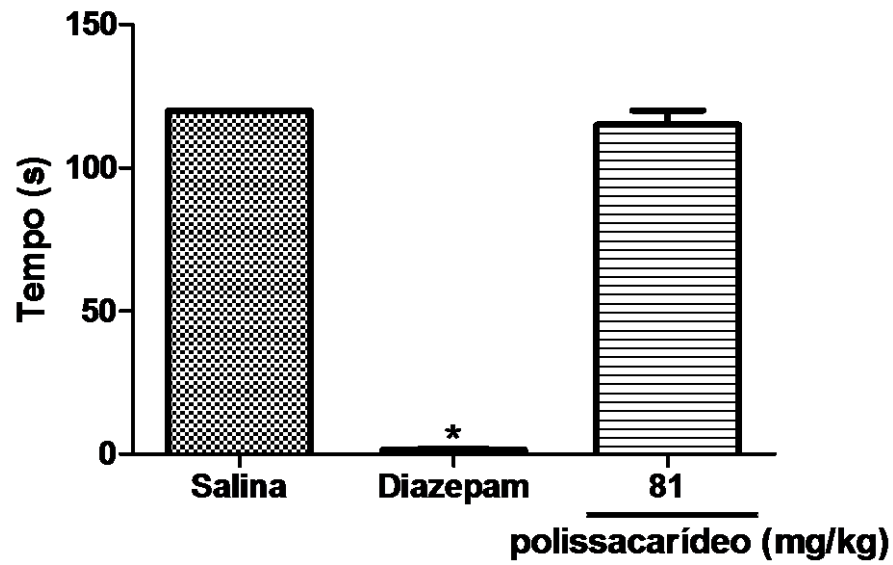


Figure 12: Efeitos do tratamento com o polissacarídeo no teste do cilindro giratório em camundongos.

Camundongos foram tratados inicialmente com o polissacarídeo (81 mg/kg) ou salina por via intraperitoneal. Diazepam (10 mg/kg i.p.; diluído em solução salina) foi o fármaco padrão. Dados foram expressos como médias \pm E.P.M.; $n=6$ camundongos por grupo. *Significativamente diferente em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$) foi determinada por one-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni.

6 DISCUSSÃO

As propriedades farmacológicas dos polissacarídeos estão estreitamente relacionadas com algumas características químicas e estruturais, como configuração anomérica (α ou β), conformação (linear, ramificada, helicoidal, agregação entre cadeias), tipo de monômero, posição das ligações glicosídicas, dentre outros. Assim sendo, a caracterização química (ANEXO B) é de fundamental importância para elucidar o mecanismo de ação da substância em estudo. (SILVA *et al.*, 2006).

Muitos estudos têm sido realizados para o conhecimento da composição química da parede celular de inúmeras leveduras e consequente atividade farmacológica. A literatura relata que as mananas de leveduras são constituídas principalmente por manoses, porém podem conter resíduos de glicose, galactose e xilose (KRIZKOVÁ *et al.*, 2001). Zhang e colaboradores (2007) mostraram que manoglucanas, galactomananas, e glucomananas, obtidas da biomassa de basidiomicetos, tais como *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa* e diferentes espécies do gênero *Pleurotus*, como *P. cittinopileatus*, podem apresentar atividades antitumorais ou imunomoduladoras.

Além disso, uma pesquisa realizada por Krizková e colaboradores (2001) mostrou que a manana extraída da parede celular das leveduras *Candida utilis*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* possui atividade antimutagênica e antioxidante. Já Valasques Junior e colaboradores (2014) mostraram que o plissacarídeo (1 \rightarrow 3)- β -D-glucana, extraído da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* apresentou um grande efeito antinociceptivo periférico, possibilitando a inibição de mediadores inflamatórios.

A utilização de modelos experimentais é de essencial importância para o entendimento do processo da dor, assim como para a descoberta de novos fármacos para este sintoma que está presente em tantas enfermidades (SILVA *et al.*, 2013). Nesta conjuntura, o efeito antinociceptivo do polissacarídeo obtido a partir da levedura *Rhodotorula oryziicola* foi avaliado, primeiramente, pelo modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, em camundongos.

