



Bubimex

Tecnologia exclusiva: eficaz e duradoura

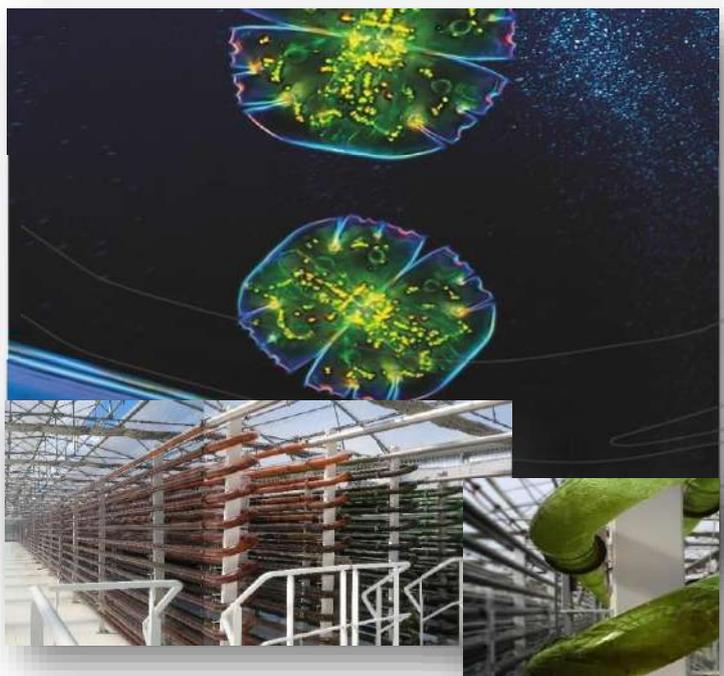


Bubimex, com mais de 20 anos de experiência e sempre à procura de novos horizontes, na procura constante de produtos de qualidade, encontramos tecnologia exclusiva, eficaz e duradoura

O nosso laboratório parceiro desenvolveu e patenteou a primeira tecnologia hidro biomimética para o cultivo de microalgas: “os fotobiorreatores”.

- ✿ Reproduzir as condições de vida de forma natural
- ✿ Cultivo único de microalgas que antes era impossível
- ✿ Proporcionam um alto teor de moléculas interessantes
- ✿ Produção ecológica de acordo com o meio ambiente

Este processo hidro biométrico é realizado sob os mais elevados padrões de qualidade: o selo “**Envol**”, um compromisso social e ambiental e uma responsabilidade activa para reduzir o nosso impacto no ambiente e proteger a biodiversidade e os ecossistemas naturais. Produção amiga do ambiente, retenção de elevados níveis de CO2 graças



ao cultivo de microalgas, água reciclada utilizada no sistema de arrefecimento do fotobiorreator, utilização de solventes orgânicos e ingredientes com certificação **GreenCosmos** e, por fim, ingredientes orgânicos certificados pela **ECOCERT**



3 chaves para ajudar os animais de estimação a manterem-se saudáveis à medida que envelhecem:
Exercício, Nutrição Adaptada e Suplementos

Índice



Plaque Destructor	05
Spray Dental	05
Gel Dental	06
Guloseimas Dentárias	07
Cuidado com os ouvidos	09
Cuidado com os olhos	10
Patatas e almofadas	11
Higiene e educação	12
Óleo de fígado de bacalhau	13
Óleo de Salmão	14
Óleo de Sardinha	15
Óleo vegetal	16
Óleo de Inseto	17
Óleo de cânhamo	18
Óleo de microalgas	19
Suplementos em pó	25
Spray de jojoba	29
Spray de macadâmia	30
Champô	31
Champô seco	32
Champô em espuma	32
Spray desembaraçador	33
Óleo CBD de uso tópico	34
Spray calmante	34
Maltes	35
Leite	37
Estimulantes	37
Snacks Cremosos	38
Bubinature Cães	40
Bubinature Gatos	40
Acessórios	41
Anexos	42

Higiene Dental

05

Ouvidos
Olhos
Patatas e almofadas

09

Óleos e
Suplementos

13

Cuidado do
pelo

29

Relaxamento

34

Comida Húmida,
Cremes e
Acessórios

35

Higiene Dental



AB
AGRICULTURE
BIOLOGIQUE

	EAN
8	4 250078 903338
6	4 250078 903345

Art. 333 Plaque Destructor 80 grs
Art. 334 Plaque Destructor 160 grs

Composição: Alga Parda (fucus vesiculosus)

Posologia: (polvilhar na ração)

Peso	Dose/diária	Duração
-10 kg	½ colher de sopa	8 meses
10-25 kg	1 colher de sopa	4 meses
+25 kg	2 colheres de sopa	2 meses

Para cães e gatos adultos

« **Plaque Destructor**, o seu princípio ativo combate a placa bacteriana, o tártaro e o mau hálito »

(ingrediente com selo de agricultura BIO francesa)




	EAN
6	4 250078 903314

Art. 331 Spray de Limpeza 175 ml

Composição: água, ácido cítrico, EDTA dissódico, propilenoglicol, benzoato de sódio, mentol

Posologia:
Pulverizar 1 ou 2 vezes nos dentes do animal (agitar antes de utilizar, conservar à temperatura ambiente)

Para cães e gatos adultos



Higiene Dental



Art. 335 Gel de Limpeza 100 gr

Composição: água, gluconato de zinco, sabor a carne de bovino, BP940, sorbitol, glucose oxidase, lisozima, proteases, benzoato, polisorbato 20, glicerina sódica, hidrato de sódio

Utilização: Aplicar nas gengivas uma vez por dia com uma massagem suave. Inofensivo se ingerido, conservar à temperatura ambiente



Art. 332 Pasta de dentes sabor a carne 100 gr

Composição: 0,2% Metilparabeno, 0,9% Goma de Celulose, 0,3% Benzoato de Sódio, 16% Dióxido de Silício, 8% Carbonato de Cálcio, 47,05% Sorbitol, 27,5% Água, 0,05% Sabor a Carne

Utilização: Escovar os dentes do cão uma vez por dia ou pelo menos 2 a 3 vezes por semana. Inofensivo se ingerido.



Art. 3320 KIT Dental

« Melhore a saúde e o bem-estar dos seus pacientes com a nossa linha de higiene dentária »



Higiene Dental



Contenance	Taille		Code EAN
7 pcs	12,5 cm Ø 1,2	18	 4 250078 908193

Contenance	Taille		Code EAN
4x7 pcs	12,5 cm Ø 1,2	4	 4 250078 901001

Art. 619 Denties 180 grs

Art. 6190 Denties 720 grs

Composição: Carne, subproduto de origem animal e vegetal, cereais, propilenoglicol, vitamina A 1500 UI, vitamina D3 150 UI, vitamina E 6 mg, iodo 0,15 mg, cobre 0,5 mg, ferro 5 mg, manganésio 3,5 mg

Utilização: uso diário, não substitui as refeições, é uma guloseima

« **Denties:** Oligoelementos, vitaminas e minerais que ajudam a manter o bem-estar do cão »



Art. 6190



		EAN
20		 4 250078 908258
10		 4 250078 908265
10		 4 250078 908272

Art. 825 Osso de menta 11 cm

Art. 826 Osso de menta 16 cm

Art. 827 Osso de menta 25 cm

Composição: Pele bovina e menta

Utilização: uso diário, não substitui as refeições, é uma guloseima

Reduz a acumulação de tártaro e deixa o hálito fresco

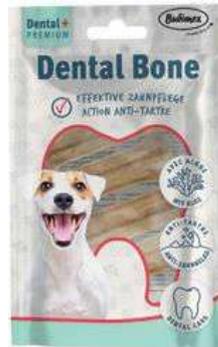
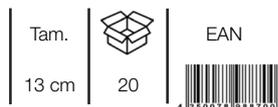
Menta



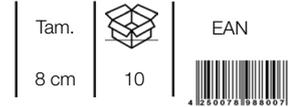
Higiene Dental



Art. 8870 Sticks enrolados com algas
13 cm x 10 unidades
90 gr



Art. 8800 Osso prensado misturado com algas
8 cm x 4 unidades
80 gr



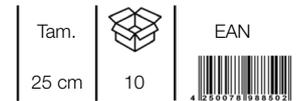
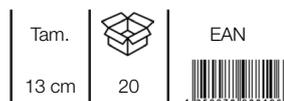
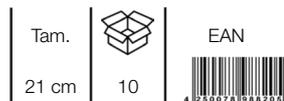
Benefícios: *Fucus vesiculosus*: também conhecida como alga parda, é originária do Atlântico Norte e do Báltico. Quebra a placa bacteriana e o tártaro, reduz a acumulação de substâncias e, assim, ajuda a melhorar o hálito e até a prevenir doenças do estômago.

Fosfato bicálcico: Muito utilizado nas indústrias farmacêuticas e veterinárias como fonte de cálcio e fósforo, que ajudam a manter a saúde oral.

Zinco: propriedades antibacterianas e antifúngicas

Composição: Pele bovina 96%, algas (*fucus vesiculosus*) 2%, fosfato bicálcico 2%, zinco

Utilização: uso diário, não substitui as refeições, é uma guloseima



Art. 8820 Osso prensado misturado com algas
21 cm x 1 unidade
180 gr

Art. 8810 Osso prensado misturado com algas
13 cm x 2 unidades
110 gr

Art. 8840 Osso com nó misturado com algas
16 cm x 1 unidade
90 gr

Art. 8850 Osso com nó misturado com algas
25 cm x 1 unidade
180 gr



Uso ótico e recomendações

Composição: Água, óleo de rícino hidrogenado PEG-40, propilenoglicol, álcool, citrato de sódio, ácido bórico, mentol, timol, metilcloroisotiazolinona, metilisotiazolinona

Posologia em cães:

Peso	Gotas
-10 kg	2 - 3 gotas por ouvido
10-25 kg	3 - 5 gotas por ouvido
+25 kg	5 - 8 gotas por ouvido

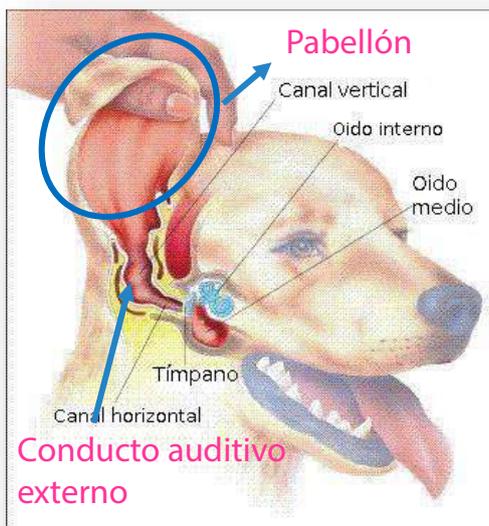
Posologia em gatos e roedores:

1 - 2 gotas por ouvido



Gotas para os ouvidos

Nº Art.	Size		EAN
3441	50 ml	12	 4 250078 934417



Frequência de utilização

Depende da raça e do estilo de vida do animal

Recomendações de utilização

- Lavar bem as mãos com água e sabão antes
- Certificar que não haja feridas abertas, corrimento invulgar ou odor desagradável. Se notar alguma anormalidade, consultar o médico veterinário
- Para limpar a orelha, ter à mão uma gaze ou algodão, aplicar as primeiras gotas sem tocar no ouvido com o conta-gotas e limpar cuidadosamente depois
- Para limpar o ouvido externo, posicionar suavemente a cabeça na vertical, aplicar as gotas de acordo com a dose recomendada sem tocar com o conta-gotas no canal auditivo e massajar a base do ouvido durante 20 a 30 segundos para permitir que a solução se espalhe no canal



Uso oftalmológico e recomendações

Composição: Água 78,23%, etanol 6%, EDTA dissódico 0,1%, ácido bórico 0,1%, cânfora 0,01%, sulfato de zinco 0,2%, trietanolamina-0,1%, sulfato de laurilcônio 0,02%, cloreto de sódio 0,5%, álcool isopropílico 3%

Utilização:

Colocar algumas gotas num pano limpo e passar suavemente à volta dos olhos do animal e nas pálpebras fechadas para remover as impurezas. Qualidade ótima até 12 meses após a abertura.

Manter fora do alcance das crianças



Gotas, contorno dos olhos

Nº Art.	Size		EAN
3440	50 ml	6	 4 250078 934400



Gotas, anti-manchas das lágrimas

A loção Bubimex limpa com delicadeza e segurança manchas desagradáveis em redor dos olhos do cão, gato ou outro animal. É também ideal para remover descolorações desagradáveis nos pelos em redor da boca, orelhas e patas

Recomendações de utilização

- Lavar bem as mãos com água e sabão antes
- Certificar que não haja feridas abertas, corrimento invulgar ou odor desagradável. Se notar alguma anormalidade, consultar o médico veterinário
- Aplicar umas gotas da solução num pano limpo (evitar o algodão que pode deixar fibras e causar infecções). Limpar delicadamente as zonas manchadas. Não verter diretamente nos olhos
- Qualidade ótima até 12 meses depois de aberto

Nº Art.	Size		EAN
3442	50 ml	6	 4 250078 934424

Patas e almofadas

Composição: < 5% de tensoactivos não iónicos, tensoactivos anfotéricos, fragrâncias de laranja, conservantes. Contém a massa de reação da metilcloroisotiazolinona e da metilisotiazolinona (3:1)

Utilização:

Agitar ligeiramente antes de usar. Aplicar a espuma com a escova nas patas e almofadas e deixar atuar durante 2 a 3 minutos. Depois, retirar a sujidade e secar completamente com uma toalha.

