UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo do metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos expostos a produtos de alga marinha e fungo endofítico provenientes da Antártica

Gabriel Antonio Nogueira

Ribeirão Preto
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo do metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos expostos a produtos de alga marinha e fungo endofítico provenientes da Antártica

Gabriel Antonio Nogueira

Ribeirão Preto
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo do metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos expostos a produtos de alga marinha e fungo endofítico provenientes da Antártica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientado: Gabriel Antonio Nogueira

Orientadora: Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado

Ribeirão Preto
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Nogueira, Gabriel Antonio

Estudo do metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos expostos a produtos de alga marinha e fungo endofítico provenientes da Antártica. Ribeirão Preto, 2018. 77 p: il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Marzocchi-Machado, Cleni Mara.

1. Neutrófilo. 2. Metabolismo Oxidativo. 3. Produtos Naturais.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Gabriel Antonio Nogueira

Título do trabalho: Estudo do metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos expostos a produtos de alga marinha e fungo endofítico provenientes da Antártica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____Assinatura:_____

Dedicatória

Este trabalho é dedicado aos professores do Colégio Estadual Carlos de Pina, situado na cidade de Anápolis, Goiás.

Por acreditarem em seus alunos e por se dedicarem a uma profissão que merece toda valorização, a de **professor**!

Agradecimentos

Aos meus familiares por me apoiarem durante todo o tempo fora de casa e por toda dedicação.

À Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado pela confiança para realização deste trabalho, por toda assistência científica, amizade e por me ensinar a valorizar cada passo durante o processo.

À Profa. Dra. Hosana Maria Debonsi e sua equipe pela colaboração com as amostras para execução do trabalho.

Ao químico e grande amigo Luiz Fernando Fortunato Tucci, sempre presente em todos os experimentos e discussões.

Às minhas colegas de laboratório, fieis amigas e escudeiras: Aline Sanches Pereira, Bruna Samham Archangelo, Nathália Cristina Canicoba, Giovanna Fondato de Souza, Patrícia Moromisato.

À Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim por ceder a infraestrutura de seu laboratório e contribuir com a construção deste trabalho.

Ao Gustavo Souza dos Santos, aluno de doutorado da FCFRP-USP, pela colaboração, paciência e dedicação no preparo das amostras, além de todo ensinamento dos métodos químicos.

À farmacêutica-bioquímica e amiga Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini por todas as discussões de metodologia, por todos os ensinamentos fundamentais para a construção do trabalho.

À minha psicoterapeuta Msc Juliana Caseiro Viviani pelo profissionalismo e dedicação à sua profissão, fornecendo incomparável assistência durante meu período de formação.

Aos meus amigos e professores Dra. Gisner Alves de Souza Pereira, Raphael Rocha de Oliveira, Msc Janaína Moscatto e Dra. Aline Mendonça Pascoal que me incentivaram arduamente e acompanharam durante o processo de preparo para a candidatura ao mestrado.

Aos meus amigos que se tornaram família durante o tempo longe de casa Gustavo Barros, Marina Gonçalves de Souza, Gilson Fuzaro Júnior, pela convivência, momentos bons e de aprendizado. Obrigado e obrigado! Eu os levarei para sempre!

À minha amiga Min-sun Hazel Kim pelas horas de conversa, por me ensinar que a distância não interfere nas amizades que nascem no coração.

À minha amiga Nathália Quadros por ter me acolhido em momentos de dificuldade e oferecido um ombro amigo, sempre me apoiando e corrigindo nos momentos necessários.

Às minhas amigas Isabel Cristina Guerra Gomes e Tamara Silva Rodrigues por termos compartilhado tantos momentos bons, e por me fazerem acreditar que era possível. Vocês são referenciais para mim.

Ao meu amigo Matheus Pereira Da Silva pelas ligações telefônicas nos dias difíceis, por me ouvir mesmo quando não havia o que dizer, e sempre oferecer uma amizade sincera e presente.

Aos meus amigos de longa jornada Moisés Augusto Ferreira Rodrigues, Luiz Filipe Oliveira Mansão, Jônatas Soares de Lima pela amizade incomparável e intransponível.

À minha amiga Tálita Pollyanna Moreira dos Santos por me acompanhar durante toda a caminhada, por me apresentar o processo de autoconhecimento, a quem meus agradecimentos seriam incontáveis.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia pela oportunidade e pelo constante incentivo para o nosso crescimento.

À CAPES pela bolsa concedida para realização deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela infraestrutura para o ensino, a pesquisa e a extensão.

Aos que estiveram presentes de forma direta e indireta: Obrigado!

Epígrafe

No one stays the same
You know what goes up must come down
Change is a thing you can count on
I feel so much younger now

Miley Cyrus – Younger Now

RESUMO

NOGUEIRA, G. A. **Estudo do metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos expostos a produtos de alga marinha e fungo endofítico provenientes da Antártica**. 2018. 77f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Neutrófilos são a primeira linha de defesa do sistema imunológico, eles produzem substâncias microbicidas, tais como espécies reativas de oxigênio (ERO), são capazes de eliminar patógenos e possuem papel importante em processos inflamatórios fisiológicos e patológicos. No entanto, os efeitos benéficos e nocivos mediados por esta célula dependem, em grande parte, do equilíbrio redox, que se estabelece entre a produção de ERO e a ação de antioxidantes. A quebra deste equilíbrio leva ao estresse oxidativo, capaz de causar danos pelas ERO sobre as estruturas biológicas. Sendo assim, a regulação das funções dos neutrófilos é um importante alvo terapêutico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação de produtos naturais – extrato bruto, frações e subfrações – oriundas da Antártica na regulação do metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos. Para este propósito, o extrato bruto da alga *Palmaria decipiens*, nove (9) frações do fungo endofítico *Aspergillus unguis* e nove (9) subfrações deste foram estudadas. As amostras foram avaliadas quanto à atividade *scavenger*, utilizando-se o 2,2-difenil-β-picrilhidrazil; à citotoxidade aos neutrófilos, por análise da viabilidade celular com o ensaio de exclusão do Azul de Trypan; e ao efeito sobre a produção de ERO pelos neutrófilos, medida por quimiluminescência dependente de luminol, utilizando-se forbol-12-miristato-13-acetato como estímulo para os neutrófilos. Os resultados mostraram que: 1) nenhuma das amostras apresentou atividade *scavenger*; 2) a viabilidade celular manteve-se igual ou maior que 90% quando neutrófilos foram expostos às frações FR5, FR6*, FR8, e às subfrações contendo 100% Acetato de Etila, 10% Acetato de Etila:Hexano, 20% Acetato de Etila:Hexano e 40% Acetato de Etila:Hexano; 3) dentre as frações que mostraram viabilidade celular maior que 90%, a inibição da produção de ERO pelos neutrófilos foi observada com a FR5 (51%), a FR6* (20%), a subfração 100% Hexano (73%), a subfração 20% Acetato de Etila/Hexano (42%) e a subfração 40% Acetato de Etila/Hexano (38%). Os resultados mostram que algumas das frações e subfrações do fungo endofítico *Aspergillus unguis* apresentaram inibição da produção de ERO pelos neutrófilos humanos entre (20 a 73%). Esta inibição não é por atividade *scavenger* de radiciais de oxigênio, sugerindo que este efeito regulador sobre o neutrófilo possa resultar da atividade dos componentes nestas frações sobre outras vias metabólicas desta célula. A partir destes resultados, faz-se necessário identificar a composição destas frações e seus efeitos sobre vias metabólicas e sobre outras funções efetoras dos neutrófilos. A contribuição deste estudo é a procura por moléculas bioativas, capazes de regular parcialmente as respostas do neutrófilo, para restabelecer o equilíbrio funcional desta célula em estados patológicos, diminuindo seus efeitos nocivos sem prejuízo do seu papel crucial para a homeostase.

Palavras-chave: Neutrófilo; Metabolismo Oxidativo; Produtos Naturais.

ABSTRACT

NOGUEIRA, G. A. **Study of the oxidative metabolism of human neutrophils exposed to compounds of marine algae and endophytic fungi from Antarctica.** 2018. 77f. Dissertation (Master) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Neutrophils are the first line of defense of the immune system, they produce microbicidal substances, such as reactive oxygen species (ROS), able to eliminate pathogens and play important roles in physiological and pathological inflammatory processes. However, the beneficial and harmful effects mediated by this cell depend on the redox balance, which is established between the production of ROS and the action of antioxidants. The imbalance leads to oxidative stress capable of causing damage by ROS on biological structures. Thus, the regulation of neutrophil functions is an important therapeutic target. The aim of this work was to evaluate the action of natural products - crude extract, fractions and subfractions - originating from Antarctica environment in the regulation of the oxidative metabolism of human neutrophils. For this purpose, the crude extract of the *Palmaria decipiens* algae, nine (9) fractions of the endophytic fungus *Aspergillus unguis* and nine (9) subfractions from this fungus were studied. The samples were evaluated for scavenger activity using 2,2-diphenyl-β-picrylhydrazyl; cytotoxicity to neutrophils, by cellular viability analysis with the Trypan Blue exclusion assay; and to the effect on neutrophil production of ROS, as measured by luminol-dependent chemiluminescence, using phorbol 12-myristate 13-acetate as a stimulus for neutrophils. The results showed that: 1) none of the samples had scavenger activity; 2) the cell viability remained equal to or greater than 90% when neutrophils were exposed to fractions FR5, FR6*, FR8, and subfractions containing 100% Ethyl Acetate, 10% Ethyl Acetate:Hexane, 20% Ethyl Acetate:Hexane and 40% Ethyl Acetate:Hexane; 3) among the fractions that showed cellular viability greater than 90%, the inhibition of ROS production by neutrophils was observed with FR5 (51%), FR6* (20%), subfraction 100% Hexane (73%), the subfraction 20% Ethyl acetate / Hexane (42%) and subfraction 40% Ethyl acetate / Hexane (38%). The results show that some of the fractions and subfractions of the endophytic fungus *Aspergillus unguis* showed inhibition of ROS production by human neutrophils between (20 to 73%). This inhibition is not by scavenger activity of oxygen radicals, suggesting that this regulatory effect on the neutrophil may result from the activity of the components in these fractions on other metabolic pathways of this cell. From these results, it is necessary to identify the composition of these fractions and their effects on metabolic pathways and on other effector functions of neutrophils. The contribution of this study is the search for bioactive molecules, able to partially regulate neutrophil responses, to restore the functional balance of this cell in pathological states, reducing its harmful effects without prejudice to its crucial role for homeostasis.

Keywords: Neutrophil; Oxidative Metabolism; Natural Products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do metabolismo oxidativo de neutrófilos 17

Figura 2. Estruturas de depsidonas descritas no fungo *Aspergillus unguis*. 22

Figura 3. Fluxograma com o delineamento experimental..... 26

Figura 4. Mecanismo de reação do DPPH 29

Figura 5. Mecanismo de ação da sonda quimiluminescente Luminol 32

Figura 6. Análise em CCD-analítica utilizando o sistema Hexano:AcOEt (3:7) para obtenção dos perfis das frações do fungo *Aspergillus unguis*..... 35

Figura 7. Análise em CCD-analítica utilizando o sistema Hexano:AcOEt (4:6).. 35

Figura 8. Análise comparativa em CCD-analítica utilizando o sistema Hexano:AcOEt (4:6) 36

Figura 9. Análise comparativa da escolha de solventes para solubilização da amostra 37

Figura 10. Análise cromatográfica utilizando o sistema de solventes Hexano:AcOEt (4,5:5,5) 37

Figura 11. Análise cromatográfica utilizando o sistema de solventes Hexano:AcOEt (4,5:5,5) 38

Figura 12. Placa preparativa em CCD da amostra de *A. unguis* 39

Figura 13. Análise do perfil das bandas após separação e eluição em AcOEt (puro)..... 40

Figura 14. Análise do perfil das bandas após utilização de um segundo sistema de solventes para análise de CCD-analítico..... 40

Figura 15. Análise de separação dos compostos após corrida em sílica aderida ao vidro 41

Figura 16. Comparação de separação dos compostos após corrida em sílica aderida ao vidro e reveladas em vanilina 41

Figura 17. Comparação de separação dos compostos após corrida em sílica aderida ao vidro..... 42

Figura 18. Espectro de varredura das amostras na faixa de 200 a 700nm 44

Figura 19. Perfil de inibição da QLlum de neutrófilos humanos 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição do material obtido a partir da alga *Palmaria decipiens* e do fungo endofítico *Aspergillus unguis*. 34