O modelo químico de contorções abdominais consiste na contagem das contorções na região peritoneal seguidas da torção do tronco e extensão dos membros posteriores, como uma resposta reflexa à irritação peritoneal produzida

pela injeção intraperitoneal de uma solução de ácido acético a 0,8%. Esta substância induz nocicepção devido à estimulação direta de nervos terminais, além de provocar, indiretamente, a liberação de uma série de mediadores endógenos, tais como prostaglandinas, bradicininas, serotonina, histamina e substância P (BERKENKOPF; WEICHMAN, 1988; DERAEDT *et al.*, 1980; WHITTLE *et al.*, 1964). Esta nocicepção também depende da liberação de citocinas pró-inflamatórias a exemplo das IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α , a partir de mastócitos e macrófagos presentes na cavidade abdominal (RIBEIRO *et al.*, 2000).

A redução do número de contorções abdominais foi obtida com o pré-tratamento do polissacarídeo nas doses de 9 e 27 mg/kg. A morfina (5 mg/kg), um opióide potente no tratamento das dores aguda e crônica intensas, também apresentou este perfil de resposta ao estímulo nocivo químico. Este teste apresenta alta sensibilidade, no entanto, possui baixa seletividade; devido a isto é utilizado como um teste de rastreio para estudo de drogas antinociceptivas (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Assim, resultados positivos não podem ser totalmente aceitos apenas com a realização deste modelo, necessitando, então, de testes que sejam mais específicos. O amplo espectro de drogas efetivas neste modelo tornam limitadas as conclusões obtidas através de seus resultados.

Com o intuito de caracterizar melhor a ação nociceptiva do polissacarídeo, foi realizado o teste químico de formalina, que consiste em uma lesão tecidual provocada pela injeção subcutânea de formalina diluída, sendo quantificadas as respostas comportamentais observada no animal, como a lambertura vigorosa, mordidas e agitação da região onde foi aplicado o estímulo nocivo (pata direita). Este modelo é considerado o mais próximo da dor clínica (TJÖLSEN; HOLE, 1997).

As respostas comportamentais a formalina seguem um padrão bifásico que parecem envolver estímulos diferentes (TJÖLSEN *et al.*, 1992). A fase inicial (dor neurogênica ou aguda) é iniciada logo após a injeção da formalina e se prolonga pelos primeiros 5 minutos, estando relacionada com a estimulação química direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e, em parte, das fibras do tipo A δ e associada à liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P. A fase tardia (dor inflamatória) acontece entre 15 e 30 minutos após a administração de formalina e está relacionada com a liberação de inúmeros mediadores pró-inflamatórios, como bradicinina, prostaglandinas, serotonina, histamina e glutamato,

entre outros, a partir de células ativadas na presença do agente flogístico. (DUBUISSON; DENNIS, 1977; HUNSKAAR; HOLE, 1987, ROSLAND *et al.*, 1990).

No presente estudo, os camundongos pré-tratados com o polissacarídeo (27 mg/kg) apresentaram inibição do comportamento nociceptivo apenas na fase tardia. A morfina (5 mg/kg), o fármaco padrão, gerou inibição nas duas fases. Considerando que drogas que reduzem a inflamação inibem apenas a fase tardia, pode ser sugerida uma provável atividade anti-inflamatória deste polissacarídeo.

Ainda avaliando a ação antinociceptiva do polissacarídeo foi utilizado o modelo de hipernocicepção mecânica induzida pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA). Neste teste, uma medida de pressão eletrônica é mensurada através do uso de um sensor acoplado a uma sonda de plástico pontiaguda que é aplicada na superfície plantar da pata traseira direita do camundongo para produzir a retirada da pata lesionada. O limiar de nocicepção é mensurado a partir da força (g) gerada para provocar a retração da pata.

Os modelos experimentais baseados em testes mecânicos permitem a avaliação do aumento da sensibilidade do nociceptor a estímulos inócuos (alodinia) ou nocivos (hiperalgesia). Para isso é utilizado o Von Frey eletrônico para avaliar através do estímulo mecânico inócuo e crescente (hipernocicepção mecânica) a sensibilidade tecidual provocada pela incisão (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

Considerado o adjuvante mais eficaz para aumentar a resposta imunológica aos antígenos, o CFA é composto por uma mistura de um óleo mineral, surfactante e micobactérias, que também geram dor (HEILBORN *et al.*, 2007). A injeção intraplantar de CFA causa hipernocicepção mecânica e térmica, sendo este efeito mediado pela sensibilização local dos nociceptores e sistêmica na região neuronal (como a sensibilização central) e imune, a partir do aumento de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral α (TNF α), interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de crescimento neural (NGF) (SAMAD *et al.*, 2001; WOOLF *et al.*, 1997).