Manter fora do alcance das crianças



Espuma de limpeza
Escova integrada · Sem enxaguar · Sem parabenos · A espuma de limpeza para cães e gatos

Nº Art.	Size		EAN
3430	50 ml	6	 4 250078 934424



Nº Art.	Size		EAN
3430	50 ml	6	 4 250078 934424



Nº Art.	Size		EAN
3430	50 ml	6	 4 250078 934424

Recomendações de utilização

Limpar os pelos mais compridos entre as almofadas antes de aplicar o produto. Esfregar o batom sobre e entre as almofadas, massajando com o polegar. Se possível, evitar que o animal lamba as patas durante alguns minutos (pode colocar meias / proteção)

Recomendação: uso diário

Composição: Óleo de grainha de uva 73,9%, cera de candelila 5%, óleo de lavanda 0,15%, cera de ceresina 20%, vitamina E (DI- α -acetato de toferol) 1%

Composição: Cera de abelha, poligliceril-2, isodecanoato glicéridos dioleato, óleo de rícino hidrogenado peg-40, água delonizada, petrolato, glicerina, miristato de isopropilo, óleo mineral monooleato de sorbitano, dimeticone, sulfato de magnésio, fragrância, borato de sódio, metoxicloroisotiazolinona

Protege-os do frio e de possíveis ferimentos causados por revestimentos de pavimento, por vezes irritantes. Este tratamento também previne as fissuras nas patas e alivia as irritações existentes. É especialmente útil durante longas caminhadas e no inverno, quando o frio, a neve e o sal atacam as patas dos animais.

Higiene Educação



Nº Art.	Size		EAN
346	175 ml	6	 4 250078 903468



Nº Art.	Size		EAN
349	30 folhas	4	 4 250078 903499
3490	20 x 20 folhas	4	 4 250078 934905



Nº Art.	Size		EAN
347	50 x 30 cm / 10x	12	 4 250078 903475
348	60 x 40 cm / 10x	12	 4 250078 903482



Óleo de Fígado de Bacalhau

VISÃO



Benefícios

Vitamina **A** + + +

- É essencial para a visão, previne a cegueira noturna
- Protege o sistema imunitário e, por conseguinte: promove o crescimento e o brilho do pelo, previne a queda de pelo, protege a pele e as mucosas

Vitamina **D** + + +

Contribui para a absorção de cálcio e fósforo, contribuindo assim para a saúde óssea (embora alguns outros óleos também contenham vitamina D, a concentração no óleo de fígado de bacalhau é geralmente mais elevada)

Omega **3** (EPA e DHA) + +

Os ácidos gordos polinsaturados do óleo de fígado de bacalhau facilitam: Metabolismo, bom funcionamento do sistema cardiovascular e redução da inflamação das articulações



Nº Art.	Formato		EAN
675	250 ml	6	4 250078 906759
6750	500 ml	4	4 250078 967507
6751	1000 ml	4	4 250078 967514
6752	5000 ml	1	4 250078 967521

Art. 6752 5 litros

Posologia:

Peso	Dose / diária para cães	
-10 kg	¼ a ½ colher de sopa	(1,25 ml a 2,5 ml)
10-25 kg	½ a 1 colher de sopa	(2,5 ml a 5 ml)
+25 kg	1 a 2 colheres de sopa	(5 ml a 10 ml)

Peso	Dose / diária para gatos	
-5 kg	1/8 a ¼ colher de sopa	(0,625 ml a 1,25 ml)
5-10 kg	¼ a ½ colher de sopa	(1,25 ml a 2,5 ml)

Para cães e gatos adultos

Roedores uma gota, (utilizar um conta-gotas) uma a duas vezes por semana



Atenção à sobredosagem de vitamina D





Óleo de Salmão

CARDIOVASCULAR

Benefícios

Omega 3 e 6 (EPA e DHA) + + +

Os ácidos gordos polinsaturados do óleo de salmão facilitam: Metabolismo, o bom funcionamento do sistema cardiovascular.

Anti-inflamatório, reduzindo assim o risco de artrite.

Fortalece o sistema imunitário, combatendo os agentes patogénicos de forma mais eficaz.

Contribui para uma pelagem saudável e brilhante.

O **DHA** contribui para um melhor desenvolvimento cerebral e função cognitiva.

Ideal para cães e gatos lactantes.

Ideal para uma boa recuperação após uma doença ou cirurgia.



Nº Art.	Formato		EAN
676	250 ml	6	4 250078 906766
6760	500 ml	4	4 250078 967606
6761	1000 ml	4	4 250078 967613
6762	5000 ml	1	4 250078 967620

Art. 6762 5 litros

Posologia:

Peso	Dose / diária para cães	
-10 kg	¼ a ½ colher de sopa	(1,25 ml a 2,5 ml)
10-25 kg	½ a 1 colher de sopa	(2,5 ml a 5 ml)
+25 kg	1 a 2 colheres de sopa	(5 ml a 10 ml)

Peso	Dose / diária para gatos	
-5 kg	1/8 a ¼ colher de sopa	(0,625 ml a 1,25 ml)
5-10 kg	¼ a ½ colher de sopa	(1,25 ml a 2,5 ml)

Para cães e gatos adultos

Roedores uma gota, (utilizar um conta-gotas) uma a duas vezes por semana





Óleo de Sardinha



CÉREBRO E METABOLISMO



Benefícios

Omega 3 e 6 (EPA e DHA) + + + +

Por ter uma maior concentração de **DHA** que o **óleo de salmão**, é perfeito para cachorros e cães adultos, pois contribui para um melhor desenvolvimento cerebral e função cognitiva.

Sensação de saciedade, que ajuda os animais com excesso de peso. Alivia a artrite.

Os ácidos gordos polinsaturados do óleo de sardinha facilitam: Metabolismo, o bom funcionamento do sistema cardiovascular.

Por ter um cheiro e sabor mais fortes que o salmão, muitos animais de estimação preferem-no.

Fortalece o sistema imunitário, combatendo os agentes patogénicos de forma mais eficaz. Contribui para uma pelagem saudável e brilhante.

Menos toxinas: Como as sardinhas são tão pequenas, acumulam menos toxinas e metais pesados no seu organismo, que se encontram nos mares, como resultado da poluição humana.



Nº Art.	Formato		EAN
661	250 ml	6	4 250078 906612
6610	500 ml	4	4 250078 966104
6611	1000 ml	4	4 250078 966111
6612	5000 ml	1	4 250078 966128

Art. 6612 5 litros

Posologia:

Peso	Dose / diária para cães	
-10 kg	¼ a ½ colher de sopa	(1,25 ml a 2,5 ml)
10-25 kg	½ a 1 colher de sopa	(2,5 ml a 5 ml)
+25 kg	1 a 2 colheres de sopa	(5 ml a 10 ml)

Peso	Dose / diária para gatos	
-5 kg	¼ a ½ colher de sopa	(1,25 ml a 2,5 ml)
5-10 kg	½ a 1 colher de sopa	(2,5 ml a 5 ml)

Para cães e gatos adultos

Roedores uma gota, (utilizar um conta-gotas) uma a duas vezes por semana





Óleo Vegetal

ALERGIAS, ANTIOXIDANTES, CARDIOVASCULAR

Benefícios

Omega 3 (ALA) + + + +

Graças à elevada percentagem de óleo de colza, este produto é fonte de ómega-3, especificamente ácido alfa-linolénico (ALA). O ALA é um ácido essencial que o corpo do cão não consegue produzir sozinho, por isso precisa de o obter através da dieta. Pois contribui para a saúde cardiovascular e reduz as alergias.

Omega 6 (Ácido Linoleico) + + +

Presente no óleo de colza, mas especialmente no óleo de girassol. Este óleo é essencial para a saúde do pelo e da pele do cão, além de ser essencial para o crescimento e desenvolvimento celular. A combinação de óleos de colza e de girassol proporciona um equilíbrio de ácidos gordos ómega-3 e ómega-6. Isto é importante para evitar o excesso de ácidos gordos ómega-6, que podem causar inflamação se não forem equilibrados com ácidos gordos ómega-3.

Antioxidantes + +

Os óleos de gralha de uva e de noz são fontes de vitamina E, que contribui para uma pele saudável e um sistema imunitário saudável. Já o óleo de nozes, devido ao seu ómega ALA, pode reduzir as alergias.

Omega 3 e 6 (EPA e DHA) +

Ver os benefícios do óleo de salmão.

Nº Art.	Formato		EAN
660	250 ml	6	 4 250078 906605
6600	500 ml	4	 4 250078 966005
6601	1000 ml	4	 4 250078 966012

Posologia:

Peso	Dose / diária para cães	
-10 kg	¼ a ½ colher de sopa	(1,25 ml a 2,5 ml)
10-25 kg	½ a 1 colher de sopa	(2,5 ml a 5 ml)
+25 kg	1 a 2 colheres de sopa	(5 ml a 10 ml)

Para cães adultos

Composição

Óleos vegetais (60% óleo de colza, 25% óleo de girassol, 5% óleo de noz, 5% óleo de gralha de uva), óleo de salmão 5%.



Óleo de insetos

PELE - DERMATITE, SISTEMA ÓSSEO, NERVOSO E MUSCULAR



Benefícios

Proteína de alta qualidade + + +

O óleo de tenébrio, também conhecido como óleo de larvas de bicho-da-farinha, é uma fonte de proteína de alta qualidade, essencial para o crescimento, manutenção e reparação dos tecidos. É benéfico em casos de dermatite atópica.

Vitamina D3 + + +

Ao contrário dos humanos, os cães, gatos e roedores não sintetizam vitamina D com a exposição solar. Por este motivo, é importante fornecê-la através de suplementos ou na dieta.

Devido ao seu efeito **regulador do cálcio e do fósforo**: ajuda a prevenir problemas ósseos como a osteoporose e o raquitismo, garantindo que os ossos se desenvolvem adequadamente e se mantêm fortes.

Contribui para a saúde muscular permitindo uma correta contração e função muscular.

Nº Art.	Formato		EAN
665	250 ml	6	 4 250078 906650
6650	500 ml	4	 4 250078 966500

Posologia

Peso	Dose / diária para cães adultos	
-10 kg	¼ a ½ colher de sopa	(1,25 ml a 2,5 ml)
10-25 kg	½ a 1 colher de sopa	(2,5 ml a 5 ml)
+25 kg	1 colher de sopa	(5 ml)

Peso	Dose / diária para gatos adultos	
-5 kg	¼ ml	(0,25 ml, aproximadamente 5 gotas)
5 - 6 kg	½ ml	(0,50 ml, aproximadamente 10 gotas)
≥ 6 kg	1 ml	(1 ml, aproximadamente 20 gotas)

Roedores

- Pequenos (hamsters, ratos): 1 gota (aprox. 0,05 ml)
- Médios (gerbil): 2 - 3 gotas (aprox. 0,1 - 0,15 ml)
- Grandes (porquinhos-da-índia, chinchilas): 4 - 5 gotas (aprox. 0,2 - 0,25 ml)

Sustentabilidade: A produção de óleo de tenébrio é mais sustentável do que a produção tradicional de carne, pois requer menos recursos — menos água, menos terra e menos alimentos — gerando, assim, menos gases com efeito de estufa.



A dose deve ser rigorosamente respeitada. A sobredosagem de vitamina D pode causar hipercalcemia, danos renais, problemas cardíacos e outros distúrbios graves. Os sintomas de toxicidade incluem: vômitos, perda de apetite, letargia, aumento da sede e da micção.



Óleo de cânhamo

ANSIOLÍTICO, CONTROLO DE CONVULSÕES, ANTI-INFLAMATÓRIO, PELE, VITALIDADE, APETITE

Benefícios

Omega 6 (GLA) + + +

O GLA (ácido gama-linoleico) é um tipo de ómega 6 encontrado em poucos óleos sendo eficaz no tratamento de problemas de pele em animais, tais como: secura, comichão, eczema e dermatite, reduz a inflamação da pele, proporcionando um pelo mais suave e brilhante.

É também eficaz na redução dos sintomas de artrite e outras doenças inflamatórias crónicas.

Ajuda a regular os níveis hormonais, o que pode ser útil em casos específicos relacionados com o ciclo reprodutivo ou com distúrbios hormonais.

De forma natural, contém fitonutrientes como os terpenos e os fenóis que ajudam a controlar a ansiedade e têm um efeito benéfico no sistema nervoso, que também ajuda a reduzir as convulsões.

Omega 9 (Ácido Oleico) + + +

Tem um efeito positivo no metabolismo e é uma fonte de energia que ajuda a manter um bom nível de atividade e vitalidade.

Omega 3 (EPA) + +

Os ácidos gordos polinsaturados facilitam o bom funcionamento do sistema cardiovascular. Fortalece o sistema imunitário, combatendo os agentes patogénicos de forma mais eficaz. (Ver óleo de salmão).

Nº Art.	Format		EAN
662	250 ml	6	4 250078 906629
6620	500 ml	4	4 250078 966203
6621	1000 ml	4	4 250078 966210

Posologia

Peso	Dose / diária para cães adultos	
-10 kg	¼ a ½ colher de sopa	(1,25 ml aprox.)
10-25 kg	½ a 1 colher de sopa	(2,5 ml aprox.)
+25 kg	1 a 2 colheres de sopa	(5 ml aprox.)