Tabela 2 – Rendimento das amostras após extração por Cromatografia Líquida a Vácuo. 42

Tabela 3 – Avaliação da solubilidade do extrato bruto de *Palmaria decipiens* e das frações obtidas do fungo *Aspergillus unguis* 44

Tabela 4 – Atividade *scavenger* dos produtos sobre o radical DPPH. 45

Tabela 5 – Efeito da citotoxicidade do extrato bruto de *Palmaria decipiens* e das frações de *Aspergillus unguis* sobre neutrófilos humanos 46

Tabela 6 – Porcentagem de inibição da produção de ERO por neutrófilos expostos a diferentes compostos na máxima concentração de experimento... 55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt Acetato de Etila

CAT Catalase

CCD Cromatografia em Camada Delgada

CG-MS Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Cl^- Íon Cloro

CLV Cromatografia Líquida a Vácuo

DMSO Dimetilsufóxido

DPPH 2,2-difenil-β-picrilhidrazil

DNA Desoxirribose

ERO Espécies Reativas de Oxigênio

Fc Fragmento cristalizável

Fe^{2+} Íon Ferro (estado ferroso)

Fe^{3+} Íon Ferro (estado férrico)

G-CSF Fator estimulador de crescimento de colônia de granulócitos, do inglês *Granulocyte-colony stimulating factor*

GPO Glutationa Peroxidase

GSH Glutationa Reduzida

GSSH Glutationa Oxidada

H_2O_2 Peróxido de hidrogênio

IgG Imunoglobulina G

LES Lúpus Eritematoso Sistêmico

MeOH Metanol

MPO Mieloperoxidase

NaCl Cloreto de Sódio

NADPH Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida, do inglês *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*

NET Armadilha Extracelular dos Neutrófilos, do inglês *Neutrophil Extracellular Trap*

Nox2	NADPH oxidase isoforma 2
OH^-	Radical hidroxila
O_2^-	Ânion superóxido
QLlum	Quimiluminescência dependente de Luminol
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PDB	Caldo Dextrose Batata, do inglês *Potato Dextrose Broth*
PKC	Proteína Quinase C, do inglês *Protein Kinase C*
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
SOD	Superóxido Dismutase

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista de figuras iii
Lista de tabelas v
Lista de abreviaturas e siglas vi
Lista de símbolos viii

1. Introdução 15
1.1. Neutrófilos: características gerais 15
1.2. Produção de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos 16
1.3. Neutrófilos como alvo terapêutico de produtos naturais 18
1.4. Produtos naturais de origem marinha 18
1.4.1. *Palmaria decipiens* e o fungo endofítico *Aspergillus unguis* 20
2. Justificativa 23
3. Objetivos 24
3.1. Objetivo Geral 24
3.2. Objetivos Específicos 24
4. Casuística e Metodologia 25
4.1. Casuística 25
4.2. Delineamento Experimental 26
4.3. Preparo das amostras de alga e fungo 26
4.3.1. Extrato da alga *Palmaria decipiens* e frações do fungo *Aspergillus unguis* 26
4.4. Avaliação da solubilidade das amostras 27
4.5. Avaliação do efeito de supressão de fluorescência (efeito *quenching*) dos produtos naturais 27
4.6. Ensaio biológico com neutrófilos humanos 28
4.6.1. Amostras de sangue para obtenção de neutrófilos 28
4.6.2. Obtenção dos neutrófilos 28
4.6.3. Ensaio de citotoxicidade 29
4.6.4. Estímulo para os neutrófilos 29
4.6.4.1. Padronização com estímulo independente de receptor 29
4.6.5. Metabolismo oxidativo dos neutrófilos 30

4.6.5.1. Padronização dos ensaios de quimiluminescência 30
4.6.5.2. Ensaio de quimiluminescência dependente de luminol (QLlum) .. 31
4.8. Triagem química e separação das amostras 32
4.8.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) analítica e preparativa 32
4.8.2. Análise de separação de compostos por Cromatografia Líquida a Vácuo 33
5. Resultados 34
5.1. Extrato da alga *Palmaria decipiens* e frações do fungo endofítico *Aspergillus unguis* 34
5.2. Análise da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) analítica 34
5.3. Análise da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) preparativa 38
5.4. Análise de separação por Cromatografia Líquida a Vácuo 42
5.5. Avaliação do efeito de supressão de fluorescência (efeito *quenching*) dos produtos naturais 43
5.6. Avaliação da solubilidade dos produtos 44
5.8. Avaliação da citotoxicidade do extrato bruto de *Palmaria decipiens* e das frações de *Aspergillus unguis* 46
5.9. *Screening* do efeito dos compostos no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados por PMA 47
6. Discussão 56
7. Conclusão 62
8. Referencial bibliográfico 63
ANEXO 1 70

1. Introdução

1.1. Neutrófilos: características gerais

O sistema imunológico é composto por um arsenal de células e moléculas solúveis. Didaticamente o sistema imunológico é dividido em inato e adaptativo ou adquirido. Esta divisão ocorre considerando que o sistema imunológico inato é filogeneticamente mais antigo, no entanto, as ações efetoras de ambos se comunicam em todas as fases da resposta frente ao agente invasor. O sistema imunológico inato constitui a primeira linha de defesa em resposta à invasão de patógenos para a prevenção e/ou resolução de infecções. Dentre as células da imunidade inata destacam-se os neutrófilos (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013; WARD; ROSENTHAL, 2014).

Os neutrófilos são as células mais produzidas pela medula óssea de um indivíduo saudável ($2x10^{11}$ células/dia), constituindo cerca de 40-60% das células sanguíneas. Sua forma madura apresenta características morfológicas distintas, com aproximadamente 10-15 µm de diâmetro, núcleo com 3 a 5 lóbulos, citoplasma rico em grânulos e tempo de meia vida de aproximadamente 6-8 horas. As características morfológicas de núcleo lobulado e citoplasma com grânulos conferem ao neutrófilo a classificação como leucócito polimorfonuclear e granulócito, respectivamente (BORREGAARD, 2010).

Os neutrófilos são originados a partir de uma célula hematopoiética pluripotente da medula óssea e sua produção é estimulada na presença de fatores de crescimento, como o fator estimulador de crescimento de colônia de granulócitos (G-CSF). Em resposta aos fatores de crescimento, os precursores dos neutrófilos são estimulados à diferenciação e maturação, tendo o mieloblasto como a forma mais imatura desta linhagem celular seguido pelo pró-mielócito, mielócito, metamielócito, neutrófilo bastonete e, por fim, o neutrófilo segmentado, a forma celular mais madura (MA *et al*., 2012; FRANCISCO-CRUZ *et al*., 2014).

Enquanto viáveis, em organismos saudáveis, os neutrófilos desempenham funções efetoras características, como a fagocitose, produção e liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO) resultantes do seu metabolismo oxidativo ou *burst* respiratório, liberação de grânulos com ação microbicida direta ou indireta, e liberação extracelular de DNA, um mecanismo de “armadilha” para capturar e imobilizar patógenos denominada de NETose

(*Neutrophil Extracellular Trap,* armadilha extracelular dos neutrófilos) (ABDALLAH *et al*., 2011).

1.2. Produção de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos

A ativação dos neutrófilos pode se dar pelo reconhecimento e interação dos seus receptores com moléculas ligantes na superfície dos patógenos, tais como imunoglobulinas, proteínas do sistema complemento e/ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). A partir da interação entre receptores e ligantes, o neutrófilo é ativado e desempenha seu papel como fagócito profissional, levando à internalização do patógeno e formação de um vacúolo citoplasmático que se funde ao lisossomo, o fagolisossomo. Para que haja eliminação do agente invasor, há a formação do complexo enzimático NADPH-oxidase (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) na membrana do fagolisossomo, conforme esquematização na Figura 1, iniciando a formação de seu primeiro produto microbicida, o ânion superóxido (O_2^-), que atua como mediador da produção de outras substâncias citotóxicas (HORDIJK, 2006; AMULIC *et al*., 2012; MITTAL *et al*., 2014).

O ânion superóxido pode sofrer dismutação para peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por ação da enzima Superóxido Dismutase (SOD), que atua como catalisadora de reação. Posteriormente, moléculas de H_2O_2 reagem, na presença da enzima mieloperoxidase, com íons cloro (Cl^-), originando ácido hipocloroso (HOCl) (FLANNAGAN *et al*., 2012; MITTAL *et al*., 2014).

Adicionalmente, o ânion superóxido como mediador na produção de substâncias oxidantes pode reagir com íons Ferro (Fe^{3+}), tendo como resultado a formação de radicais hidroxila (OH^-) por duas vias: a primeira, conhecida como reação de Haber-Weiss, ocorre quando íons ferro (Fe^{3+}) produzem OH^- pela redução do O_2^-. A segunda reação ocorre quando as hidroxilas são formadas a partir da interação de íons ferro reduzidos (Fe^{2+}) com H_2O_2, na denominada reação de Fenton (MITTAL *et al*., 2014)

Apesar de eliminar patógenos, as ERO podem causar dano tecidual caso não haja equilíbrio de sua liberação e interação com substâncias antioxidantes circulantes, as quais atuam prevenindo, removendo ou postergando o dano oxidativo da molécula alvo (WINTERBOURN, 2008). O balanço estabelecido entre oxidantes e antioxidantes é conhecido por equilíbrio redox.

Compõe o arsenal de substâncias antioxidantes enzimas com ação *scavenger* como a catalase, glutationa peroxidase (GPO), superóxido dismutase, peroxirredoxinas e tioredoxinas. Além de substâncias endógenas, a ação antioxidante pode ser obtida de forma exógena, pela alimentação e suplementação. Diversos compostos têm sido investigados como potenciais agentes antioxidantes. Dentro deste conjunto, há destaque para o interesse crescente por substâncias de origem natural (VALKO *et al*., 2007; LI *et al.*, 2011; HANDY; LOSCALZO, 2012; TAKAO *et al.*, 2015).