Sendo assim, a administração do polissacarídeo nas doses de 27 e 81 mg/kg foram capazes de inibir o efeito causado pelo CFA nas duas primeiras horas ($p < 0,0001$) após a aplicação do estímulo nocivo, sendo que a maior dose estendeu este efeito até a quarta hora ($p < 0,01$). Este resultado foi semelhante à morfina (5 mg/kg), o controle positivo.

O limiar nociceptivo térmico foi avaliado pelo teste de retirada da cauda, método utilizado para avaliar drogas com atividade analgésica central (CAPIM *et al.*, 2013; KING; JOYNES; GRAU, 1997; RUJJANAWATE; KANJANAPOTHI; PANTHONG, 2003). Substâncias que agem em nível central, como os opióides, tem a capacidade de aumentar o tempo de latência no teste, uma vez que podem suprimir respostas de neurônios espinhais ao estímulo térmico nocivo na cauda (SILVA *et al.*, 2013).

O polissacarídeo, em todas as doses testadas (9, 27 e 81 mg/kg), conseguiu aumentar o tempo de latência frente ao estímulo térmico, sendo que as doses de 9 e 27 mg/kg inibiram no tempo de 0,5 horas ($p < 0,01$) e as doses de 27 e 81 mg/kg aumentaram a inibição no tempo de 1 hora ($p < 0,05$). O mesmo aconteceu com a morfina (5 mg/kg), analgésico opióide, onde houve um aumento significativo no tempo de latência de 0,5 e 1 hora após a administração ($p < 0,001$). Este resultado é sugestivo de uma antinocicepção em nível central-medular.

Substâncias com efeitos sedativos e/ou relaxantes musculares podem reduzir a resposta de coordenação motora em animais, assim como a expressão de comportamentos nociceptivos (SOARES *et al.*, 2000). Visto que os testes descritos até então são caracterizados por uma resposta motora, a avaliação da integridade da função motora é primordial para a validação dos resultados. Assim, dois modelos foram executados para esta ratificação: o teste do campo aberto e o teste do cilindro giratório.

O teste do campo aberto fornece informações simultâneas acerca do comportamento exploratório, locomoção e ansiedade do animal (GOULD; DAO; KOVACSICS, 2009). Por isso, com este método, proposto por Hall (1934), é possível verificar se a droga em questão pode promover incoordenação motora e diminuição do comportamento exploratório nos animais, seja por sedação e/ou relaxamento muscular. Enquanto isso, o teste do cilindro giratório é composto por um equipamento que mede a atividade motora forçada gerada pelos camundongos, através da avaliação do equilíbrio e coordenação motora (PINTO; KO, 2012). Este modelo é bastante útil no estudo de déficits motores provocados por disfunções cerebelares e de núcleos da base do telencéfalo, doenças neuromusculares e no estudo da aprendizagem motora (PINTO; KO, 2012; SHIOTSUKI *et al.*, 2010). O diazepam, um benzodiazepínico, utilizado nestes métodos como controle positivo,

tem o efeito de potencializar a resposta a neurotransmissores inibitórios no SNC, resultando em sedação e redução da coordenação motora (RANG; DALE, 2016).

O tratamento com o polissacarídeo na maior dose testada (81 mg/kg) nos modelos nociceptivos, não induziu nenhuma alteração no desempenho motor dos animais, medida pela locomoção e atividade motora nos testes do campo aberto e do cilindro giratório. Em contrapartida, o diazepam (10 mg/kg) reduziu de forma significativa, a coordenação motora e equilíbrio dos animais ($p < 0,05$). Assim, pode-se inferir que o tratamento com o polissacarídeo não promove alteração na função motora.