Roedores

- Pequenos (hamsters, ratos): 1 gota (aprox. 0,05 ml)
- Médios e grandes (gerbil, porquinhos-da-índia, chinchilas): 2 - 3 gotas (aprox. 0,1 - 0,15 ml)

Óleo de Microalgas

DESCRIÇÃO



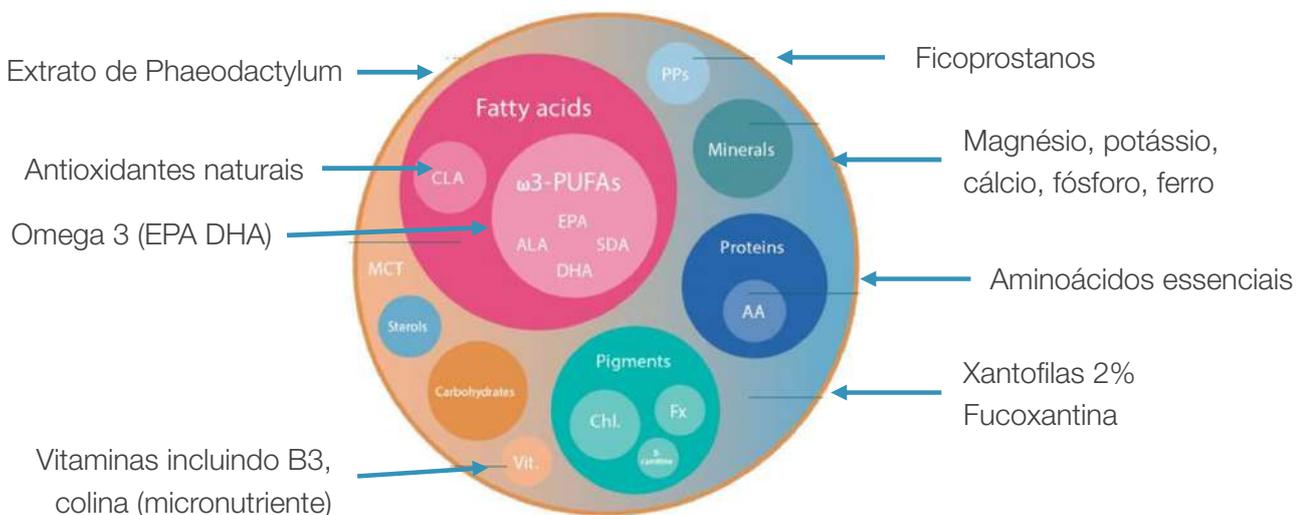
MICROALGAS PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM

A microalga marinha Diatomácea é a única espécie do género Phaeodactylum capaz de produzir um elevado rendimento de ácidos gordos, incluindo ácidos gordos polinsaturados, úteis para consumo animal e humano.

A biomassa é muito utilizada na aquacultura como alimento para peixes e outros produtos do mar. (principalmente para alimentar larvas) destinado ao consumo humano.



Utiliza a sinergia de vários compostos naturais para combater o stress oxidativo





Inflamação Articular

Sistema Cognitivo

Cardiovascular

Pele / Pelagem

Visão

BENEFÍCIOS

Benefícios

O óleo Bubimex com extrato de microalgas para cães, gatos e pequenos e grandes mamíferos é um suplemento alimentar inovador. O óleo de coco MCT e o extrato de microalgas *Phaeodactylum tricornutum* têm efeitos positivos na saúde dos animais de estimação. O extrato desta microalga fornece ácidos gordos, ômega-3 (EPA e DHA), antioxidantes (fucoxantina), vitaminas e minerais. Tem um efeito principal sobre:

- Mobilidade (Artrite e reumatismo)
- Envelhecimento (declínio cognitivo)
- Desempenho (Aprendizagem, Memória)
- Cardiovascular
- Pele - pelagem
- Visão

ALIMENTO COMPLEMENTAR PARA CÃES E GATOS

COMPOSIÇÃO: 99,65% de óleo MCT, 0,35% de extrato de *Phaeodactylum tricornutum* (este extrato de *Phaeodactylum* 0,35% é o ingrediente ativo do óleo de microalgas Bubimex)

COMPONENTES ANALÍTICOS: Proteína 8,4%, teor de gordura 67,8%, fibra bruta 0,5%, cinza bruta 4,19%, humidade 4,4%

INSTRUÇÕES DE USO: Para ser adicionado diretamente na boca do animal de estimação. A aplicação em alimentos ou em brinquedos de roer pode reduzir os efeitos. Administrar em várias tomas ao longo do dia. Consulte as instruções para uma dosagem precisa.

Para cães e gatos adultos

Dose Diária:

		
2,5 - 5 kg	15 - 30 kg	30 - 50 kg
= 3 	= 11 	= 17 

Art. 667 - 668

Frequência e utilização:

Em cães mais velhos, pode ser utilizado durante todo o ano com 1 ou 2 pausas se desejado (mas não necessário), a menos que o animal já tenha uma contraindicação prescrita para problemas específicos.

Nos cães jovens, no mínimo três vezes por ano durante um mês, se forem desejados resultados mais visíveis e dependendo das necessidades do animal, o óleo de microalgas é um alimento complementar que gera muitos benefícios. Aplicar as gotas diretamente na boca.

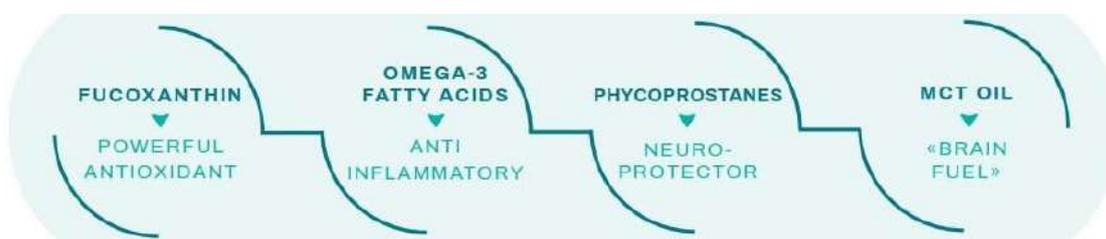
« Ideal para cães que pratiquem agilidade, para cães na fase final de desenvolvimento cognitivo (adolescência) e para cães ou gatos mais velhos »





BENEFÍCIOS

MICROALGAS PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM



- 🐾 A fucoxantina é um bioativo natural que atravessa a barreira hematoencefálica. Este pigmento pertence à família dos carotenóides e encontra-se nos cloroplastos de muitas microalgas castanhas
- 🐾 O ómega 3 pode aumentar o fluxo sanguíneo para o córtex cerebral e reduzir a inflamação
- 🐾 O TCM é uma fonte alternativa de glicose e induz um efeito hipnagénico
- 🐾 **Memória espacial de curto prazo:** Melhoria significativa na memória de curto prazo e na capacidade de memória operacional espacial. Porque elimina completamente os efeitos do D-Gal
- 🐾 **TESTE MWM: LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS:** Este teste mostrou que também melhora a memória a longo prazo, eliminando os efeitos nocivos do D-Gal no desempenho e na aprendizagem
- 🐾 Diminuição da ansiedade
- 🐾 Diminuição do stress oxidativo no cérebro
- 🐾 Diminuição do stress inflamatório no cérebro
- 🐾 **Bem-estar e Mobilidade:**
 - Redução dos níveis de inflamação articular
 - Diminuição da atrofia muscular
 - Diminuição da inflamação do tecido sinovial
 - Diminuição da erosão da cartilagem





BENEFÍCIOS

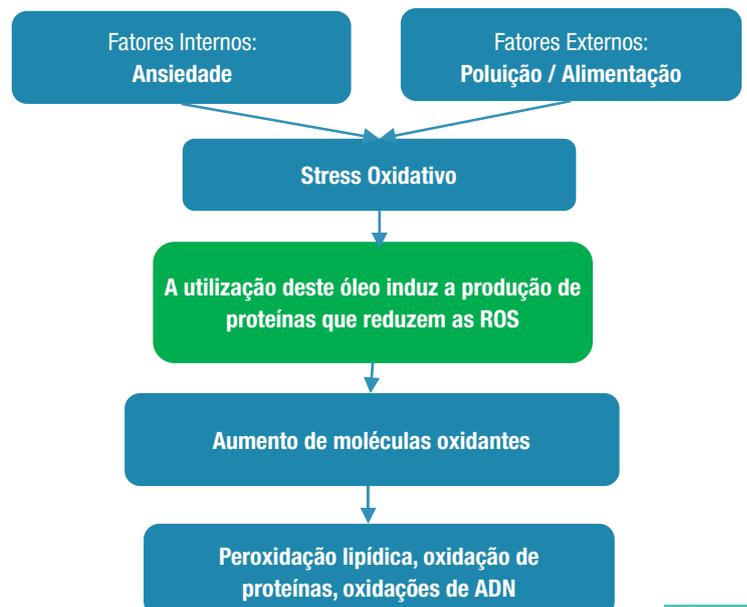
► 7 estudos pré-clínicos confirmam benefícios na **cognição, stress e ansiedade**



Ocorre quando existe muitas moléculas radicais e poucos antioxidantes

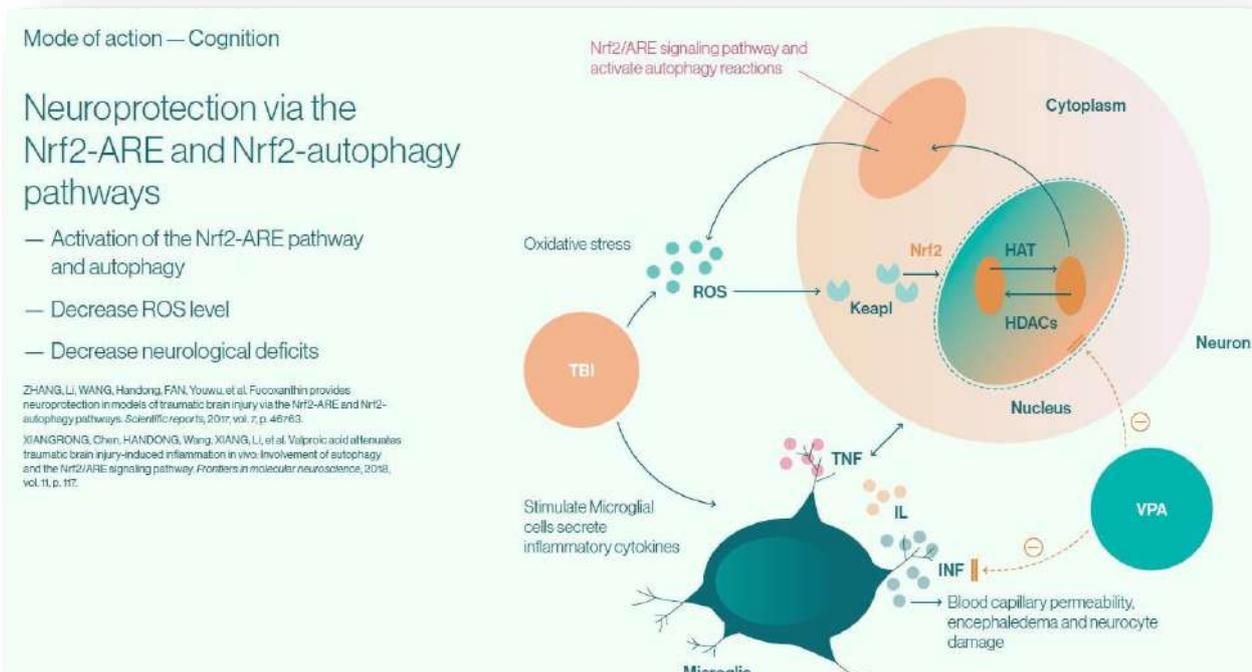


Ação das microalgas no stress oxidativo



MICROALGAS PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM

Como Funciona?



MICROALGAS: O ALIMENTO DO FUTURO PARA OS NOSSOS ANIMAIS

Para levar uma vida saudável, a comida para os animais deve fornecer **macronutrientes** (proteínas, lípidos e hidratos de carbono) e **micronutrientes** (oligoelementos, vitaminas, minerais e antioxidantes).

Os nutrientes podem ser fornecidos pela carne, peixe oleoso, gordura animal, óleo vegetal, cereais, ovos, arroz, etc. Mas no contexto das preocupações ambientais, as microalgas são uma alternativa sólida aos alimentos para animais de estimação:

- 🌱 Boa fonte de proteína
- 🌱 Fonte natural de ómega 3 e micronutrientes
- 🌱 Cheiro e sabor atraente a peixe
- 🌱 Sustentabilidade, são necessários menos recursos para a sua produção. Além disso, a matéria-prima utilizada é quase 70% reciclável.
- 🌱 Contribuição para a saúde integral dos animais de companhia





Suplementos alimentares



Suplementos



Art. 6670 Pó de chifre de veado 60 gr
Art. 6671 Pó de chifre de veado 400 gr

60 gr	6	
400 gr	4	



Benefícios

- Fortalece o sistema ósseo e muscular
- Reduz as alergias e a pele sensível
- Rico em cálcio e magnésio
- Promove o bom funcionamento dos rins



Art. 6672 Espirulina em pó 60 gr
Art. 6673 Espirulina em pó 400 gr

60 gr	6	
400 gr	4	



Benefícios

- Contribuição da proteína vegetal
- Fonte de energia e antioxidante
- Ingestão de vitamina A
- Protege o sistema imunitário



Não administrar a animais com problemas de coagulação.
 Não recomendado para cães com menos de 4 meses de idade.

Composição: 100% pó de chifre de veado

Utilização: Polvilhar diretamente na comida como cobertura ou misturar. Utilizar durante vários meses do ano. Certificar de que existe água limpa e fresca disponível. Conservar em local fresco e seco.

Para cães e gatos adultos.

Duração do tratamento: 2 meses

Uma colher de 1 ml = 0,6 gr

KG	*/
< 10 kg	3 à 4
> 10-15 kg	4 à 6
> 25 kg	6 à 8

Composição: 100% pó de espirulina

Utilização: Polvilhar diretamente na comida como cobertura ou misturar. Utilizar durante vários meses do ano. Certificar de que existe água limpa e fresca disponível. Conservar em local fresco e seco.

Para cães e gatos adultos.

Duração do tratamento: 2 meses

Uma colher de 1 ml = 0,6 gr

KG	*/
< 10 kg	$\frac{1}{2}$
> 10-15 kg	1
> 25 kg	2

Suplementos



Art. 6774 Pó de nervo de boi 40 gr
Art. 6775 Pó de nervo de boi 400 gr

40 gr	6	
400 gr	4	



Art. 6676 Pó de mexilhão verde 60 gr
Art. 6677 Pó de mexilhão verde 400 gr

60 gr	6	
400 gr	4	



Benefícios

- Rico em proteína animal
- Desenvolvimento muscular
- Recuperação e Desempenho
- Fonte de energia

Benefícios

- Protege ligamentos e cartilagens
- Melhora a mobilidade
- Retarda e limita os efeitos da osteoartrite



Não administrar a animais com problemas de coagulação e / ou cardíacos. Não recomendado para cães com menos de 4 meses de idade.

Composição: 100% pó de nervo de boi

Utilização: Polvilhar diretamente na comida como cobertura ou misturar. Utilizar durante vários meses do ano. Certificar de que existe água limpa e fresca disponível. Conservar em local fresco e seco.

Para cães e gatos adultos.