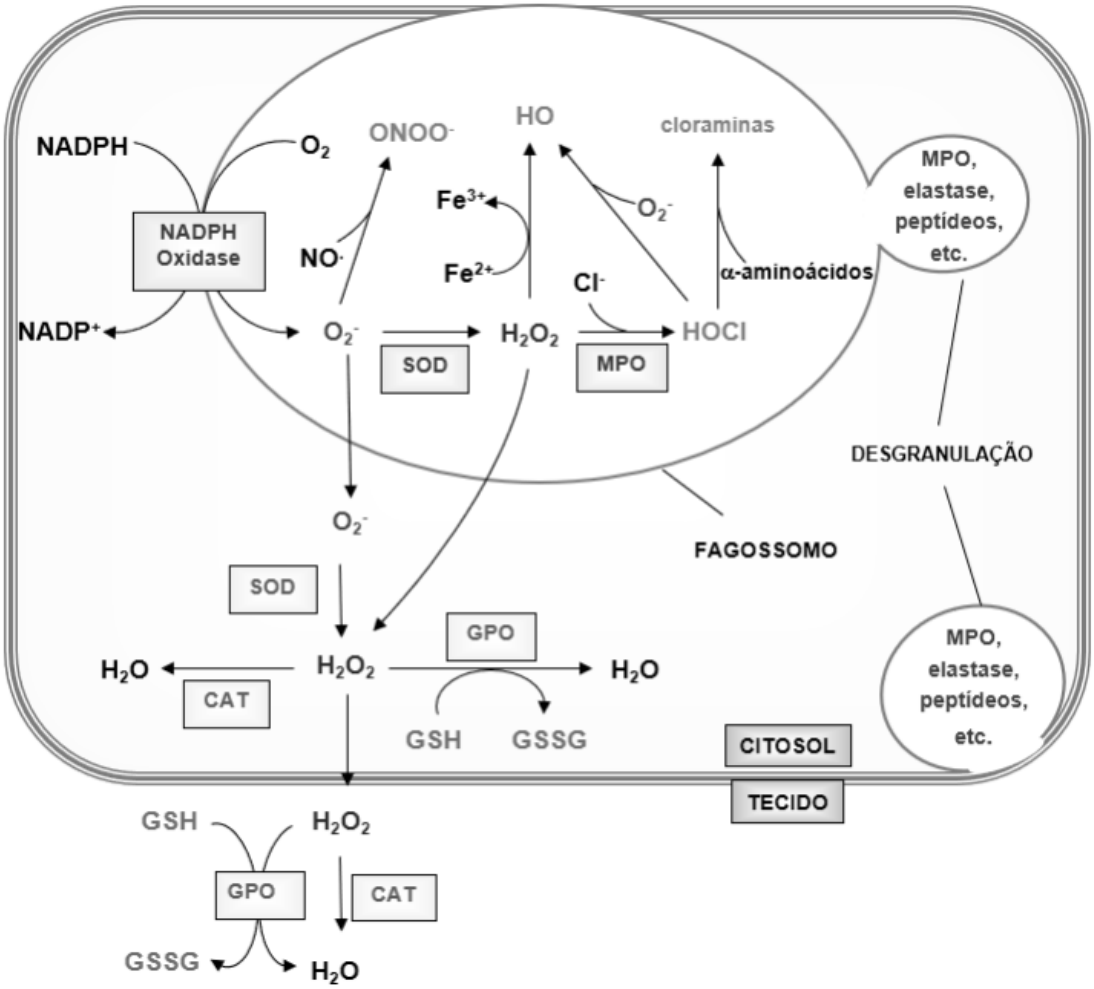


Figura 1 – Representação esquemática do metabolismo oxidativo de neutrófilos. Após formação do complexo enzimático NADPH-oxidase, há conversão do O_2 em ânion superóxido (O^-), que pode ser submetido a duas transformações: reagindo com o óxido nítrico (NO^-) é capaz de formar peroxinitrito, ou sofrer dismutação espontânea pela enzima superóxido dismutase (SOD). O peróxido de hidrogênio pode reagir com íons ferro e gerar radicais hidroxila, ou pela ação da enzima mieloperoxidase (MPO) gerar ácido hipocloroso (HOCl). O HOCl, na presença de aminoácidos é capaz de gerar cloraminas. Esse processo é dependente de enzimas granulares e é passível de regulação pelo sistema antioxidante, endógeno e exógeno. **ERO**, Espécies Reativas de Oxigênio; **NADPH**, Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Fosfato; **SOD**, Superóxido Dismutase; **MPO**, Mieloperoxidase; **CAT**, Catalase; **GPO**, Glutationa Peroxidase; **GSH**, Glutationa Reduzida; **GSSH**, Glutationa Oxidada (Adaptado a partir de Kabeya, 2006).

1.3. Neutrófilos como alvo terapêutico de produtos naturais

Os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa do hospedeiro. No entanto, em processos inflamatórios de caráter crônico, estas células podem ser constantemente ativadas, gerando uma quantidade de ERO superior às moléculas destinadas ao equilíbrio redox, causando dano tecidual, prejuízo funcional ou perda do órgão (SMALL *et al*., 2012).

Pelo seu papel em processos inflamatórios, os neutrófilos têm se tornado alvo na pesquisa de compostos capazes de controlar suas funções efetoras em situações onde estes mecanismos se apresentam prejudiciais. O desafio está em como desenvolver um alvo terapêutico que controle as respostas deletérias dos neutrófilos sem prejudicar as funções importantes para a manutenção da homeostase.

Dentre as funções dos neutrófilos, destacam-se como possíveis alvos de controle o processo de fagocitose, a migração endotelial, a desgranulação, a liberação de NETs e o sistema oxidante (JOHANSSON *et al*. 2002; COSTA *et al*., 2016; KORINEK *et al*., 2016; HMOTEH; MUSTHAFA; VORAVUTHIKUNCHAI, 2018). As estratégias utilizadas para estudo do sistema oxidante incluem a atividade direta (*scavenger*) de produtos naturais sobre as espécies reativas de oxigênio (radicalares e não radicalares), a inibição das subunidades da enzima NADPH-oxidase (Nox2) ou as enzimas que participam da geração de produtos oxidantes (DEROCHETTE *et al*., 2013; FIGUEIREDO-RINHEL *et al*., 2017; McDONALD, 2017; ZEINALI *et al*. 2017).

A escolha dos neutrófilos como alvo de pesquisa para utilização terapêutica se baseia na crescente demanda da descoberta destas células como importantes biomarcadores, capazes de auxiliar no diagnóstico clínico, monitoramento e prognóstico de doenças. Na prática clínica já são utilizados medicamentos (sintéticos e biofármacos) que controlam suas funções, a fim de auxiliar o tratamento (McDONALD, 2017). Neste sentido, o avanço na descoberta, elucidação e síntese de novos fármacos a partir de produtos naturais se mostra como um potente e crescente nicho de atuação.

1.4. Produtos naturais de origem marinha

Os produtos naturais representam uma fonte de diversidade química para a descoberta de novos candidatos a fármacos com potencial terapêutico para uma variedade de doenças (KINGSTON, 2011; NEWMAN; CRAGG, 2012;

CRAGG; NEWMAN, 2013). Na área farmacêutica, os metabólitos de origem natural representam aproximadamente 64% do número de substâncias (de baixo peso molecular) aprovadas para serem usadas como fármacos, no período de janeiro de 1981 a dezembro de 2010 (NEWMAN; CRAGG, 2012). Estes dados atestam a contribuição significativa da química de produtos naturais para o desenvolvimento de novos medicamentos.

Neste contexto, o ambiente marinho é considerado uma importante fonte de produtos naturais, acumulados principalmente nos organismos vivos (OLIVEIRA *et al.,* 2012; UZAIR *et al.*, 2012). Estima-se que cerca de 1% das 250.000 espécies marinhas conhecidas tem sido estudado (BLUNT *et al.*, 2014), o que mostra que existe uma enorme variedade de organismos marinhos a serem explorados quanto à suas propriedades química, biológica e biossintética.

O Continente Antártico possui um cenário marinho exuberante. É um dos ambientes mais extremos da Terra, com o clima mais frio e seco do planeta e uma variação da temperatura anual de 15°C no verão a -80°C no inverno (FERREIRA, 2009). Mesmo em condições tão adversas, uma diversidade de formas de vida está presente no continente Antártico como bactérias, fungos, invertebrados, aves e mamíferos (ONOFRI *et al.*, 2007; SHIVAJI; PRASAD, 2009). Em particular, o ambiente marinho é perfeito para proliferação de algas (BISCHOFF, 1996).

A pesquisa sobre a biodiversidade de macroalgas na Antártica é restrita devido à falta de informações taxonômicas e de distribuição consistente, o que impulsiona a realização de estudos de prospecção química e biológica com as mesmas (CLAYTON, 1994).

As macroalgas são organismos multicelulares que apresentam clorofila e são retratadas com ampla distribuição nas regiões litorâneas de todo o planeta (SILVA *et al.*, 2008; GAMAL, 2010). Estima-se que 90% das espécies de macroalgas estão localizadas no oeste da Antártica (WIENCKE; CLAYTON, 2002). Por ser fortemente isolada, a flora ficológica do Oceano Antártico teve como consequência um alto grau de endemismo na Antártica e, por isso, aproximadamente 30% das espécies da região são endêmicas.

Macroalgas saudáveis produzem uma secreção rica em carboidratos, lipídeos e peptídeos, os quais agem como um fator atrativo para os microrganismos colonizadores (ZUCCARO; MITCHELL, 2005), como por

exemplo, fungos. Fungos em associação com macroalgas integram um grupo variado que inclui espécies simbiontes, sapróbias, parasitas e patogênicas (KOHLMEYER; VOLKMANN-KOHLMEYER, 2003; RAGHUKUMAR, 2006; SURYANARAYANAN, 2012).

1.4.1. *Palmaria decipiens* e o fungo endofítico *Aspergillus unguis*

Dentro das espécies de algas encontradas no ambiente antártico, destaca-se neste trabalho a macroalga *Palmaria decipiens,* um dos 37 membros do filo das rodófitas na Antártica, sendo pertencente à classe *Florideoficeae*. Sua macro morfologia é caracterizada pelo seu talo de até 70 cm e superfície brilhante com coloração avermelhada ao roxo, sendo encontrada normalmente em ambientes rasos (menor que 6 m) (HOMMERSAND *et al*., 2009; BECKER *et al*., 2011).

Na literatura não são encontrados estudos que avaliem o potencial biológico dos produtos obtidos a partir desta alga. No entanto, foi demonstrado por McDowell e colaboradores (2014) que esta alga possui capacidade oxidante. Em outro estudo realizado por Bucolo e colaboradores (2012) foi evidenciada a capacidade quimiossensorial de metabólitos produzidos pela alga *P. decipiens* na formação de esporos de outra espécie de alga marinha, o que reafirma a complexidade dos produtos metabótitos secundários desta macroalga.

Além disso, *Palmaria decipiens* tem sido descrita como hospedeira de diferentes espécies fúngicas, das quais os produtos de extração têm mostrado papel bioativo (GODINHO *et al*., 2013). Neste cenário a relação entre alga e fungo desempenha papel importante, uma vez que há relação direta entre o meio em que a macroalga se desenvolve e a produção de metabólitos que serão compartilhados na relação simbiótica.

Dentre os fungos que coabitam de forma endofítica a macroalga *Palmaria decipiens*, há destaque neste trabalho para a espécie *Aspergillus unguis*. As informações sobre o gênero *Aspergillus* são diversas, no entanto aquelas relacionadas à espécie *A. unguis* são escassas, não havendo informações sobre a relação endofítica com *Palmaria decipiens*, refletindo a importância de estudos químicos e taxonômicos.

As principais classes de compostos descritas nesta espécie são as depsidonas, dentre as mais conhecidas encontram-se a nidulina, nornidulina e

2-clorounguinol (Figura 2). Às depsidonas têm se atribuída atividade antitumoral, antibacteriana, antifúngica e antioxidante (CHOMCHEON *et al.*, 2009; KHUMKOMKHET *et al.*, 2009; ABDOU *et al.*, 2010; SURERAM *et al.*, 2012). El-Hady e colaboradores (2015) descreveram, em ensaios livres de células, atividade *scavenger* sobre o ânion superóxido, inibição da enzima acetilcolinesterase e alfa-glucosidase.

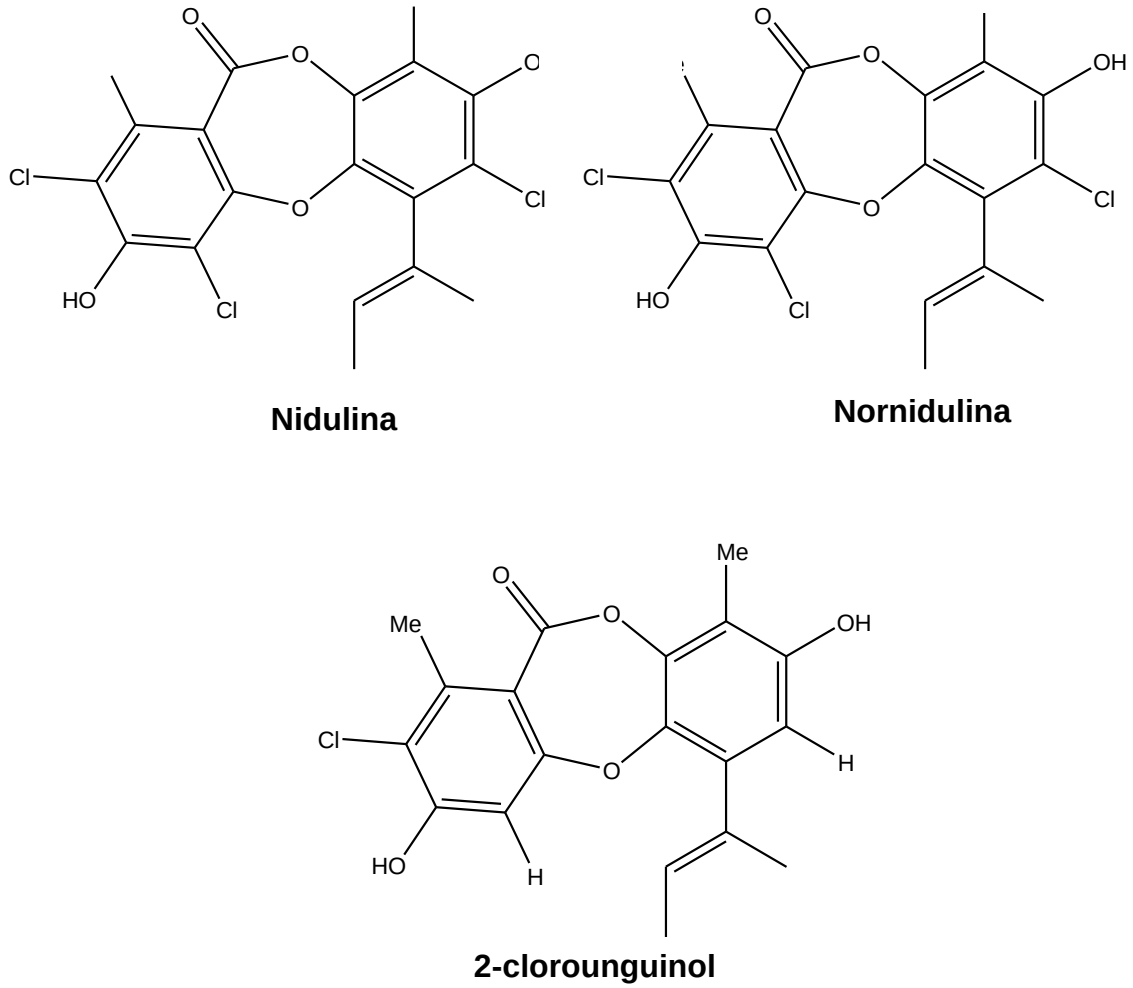


Figura 2 – Estruturas de depsidonas descritas no fungo *Aspergillus unguis* (adaptado a partir de MORAES, 2017).