Em resumo, o presente estudo demonstrou que o polissacarídeo obtido a partir da levedura *Rhodotorula oryzoicola* apresenta um efeito antinociceptivo, sendo possível validar sua utilização para o desenvolvimento de fármacos analgésicos. Este trabalho estimula novas investigações sobre o potencial terapêutico do polissacarídeo no controle da dor, assim como sobre os mecanismos de ação envolvidos. O uso de polissacarídeos produzidos a partir de fungos e leveduras para fins medicinais representa um grande potencial biotecnológico, sendo considerado uma fonte promissora para o surgimento de novos fármacos com atividade analgésica e/ou anti-inflamatória.

7 CONCLUSÕES

Estudos demonstraram que os polissacarídeos, substâncias presentes na estrutura das leveduras, apresentaram atividades farmacológicas de interesse biotecnológico, a exemplo das atividades antinociceptiva, anti-inflamatória e imunomodulatória.

Diante dos resultados encontrados, foi possível verificar que o tratamento com polissacarídeo obtido a partir da levedura *Rhodotorula oryzzicola* conferiu atividade antinociceptiva, comprovada através dos modelos experimentais de dor aguda. Ademais, o polissacarídeo mostrou uma possível ação central, evidenciada pelo modelo de nocicepção térmico. Além disso, nas doses terapêuticas não houve comprometimento na função motora.

Portanto, os resultados obtidos nesta pesquisa sugerem a utilização do polissacarídeo obtido a partir da levedura *Rhodotorula oryzzicola* como matéria-prima para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da dor. Todavia, novos estudos precisam ser realizados, a fim de elucidar a estrutura do polissacarídeo, assim como estudar novas vias de administração.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v. 1000, n. 1-2, p. 40-56, 2004.
- ANANTHI, S. et al. In vitro antioxidant and in vivo anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 187-192, 2010.
- ANDRADE, J.P. et al. Produção de exopolissacarídeos utilizando fungos filamentosos. **Cadernos de Prospecção**, Salvador, v. 8, n. 2, p. 311-318, 2015.
- ARMSTRONG, E.J. KLICKSTEIN, L.B. In: GOLAN, D.E. et al. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 734-744p.
- BAGGIO, C.H. et al. Antinociceptive Effects of (1→3),(1→6)-Linked β-Glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius* in Models of Acute and Neuropathic Pain in Mice: Evidence for a Role for Glutamatergic Receptors and Cytokine Pathways. **The Journal of Pain**, v. 11, n. 10, p. 965-971, 2010.
- BARANIDHARAN, G.; BRIGGS, M. Local and regional anaesthetic techniques in wound management. **Surgery**, v. 35, n. 9, p. 484-488, 2017.
- BARBOSA, A.M. et al. Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.
- BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BASBAUM, A.I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 67-84. 2009.
- BATISTA, J.A. et al. Polysaccharide isolated from *Agardhiella ramosissima*: Chemical structure and anti-inflammation activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 99 p. 59- 67, 2014.

- BATLOUNI, M. Anti-Inflamatórios Não Esteroides: Efeitos Cardiovasculares, Cerebrovasculares e Renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 556-563, 2010.
- BERENBAUM, F. COX-3: Fact or fancy? **Joint Bone Spine**, v. 71, p. 451-453, 2004.
- BERKENKOPF, J.W.; WEICHMAN, B.M. Production of prostacyclin in mice following intraperitoneal injection of acetic acid, phenylbenzoquinone and zymosan: its role in the writhing response. **Prostaglandins**, v. 36, n. 5, p. 693-709, 1988.
- BESSION, J.M. The neurobiology of pain. **The Lancet**, v. 353, p. 1610-1615, 1999.
- BRIDGESTOCK, C.; RAE, C.P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v.14, n.11, p. 480-483, 2013.
- BUTLER, M.S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 22, p. 162-195, 2005.
- CALIXTO, J.B.; SIQUEIRA JÚNIOR, J.M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, p. 98-106, 2008.
- CAPAZ, F.R. et al. The open-field: a simple method to show ethanol withdrawal symptoms. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**, v. 251, n. 1, p. 228-236, 1981.
- CAPIM, S.L. et al. High analgesic and anti-inflammatory in vivo activities of six new hybrids NSAIA tetrahydropyran derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 6003-6010, 2013.
- CHANDRASEKHARAN, N.V. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 21, p. 13926-13931, 2002.
- CHEN, L.; YANG, G.; GROSSER, T. Prostanoids and inflammatory pain. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**. v. 104-105, p. 58-66, 2013.