Duração do tratamento: 2 meses

Uma colher de 1 ml = 0,6 gr

KG	*/ 5ml
< 10 kg	1/2
> 10-15 kg	1
> 25 kg	2

Composição: 100% pó de mexilhão verde.

Contêm zinco, magnésio, cálcio e complexos B.

Utilização: Polvilhar diretamente na comida como cobertura ou misturar. Utilizar durante vários meses do ano. Certificar de que existe água limpa e fresca disponível. Conservar em local fresco e seco.

Para cães e gatos adultos.

Duração do tratamento: 2 meses

Uma colher de 1 ml = 0,6 gr

KG	*/ 5ml
< 10 kg	1/2
> 10-15 kg	1
> 25 kg	2

Suplementos



Art. 6680 Pó de Krill 60 gr
Art. 6681 Pó de Krill 400 gr

60 gr	6	4 250078 967804
400 gr	4	4 250078 967811



Benefícios

- Pelo brilhante e pelagem saudável
- Reduz a secura da pele
- Melhora a textura do pelo
- Previne problemas de pele, como alergias
- De melhor digestão e absorção (porque este tipo de Omega 3 está ligado aos fosfolípidos)
- Melhora a mobilidade
- Fortalece o sistema imunitário

Composição: 100% krill em pó, o krill é rico em ómega 3 e 6 (EPA 10%, DHA 4,5%), astaxantina 80 mg/kg e colina. É composto por 20 aminoácidos, 13 vitaminas e 7 minerais.

Utilização: Polvilhar diretamente na comida como cobertura ou misturar. Utilizar durante vários meses do ano. Certificar de que existe água limpa e fresca disponível.

Para cães e gatos adultos.

Duração do tratamento: 2 meses
 Uma colher de 1 ml = 0,6 gr

KG	🍴
< 10 kg	1/2 🍴
> 10-15 kg	1 🍴
> 25 kg	2 🍴



Art. 6688 Pó de cenoura 60 gr
Art. 6689 Pó de cenoura 400 gr

60 gr	6	4 250078 967880
400 gr	4	4 250078 967897



Benefícios

- Saúde oral, dos olhos e do pelo
- Melhora o trânsito intestinal
- Ajuda a controlar o peso
- Rico em vitaminas
- Contribuição de potássio que auxilia na manutenção do equilíbrio hídrico e da função muscular
- O manganês é essencial para um bom metabolismo e formação óssea

Composição: 100% pó de Cenoura

Utilização: Polvilhar diretamente na comida como cobertura ou misturar. Utilizar durante vários meses do ano. Certificar de que existe água limpa e fresca disponível. Conservar em local fresco e seco.

Para cães e gatos adultos.

Duração do tratamento: 2 meses
 Uma colher de 1 ml = 0,6 gr

< 10 kg	3 🍴
> 10-15 kg	5 🍴
> 25 kg	9 🍴

Suplementos



Art. 6684 Pó de levedura de cerveja 60 gr

Art. 6685 Pó de levedura de cerveja 400 gr

60 gr	6	
400 gr	4	



Benefícios

- Promove o metabolismo
- Melhora a função celular
- Ajuda a melhorar o funcionamento do sistema nervoso
- Fortalece o sistema imunitário
- Antioxidantes e Desintoxicantes
- Pelagem, unhas e músculos saudáveis
- Saúde intestinal e imunológica

Composição: 100% levedura de cerveja em pó

Utilização: Polvilhar diretamente na comida como cobertura ou misturar. Utilizar durante vários meses do ano. Certificar de que existe água limpa e fresca disponível. Conservar em local fresco e seco.

Para cães e gatos adultos.

Duração do tratamento: 2 meses

Uma colher de 1 ml = 0,6 gr

< 10 kg	2	
> 10-15 kg	4	
> 25 kg	6	



Art. 6686 Pó de yak 60 gr

Art. 6687 Pó de yak 400 gr

60 gr	6	
400 gr	4	



Benefícios

- Estimula o apetite
- Ajuda na digestão
- Saúde oral
- Fonte de cálcio
- Rico em vitaminas e minerais

Composição: Vitaminas por 100 g zinco 18,6 mg, sódio 88,7 mg, cálcio 3,5 g, potássio 233 mg, ferro 5,1 mg, ácido fólico 3,9 µg, fósforo 1,3 g, vitamina B6 0,9 µg, vitamina D 0,04 mg, vitamina E 0,01 mg/100%.

Utilização: Polvilhar diretamente na comida como cobertura ou misturar. Utilizar durante vários meses do ano. Certificar de que existe água limpa e fresca disponível. Conservar em local fresco e seco.

Para cães e gatos adultos.

Duração do tratamento: 2 meses

Uma colher de 1 ml = 0,6 gr

Dosagem: Igual que com o fermento



Benefícios

A nossa linha de sprays para o pelo contém ingredientes naturais como jojoba e nozes de macadâmia.

A jojoba contém 1 molécula de glicerina e 2 ácidos gordos. A sua composição destaca o seu elevado teor de ácido gordo gadoleico (tipo ómega 9), vitamina E e ainda contém ómega 6.

Possui propriedades antissépticas, anti-inflamatórias e antimicrobianas, o que o torna perfeito para combater estas erupções hormonais da pele.

- Limpa profundamente a pele do animal
- Evita o excesso de pele morta
- Previne a caspa
- Mais brilho e volume
- Previne o frisado
- Condicionador natural
- Previne a queda do pelo
- Promove o crescimento

Aplicação

Pulverizar uniformemente sobre o pelo a uma distância de 30 cm.

Depois escovar bem para obter o efeito ideal.

Nº Art.	Size		EAN
3286	175 ml	6	 4 250078 932864





Benefícios

Ajuda a regenerar as células da pele e, por conseguinte, produz o crescimento de pelos novos e saudáveis. Atua como antioxidante, mesmo quando usado externamente, penetra pelos poros da pele e torna o seu efeito duradouro.

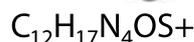
As nozes de macadâmia contêm grandes quantidades de tiamina e gorduras monoinsaturadas (cerca de 60% de ácidos gordos monoinsaturados), minerais, hidratos de carbono, cálcio, fósforo, proteínas e vitaminas A, B1 e B2. Contém ácido oleico (ômega 9), ácido palmitoleico (ômega 7) que restaura a humidade e melhora a textura do pelo, especialmente para cães com pele seca, pelo áspero ou danificado.

Aplicação

Pulverizar uniformemente sobre o pelo a uma distância de 30 cm.

Depois escovar bem para obter o efeito ideal.

- Hidratante
- Reduz a irritações ou possível vermelhidão
- Mais brilho e volume (devido à sua capacidade de nutrir o folículo piloso)
- Reparação de danos: devido a fatores externos como o sol, o frio ou os produtos de higiene, o pelo pode ser danificado, reparado e amaciado
- Protege a pelagem dos radicais livres
- Leve e de fácil absorção
- Previne a caspa



Nº Art.	Size		EAN
3287	175 ml	6	 4 250078 932871



CHAMPÔS

PARABEN
FREE



Champô para cachorro

Nº Art.	Size	Box	EAN
3280	250 ml	6	4 250078 932802



Champô para pelo negro

Nº Art.	Size	Box	EAN
3282	250 ml	6	4 250078 932826



Champô para pelo branco

Nº Art.	Size	Box	EAN
3281	250 ml	6	4 250078 932819



Champô de Aloe Vera

Nº Art.	Size	Box	EAN
326	250 ml	6	4 250078 903260



Champô desembaraçador

Nº Art.	Size	Box	EAN
3283	250 ml	6	4 250078 932833
3277	1000 ml	1	4 250078 932772



Champô anti-comichão

Nº Art.	Size	Box	EAN
3285	250 ml	6	4 250078 932857
3278	1000 ml	1	4 250078 932789



CHAMPÔS



Champô desembaraçador

Nº Art.	Size		EAN
3283	250 ml	6	 4 250078 932833
3277	1000 ml	1	 4 250078 932772

Champô em Espuma

Nº Art.	Size		EAN
3250	220 g	6	 4 250078 932505

Champô seco

Nº Art.	Size		EAN
325	100 g	6	 4 250078 903253

Champô em espuma e champô em seco para cães e gatos · Usar em pelo seco · Sem enxaguamento · Sem parabenos



Toalha de Microfibras

Nº Art.	Size		EAN
3292	50 x 60 cm	6	 4 250078 932925
3293	110 x 60 cm	6	 4 250078 932932

SPRAY



N� Art.	Size		EAN
3288	175 ml	6	 4 250078 932888

O Spray desembaraçador da Bubimex, facilita a escovagem e alisa o pelo. Também atua como repelente contra poeiras e sujidades.   inodoro e não fica gorduroso.



Utilizar em cestos, almofadas, móveis, coleiras...

A lavanda e a camomila têm propriedades ansiolíticas. O seu aroma pode ajudar a acalmar o sistema nervoso, reduzindo o stress e a ansiedade.

Este spray pode ser útil em situações como tempestades, visitas ao veterinário ou grooming, fogos de artifício, separação ou viagens.

Contém: metilcloroisotiazolinona, metilisotiazolinona



Ter cuidado com o contacto com os olhos, pois pode causar irritação grave. Em caso de irritação, lavar com água de forma abundante.

Relaxamento



Nº Art.	Size		EAN
345	175 ml	6	 4 250078 903451

Uso tópico

O CBD pode ser benéfico para cães com problemas de pele, comichão, dermatite ou infeções ligeiras.

Pode também reduzir os efeitos da artrite, como a dor e a inflamação, devido às suas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias.

Ajuda também na recuperação mais rápida de feridas. Reduz a ansiedade.

Aplicação: Lavar as mãos. Aplicar diretamente no pelo e massajar suavemente em movimentos circulares.



Art. 6631	Óleo CBD 2,5%	10ml
Art. 6641	Óleo CBD 5%	10ml



*Fabricamos bem-estar, procurando o
prazer dos gatos*



Art. 9301



Art. 9302



Art. 9303



Art. 9304

Benefícios

- Previne as bolas de pelo: Ajuda a lubrificar o tubo digestivo, facilitando a eliminação natural dos pelos pelas fezes. O que reduz o risco de formação de bolas de pelo
- Elimina bolas de pelo
- Diminuição da Regurgitação
- Multivitamínico
- Reduz os efeitos da osteoartrite, protege a cartilagem e os ligamentos (art. 9303)



Malte para gatos



Nº Art.	Size		EAN
9301	100 gr	8	4 250078 993018

Art. 9301 Malte para gatos
100gr (frango)

Composição: Extrato de malte (55%), óleos e gorduras, carne e subprodutos animais (10% aves)

Estrutura e características físico-químicas:

Forma pastosa, entre sólida e líquida.

Aditivos: Nenhum

Utilização: Administrar diretamente na boca do animal ou na comida. Também pode ser colocado a quantidade recomendada nas patas dianteiras para que o animal lamba enquanto se limpa.

Dose diária: 3 vezes x 1 gr para gatos de 5 - 6 kg
(1g = 1,5 cm de pasta)



Nº Art.	Size		EAN
9302	100 gr	8	4 250078 993025

Art. 9302 Malte para gatos
100gr (salmão)

Composição: Extrato de malte (55%), óleos e gorduras (incluindo 30% de óleo de salmão). Carnes e subprodutos animais



Nº Art.	Size		EAN
9303	100 gr	8	4 250078 993032

Art. 9303 Malte para gatos
100gr (mexilhões)

Composição: Extrato de malte (55%), óleos e gorduras, pó de mexilhão verde da Nova Zelândia (10%)

Composição: Extrato de malte (55%), óleos e gorduras, pó de mexilhão verde da Nova Zelândia (10%)



Nº Art.	Size		EAN
9304	100 gr	8	4 250078 993049

Art. 9304 Malte para gatos
100gr (espirulina e óleo de bacalhau)

Malte multivitamínico,
naturalmente rico em vitamina A,
D3 graças ao óleo de fígado de
bacalhau e à spirulina



Leite



Composição:

Leite e derivados, subprodutos vegetais, óleos e gorduras, dextrose (para fornecer uma fonte rápida de energia, pois é facilmente absorvida pela corrente sanguínea). Vitamina A 50.000 IE/UI/IU, Vitamina D3 2.000 IE/UI/IU, Vitamina E α -Tocoferol 250 mg, Vitamina B1 Tiamina 60 mg, Vitamina B2 Riboflavina 40 mg, Vitamina B6 Cloridrato de Piridoxina 30 mg, Ácido L-Ascórbico (Vitamina C) 120mg

Utilização:

Misturar 1 unidade de leite em 3 unidades de água morna (max. 30°)

Gatinhos de idade < 2 semanas: de 1 a 2 colheres de solução a cada 2 horas, 10 vezes ao dia

Gatinhos de idade > 3 a 4 semanas: de 3 a 4 colheres de solução a cada 2 horas, 8 vezes ao dia

Gatinhos de idade > 4 semanas: misturar a solução com o alimento principal do gato até que esteja satisfeito

Nº Art.	Size		EAN
925	250 gr	4	 4 250078 909255

Estimulantes...