As relações ecológicas que existem entre microrganismos e macroalgas são pouco conhecidas e podem ter grande significado para a conservação e exploração biotecnológica dos ambientes marinhos (HAWKSWORTH, 1991).

Os fungos marinhos são uma classe de microrganismos pouco estudada dentro de um diversificado e complexo ecossistema, no entanto, sabe-se que

estes fungos são importantes no reaproveitamento de nutrientes, principalmente, na decomposição de substratos lenhosos, herbáceos e até mesmo de animais mortos nos oceanos (HYDE *et al.*, 1998), podendo ser uma fonte de novas substâncias com atividade terapêutica.

A parte externa das algas fornece uma região protegida em um ambiente que constantemente é alvo de fatores de estresse como a baixa concentração de nutrientes, dessecamento, salinidade e radiação ultravioleta. Por crescerem em um habitat extremo e crítico para reprodução, os fungos produzem metabólitos secundários diferenciados, resultantes da adaptação química frente às pressões ambientais (BHADURY *et al.*, 2006).

O primeiro fármaco oriundo do ambiente marinho foi a Ziconotida, que é potente analgésico extraído do gastrópode *Conus magus* (OLIVEIRA *et al.*, 2012). O antibiótico cefalosporina C foi o primeiro metabólito terapeuticamente ativo extraído do fungo marinho *Cephalosporium sp.* obtido de água marinha (BURTON, 1951, KELECOM, 2002).

Embora um grande número de compostos com novas estruturas e grande diversidade de atividades biológicas tenha sido isolado e identificado dos fungos endofíticos de origem marinha (GAUTSCHI *et al*., 2004; KJER *et al*., 2010), a literatura é escassa a respeito dos efeitos destes compostos.

2. Justificativa

Considerando-se a importância fisiológica do neutrófilo, bem como o seu envolvimento na fisiopatologia de inúmeras doenças inflamatórias, esta célula constitui um alvo terapêutico em potencial na busca de moléculas/substâncias que possam controlar fenótipos pró e anti-inflamatórios. O desafio está em como desenvolver um alvo terapêutico que controle as respostas deletérias dos neutrófilos sem prejudicar suas funções importantes para a manutenção da homeostase.

O nosso grupo de pesquisa tem estudado a biologia dos receptores para IgG e do sistema complemento no lúpus eritematoso sistêmico (LES) – uma doença inflamatória crônica, de caráter autoimune, com forte envolvimento dos neutrófilos na sua fisiopatologia - tendo descrito alterações de expressão e de funções mediadas por estes receptores (MARZOCCHI-MACHADO *et al.*, 2002; 2005; ALVES *et al*., 2003), bem como a influência dos polimorfismos genéticos destes receptores nas funções efetoras dos neutrófilos e na suscetibilidade ao LES (TOLLER-KAWAHISA *et al.*; 2014; VIGATO-FERREIRA *et al.*, 2014; URBACZEK *et al.*, 2014), e a influência da obesidade e do estresse oxidativo no aparecimento do lúpus (TOLLER-KAWAHISA *et al.*, 2015).

Assim os ensaios biológicos estabelecidos no nosso laboratório oferecem uma importante ferramenta para estudar a atividade biológica de novas substâncias sobre os neutrófilos.

Os produtos naturais representam uma fonte importante de novas substâncias bioativas, em especial os fungos associados à macroalgas marinhas, devido às suas relações ecológicas e/ou interações bioquímicas. Em parceria com a Profa. Dra. Hosana Debonsi da FCFRP-USP, coordenadora de estudos de prospecção química e biológica de organismos marinhos provenientes da Antártica, a justificativa deste estudo foi fomentar a busca por substâncias, presentes nas algas e fungos provenientes da Antártica, com atividade biológica sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito do extrato da alga marinha *Palmaria decipiens* e frações do fungo endofítico *Aspergillus unguis* sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade do extrato e das frações para os neutrófilos humanos;
- Avaliar o efeito do extrato e das frações sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos;
- Analisar o potencial *scavenger* do extrato e das frações em ensaio livre de célula.

4. Casuística e Metodologia

4.1. Casuística

O presente protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) (ANEXO 1). O grupo de estudo foi constituído por sujeitos saudáveis, de ambos os sexos, participantes voluntários, faixa etária de 18 a 50 anos, recrutados na comunidade do campus USP Ribeirão Preto, para doação de sangue a partir do qual foram obtidos os neutrófilos para este estudo. Todos os participantes voluntários, ao serem convidados a participar da pesquisa, foram esclarecidos sobre o protocolo de pesquisa e aqueles que concordaram em participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os critérios de exclusão foram: tabagismo, uso de anti-inflamatórios há menos de sete dias ou terapia com medicamentos controlados, uso de contraceptivo e gestação.

4.2. Delineamento Experimental

A Figura 3 apresenta um fluxograma com ilustração do delineamento experimental.

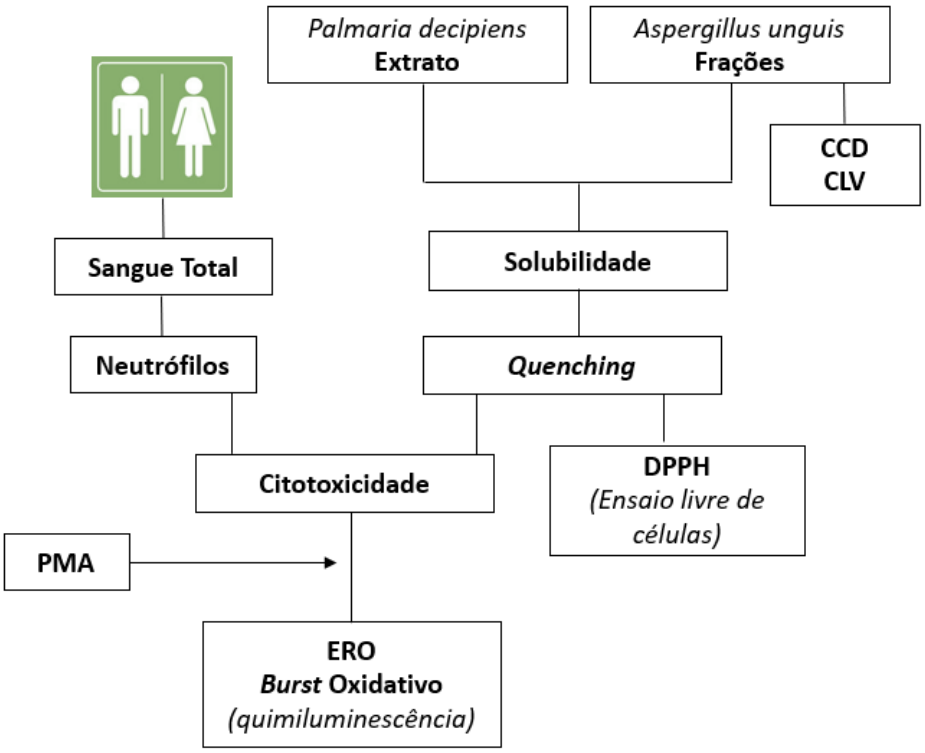


Figura 3 – Fluxograma com o delineamento experimental. **ERO**, Espécie reativa de oxigênio; **PMA**, Forbol-12-miristato-13-acetato; **DPPH**, 2,2-difenil-β-picrilhidrazil; **CCD**, Cromatografia em Camada Delgada; **CLV**, Cromatografia Líquida a Vácuo.

4.3. Preparo das amostras de alga e fungo

4.3.1. Extrato da alga *Palmaria decipiens* e frações do fungo *Aspergillus unguis*

O extrato da alga *P. decipiens* e as frações do fungo *A. unguis* foram fornecidos pelo Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho - incorporado ao Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais e Sintéticos, do Depto. de Física e Química da FCFRP-USP, sob responsabilidade da Profa. Dra. Hosana Maria Debonsi. O isolamento e a caracterização molecular e morfológica da alga *P. decipiens* e do fungo associado *A. ungui*, bem como a triagem química do extrato e das frações, foram realizados previamente no laboratório da Dra. Hosana M. Debonsi em colaboração com a Profa Dra. Marcia Regina von Zeska Kress também da FCFRP-USP.

Para este trabalho foram utilizados o extrato bruto da alga *Palmaria decipiens*, frações e subfrações obtidas do fungo endofítico *A. unguis* (Tabela 1).

O extrato da alga *Palmaria decipiens* foi preparado como parte do trabalho da dissertação de mestrado de Tavares (2016), o qual foi obtido por extração com a mistura de solventes orgânicos diclorometano:metanol (MeOH) (2:1), filtração, ultrassom e rotaevaporação. O extrato assim obtido foi cedido para este estudo como o extrato orgânico concentrado.

Quanto às frações e subfrações do fungo *A. unguis*, estas foram preparadas como parte da dissertação de mestrado de Moraes (2017). O material de cultivo do fungo em meio PDB (*Potato Dextrose Broth*, do inglês Caldo Dextrose Batata) foi submetido à cromatografia em coluna de Sephadex LH 20 e metanol (MeOH) como fase móvel. As frações e subfrações do fungo foram obtidas, concentradas e cedidas para o presente estudo.

4.4. Avaliação da solubilidade das amostras

Os compostos foram preparados em DMSO puro, para dissolução, a partir de uma concentração de 100mg/mL. As amostras que não foram solúveis nesta concentração seguiram para diluições de 75, 50, 25 e 10mg/mL, respectivamente. Para análise da solubilidade em meio aquoso (Solução Hanks pH 7,2), foi feita uma diluição intermediária da amostra, a fim de diminuir a concentração de DMSO inicial e observar o comportamento da amostra em meio polar. Para tanto, uma alíquota da amostra previamente diluída em DMSO foi acrescida à solução de Hanks, e observada a formação de precipitado, a partir da observação visual foram classificadas como insolúveis ou solúveis.

4.5. Avaliação do efeito de supressão de fluorescência (efeito *quenching*) dos produtos naturais

Como controle de qualidade para os resultados das análises de quimiluminescência e DPPH, foi empregada a análise de varredura espectrofotométrica das amostras estudadas no presente trabalho. A análise do efeito *quenching* permite compreender a faixa de absorção dos compostos em comprimentos de onda ultravioleta. Foram consideradas as faixas de absorção do luminol em 425nm e DPPH em 510nm.

Os ensaios foram realizados conforme descrito por Melo (2015), em que uma alíquota das substâncias (1mL) foi adicionada em cubeta de quartzo de 1cm de caminho óptico e submetidas a uma varredura na faixa de 200 a 700nm para a determinação do espectro de absorvância.

As amostras foram preparadas nas mesmas condições dos ensaios de QL(Lum), conforme descrito adiante no item 4.6.5, e analisadas em espectrofotômetro (Hitachi-UV 2900). Como branco foi utilizada solução balanceada de Hanks (pH 7,2) contendo DMSO a 0,1% e as amostras foram analisadas na concentração de 50 µg/mL.

4.6. Ensaio biológico com neutrófilos humanos

4.6.1. Amostras de sangue para obtenção de neutrófilos

Um volume de 20mL de sangue venoso periférico foi colhido dos participantes, com sistema de coleta a vácuo e estéril, na presença de anticoagulante Alséver (Citrato de Sódio 1:1 (v/v)) para obtenção dos neutrófilos.