- COLLIER, H.O.J. et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 32, n. 2, p. 295-310, 1968.
- CORREA, G. **Revista Iberoamericana Del Dolor**, v. 2, n. 4, p. 12-20, 2007.
- COSTA, E.A. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of LQFM002 - A4-nerolidylcatechol derivative. **Life Sciences**. v. 92, p. 237-244, 2013.
- DERAEDT, R. et al. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v. 61, p.17-24, 1980.
- DICKENSON, A. The neurobiology of chronic pain states. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v.14, n.11, p. 484-487, 2013.
- DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain-stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, n. 2, p. 161-174, 1977.
- DUCHARME, J. Acute Pain and Pain Control: State of the Art. **Annals of Emergency Medicine**, v. 35, n. 6, p. 592-603, 2000.
- FEIN, A. *Nociceptores: As células que sentem dor*. PETROV, P., FRANCISCHI, J.N., FERREIRA, S.H., et al. tradutores. Ribeirão Preto – SP: Dor On Line, 2012. 106
- FERREIRA, S. H. et al. Dor Inflamatória. In: NETO, O.A. et al. **Dor: princípios e prática**. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- FUKUDA, E.K. et al. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 117-134, 2009.
- GHOSH, P. et al. In vitro anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 23, p. 3151-3157, 2004.
- GOULD T.D.; DAO D.T.; KOVACSICS C.E. The open field test. In: GOULD, T.D. **Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice: Characterization Using Behavioral Tests**. Series: Neuromethods 42, Springer protocols. New York, NY: Humana Press, 2009.

GREEN, L. Assessment of acute and chronic pain. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 14, n. 11, p. 488-490, 2013.

GRIFFIN, R.S.; WOOLF, C.J. Farmacologia da Analgesia. In: GOLAN, D.E. et al. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 266-285p.

GUERRA DORE, C. M. P. G. et al. Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of β -glucan-rich extract from *Geastrum saccatum* mushroom. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 1160-1169, 2007.

GUYTON A.C.; HALL J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2006. 1115p.

HALL, C.S. Emotional behavior in the rat: Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, p. 385-403, 1934.

HARSTALL, C.; OSPINA, M. How prevalent is chronic pain? **Pain Clinical Updates**, v. 11, n. 2, p. 1-4, 2003.

HARVEY, A.L. Natural products as a screening resource. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, p. 480-484, 2007.

HEBBES, C.; LAMBERT, D.G. Non-opioid analgesics. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 14, n. 11, p. 510-513, 2013.

HEILBORN, U. et al. Spontaneous nociceptive behaviour in female mice with Freund's complete adjuvant- and carrageenan-induced monoarthritis. **Brain Research**, v. 1143, p. 143-149, 2007.

HENSCHKE, N.; KAMPER, S.J.; MAHER, C.G. The Epidemiology and Economic Consequences of Pain. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 1, p. 39-147, 2015.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluation mild analgesia. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 69-76, 1985.

HUNSKAAR, S.; HOLE; K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p.103–114, 1987.

IASP (International Association for Study of Pain) Subcommittee on taxonomy. Classification of cronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Pain**, (Suppl 3), 1986.

IASP, International Association for the Study of Pain. IASP Taxonomy. 2012. Disponível em: < <http://www.iasp-pain.org/Taxonomy#Pain>> Acesso em: 15.11.2016.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 9, p. 203-210, 2001.

KING, T.E.; JOYNES, R.L.; GRAU, J.W. Tail-Flick Test: II. The Role of Supraspinal Systems and Avoidance Learning. **Behavioral Neuroscience**, v. 111, n. 4, p. 754-767, 1997.

KINGSTON, D.G.I. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. **Journal of Natural Products**, n. 74, p. 496-511, 2011.

KLAUMANN, P.R.; WOUK, A.F.P.F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, p.1-12, 2008.

KONETI, K.K.; JONES, M. Management of acute pain. **Surgery**, v. 31, n. 2, p. 77-83, 2013.

KRIZKOVÁ, L. et al. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell mannans in vitro. **Mutation Research**, v. 497, n. 2, p. 213-222, 2001.

KURIBARA, H.; HIGUCHI, Y.; TAKADORO, S. Effects of central depressants on Rota-Rod and traction performances in mice. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 27, p. 117–126, 1977.