Art. 911 Erva para gatos em Spray 150 ml

Nº Art.	Size		EAN
911	150 ml	6	 4 250078 909118

Art. 9111 Spray de Valeriana 175 ml

Nº Art.	Size		EAN
9111	175 ml	6	 4 250078 991113

SNACKS CREMOSOS



TEXTURA CREMOSA



FAVORECE A HIDRATAÇÃO



SNACK & TOPPING



SEM CEREAIS



ALTO TEOR DE CARNE



AMPLA SELEÇÃO DE SABORES



168 cm

38cm

29cm

Artigo	Descrição	Und
BBX923	Snack cremoso de Salmão (4p)	12
BBX924	Snack cremoso de Salmão e Atum (4p)	12
BBX9233	Snack cremoso Kitten de Atum (4p)	12
BBX9234	Snack cremoso de Frango com Queijo (4p)	12
BBX9236	Snack cremoso de Peru e Krill (4p)	12
BBX9237	Snack cremoso de Frango e Caranguejo (4p)	12
BBX9230	Snack cremoso Skin&Coat de Salmão e Krill (4p)	24
BBX9231	Snack cremoso Digestão de Salmão e Krill (4p)	24
BBX9232	Snack cremoso Imunidade de Salmão e Boi (4p)	24
BBX9235	Snack cremoso Urinário de Frango e Mirtilo (4p)	12
BBX9238	Snack cremoso Multipack (20p)	1
BBX9239	Snack cremoso Multipack (50p)	1
BBX6056	Expositor Bubimex Snacks cremosos 12 displays	1



MULTI-PACKS

Também disponível em caixas de 20 e 50 unidades

BBX9240

BOOSTER PACK

Aumente as tuas vendas com amostras grátis para os consumidores



Mesma receita, mesma delicia

BUBI
nature
by Bubimex



  Bubimex _es
ARP Nutrisome

BUBINATURE GATO

FILETE 70 G



FILETE 140 G



EMBALAGEM 70 G



SAQUETAS 70 G



SOPA 135 G



BUBINATURE CÃO

FILETE 70 G



FILETE 150 G



SOPA 135 G



Acessórios



N° Art.	Size		EAN
4953	20x20x0,75 cm	6	4 250078 949534
4954	20x20x1 cm	6	4 250078 949541



N° Art.	Size		EAN
4955	20x20x1 cm	6	4 250078 949558
4956	20x20x1 cm	6	4 250078 949565

N° Art.	Size		EAN
4957	Ø16,5x8 cm	6	4 250078 949572
4958	Ø16,5x8 cm	6	4 250078 949589



Pelù

Pet Cat

A base de óleos
essenciais naturais



Especialmente desenhado para gatos. Elimina os pelos soltos, evitando a formação de bolas de pelo



Elimina a sujidade da caspa do pelo dos gatos, reduzindo os alérgenos que contém



Liberta uma ligeira mistura de óleos essenciais naturais e extratos de plantas naturais para manter uma pelagem saudável



Escova diretamente a pelagem do gato, inclusive em contrapelo. Pode ser repetido o processo várias vezes durante o dia. Não substituí por uma escova regular do pelo

Ref: LINTCAT

Hairball

Tomillo, Lavanda y Limon



Bubimex

Pelù

Rolos
Removedor de Pelos
SUPERPREMIUM



DISTRIBUIDOR OFICIAL

PERFUME NATURAL SUPER ADESIVO MAIS DE 60 APLICAÇÕES (10 METROS) ÓLEOS ESSENCIAIS

ANTI-ÁCAROS

1. Elimina 99% dos ácaros
2. Extratos vegetais que repelam os ácaros, evitando o reaparecimento
3. Perfumado, ambienta o espaço
4. Limpa e remove o cotão de todos os tipos de superfícies e tecidos
5. Papel adesivo altamente eficaz

ref: LINTAC



ANTIBACTERIANO

1. Elimina 90% das bactérias ambientais
2. Extratos vegetais conhecidos pelos seus efeitos desinfetantes
3. Perfumado, ambienta o espaço
4. Limpa e remove o cotão de todos os tipos de superfícies e tecidos
5. Papel adesivo altamente eficaz

ref: LINTBAC



ANTI-MOSQUITOS

1. Aplicável diretamente nos pelos dos animais. Dá brilho e cheiro
2. Repela os mosquitos. Liberta uma mistura de óleos essenciais conhecidos pela sua ação protetora
3. Perfumado, ambienta o espaço
4. Limpa e remove o cotão de todos os tipos de superfícies e tecidos
5. Papel adesivo altamente eficaz

ref: LINTMOS



Effect of Fucoxanthin Alone and in Combination with D-glucosamine Hydrochloride on Carrageenan/kaolin-induced Experimental Arthritis in Rats

Dezheng Gong,^{1,2} Wanjiang Chu,¹ Liping Jiang,¹ Chengyan Geng,¹ Jing Li,² Nobuyuki Ishikawa,³ Koji Kajima^{3*} and Laifu Zhong^{1*}

¹China-Japanese Joint Institute for Medical and Pharmaceutical Science, Dalian Medical University, No. 9, West Segment of South Lvshun Road, Dalian 116044, China

²College of Basic Medical Sciences, Dalian Medical University, No. 9, West Segment of South Lvshun Road, Dalian 116044, China

³Sankyo Co., Ltd., 573-13, Denbo, Fuji, Shizuoka, Japan 417-0061

The objective of the present study was to investigate the effect of the fucoxanthin (FUCO) alone and in combination with glucosamine hydrochloride (GAH) on carrageenan/kaolin-induced inflammatory arthritis model in rats and to explore its underlying mechanisms. Joint swelling, muscle weight ratio (%), histopathological examination and scoring, and proteoglycan degradation were examined. Pro-inflammatory interleukin (IL-1 β) and tumor necrosis (TNF- α) levels, cyclooxygenase-2 (COX-2), and inducible nitric oxide synthase (iNOS) protein expression and nitric oxide (NO) level in knee synovial tissue extract were analyzed using enzyme-linked immunosorbent assay, western blotting analysis, and Griess reagent assay, respectively. FUCO and FUCO + GAH not only may significantly reduce degrees of knee joint swelling and prevent against muscle atrophy, but also may significantly attenuate inflammation in synovial tissue, cartilage erosion, and proteoglycan loss. The efficacies of FUCO + GAH were stronger than that of GAH or FUCO. FUCO alone and FUCO + GAH can significantly inhibit upregulation of COX-2 and iNOS protein expressions, decrease of IL-1 β and TNF- α levels, and reduce NO production in knee synovial tissue extract. These results indicated that FUCO is an effective anti-arthritis agent through an antiinflammation mechanism. FUCO may enhance therapeutic effect of GAH on rat arthritis through mechanism of antiinflammation. Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: fucoxanthin (FUCO); antiinflammatory; anti-arthritis; cytokine; proteoglycan (PG).

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is characterized by chronic inflammation of the synovial membrane and infiltration of lymphocytes and macrophages, which cause progressive destruction of cartilage and bone. Although the etiology of RA is poorly understood now, it is widely recognized that an interdependent network of cytokines plays a primary role in mediating the pathophysiological processes underlying inflammation and tissue destruction in RA. One of the critical pathogenesis of RA is the tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β), and rheumatoid factor in synovial membrane and serum (Dayer, 2003; Brennan and McInnes, 2008). Conventional medicine, including treatment with steroids, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), and such biological agents as TNF- α and IL-1 β antagonists, has shown only limited success against RA (Fleischmann *et al.*, 2004). Moreover, the adverse effects of drug therapy are significant and include gastrointestinal disturbances, infections, and cardiovascular risks (Scheiman, 2001; Mangge *et al.*, 2003).

It is widely accepted that macrophages are the principal cells produce pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1, and IL-6, which play important roles in both RA in human and rat (Dayer, 2003; Silva *et al.*, 2000). IL-1 also contributes to inflammation by inducing the expression of cell-adhesion molecules, other cytokines, chemokines and chemokine receptors, angiogenic factors, and small inflammatory mediators for example prostaglandin E₂ (PGE₂) and nitric oxide (NO), through the stimulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible NO synthase (iNOS). Upregulation of the production of prostaglandins and other pro-inflammatory mediators by IL-1 thereby accounts for some of the pain, swelling, and tenderness typically seen in rheumatoid joint inflammation (Dayer, 2003). Carrageenan, a sulfated mucopolysaccharide, is extracted from the seaweed *Chondrus* spp. and *Gigartina* spp., which are commonly known as Irish moss or carrageen moss. It has been used to induce various rat models of inflammation, including the footpad inflammation and paw edema model (Vinegar *et al.*, 1987). Moreover, carrageenan has been used to induce acute arthritis (Lundeberg *et al.*, 1996) and deteriorating pathological symptoms of inflammatory arthritis in other models such as the model of RA (Silvan *et al.*, 1996; Day *et al.*, 2004). The lesions present in the carrageenan-induced arthritis model possess many features that mimic those of human RA, such as synovitis, synovial pannus formation, and degradative changes in the articular cartilage matrix proteoglycan (PG). Intra-articular injection of lambda

* Correspondence to: Koji Kajima, Sankyo Co., Ltd., 573-13, Denbo, Fuji, Shizuoka, Japan 417-0061; Laifu Zhong, China-Japanese Joint Institute for Medical and Pharmaceutical Science, Dalian Medical University, No. 9, West Segment of South Lvshun Road, Dalian 116044, China.
E-mail: kajima@sankyocoldt.co.jp; zhong@dlmedu.edu.cn

carrageenan into the knee joint and paw resulted in localized inflammation, which is largely associated with the production of several inflammatory mediators such as cytokines (TNF- α , IL-1 β), COX-2, NO, and PGE₂ (Posadas *et al.*, 2004; Rocha Ana *et al.*, 2006).

Brown algae hijiki (*Sargassum fusiforme*), kombu (*Laminaria japonica*), wakame (*Undaria pinatifida*), and *Padinatetrastromatica* are edible delicacies consumed across Southeast Asia and a few European countries, and are reported to contain high levels of fucoxanthin (FUCO) (Wang *et al.*, 2005). Many of the biological functions of FUCO have been previously characterized, including its antioxidant (Yan *et al.*, 1999) and antiinflammatory activities (Shiratori *et al.*, 2005). Interestingly, recent studies demonstrate that FUCO reduces the levels of pro-inflammatory mediators including TNF- α , IL-1 β , IL-6, NO, and PGE₂ and significantly inhibited the iNOS and COX-2 protein expressions (Kim *et al.*, 2010; Heo *et al.*, 2010). These effects of FUCO may be a useful therapeutic approach for the various inflammatory diseases, including RA. Glucosamine is an amino sugar that acts as a precursor in the biosynthesis of glycosaminoglycan (GAG) and PG aggregates (de los Reyes *et al.*, 2000). Given that one of the characteristics of RA and osteoarthritis in an imbalance in the synthesis and degradation of cartilage components, of the possible physiologic roles of exogenous glucosamine is to function as an additional source of hexosamine and sulfate precursors for GAG synthesis (de los Reyes *et al.*, 2000; Setnikar *et al.*, 1986). The data indicated that oral glucosamine hydrochloride (GAH) prevents the loss of GAG in joint cartilage damage (Oegema *et al.*, 2002). However, there has been no report so far on the efficacy of FUCO alone and in combination with GAH in carrageenan/kaolin-induced inflammatory arthritis. In this study, we aimed to investigate the FUCO alone and in combination with GAH effects on cartilage destruction and synovial inflammation in an experimental inflammatory arthritis model induced by intra-articular injections of carrageenan/kaolin in rats.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. FUCO was supplied by BGG-JAPAN Co., Ltd. (Tokyo, Japan). FUCO was oily liquid extracted with ethanol from kombu (*Laminaria japonica*) collected in Japan and then purified. The purity of FUCO was approximately 96%. GAH was supplied by Nippon Suisan Kaisha, Ltd. (Tokyo, Japan). Purity of the GAH used was 99.5%.

Animals. Male Sprague-Dawley rats, body weight range of 168–226 g, from Laboratory Animal Center, Dalian Medical University (Dalian, PR China), acclimatized to laboratory conditions for 1 week and observed any sign of illness. Rats were housed in plastic cages (five rats/cage) on chip bedding. The animal room was maintained at 23–25 °C and 50–60% relative humidity with a 12-h light/dark cycle and room air change of about 12 times/h. All animals were supplied with a sterile commercial diet and tap water, which was boiled and then chilled *ad libitum* throughout the acclimation

and testing periods. The experimental protocol was approved by the Animal Ethics Committee of Dalian Medical University, in accordance with 'principles of Laboratory Animal Care and Use in Research' (Ministry of Health, Beijing, China).

Induction of arthritis. Arthritis was induced by λ -carrageenan and kaolin as described previously (Day *et al.*, 2004). The rats were anesthetized with pentobarbital sodium (30 mg/kg b.w.) by intraperitoneal injection, and then 0.1 mL mixture of 2% λ -carrageenan and 4% kaoling (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) in sterile saline (0.9%) into synovial cavity of right knee joint through the patellar ligament with a 26 gauge needle after the right knee joints were sterilized with 75% ethanol solution, followed by repeated limb extensions and flexions for 15 min to ensure adequate dispersion of the suspension within the joint and to cause articular abrasion. The test substances were administered by gavage 1 h before induction of arthritis, and then daily for six consecutive days from day 1 after induction of arthritis.

Group composition and treatment. The animals were randomly assigned to six groups of 20 rats. Rats in three experimental groups received by gavage distilled water (control and model control) or diclofenac sodium solution (positive drug control, 2.0 mg/kg b. w.), respectively. Rats in additional three experimental groups received by gavage FUCO 18 mg/kg b.w., GAH 1000 mg/kg b.w., and FUCO + GAH, respectively.

Degree of right knee joint swelling. The diameter (cm) of left and right knee joints for rats in each group were estimated by digital caliper days 1, 3, 5, and 7 after induction of arthritis (day 0). The degree of right knee joint swelling was calculated by:

$$\frac{\text{diameter (cm) of right knee joint} - \text{diameter (cm) of left knee joint}}{\text{diameter (cm) of right knee joint}} \times 100$$

Measurement of muscle weight. At day 7 after induction of arthritis, the gastrocnemius/soleus and tibialis anterior muscles from both legs were separated and sampled after euthanasia with ethyl ether, and their fresh weights were taken, and the muscle weight ratio (%) was calculated by comparing muscle weight of the injected hind limb with the un-injected hind limb.

Histopathological examination and scoring. Right knee joints were isolated under ether anesthesia for rats in each group at day 7 after induction of arthritis, fixed in 10% neutral buffered formalin, decalcified with 5% formic acid-formalin, embedded in paraffin, and sectioned. The sections were stained with hematoxylin-eosin to observe inflammation in synovial tissue and cartilage erosion. The additional sections were stained with safranin-o-fast-green to observe PG depletion in articular cartilage.

All histopathological evaluations were carried out blindly by the same pathologist. The histopathological severity of arthritis was evaluated and scored on the basis of inflammation in synovial tissue, cartilage erosion, and PG loss in articular cartilage.