4.6.2. Obtenção dos neutrófilos

Os neutrófilos foram obtidos a partir da mistura da amostra de sangue periférico com solução de Alséver utilizando-se metodologia descrita por Lucisano & Mantovani (1984). A mistura foi submetida à centrifugação a 664x*g*/10min/23°C, desprezando o sobrenadante e camada de células mononucleares. A fim de separar os neutrófilos das demais células, foi adicionada solução de gelatina 2,5% em NaCl 0,15M em quantidade equivalente ao dobro do número de células, seguido de incubação a 37°C por 15min. Acrescentou-se ao sobrenadante uma solução de NaCl 0,15M, seguido de homogeneização. As amostras foram centrifugadas a 664x*g*/10min/23°C, desprezando o sobrenadante e lavadas em seguida com solução de NH_4Cl 0,83% pH 7,2, para lise de eritrócitos remanescentes, e deixada em repouso por 5min/37°C. As amostras foram então lavadas em NaCl 0,15M e submetidas à centrifugação a 664x*g*/10min/23°C. Foi adicionado 1mL de solução balanceada de Hanks pH 7,2 contendo gelatina 0,1%. Para contagem de neutrófilos foram retirados 10µL de amostra e adicionados ~~a~~ 990µL de líquido de Turk. A contagem foi realizada em Câmara de Neubauer. A suspensão celular foi ajustada para $5x10^6$ células/mL. Para determinação da viabilidade

celular foram acrescentados 50µL de suspensão de neutrófilos a 50µL de solução de Azul de Tripan 0,1% em NaCl 0,15M e a identificação dos neutrófilos viáveis foi realizada em microscopia ótica comum.

4.6.3. Ensaio de citotoxicidade

Para investigação da capacidade citotóxica dos compostos marinhos (extrato bruto e frações), foi realizado inicialmente o ensaio de viabilidade celular, conforme descrito por Lucisano-Valim e colaboradores (2002).

Para este ensaio, neutrófilos (1×10^6) foram incubados na presença de solução balanceada de Hanks pH 7,2 (controle negativo), DMSO 0,11% (controle de solvente); ou Triton-X 0,2% (controle positivo), ou compostos naturais na maior concentração de estudo, com tempos de exposição de 5 e 25min/37ºC. Para as amostras obtidas por cromatografia líquida a vácuo foi empregada a concentração de 200 µg/mL para todas as amostras. Decorrido o respectivo tempo, as amostras foram centrifugadas a 970x*g*/4ºC/10min para separação e obtenção do sedimento.

O sedimento foi ressuspenso em solução balanceada de Hanks pH 7,2 contendo gelatina 0,1% (p/v) e uma alíquota dessa suspensão foi adicionada a um tubo com o corante Azul de Tripan 0,1% em uma proporção 1:2. A porcentagem de células viáveis foi obtida pela contagem de 200 células em microscopia óptica comum e calculado pela fórmula:

$$Células\ viáveis\ (\%): \frac{Número\ de\ células\ viáveis\ x\ 100}{200}$$

4.6.4. Estímulo para os neutrófilos

4.6.4.1. Padronização com estímulo independente de receptor

Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) foi utilizado como estímulo independente de receptor para os ensaios da medida do metabolismo oxidativo dos neutrófilos. PMA foi solubilizado em DMSO na concentração 10^{-2}M e estocado a -80°C. No momento do uso, 2µL foram diluídos em 20mL de solução de Hanks pH 7,2, sendo utilizado na concentração final de 10^{-7}M como descrito por Pavelkova e Kubala (2004).

4.6.5. Metabolismo oxidativo dos neutrófilos

4.6.5.1. Padronização dos ensaios de quimiluminescência

A produção das ERO foi medida por quimiluminescência (QL) dependente de luminol (5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinodiona, $C_8H_7N_3O_2$, *M*: 177,16), baseando-se nos ensaios descritos por ALVES *et al.* (2003) A Figura 4 representa o mecanismo de emissão de luz da sonda quimiluminescente luminol.

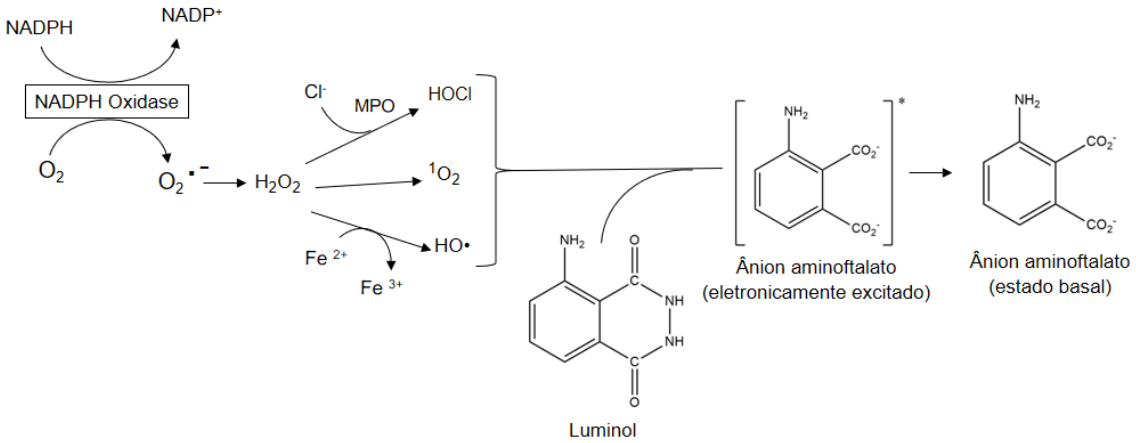


Figura 4 – Mecanismo de emissão de luz da sonda quimiluminescente luminol. Após contato com o estímulo, o neutrófilo é ativado e leva à formação do complexo enzimático NADPH oxidase, reduzindo o oxigênio molecular (O_2) em ânion superóxido (O_2^-), que por sua vez será convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), este pode sofrer ação de enzimas ou íons e ser convertido em novas espécies reativas. As ERO formadas a partir do H_2O_2 são capazes de oxidar o luminol, produzindo sua forma eletronicamente excitada, o ânion aminoftalado, que ao retornar ao seu estado basal, emite fótons que são lidos por um aparelho chamado luminômetro, e posteriormente quantificados por um *software* computacional (Adaptado de KABEYA, 2006).

Os neutrófilos foram tratados com o extrato bruto da alga *Palmaria decipiens* e diferentes frações do fungo *Aspergillus unguis*, objetos deste estudo.

As condições experimentais de padronização dos ensaios de QL deste estudo foram realizadas adotando os seguintes parâmetros: concentração de células ($1x10^6$ células por tubo de reação em volume final de 500µL); concentração de PMA (10^{-7}M), concentração da sonda quimiluminescente (280µM); tempo de exposição aos compostos de 20min. As padronizações foram acompanhadas por ensaios de citoxicidade do extrato bruto e frações para os neutrófilos pelo método de exclusão pelo corante Azul de Tripan 0,1% em NaCl 0,15M.

4.6.5.2. Ensaio de quimiluminescência dependente de luminol (QLlum)

Os neutrófilos ($1x10^6$) foram pré-incubados em banho-maria a 37ºC por 3 min, com as amostras de extrato bruto de *P. decipiens* ou frações de *A. unguis* em diferentes concentrações, e da sonda para QLlum (280 µM), sendo o volume final da reação 500 µL. As amostras foram transportadas para o luminômetro (Berthold, AutoLumat Plus) e incubadas a 37ºC por 20 min, onde foi registrada a contagem de fótons por minuto (cpm).

Como controle negativo (reação espontânea), os neutrófilos foram incubados somente com a sonda quimiluminescente; para o controle positivo da reação, as células foram incubadas com PMA (10^{-7}M); e no controle de solvente foi utilizada a concentração de DMSO 0,11% diluído em solução balanceada de Hanks pH 7,2. Os resultados foram expressos como a área integrada sob o perfil de QL registrado.

4.7. Ensaio livre de células

4.7.1. Atividade antioxidante pelo ensaio de DPPH

A atividade antioxidante das amostras sobre o radical DPPH (2,2-difenil-β-picrilhidrazil), foi avaliada pelo método de Blois (1958) e adaptado ao descrito por Fernandes *et al*. (2014). O princípio do método baseia-se na redução do radical DPPH por substâncias antioxidantes com capacidade *scavenger* (Figura 5), em que há mudança na coloração do meio de lilás para tons amarelo.

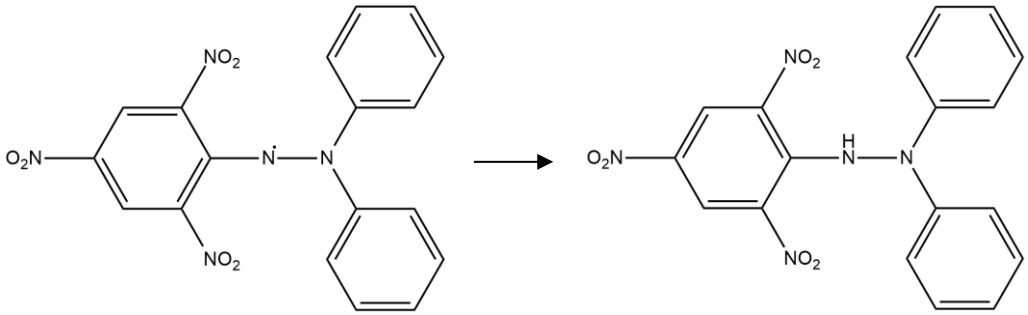


Figura 5 – Mecanismo de reação do DPPH (2,2-difenil-β-picrilhidrazil, $C_{18}H_{12}N_5O_6$, $M = 394.33$). O elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio da hidrazina na molécula de DPPH é reduzido ao receber átomos de um composto antioxidante (Adaptado de KEDARE; SINGH, 2011).

Para o ensaio foram feitas diluições intermediárias das amostras previamente solubilizadas conforme o item 4.4, sendo utilizadas na concentração inicial de 100 µg/mL, e para a(s) amostra(s) que apresentou(aram) atividade antioxidante sobre o DPPH, foram utilizadas novas concentrações (20, 50, 50, 60, 80 µg/mL).

As condições experimentais foram realizadas conforme descrito abaixo:

a. Para o branco da reação foram utilizados 800 µL tampão acetato 0,1M (pH 5,5) e 200 µL de etanol (puro);
b. Para o padrão da reação foram utilizados 800 µL tampão acetato 0,1M (pH 5,5) e 200 µL de solução etanólica de DPPH 0,250 mM;
c. Para a reação foram utilizados 800 µL tampão acetato 0,1M (pH 5,5) e 200 µL de amostra.

Os valores de absorvância foram medidos em 510nm a 30°C (espectrofotômetro Hitachi-UV 2900) e calculados da seguinte forma:

$$\text{DPPH reduzido } (\%): \frac{Absorvância\ inicial - \ Absorvância\ final}{Absorvância\ inicial}\ x\ 100$$

Para as amostras com atividade antioxidante, os resultados foram expressos como a concentração inibitória (IC_{50}) (*µ*g/mL), o que reflete a concentração necessária de substrato para reduzir 50% o radical DPPH.

4.8. Triagem química e separação das amostras

4.8.1. Cromatografia em Camada Delgada analítica e preparativa

Após a realização dos ensaios mencionados nos itens anteriores, a fim de otimizar a quantidade de massa remanescente, foi utilizada a técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para triagem da possível semelhança química das amostras de frações do fungo *A. unguis.* As amostras FR3, FR4, FR5 e FR6* foram reunidas e dissolvidas em Acetato de Etila (AcOEt) puro. Em seguida, a mistura foi submetida à CCD com diferentes sistemas de solvente, a fim de obter a formação dos *spots* (pontos de parada dos compostos, considerando o princípio do teste) e otimização da cromatografia. Para a CCD foram utilizadas placas TLC (*Thin Layer Chromatography*) Silicagel 60G F254 (Merck KGaA, Código 105554).

4.8.2. Análise de separação de compostos por Cromatografia Líquida a Vácuo

Para separação de compostos considerando a polaridade, foi utilizada a metodologia descrita por Targett, Killcoyne e Green (1979). O método de cromatografia líquida a vácuo se baseia na extração de compostos utilizando pressão reduzida, aumentando dessa forma a taxa de passagem da fase móvel pela fase estacionária.