LAM, K.S. New aspects of natural products in drug discovery. **Trends in Microbiology**, v.15, n. 6, p. 279-289, 2007.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal Models of Nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 597–652, 2001.

- LIU, Y. et al. Structural analysis and antioxidant activities of polysaccharide isolated from Jinqian mushroom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 63-68, 2014.
- LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1607-1609, 1999.
- LULL, C.; WICHERS, J.; SAVELKOUL, H.F.J. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. **Mediators of Inflammation**, v. 2, p. 63-80, 2005.
- MAIA, L.C.; CARVALHO JUNIOR, A.A. Introdução: os fungos do Brasil. In: FORZZA, R.C., org., et al. **Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. v. 1, p. 43-48.
- MERSKEY, H. Development of a universal language of pain syndromes. **Advances in Pain Research Therapy**, v. 5, p. 37-52, 1983.
- MILES, B.; ROTH, B. Farmacologia da Neurotransmissão Serotoninérgica e Adrenérgica Central. In: GOLAN, D.E. et al. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 208-226p.
- MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.
- NANDI, A. K. et al. Antioxidant and immunostimulant β -glucan from edible mushroom *Russula albonigra* (Krombh.) Fr. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 774-782, 2014.
- PARADA, C.A. et al. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. **Proceeding of the National Academy Sciences USA**, v. 100, n. 5, p. 2923-2928, 2003.
- PIMENTEL, V. et al. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Revista do BNDES**, v. 43, p. 41-89, 2015.

PINTO, V.B.V.R.; KO, G.M. Teste de *Rotarod*: Contribuições no Estudo das Doenças Neuromusculares, das Síndromes Extrapiramidais e das Ataxias Cerebelares. **Resbcal**, v.1, n.2, p. 202-212, 2012.

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

QUINTÃO, N.L.M. et al. The Effects of Diacerhein on Mechanical Allodynia in Inflammatory and Neuropathic Models of Nociception in Mice. **Anesthesia & Analgesia**. v. 101, p.1763-1769, 2005.

RANG, H.P, DALE, M.M. **Farmacologia**. 8.ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2016. 760p.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603–613, 2001.

REN, L.; PERERA, C.; HEMAR, Y. Antitumor activity of mushroom polysaccharides: A review. **Food & Function**, v. 3, p. 1118-1130, 2012.

RIBEIRO, R.A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, p. 111-118, 2000.

ROCHA, A.P.C. et al. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, n. 1, p. 94-105, 2007.

ROSLAND, J.H. et al. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, v. 42, p. 235-242, 1990.

ROY, S. K. et al. Structural studies of an immunoenhancing water-soluble glucan isolated from hotwater extract of an edible mushroom, *Pleurotus florida*, cultivar Assam Florida. **Carbohydrate Research**, v. 344, p. 2596-2601, 2009.

RUJJANAWATE, C.; KANJANAPOTHI, D.; PANTHONG, A. Pharmacological effect and toxicity of alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 91-95, 2003.

RUTHES, A.C. et al. Fucomannogalactan and glucan from mushroom *Amanita muscaria*: Structure and inflammatory pain inhibition. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 9, p.761-769, 2013a.

RUTHES, A.C. et al. *Lactarius rufus* (1→3),(1→6)-β-D-glucans: Structure, antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p. 129-136, 2013b.

SÁ, K.N. et al. Chronic pain and gender in Salvador population, Brazil. **Pain**, v. 139, n. 3, p. 498-506, 2008.

SAMAD, T.A. et al. Interleukin-1b-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Nature**, v. 410, p. 471-475, 2001.

SBED, Sociedade Brasileira de Estudos para Dor. Classificação. Disponível em: <http://www.sbed.org.br/lormais_materias.php?cd_materias=172&friurl=_-Classificacao-_> Acesso em: 03.12.2016.

SBED, Sociedade Brasileira para Estudos da Dor. Porque a Dor é uma questão também de Saúde Pública! Disponível em: <http://www.sbed.org.br/materias.php?cd_secao=74> Acesso em: 01.12.2016.

SERPELL, M.G.; MAKIN, A.; HARVEY, A. Acute pain physiology and pharmacological targets: The present and future. **Acute Pain**, v.1, n. 3, p. 31-47, 1998.