The inflammation in synovial tissue, cartilage erosion, and PG loss in articular cartilage was evaluated by a scoring system based on Rooney, *et al.*, Plater-zybert, *et al.*, and Joosten, *et al.*, respectively, with a little modification as described in Table 1. The total histopathological scores were the sum of the three parameters.

Preparation of knee synovial tissue extract. Synovial tissue extract was prepared according to the protocol previously described by Penido *et al.* and Jean *et al.*, and modified slightly by us. Ten rats in each group were anesthetized by ether and then killed 24 h after injection of carrageenan/kaolin to knee joint cavity in rats. The right hind limb of the rat was cut off and washed with an ice-cold phosphate-buffered saline. The knee synovial tissue was collected and homogenized by hand using a glass potter homogenizer in ice-cold extract buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100) with added protease inhibitor cocktail. The homogenate was transferred a microcentrifuge, and then centrifuged (20,000 × g for 10 min at 4 °C). The supernatant was stored at -70 °C. Total protein content in the supernatant was estimated using Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Enzyme-linked immunosorbent assay. Levels of IL-1 β and TNF- α in the knee synovial tissue extract were measured by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using matched antibody pairs from R & D Systems (Quantikine, R & D Systems, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions.

Western blotting analysis. The western blotting analysis was performed according to the method previously

Table 1. Histopathological parameters and scores for the arthritis lesion in rats

Histopathological parameter	Scoring scale
Synovial tissue	
No change	0
Synovial lining cell hyperplasia	1
Villous formation (<500 μ m projections)	2
Papillary proliferation (>500 μ m projections)	3
Articular cartilage	
No destruction of cartilage (normal surface appearance)	0
Localized cartilage erosions	1–2
More extended erosions	3
General cartilage destruction and presence of bone erosions	4
Proteoglycan in articular cartilage	
Fully stained cartilage	0
Destained cartilage	1–2
Complete loss of cartilage	3

described by Jean *et al.* and Rosengren *et al.*, and modified slightly by us. In brief, an equal volume of sample buffer (2% sodium dodecyl sulfate, SDS), 10% glycerol, 0.1% bromophenol blue, 2% 2-mercapto-ethanol, and 50 mM Tris-HCl, pH 7.2) was added to the sample of knee synovial tissue extract, which was then loaded onto a tricine SDS-polyacrylamide gel and electrophoresed at 150 V for 90 min. The proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P, Millipore, 0.45 μ m pore size). The membrane was blocked for 60 min at room temperature with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (TBS), and then incubated for 180 min at room temperature with primary antibodies against iNOS (1:300 dilution) or COX-2 (1:1000 dilution, BD pharmingen, San Diego, CA, USA) or β -actin (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) proteins. After three washes for 15 min in Tris-buffered saline supplemented with 0.1% Tween-20, the membrane was incubated with the horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit IgG as second antibody (1:2000 dilution, Santa Cruz) for 60 min at room temperature, respectively. Enhanced chemiluminescence (ECL kit, Santa Cruz) was used for visualizing the antigens. Western blotting for β -actin was used as internal control. Levels of immunoreactive proteins were detected by densitometry on resulting films.

Determination of NO level. NO level in knee synovial tissue extract was determined as its stable oxidative metabolite. In brief, 100 μ L of supernatant of knee synovial tissue extract was mixed with an equal volume of Griess reagent (0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride and 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid). The absorbance at 550 nm was measured, and the nitrite concentration was determined with a curve calibrated on sodium nitrite standards.

Statistical analysis. Mean values and SD were calculated for each group. Statistically significant difference between control and experimental groups was tested by one-way ANOVA, and statistical significance between two groups was tested by student's *t*-test or the Mann-Whitney's *U*-test for scores of histopathological parameters using SPSS software, version 13.0 (SPSS, Chicago, USA).

RESULTS

Effects on degree of knee joint swelling

The results are shown in Fig. 1. Rats in model control group showed a significant increase in degrees of right knee joint swelling at days 1, 3, 5, and 7 after induction of arthritis ($p < 0.01$), compared with control rats. Rats in diclofenac sodium group showed a significant reduction in degrees of right knee joint swelling at days 1, 3, 5, and 7 after induction of arthritis ($p < 0.01$). Rats in FUCO and FUCO + GAH groups showed a significant reduction in degrees of right knee joint swelling at days 1, 3, 5 and 7 after induction of arthritis ($p < 0.05$ or $p < 0.01$). Rats in GAH group showed a significant reduction in

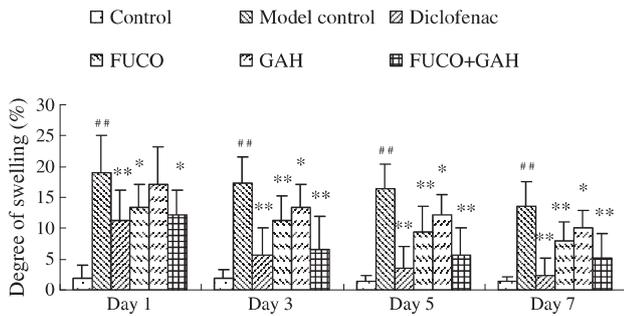


Figure 1. Effects of fucoxanthin (FUCO) and/or glucosamine hydrochloride (GAH) on degree of knee joint swelling in carrageenan/kaolin-induced arthritis model in rats. Values are mean \pm SD, $n = 10$. #, significantly different from control at $p < 0.01$; *, significantly different from model control at $p < 0.05$; **, significantly different from model control at $p < 0.01$.

degrees of right knee joint swelling at days 3, 5, and 7 after induction of arthritis ($p < 0.05$). The results suggest that efficacies of FUCO for antiinflammation of arthritis might be the most strong and efficacy of GAH might be second.

Effect on muscle atrophy caused by carrageenan/kaolin

Fig. 2 shows the muscle weight ratio of gastrocnemius/soleus and tibialis anterior of rats at day 7 after induction of arthritis. Obvious decreases in muscle weight ratio of gastrocnemius/soleus and tibialis anterior in model control group were observed, compared with that in control group ($p < 0.01$), suggesting that arthritis caused the muscle atrophy of right hind limb of rats. The muscle weight ratios of gastrocnemius/soleus and tibialis anterior in diclofenac sodium group and FUCO and FUCO+GAH groups were significantly increased, compared with model control group ($p < 0.01$).

Histopathological examination findings

The results are shown in Figs 3–6. The histopathological features of rats in model control group at day 7 after induction of arthritis were as follows: hyperplasia of

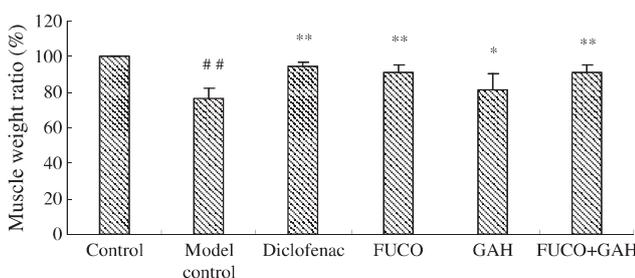


Figure 2. Effect of fucoxanthin (FUCO) and/or glucosamine hydrochloride (GAH) on muscle weight ratio (%) in carrageenan/kaolin-induced arthritis model in rats. Values are mean \pm SD, $n = 10$. #, significantly different from control at $p < 0.01$; *, significantly different from model control at $p < 0.05$; **, significantly different from model control at $p < 0.01$.

lining cell layer, formation of villi, inflammatory cell infiltration including a large macrophages, and a little neutrophilic granulocytes and lymphocytes, a little exudation of fibrin in synovial tissue; local or general cartilage erosion. The histopathological findings of rat arthritis in diclofenac sodium group, FUCO group, and FUCO+GAH group showed significant attenuation of inflammation of synovial tissue manifested by hyperplasia of lining cell layer, decrease of infiltrated inflammatory cell amount including macrophages and lymphocytes compared with that in model control rats; without obvious cartilage erosion and without obvious loss of articular cartilage. The histopathological scores of inflammation in synovial tissue, cartilage erosion, and PG staining loss and total histopathological scores in diclofenac sodium group were significantly lower than that in model control group ($p < 0.01$). The histopathological scores of inflammation in synovial tissue, cartilage erosion, and PG staining loss in FUCO+GAH groups were significantly lower than that in model control group ($p < 0.01$). The histopathological scores of articular cartilage erosion and PG staining loss in GAH group were significantly lower than that in model control group ($p < 0.05$), but there was no significant difference between GAH group and model control group in histopathological scores of inflammation in synovial tissue ($p > 0.05$). There was no significant difference between FUCO groups and model control group in histopathological scores of articular cartilage and PG staining loss ($p > 0.05$), but the histopathological scores of inflammation in synovial tissue were significantly lower than that in model control group ($p < 0.01$). The total histopathological scores in FUCO alone and FUCO+GAH groups were significantly lower than that in model control group ($p < 0.01$). The results suggest that FUCO+GAH may significantly attenuate inflammation in synovial tissue, cartilage erosion, and PG loss of rat knee joint arthritis induced by carrageenan/kaolin. Single GAH may significantly attenuate cartilage erosion and PG loss but did not significantly resolve inflammation in synovial tissue of rat knee joint arthritis induced by carrageenan/kaolin. Single FUCO may significantly attenuate only the inflammation in synovial tissue in the rat arthritis model.

Effects on pro-inflammatory cytokine generation

Interleukin-1 β and TNF- α levels shown in Fig. 7A and B, IL-1 β and TNF- α levels were significantly increased in synovial tissue extract from knee of rats in model control group at 24h after injection of carrageenan/kaolin, compared with that in normal control group ($p < 0.01$). The IL-1 β and TNF- α levels were significantly lower, which were given FUCO and FUCO+GAH except for GAH alone group, compared with model control group ($p < 0.05$ or $p < 0.01$). The results suggest that FUCO may obviously inhibit increase of generation of pro-inflammatory cytokine IL-1 β and TNF- α in knee synovial tissue after injection of carrageenan/kaolin, and there was no obvious change of pro-inflammatory cytokine IL-1 β and TNF- α levels in knee synovial tissue in GAH alone group after injection of carrageenan/kaolin.

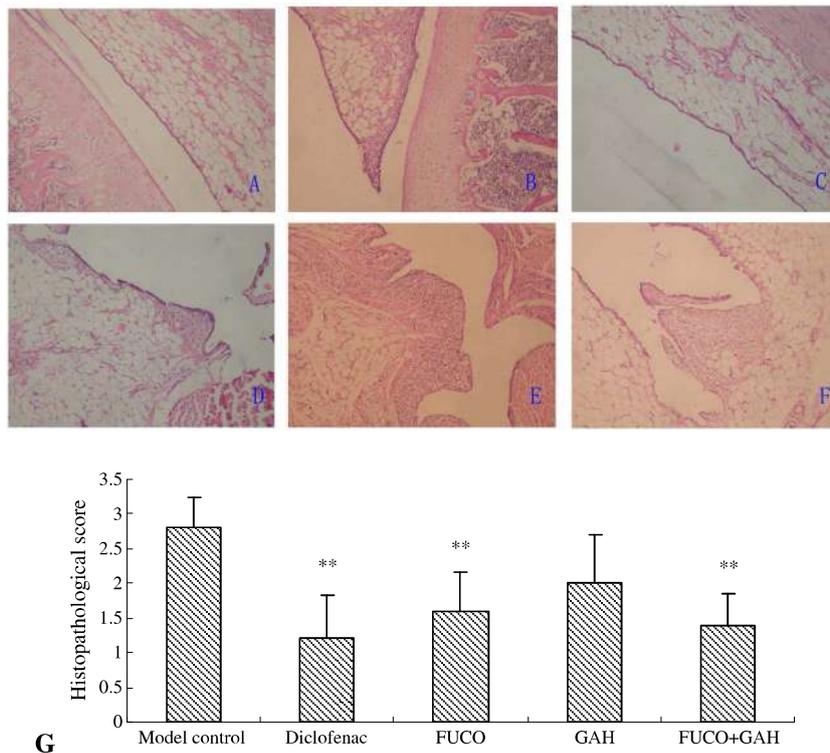


Figure 3. Representative of histopathological features of inflammation in synovial tissue in knee joint in carrageenan/kaolin-induced arthritis treated with fucoxanthin (FUCO) and/or glucosamine hydrochloride (GAH) in rats (stained with hematoxylin-eosin, $\times 100$). (A) Normal group, (B) model control group, (C) diclofenac sodium-treated group, (D) FUCO-treated group, (E) GAH-treated group, and (F) FUCO + GAH-treated group. The histopathological scores of all groups are summarized in Fig. 3G. Data are expressed as mean \pm SD, $n = 5$. **, significantly different from model control at $p < 0.01$. This figure is available in colour online at wileyonlinelibrary.com/journal/ptr.