Um funil de separação foi conectado a um kitasato, sendo este conectado a uma bomba a vácuo. Como fase estacionária foram utilizados 2g de sílica gel (grau CCD). Foi utilizada uma quantidade de 300mL de solvente para cada extração. Os sistemas de solvente utilizados foram: 100% Hexano; 10% Acetato de Etila:Hexano; 20% Acetato de Etila:Hexano; 40% Acetato de Etila:Hexano; 60% Acetato de Etila:Hexano; 80% Acetato de Etila:Hexano; 100% Acetato de Etila; 25% Metanol:Etanol; 100% Metanol.

As amostras obtidas foram concentradas utilizando evaporador rotativo, sob temperatura constante (30ºC).

5. Resultados

5.1. Extrato da alga *Palmaria decipiens* e frações do fungo endofítico *Aspergillus unguis*

Relação das amostras do extrato da *Palmaria decipiens* e das frações do fungo *Aspergillus unguis* cedidos pelo laboratório da Profa. Hosana Maria Debonsi para este estudo (Tabela 1).

Tabela 1 – Amostras do extrado da alga *Palmaria decipiens* e frações do fungo endofítico *Aspergillus unguis.*

Espécie	Método	Extrato Bruto / Fração
Palmaria decipiens	Maceração com CH_2Cl_2:CH_3OH (2:1)	Extrato Bruto
Aspergillus unguis	Sephadex LH 20	FR3 FR4 FR5 FR6* FR6*** FR7 FR8 FR 9* FR15 FR20

FR, Fração; **CH_2Cl_2**, Diclorometano; **CH_3OH**, Metanol.

5.2. Análise da Cromatografia em Camada Delgada analítica

A partir da análise da CCD analítica (Figura 6), as massas das frações FR3, FR4, FR5 e FR6* do fungo *Aspergillus unguis* foram reunidas para otimizar o processo de purificação e rendimento. A massa total obtida foi de 619,8mg (massa final). Posteriormente, a amostra resultante foi submetida a diferentes sistemas de solvente para escolha do mais adequado para extração. O primeiro sistema de solvente utilizado foi Hexano:AcOEt (4:6), observado na Figura 7.

Figura 6 – Análise em CCD-analítica utilizando o sistema Hexano:AcOEt (3:7) para obtenção dos perfis das frações do fungo *Aspergillus unguis*. A análise foi feita em duplicata. Para revelação foi utilizado o iodo. **FR:** Fração; *****:** Sobrenadante.

Figura 7 **–** Análise em CCD-analítica utilizando o sistema Hexano:AcOEt (4:6). A análise foi feita em duplicata (**1 e 2**) e os *spots* formados aparecem destacados em círculos vermelhos. Para revelação foi utilizado o iodo. **C**: Controle.

Após preparo e análise da amostra anterior (utilizando Acetato de Etila, como eluente), foi observada precipitação, o que sugeriu: 1) Quantidade insuficiente de AcOEt para solubilização da amostra; 2) Insolubilidade da

amostra no solvente de escolha. Para análise comparativa, foi realizada análise em CCD do sobrenadante e do precipitado, e separadamente, os resultados são observados na Figura 8, sendo que não houve diferença em relação ao perfil dos compostos, porém foi observado maior concentração de compostos no sobrenadante.

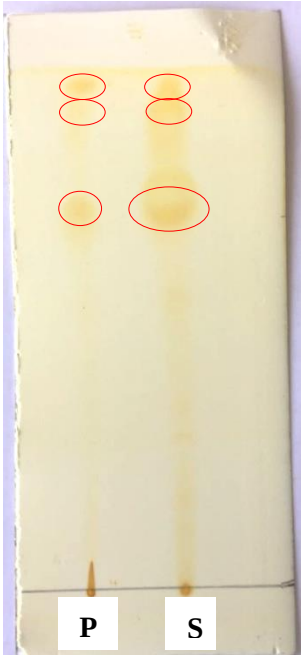


Figura 8 – Análise comparativa em CCD-analítica utilizando o sistema Hexano:AcOEt (4:6). **P**, Precipitado; **S**, Sobrenadante.

Foi realizada nova solubilização do precipitado em metanol (MeOH), e análise em CCD utilizando o sistema de solventes Hexano:AcOEt:Acetona (5:4:1). Foi observada maior solubilização em metanol, no entanto, os *spots* indicam que foram encontrados os mesmos compostos obtidos no sobrenadante da amostra solubilizada em AcOEt (Figura 9), portanto, considerando a polaridade dos dois solventes de escolha, a quantidade de AcOEt utilizado anteriormente não havia sido suficiente para a solubilização da amostra. Sendo assim, o precipitado e o sobrenadante foram armazenados no mesmo frasco para uso nos ensaios.

Figura 9 – Análise comparativa da escolha de solventes para solubilização da amostra. **A)** Precipitado da amostra previamente preparada em AcOEt (puro), solubilizada em MeOH (puro); **B)** Sobrenadante da amostra previamente solubilizada em AcOEt (puro).

Foi aplicado um terceiro sistema de solventes, a fim de obter a melhor separação dos *spots* observados. O sistema utilizado foi Hexano:AcOEt (4,5:5,5), o que promoveu melhor separação entre os compostos, conforme mostrado na Figura 10.

Figura 10 – Análise cromatográfica utilizando o sistema de solventes Hexano:AcOEt (4,5:5,5). Os *spots* aparecem circulados na cor vermelha. A análise foi realizada em duplicata.

Buscando otimizar a separação dos compostos observados pela formação de *spots*, um quarto sistema de solventes foi testado, sendo este Hexano:AcOEt (5:5), conforme apresentado na Figura 11. Entretanto, este sistema não se mostrou eficiente na separação quanto o sistema Hexano:AcOEt (4,5:5,5), portanto, foi mantido este último.

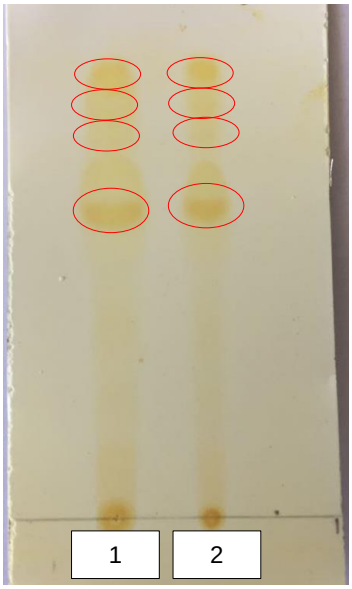


Figura 11 – Análise cromatográfica utilizando o sistema de solventes Hexano:AcOEt (4,5:5,5). Os *spots* aparecem circulados na cor vermelha. A análise foi realizada em duplicata (1 e 2).

5.3. Análise da Cromatografia em Camada Delgada preparativa

Para obtenção da placa preparativa, a amostra obtida anteriormente pela reunião de frações de *A. unguis* foi aplicada em uma placa TLC Silicagel 60G F254 (Merck KGaA, Código 105554) utilizando um capilar. Para a CCD, foi utilizado o sistema de solventes Hexano:Acetato de Etila (AcOEt) (4,5:5,5), sendo este o sistema adequado para separação dos compostos, como observado nos experimentos anteriores. Após o tempo de corrida, a placa foi observada em luz ultravioleta para visualização das bandas (Figura 12). Foram obtidas 4 regiões diferentes, posteriormente as placas foram recortadas e armazenadas em AcOEt (puro) para eluição dos compostos.

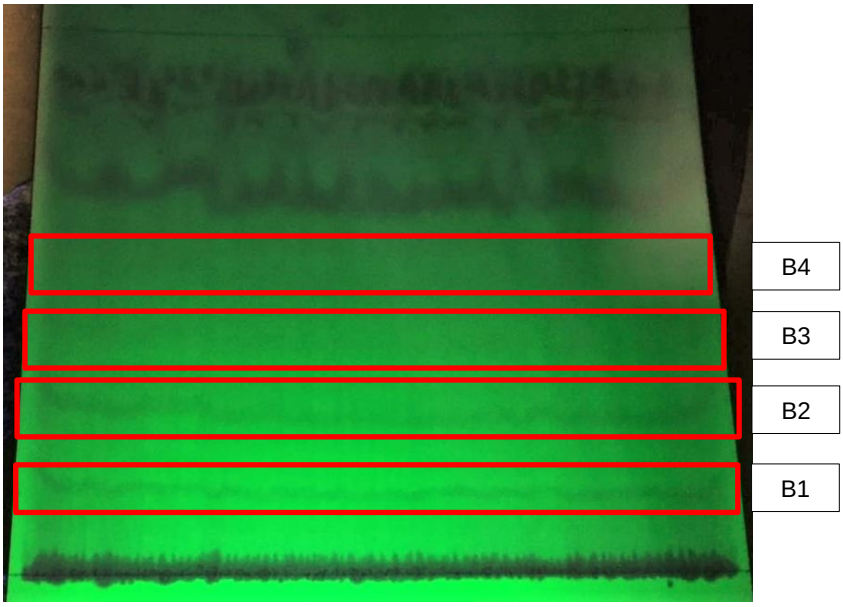


Figura 12 – Placa preparativa em CCD da amostra de *A. unguis*. O sistema de solventes utilizado foi Hexano:AcOEt (4,5:5,5). As demarcações em vermelho representam as faixas de produtos de separação encontrados. **B**, banda.

Para eluição da placa de sílica em que foi feita a separação, as bandas foram reidentificadas como PB (Preparativa de Banda), sendo estas PB1, PB2, PB3 e PB4, picotadas em diferentes *erlenmeyers* contendo Acetado de Etila (AcOEt) puro. Os frascos foram armazenados por 5 dias, sendo o conteúdo filtrado em papel filtro e algodão após esse tempo. A solução obtida foi rotaevaporada sob pressão reduzida e temperatura inferior a 30ºC (IKA® RV 10 Digital V) e o material obtido foi submetido à análise por CCD-analítica em TLC Silicagel 60G F254 (Merck KGaA, Código 105554) em sistema de solventes AcOEt:Hexano (5,5:4,5). Os resultados obtidos são apresentados na Figura 13. As amostras PB1, PB3 e PB4 apresentaram mais de 4 bandas após a eluição, enquanto a amostra PB2 apresentou arraste, sendo necessária nova análise, conforme apresentado na Figura 14.

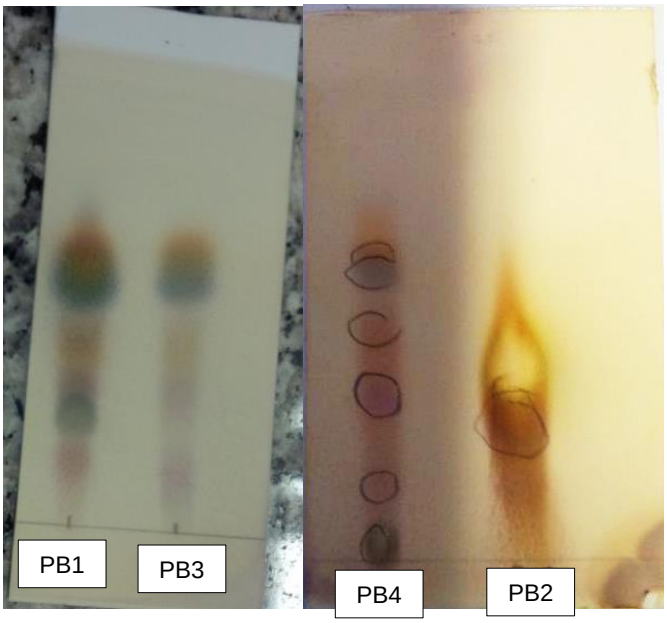


Figura 13 – Análise do perfil das bandas após separação e eluição em AcOEt (puro). O sistema de solventes para análise de CCD-analítico foi AcOEt:Hexano (5,5:4,5). **PB**: Preparativa da banda.

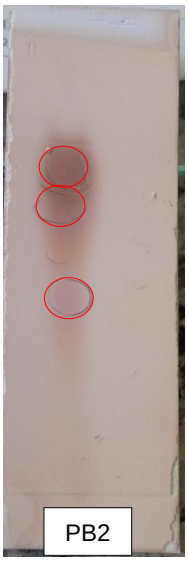


Figura 14 – Análise do perfil das bandas após utilização de um segundo sistema de solventes para análise de CCD-analítico, sendo este AcOEt:Hexano (6:4). **PB**: Preparativa da banda.