SEWELL, R.D.E.; SPENCER, P.S.J. Antinociceptive activity of narcotic agonist and partial agonist analgesics and other agents in the tail-immersion test in mice and rats. **Neuropharmacol.** v. 15, p. 23-29, 1976.

SHIOTSUKI, H. et al. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 189, p. 180-185, 2010.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 8, p. 1053-1071, 1998.

SILVA, C.J.A.; MALTA, D.J.N. A importância dos fungos na biotecnologia. **Cadernos de Graduação: Ciências biológicas e da saúde**, v. 2, n. 3, p. 49-66, 2016.

SILVA, J.C. et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 1, p. 18-23, 2013.

SILVA, M. et al. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 85-92, 2006.

SINGH, S.B.; BARRETT, J.F. Empirical antibacterial drug discovery - Foundation in natural products. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 1006-1015, 2006.

SMIDERLE, F.R. et al. *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1→6)- β -D-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p. 91-99, 2013.

SMIDERLE, F.R. et al. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1→3),(1→6)-linked β -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. **European Journal of Pharmacology**, v. 597, p. 86-91, 2008.

SOARES, A.C. et al. Activation of ATP-sensitive K⁺ channels: mechanism of peripheral anti-nociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. **European Journal of Pharmacology**, v. 400, p. 67-71, 2000.

STEEDS, C.E. The anatomy and physiology of pain. **Surgery**, v. 31, n.2, p. 49-53, 2013.

STEINMEYER, J. Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Arthritis Research**, v. 2, n. 5, p. 379-385, 2000.

TAKANO, T. et al. Traditional acupuncture triggers a local increase in adenosine in human subjects. **Journal of Pain**, v. 13, n. 12, p.1215-1223, 2012.

TASLEEM, F. et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7 (Suppl 1), p. S461-S468, 2014.

TEIXEIRA, M.J. et al. Dor no Brasil: estado atual e perspectivas. São Paulo: Limay, 1995. 196p.

- TEIXEIRA, M.J. et al. Epidemiologia clínica da dor músculo-esquelética. **Revista de Medicina**, (São Paulo), v. 80 (ed. esp. pt.1), p. 1-21, 2001.
- TJÖLSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5-17, 1992.
- TJÖLSEN, A.; HOLE, K. Animals models of analgesia. In: DICKENSON, A.H.; BESSON, J.M. (org.) **The Pharmacology of pain** (Handbook of Experimental Pharmacology series). Germany: Springer-Verlag, 1997. v. 25, p. 1-20.
- VALASQUES JUNIOR, G. L. et al. Extraction optimization and antinociceptive activity of (1→3)β-D-glucan from *Rhodotorula mucilaginosa*. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, p. 293–299, 2014.
- WHITTLE, B.A. Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. **International Journal of Neuropharmacology**, v. 3, p. 369-378, 1964.
- WOOLF, C. Pain. **Neurobiology of Disease**, v.7, p. 504-510, 2000.
- WOOLF, C.J. et al. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor α. **British Journal of Pharmacology**, v.121, p. 417-424, 1997.
- YANG, Y. et al. Effects of aloperine on acute and inflammatory pain models in mice. **Scandinavian Journal of Pain**. v. 8, p. 28-34, 2015.
- ZHANG, M. et al. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 18, n. 1, p. 4-19, 2007.
- ZHANG, Y. et al. Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 196-206, 2011.
- ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109-110, 1983.

ANEXOS

ANEXO A - OTIMIZAÇÃO PARA PRODUÇÃO DO POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DA *Rhodotorula oryzoicola*.