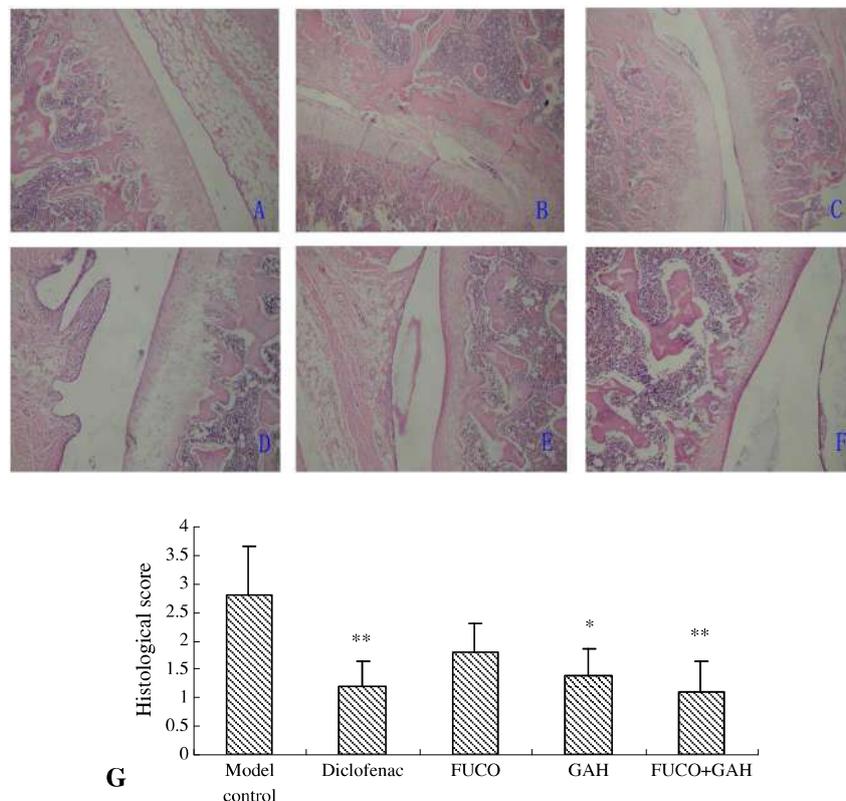


Figure 4. Representative of histopathological features of cartilage erosion in knee joint in carrageenan/kaolin-induced arthritis treated with fucoxanthin (FUCO) and/or glucosamine hydrochloride (GAH) in rats (stained with hematoxylin-eosin, $\times 100$). (A) Normal group, (B) model control group, (C) diclofenac sodium-treated group, (D) FUCO-treated group, (E) GAH-treated group, and (F) FUCO + GAH-treated group. The histopathological scores of all groups are summarized in Fig. 4G. Data are expressed as mean \pm SD, $n = 5$. *, significantly different from model control at $p < 0.05$; **, significantly different from model control at $p < 0.01$. This figure is available in colour online at wileyonlinelibrary.com/journal/ptr.

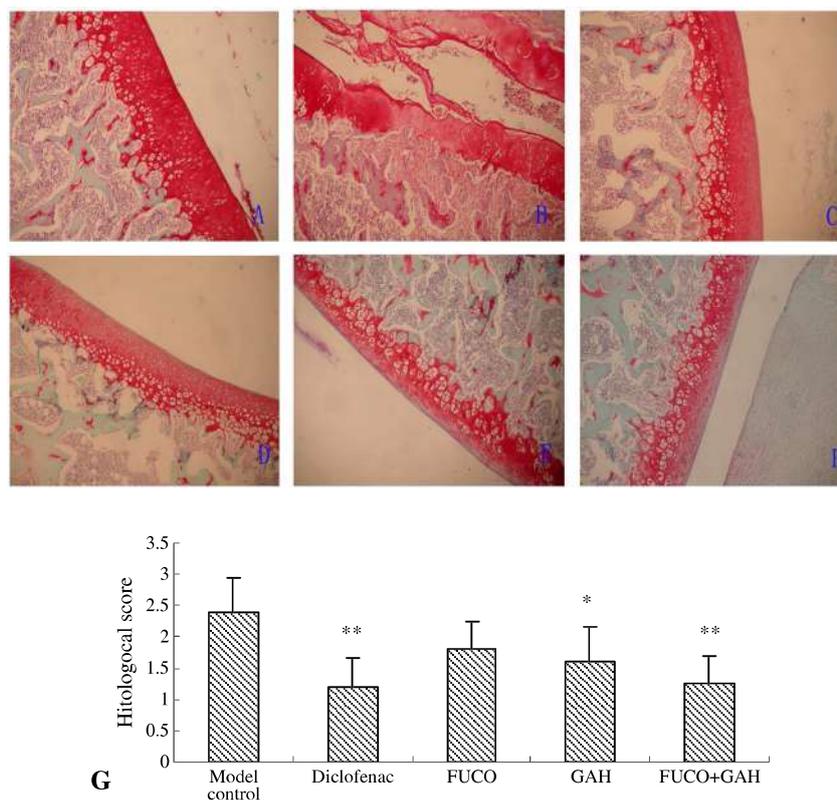


Figure 5. Representative of histopathological features of proteoglycan loss in knee joint in carrageenan/kaolin-induced arthritis treated with fucoxanthin (FUCO) and/or glucosamine hydrochloride (GAH) in rats (stained with safranin-o-fast-green, $\times 100$). (A) Normal group, (B) model control group, (C) diclofenac sodium-treated group, (D) FUCO-treated group, (E) GAH-treated group, and (F) FUCO + GAH-treated group. The histopathological scores of all groups are summarized in Fig. 5G. Data are expressed as mean \pm SD, $n = 5$. *, significantly different from model control at $p < 0.05$; **, significantly different from model control at $p < 0.01$. This figure is available in colour online at wileyonlinelibrary.com/journal/ptr.

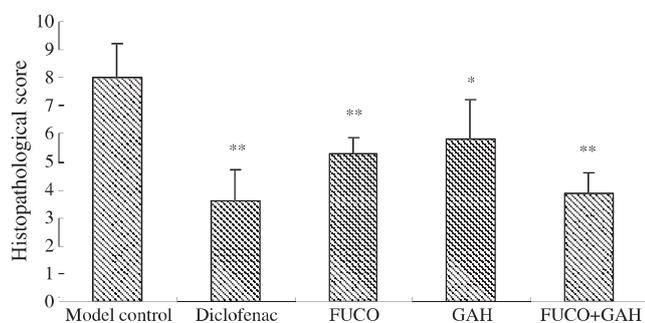


Figure 6. Summary of histopathological score in knee joint in carrageenan/kaolin-induced arthritis treated with fucoxanthin (FUCO) and/or glucosamine hydrochloride (GAH) in rats. The histopathological score of all groups are summarized in Fig. 3–5. Data are expressed as mean \pm SD, $n = 5$. *, significantly different from model control at $p < 0.05$; **, significantly different from model control at $p < 0.01$.

Effect on NO level

As shown in Fig. 7C, NO level was significantly increased in knee synovial tissue extract of rats in model control group at 24 h after injection of carrageenan/kaolin, compared with normal control group ($p < 0.01$). NO level was significantly decreased, which were given FUCO, GAH, and FUCO + GAH, compared with that in model control group ($p < 0.05$, $p < 0.01$). FUCO and GAH may significantly inhibited NO production in knee synovial tissue through the downregulation of iNOS protein expression in carrageenan/kaolin-induced rat arthritis model.

Effect on COX-2 and iNOS protein expressions

COX-2 and iNOS protein expressions were evaluated by western blotting analysis. As shown in Fig. 8, injection of carrageenan/kaolin to knee joint cavity evoked significantly upregulated expressions of COX-2 and iNOS proteins in synovial tissue extract at 24 h. COX-2 and iNOS protein expressions were significantly reduced in synovial tissue extract from knee of rats in the groups, which were given FUCO and FUCO + GAH except for GAH alone group, compared with model control group ($p < 0.05$ or $p < 0.01$). The results suggest that FUCO may obviously inhibit upregulation of pro-inflammatory protein COX-2 and iNOS expressions in synovial tissue induced by injection of carrageenan/kaolin. GAH alone did not inhibit upregulation of COX-2 and iNOS protein expressions in synovial tissue after injection of carrageenan/kaolin.

DISCUSSION

The present study assessed the effects of FUCO and GAH alone or a combination of FUCO and GAH given by gavage on parameters of arthritis. Overall, the data from this study showed that FUCO alone or FUCO + GAH ameliorated arthritis in an experimental model of inflammatory arthritis and that the combination of FUCO and GAH is more efficacious than

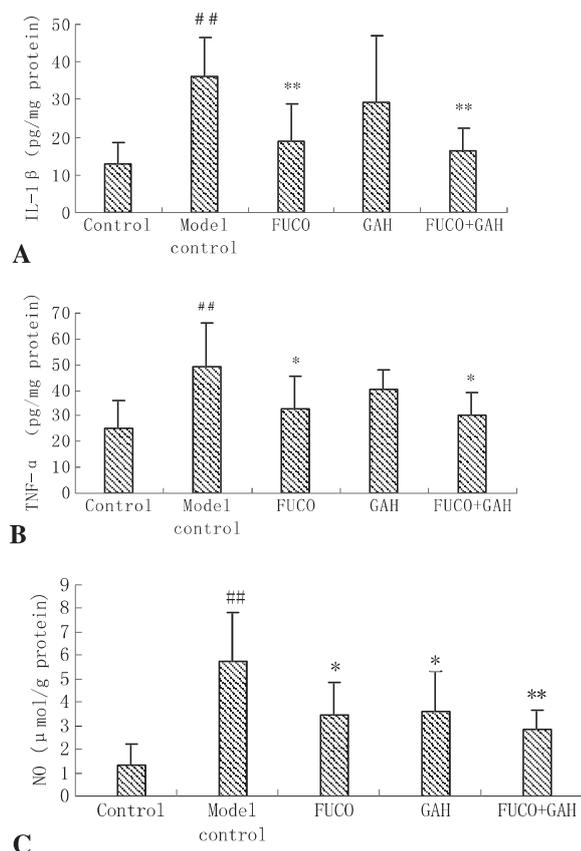


Figure 7. Effects of fucoxanthin (FUCO) and/or glucosamine hydrochloride (GAH) on IL-1 β (A), TNF- α (B), and NO (C) level in carrageenan/kaolin-induced arthritis in rats. Values are mean \pm SD, $n = 5$. #, #, significantly different from control group at $p < 0.01$; *, significantly different from model control at $p < 0.05$; **, significantly different from model control group at $p < 0.01$.

FUCO or GAH alone in improving several of arthritis markers examined.

Arthritis, an inflammation of joints, is usually an inflammatory disease that results from dysregulation of pro-inflammatory cytokines (e.g., IL-1 β and TNF- α) and pro-inflammatory enzymes (e.g., COX-2) that mediate the production of prostaglandins, together with the expression of adhesion molecules and hyperproliferation of synovial fibroblasts. All of these factors are regulated by the activation of the transcription factor nuclear factor- κ B (NF- κ B). Thus, agents that suppress the expression of IL-1 β , TNF- α , and COX-2 or adhesion molecules, or suppress the activation of NF- κ B, all have potential for the treatment of arthritis (Khanna *et al.*, 2007). It is well known that pro-inflammatory cytokines play a pivotal role in the inflammatory process of RA (Choy and Panayi, 2001): high levels of IL-1 and TNF- α are demonstrable in synovial fluids of RA patients with severe disease activity (Schlaak *et al.*, 1996). Our findings show that FUCO has significantly inhibited generation of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α), and suppressed the expression of COX-2 in knee synovial tissue after injection of carrageenan/kaolin. Recently, the data demonstrate that FUCO reduces the levels of pro-inflammatory mediators including IL-1 β , TNF- α , NO, PGE₂, and IL-6 via the inhibition of NF- κ B activation, and suppress the expression of COX-2 (Kim *et al.*, 2010; Heo *et al.*, 2010). These reports and our own findings provide support for the hypothesis that antiinflammatory FUCO provides defense mechanism against inflammatory arthritis.

NSAIDs, used for treating chronic inflammatory diseases such as RA, are typically prescribed long term to properly control the disordered immune system. Thus, there is a strong need to develop safe and effective drugs for the long-term use. The main characteristics of RA include sustained joint swelling, hyperplasia of synovial membrane, infiltration of inflammatory cells, and villous formation, which ultimately lead to cartilage erosion and articular destruction. Our findings show that FUCO has a significant attenuate knee joint swelling at days 1, 3, 5, and 7 after induction of arthritis, hyperplasia, which can lead to muscle atrophy, and infiltrated inflammatory cell amount including macrophages and lymphocytes, and villous formation. The histopathological scores of inflammation of FUCO in synovial tissue were significantly lower than that in model control group. Single GAH may significantly attenuate cartilage erosion and PG loss but did not significantly resolve inflammation in synovial tissue of rat knee joint inflammatory arthritis induced by carrageenan/kaolin. The extent of macrophage activity in inflamed RA synovial tissue has been to correlate with the severity of the disease (Kinne *et al.*, 2000). The present study demonstrated that FUCO has antiinflammatory and anti-arthritis effects. The natural products were a gold mine for arthritis treatment (Khanna *et al.*, 2007). FUCO may be also a promising natural source with potential for clinical use. Brown algae, which contain high levels of FUCO, are a traditional foodstuff of Asians, and an epidemiological study has shown that the consumption of brown sea algae is associated with a low risk of breast cancer (Teas, 1983). Recently, FUCO was reported to be free of adverse effects and mutagenicity even at repeated dose of 2000 mg/kg for animal (Beppu *et al.*, 2009a; Beppu *et al.*, 2009b); therefore, we consider the rationale for the human therapeutic long-term use of FUCO in RA.