Para escolha do melhor sistema adsorvente, foi feita análise de CCD-preparativa de sílica aderida ao vidro. O sistema de solventes escolhido foi AcOEt:Hexano (5,5:4,5). Após o tempo de corrida, a placa foi revelada em luz UV e parte da placa foi submetida à exposição ao iodo, não sendo observada diferença nas bandas apresentadas (Figura 15).

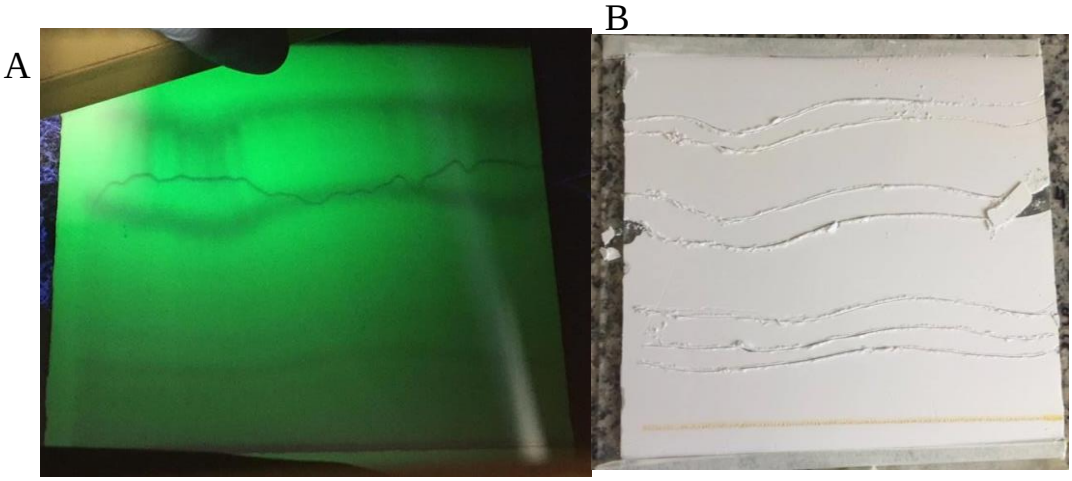


Figura 15 – Análise de separação dos compostos após corrida em sílica aderida ao vidro. O sistema de solventes utilizado foi AcOEt:Hexano (5,5:4,5). **A)** Análise da separação em exposição à luz UV, são observadas quatro bandas distintas. **B)** Preparo da separação física das quatro bandas observadas na luz UV (confirmadas em iodo, não apresentadas).

As bandas apresentadas na Figura 15 foram submetidas à eluição em AcOEt (puro) por 2 dias, seguidas de revelação em Vanilina (Figura 16) e no Iodo (Figura 17).

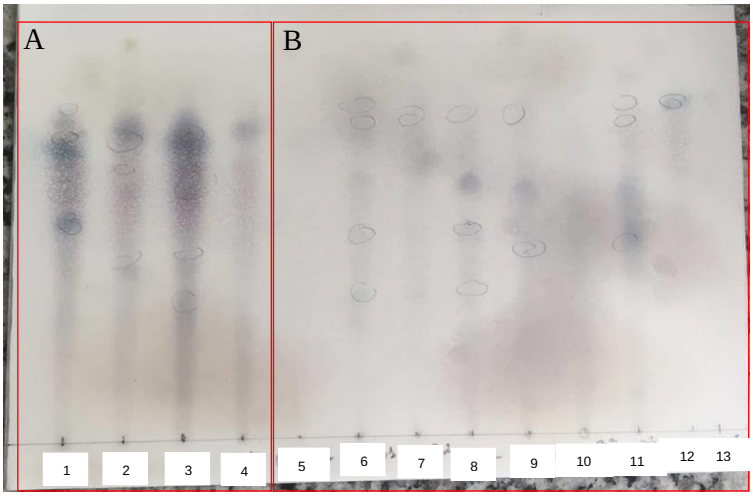


Figura 16 – Comparação de separação dos compostos após corrida em sílica aderida ao vidro e reveladas em Vanilina. São observadas as amostras eluídas a partir da sílica em alumínio (**A**) e as duas placas de sílica aderida ao vidro (**B**) para comparação de rendimento das duas técnicas. Identificação das bandas separadas a partir do vidro, sendo **P**: Placa e **B**: Banda correspondente. **1**, PB1; **2**, PB2; **3**, PB3; **4**, PB4; **5**, P1B1; **6**, P2B1; **7**, P1B2; **8**, P2B2; **9**, P1B3; **10**, P2B3; **11**, P1B4; **12**, P2B4; **13**, P1B5.

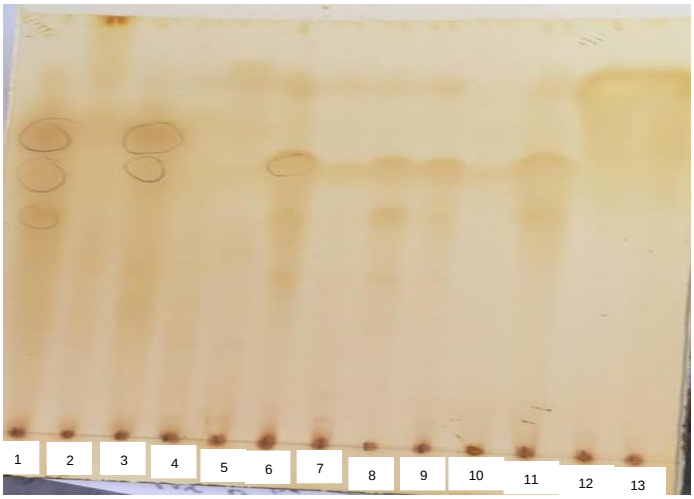


Figura 17 – Comparação de separação dos compostos após corrida em sílica aderida ao vidro. São observadas as amostras eluídas a partir da sílica em alumínio e reveladas em iodo. A placa segue a ordem das amostras apresentada na Figura 16. Identificação das bandas separadas a partir do vidro, sendo **P**: Placa e **B**: Banda correspondente. **1**, PB1; **2**, PB2; **3**, PB3; **4**, PB4; **5**, P1B1; **6**, P2B1; **7**, P1B2; **8**, P2B2; **9**, P1B3; **10**, P2B3; **11**, P1B4; **12**, P2B4; **13**, P1B5.

Todas as amostras apresentaram rendimento inferior a 20mg, inviabilizando ensaios biológicos e posteriores análises químicas dos *spots*.

5.4. Análise de separação por Cromatografia Líquida a Vácuo

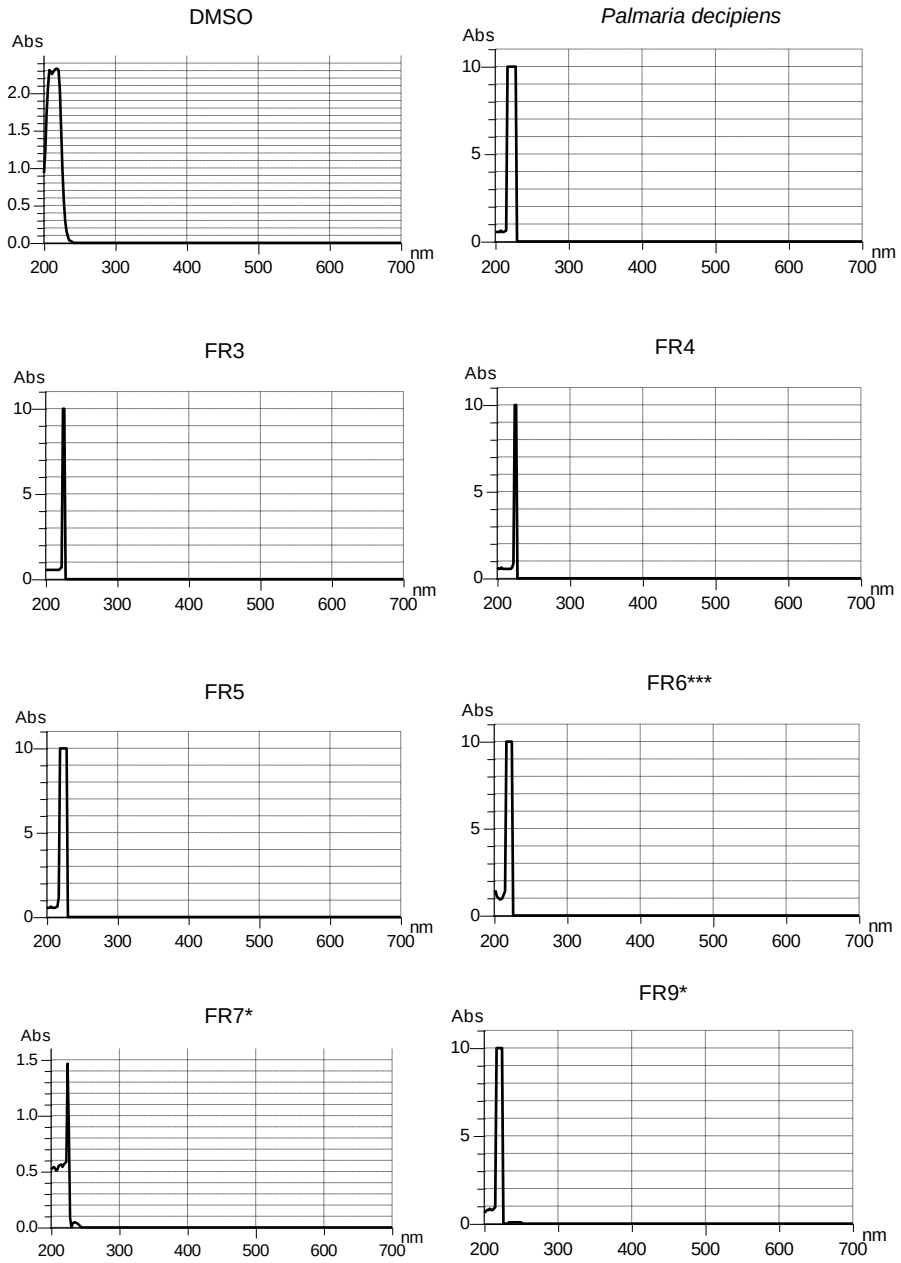
Parte da massa da amostra reunida a partir das frações foi submetida ao processo de separação por Cromatografia Líquida a Vácuo. Foram utilizados 9 (nove) sistemas de solvente para solubilização em uma escala de polaridade. Os rendimentos são observados na Tabela 2. Em seguida, as amostras foram utilizadas para os ensaios celulares e livres de células.

Tabela 2 – Rendimento das amostras após extração por Cromatografia Líquida a Vácuo. As amostras são referentes às frações FR3, FR4, FR5 e FR6* reunidas, oriundas do fungo endofítico *Aspergillus unguis*.

Produto	Massa (mg)
100% Hexano	19,3
10% Acetato de Etila:Hexano	4,6
20% Acetato de Etila:Hexano	9,3
40% Acetato de Etila:Hexano	4,1
60% Acetato de Etila:Hexano	68,9
80% Acetato de Etila:Hexano	20,9
100% Acetato de Etila	19
25% Metanol:Acetato de Etila	22,6
100% Metanol	31,3

5.5. Avaliação do efeito de supressão de fluorescência (efeito *quenching*) dos produtos naturais

Para obtenção dos perfis de absorção em espectrofotômetro, as amostras foram submetidas a análise de varredura, que compreendeu a leitura entre 200 e 700nm (Hitachi-UV 2900), conforme mostrado na Figura 18. As amostras mostraram absorção no comprimento próximo a 200nm, o que é característico do DMSO (utilizado como solvente), no entanto, não houve absorção nos comprimentos de onda dos reagentes Luminol (425nm) e do DPPH (510nm), utilizados na metodologia deste trabalho.



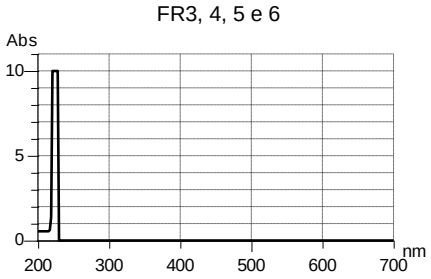


Figura 18 – Espectro de varredura na faixa de 200 a 700nm das amostras. São apresentados o controle (DMSO 0,1%), extrato de *Palmaria decipiens* e diferentes frações do fungo *Aspergillus unguis*, com picos de absorvância próximos de 200nm, característico do dimetilsulfóxido. **Abs**, absorvância; **DMSO**, dimetilsulfóxido; **FR**, fração.