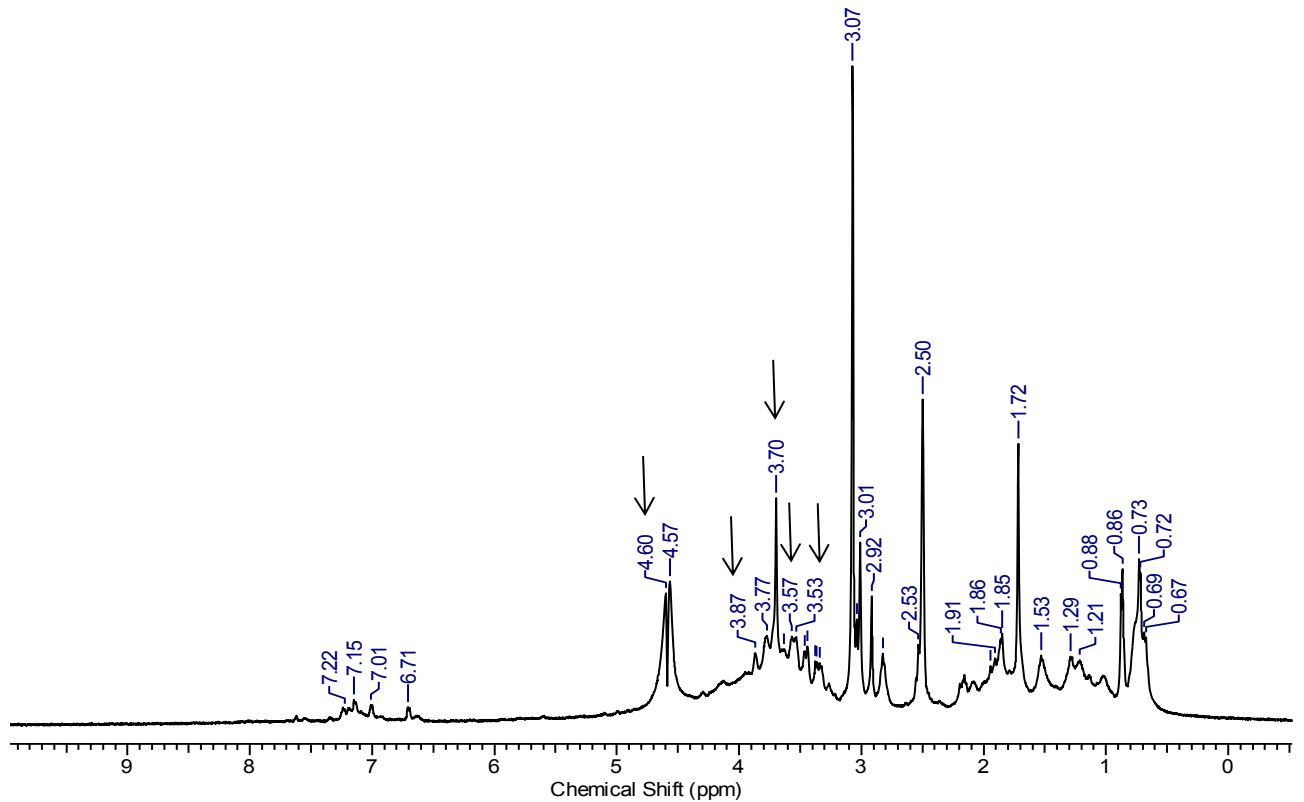
Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Polissacarídeo (mg)
1	90	90	119
2	90	150	110
3	70	60	118
4C	70	120	120
5C	70	120	121
6C	70	120	119
7	70	180	116
8	50	90	112
9	50	150	120

Matriz experimental Doehlert usada para a otimização da extração do polissacarídeo solúvel em álcali obtido de *R. oryzoicola*

Para a otimização da produção foram utilizadas três diferentes temperaturas (50 °C, 70 °C e 90 °C) em três diferentes intervalos de tempo (60, 90, 120, 150 e 180 minutos) usando o modelo experimental Doehlert. A análise estatística foi realizada através do software Statistica@version 7.0. *Em destaque estão os ensaios que apresentaram maiores produções de polissacarídeos (temperatura de 70 °C a 120 minutos).

Fonte: Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações (LAEN).

ANEXO B - DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA (RMN)



Espectro gerado a partir da análise no RMN mostrando composição de monossacarídeos produzidos por *R. orydicola*.

O espectro de hidrogênio das amostras foi obtido em um equipamento de Ressonância Magnética Nuclear (marca BRUKER), localizado na Universidade Federal de Goiás (UFG). O espectro de hidrogênio apresenta picos em 4.60 (H1), 3.53 (H2), 3.70 (H3), 3.57 (H4), 3.70 (H5) e 3.87 (H6) (indicados pelas setas) característicos de resíduos de manose envolvidos em ligação do tipo α -3,6 e sugerem que a amostra seja uma manana.

Fonte: Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações (LAEN).