The destruction of cartilage is a common feature of RA caused by multiple factors. In RA, synoviocytes and synovial macrophages produce a wide array of inflammatory mediators including pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α . The pro-inflammatory cytokines in turn stimulate articular chondrocytes and synoviocytes to produce matrix-degrading enzymes such as matrix metalloproteinases and pro-inflammatory enzymes such as COX-2. The subsequent release of prostaglandins promotes, sustains, and enhances additional cytokine production and inflammation, leading to the destruction and degeneration of the cartilage extracellular matrix (Brennan and McInnes, 2008). These cytokines play a significant role in the initiation and perpetuation of the synovial inflammation and also act directly on bone and cartilage cells to adversely affect their function. In the present study, FUCO significantly inhibited generation of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) and suppressed the expression of COX-2 in knee synovial tissue after injection of carrageenan/kaolin, and FUCO could reduce cartilage erosion and the loss of PG compares with model control group but was not statistically significant. Future studies are needed to observe effectiveness of FUCO on cartilage damage using a chronic inflammatory arthritis. Results from the present study show that joint inflammation coincided with cartilage damage in the knee joints. Treatment with

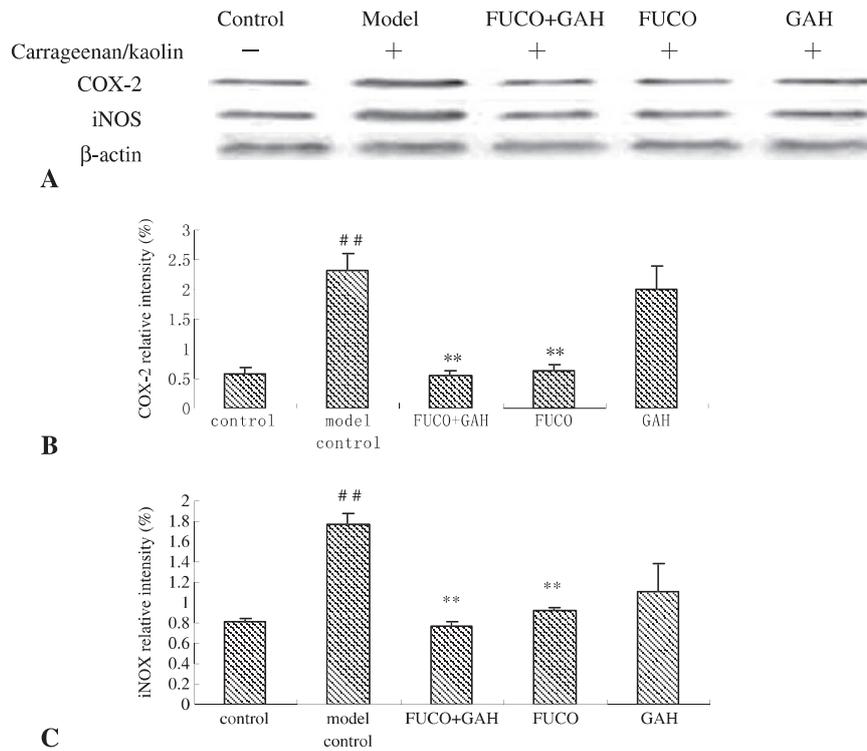


Figure 8. Effects of samples of fucosanthin (FUCO) and/or glucosamine hydrochloride (GAH) on pro-inflammatory COX-2 and iNOS protein expressions in carrageenan/kaolin-induced arthritis in rats. (A) Western blotting for COX-2, iNOS, and β -actin; (B) relative density of immunoblot of COX-2; (C) relative density of immunoblot of iNOS. Relative intensity of rats in model control group was taken to be 100%. Values are mean \pm SD, $n = 5$. #, significantly different from control group at $p < 0.01$; **, significantly different from model control at $p < 0.01$.

GAH alone and treatment with GAH in combination with FUCO attenuated cartilage damage in rat arthritis. In particular, the combination of FUCO and GAH is more efficacious than FUCO or GAH alone in improving extent of cartilage erosion and PG loss. Past studies have demonstrated that GAH may reverse arthritis-induced PG loss (Oegema *et al.*, 2002), and administration of GAH normalizes cartilage metabolism, so as to inhibit the degradation (Fenton *et al.*, 2000) and stimulate the synthesis of PG, and to restore the articular function (Oegema *et al.*, 2002). Evidence indicates that GAH was not able to change the level of TNF- α and IL-6 in synovial fluid of collagenase-induced osteoarthritis mice (Ivanovska and Dimitrova, 2011). GAH was not effective in preventing inflammation and biochemical changes in the arthritis joint fluid (Beren *et al.*, 2001), and GAH did not have any effect on standard synovial fluid parameters of inflammation (Meulyzer *et al.*, 2009). In addition, one study indicated that GAH administration had no anti-rheumatic effect, evaluated by conventional measures on patients with RA (Nakamura *et al.*, 2007). Our results show that treatment with GAH alone there was no obvious change of pro-inflammatory cytokine IL-1 β and TNF- α levels in knee synovial tissue in after injection of carrageenan/kaolin. These reports and our findings provide some support that the GAH reduces cartilage erosion and PG loss by inhibiting the degradation and stimulating chondrocyte PG synthesis. The differentiation of mesenchymal stem cells into chondrocytes provides an attractive basis for the repair and regeneration of articular cartilage. Under clinical conditions, chondrogenesis will often need to occur in the presence of mediators of inflammation produced in response to injury or disease. The data indicate that both IL-1 β and TNF- α inhibited chondrogenesis in a dose

dependent manner. This was associated with a marked activation of NF- κ B (Wehling *et al.*, 2009). The FUCO has significantly reduced levels of IL-1 β and TNF- α and that inhibition of NF- κ B activation (Shiratori *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010; Heo *et al.*, 2010). The GAH could inhibit the cartilage degradation and stimulating chondrocyte PG synthesis (Oegema *et al.*, 2002; Fenton *et al.*, 2000). We and other groups present evidence to support the hypothesis that an antiinflammation and enhancing synthesis of articular cartilage matrix could be mechanisms underlying effect of anti-arthritis in rats by FUCO in combination with GAH, represent rational objectives for therapeutics of patients with RA.

It is known that NO produced by cartilage and synovial cells is implicated in the pathogenesis of RA (McInnes *et al.*, 1996). Schuerwegh *et al.* report the synovial fluid-derived immune complexes of active RA patients to stimulate NO production and inhibit chondrocytes growth. Results from the present study show that FUCO can significantly inhibit upregulation of COX-2 and iNOS protein expressions and reduce NO production in knee synovial tissue extract of carrageenan/kaolin-induced inflammatory arthritis in rats. Treatment with GAH alone significantly decreased NO level in knee synovial tissue extract of rats. The past study indicated that although GAH did not affect the expression of COX-2 mRNA and protein in chondrocytes, GAH was shown to inhibit the production of NO and PGE₂ *in vitro* in chondrocytes and synoviocytes prepared from osteoarthritis patients (Nakamura *et al.*, 2004). In addition, one study showed that a high dose of GAH can reduce the production of NO and PGE₂ on plasma of adjuvant arthritis rats (Hua *et al.*, 2005). Our results show that FUCO alone and in combination with GAH can ameliorate

histopathological appearance in knee joint in carrageenan/kaolin-induced arthritis. Thus, the present study demonstrated that FUCO may enhance therapeutic effect of GAH on rat arthritis through mechanism of antiinflammation. In summary, results from the present study indicate that treatment with combined FUCO and GAH in an inflammatory arthritis rat, more so than FUCO and GAH alone ameliorates parameters of RA. The mechanisms of action of FUCO plus GAH involve the modulation of pro-inflammatory cytokine IL-1 β and TNF- α level and NO production, pro-inflammatory

protein COX-2 and iNOS expressions, and then enhance articular cartilage synthesis. The FUCO alone and in combination with GAH have interesting therapeutic potential for the treatment of inflammatory joint diseases in human.

Conflict of Interest

The authors have declared that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Beppu F, Niwano Y, Tsukui T, Hosokawa M, Miyashita K. 2009a. Single and repeated oral dose toxicity study of fucoxanthin, a marine carotenoid, in mice. *J Toxicol Sci* **5**: 501–510.
- Beppu F, Niwano Y, Sato E, et al. 2009b. *In vitro* and *in vivo* evaluation of mutagenicity of fucoxanthin and its metabolite fucoxanthinol. *J Toxicol Sci* **6**: 693–698.
- Beren J, Hill SL, Diener-West M, Rose NR. 2001. Effect of pre-loading oral glucosamine HCl/chondroitin sulfate/manganese ascorbate combination on experimental arthritis in rats. *Exp Biol Med* **226**: 144–151.
- Brennan FM, McInnes IB. 2008. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **118**: 3537–3545.
- Choy EH, Panayi GS. 2001. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* **344**: 907–916.
- de los Reyes GC, Koda RT, Lien EJ. 2000. Glucosamine and chondroitin sulfates in the treatment of osteoarthritis. *Prog Drug Res* **55**: 81–103.
- Day SM, Lockhart JC, Ferrell WR, Mclean JS. 2004. Divergent roles of nitric and prostanoid pathways in chronic joint inflammation. *Ann Rheumatoid Dis* **63**: 1564–1570.
- Dayer JM. 2003. The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **42** (Suppl.2): ii3–ii10.
- Fenton JI, Chlebik-Brown KA, Peters TL, Caron JP, Orth MW. 2000. Glucosamine HCl reduces equine artilage degradation in explant culture. *Osteoarthritis Cartilage* **8**: 258–265.
- Fleischmann R, Stern R, Iqba I. 2004. Anakinra: an inhibitor of IL-1 for the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Opin Biol Ther* **4**: 1333–1344.
- Heo SJ, Yoon WJ, Kim KN, et al. 2010. Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol* **48**: 2045–2051.
- Hua J, Sugruo S, Hirano S, Sakamoto K, Nagaoka I. 2005. Preventive actions of a high dose of glucosamine on adjuvant arthritis in rats. *Inflamm Res* **54**: 127–132.
- Ivanovska N, Dimitrova P. 2011. Bone resorption and remodeling in murine collagenase-induced osteoarthritis after administration of glucosamine. *Arthritis Res Ther* **13**: R44.
- Jean YH, Chen WF, Duh CY, et al. 2008. Inducible nitric oxide synthase cyclooxygenase-2 participates in anti-inflammatory and analgesic effects of the natural marine compound lemnalol from Formosa soft coral *Lemnalia cervicorni*. *Eur J Pharm* **578**: 323–331.
- Joosten ABE, Lubberts E, Helsen MMA, et al. 1999. Protection against cartilage and bone destruction by systemic interleukin-4 treatment in established murine type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Res* **1**: 81–91.
- Khanna D, Sethi G, Ahn KS, et al. 2007. Natural products as a gold mine for arthritis treatment. *Curr Opin Pharmacol* **7**: 344–351.
- Kim KN, Heo SJ, Yoon WJ, et al. 2010. Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF- κ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Eur J Pharmacol* **649**: 369–375.
- Kinne RW, Brauer R, Stuhlmüller B, Palombo-Kinne E, Burmester GR. 2000. Review: macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* **2**: 189–202.
- Lundeberg TP, Alstergren P, Appelgren A, et al. 1996. A model for experimentally induced temporomandibular joint arthritis in rats: effects of carrageenan on neuropeptide-like immunoreactivity. *Neuropeptides* **30**: 37–41.
- Mangge H, Gindl S, Kenzian H, Schauenstein K. 2003. Atopic dermatitis as a side effect of anti-tumor necrosis factor- α therapy. *J Rheumatol* **30**: 2506–2507.
- McInnes IB, Leung BP, Field M, et al. 1996. Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J Exp Med* **184**: 1519–1524.
- Meulyzer M, Vachon P, Beaudry F, et al. 2009. Joint inflammation increases glucosamine levels attained in synovial fluid following oral administration of glucosamine hydrochloride. *Osteoarthritis Cartilage* **17**: 228–234.
- Nakamura H, Masuko K, Yudoh K, Kato T, Kamada T, Kawahara T. 2007. Effects of glucosamine administration on patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* **27**: 213–218.
- Nakamura H, Shibakawa A, Tanaka M, Kato T, Nishioka K. 2004. Effects of glucosamine hydrochloride on the production of prostaglandin E₂, nitric oxide and metalloproteinases by chondrocytes and synoviocytes in osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol* **22**: 293–299.
- Oegema TR Jr, Deloria LB, Sandy JD, Hart DA. 2002. Effect of oral glucosamine on cartilage and meniscus in normal and chymopapain-injected knees of young rabbits. *Arthritis Rheum* **46**: 2495–2503.
- Penido C, Conte FP, Chagas MSS, Rodrigues CAB, Pereira JFG, Henriques MGMO. 2006. Anti-inflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis*. A model on zymosan-induced arthritis in mice. *Inflamm Res* **55**: 457–464.
- Plater-Zybert C, Joosten LAB, Helsen MMA, et al. 2001. Therapeutic effect of neutralizing endogenous IL-18 activity in the collagen-induced model of arthritis. *J Clin Invest* **108**: 1825–1832.
- Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, et al. 2004. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol* **142**: 331–338.
- Rocha Ana CC, Fernandes E, Quintao Nara LM, Campos MM, Calixto JB. 2006. Relevance of tumour necrosis factor- α for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carrageenan in the mouse paw. *Br J Pharmacol* **148**: 688–695.
- Rooney M, Condell D, Quinlan W, et al. 1988. Analysis of the histologic variation of synovitis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **31**: 956–963.
- Rosengren S, Firestein GS, Boyle DL. 2003. Measurement of inflammatory biomarkers in synovial tissue extracts by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* **2003**: 1002–1010.
- Scheiman JM. 2001. The impact of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy. *Am J Manag Care* **7**: s10–s14.
- Schlaak JF, Pfers I, Meyer Zum Buschenfelde KH, Marker-Hermann E. 1996. Different cytokine profiles in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondylarthropathies. *Clin Exp Rheumatol* **49**: 155–162.
- Setnikar I, Giacchetti C, Zanolo G. 1986. Pharmacokinetics of glucosamine in the dog and man. *Arzneimittelforschung* **36**: 729–735.
- Shiratori K, Ohgami K, Ilieva I, et al. 2005. Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*. *Exp Eye Res* **81**: 422–428.
- Silva JC, Rocha MF, Lima AA, Brito GA, de Menezes DB, Rao VS. 2000. Effects of pentoxifylline and nabumetone on the serum

- levels of IL-1 beta and TNF in the joints of adjuvant arthritis. *Inflamm Res* **49**: 14–19.
- Silvan AM, Abad MJ, Bermejo P, Villar AM, Lopez-Bote JP. 1996. Aggravation of adjuvant arthritis by carrageenan. *Gen Pharmacol* **27**: 639–642.
- Teas J. 1983. The dietary intake of Laminaria, a brown sea weed, and breast cancer prevention. *Nutr Cancer* **4**: 217–222.
- Vinegar R, Truax JF, Selph JL, Johnston PR, Venable AL, Mckenzie KK. 1987. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. *Fed Proc* **46**: 118–126.
- Wang WJ, Wang GC, Zhang M, Tseng CK. 2005. Isolation of fucoxanthin from the rhizoid of *Laminaria japonica* Aresch. *J Integr Plant Biol* **47**: 1009–1015.
- Wehling N, Palmer GD, Pilapil C, *et al.* 2009. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor α inhibit chondrogenesis by human mesenchymal stem cells through NF- κ B-dependent pathways. *Arthritis Rheum* **3**: 801–812.
- Yan X, Chuda Y, Suzuki M, Nagata T. 1999. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Biotechnol Biochem* **63**: 605–607.



O seu paciente necessita
de saúde e bem-estar e o
planeta de sustentabilidade