5.6. Avaliação da solubilidade dos produtos

Para análise de solubilidade das amostras (aquelas apresentadas anteriormente na Tabela 1) foi feita a dissolução em DMSO 100%, seguindo as concentrações descritas no item 4.4. Para análise da solubilidade em meio polar (condição experimental) foi realizada uma diluição intermediária com solução balanceada de Hanks pH 7,2. Os resultados quanto à solubilidade ou à formação de precipitado estão na Tabela 3.

Tabela 3 – Avaliação da solubilidade do extrato bruto de *Palmaria decipiens* e das frações obtidas do fungo *Aspergillus unguis* em solução balanceada de Hanks pH 7,2 em temperatura ambiente (24ºC), a partir das concentrações de dissolução em DMSO 100%.

Espécie	**Produto**	**Concentração (µg/mL)**		
		100	**50**	**10**
Palmaria decipiens	Extrato bruto	S	S	S
Aspergillus unguis	FR3	I	I	S
	FR4	I	I	S
	FR5	I	S	S
	FR6*	I	I	S
	FR6***	S	S	S
	FR7*	I	I	S
	FR7***	S	S	S
	FR8	S	S	S
	FR9*	I	S	S
	FR11***	S	S	S
	FR15	S	S	S
	FR20	I	S	S

I: Insolúvel; **S**: Solúvel; **FR**: Fração.

5.7. Atividade antioxidante pelo ensaio de DPPH

Os resultados para atividade antioxidante sobre o radical DPPH estão descritos na Tabela 4. As amostras não apresentam atividade *scavenger* por não demonstrarem atividade antioxidante direta.

Tabela 4 – Atividade *scavenger* dos produtos sobre o radical DPPH. Os valores foram obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata. Para os ensaios foi utilizada a maior concentração das amostras, descritas nos ensaios de QL(lum), exceto para os produtos obtidos por CLV, descritos na tabela. Não houve massa suficiente das amostras FR6*, FR9, FR20 para realizar o experimento. Os valores de inibição apresentados representam a média (%) e o desvio padrão.

Espécie/Produto	Substância/Fração	Inibição (% ± DP)
-	CP	100 ± 0
-	CS	96 ± 0
Palmaria decipiens	Extrato bruto	7,33 ± 2,92
Aspergillus unguis	FR3	6,50 ± 1,71
	FR4	3,83 ± 1,34
	FR5	3,33 ± 1,80
	FR6*	-
	FR6***	5,83 ± 0,37
	FR7*	5,17 ± 0,90
	FR8	-
	FR9*	-
	FR20	-
Amostras obtidas por CLV (100µg/mL)	100% Hexano	3,16 ± 2,54
	10% Acetato de Etila:Hexano	5 ± 2,68
	20% Acetato de Etila:Hexano	7 ± 1,83
	40% Acetato de Etila:Hexano	6 ± 1,91
	60% Acetato de Etila:Hexano	5,83 ± 8,50
	80% Acetato de Etila:Hexano	7 ± 1,52
	100% Acetato de Etila	6 ± 3,05
	25% Metanol: Acetato de Etila	4,5 ± 1,80
	100% Metanol	4,83 ± 1,67
Amostras obtidas por CLV (300µg/mL)	100% Hexano	5 ± 3
	10% Acetato de Etila:Hexano	5,5 ± 1,38
	20% Acetato de Etila:Hexano	5,83 ± 2,19

CN, Controle Negativo (Hanks); **CP,** Controle Positivo (Triton-X 2%); **CS,** Controle de Solvente (DMSO 0,11%); ***,****, Sobrenadante; **CLV**, Cromatografia Líquida a Vácuo; **DP**, desvio padrão.

5.8. Avaliação da citotoxicidade do extrato bruto de *Palmaria decipiens* e das frações de *Aspergillus unguis*

A fim de avaliar a citotoxicidade das frações sobre os neutrófilos humanos, foi adotada a maior concentração de solubilização da amostra. Os resultados expressos são correspondentes à contagem de 200 células pelo ensaio de exclusão de Azul de Tripan, onde células não viáveis apresentam coloração azul. Os valores correspondentes à viabilidade das células encontram-se na Tabela 5.

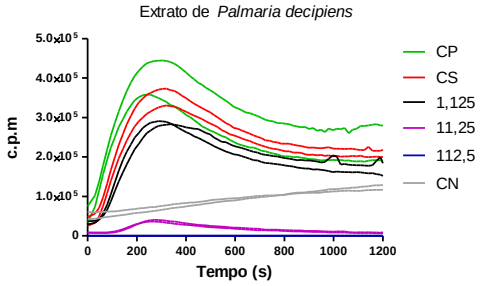
Tabela 5 – Efeito da citotoxicidade do extrato bruto de *Palmaria decipiens* e das frações de *Aspergillus unguis* sobre neutrófilos humanos.

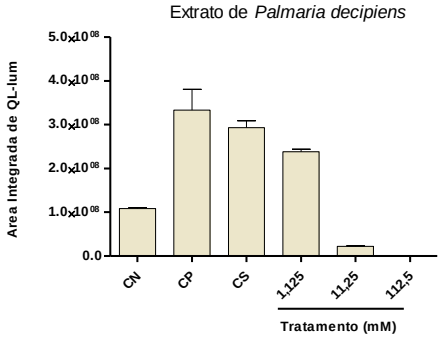
Produto	Substância/Fração	Células Viáveis (% ± DP)
-	CN	99 ± 1,22
-	CP	-
-	CS	98 ± 0,43
Palmaria decipiens	Extrato bruto	2 ± 1,2
Aspergillus unguis	FR3	77 ± 2,5
	FR4	86 ± 0
	FR5	92 ± 0
	FR6*	93 ± 1
	FR6***	74 ± 10
	FR7*	79 ± 9
	FR8	90 ± 0
	FR9*	19 ± 2
	FR20	42 ± 0
Amostras obtidas por CLV	100% Hexano	95 ± 2
	10% Acetato de Etila:Hexano	91 ± 0,5
	20% Acetato de Etila:Hexano	93 ± 4,5
	40% Acetato de Etila:Hexano	94 ± 0
	60% Acetato de Etila:Hexano	-
	80% Acetato de Etila:Hexano	68 ± 4,5
	100% Acetato de Etila	73 ± 5
	25% Metanol: Acetato de Etila	80 ± 2
	100% Metanol	67± 6,5

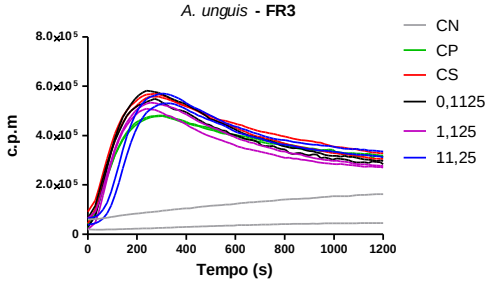
Os valores foram obtidos com base na contagem de 200 células em 2 experimentos realizados em duplicata. **CN,** Controle Negativo (Hanks); **CP,** Controle Positivo (Triton-X 2%); **CS,** Controle de Solvente (DMSO 0,11%); **CLV**, Cromatografia Líquida a Vácuo; **DP**, desvio padrão.

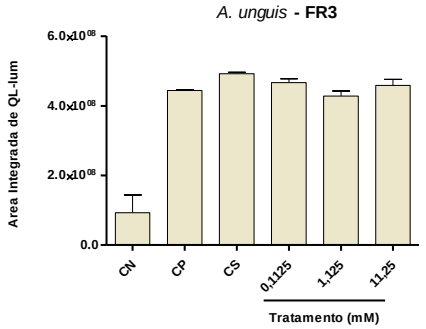
5.9. *Screening* do efeito dos compostos no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados por PMA

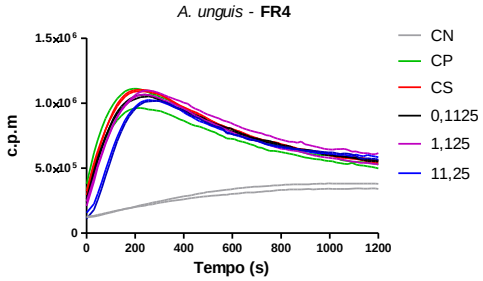
O *screening* da atividade antioxidante do extrato bruto de *Palmaria decipiens* e das frações de *Aspergillus unguis* sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos foi avaliada pelo ensaio de quimiluminescência utilizando como sonda o luminol (QLlum) e PMA 10^{-7}M como estímulo (Figura 19).

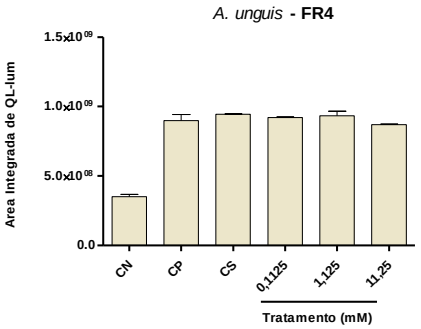

Extrato de *Palmaria decipiens*
c.p.m
Tempo (s)
CP
CS
1,125
11,25
112,5
CN

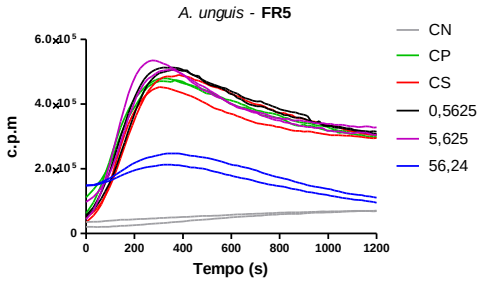

Extrato de *Palmaria decipiens*
Area Integrada de QL-lum
Tratamento (mM)
CN
CP
CS
1,125
11,25
112,5

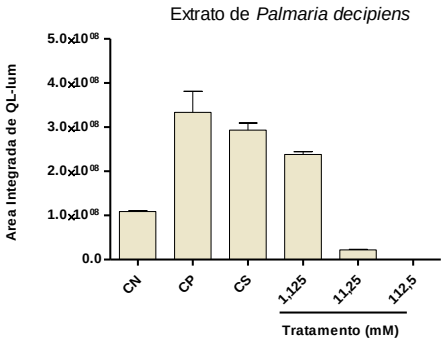

A. unguis - **FR3**
c.p.m
Tempo (s)
CN
CP
CS
0,1125
1,125
11,25

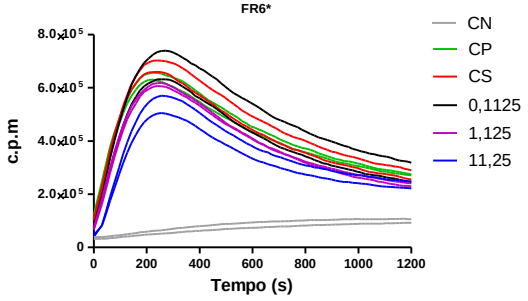

A. unguis - **FR3**
Area Integrada de QL-lum
Tratamento (mM)
CN
CP
CS
0,1125
1,125
11,25

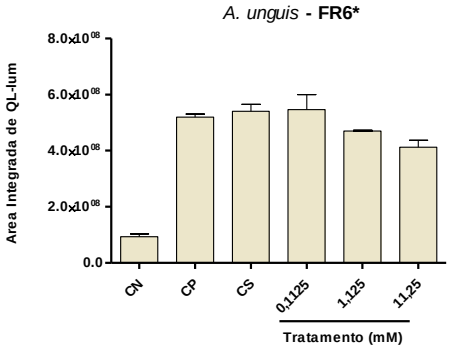

A. unguis - **FR4**
c.p.m
Tempo (s)
CN
CP
CS
0,1125
1,125
11,25

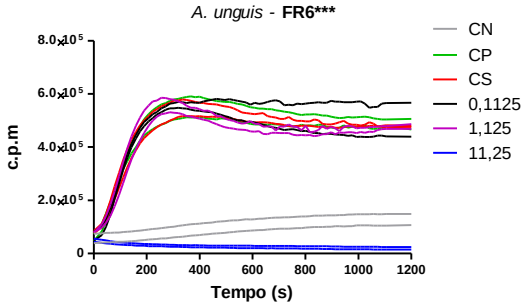

A. unguis - **FR4**
Area Integrada de QL-lum
Tratamento (mM)
CN
CP
CS
0,1125
1,125
11,25

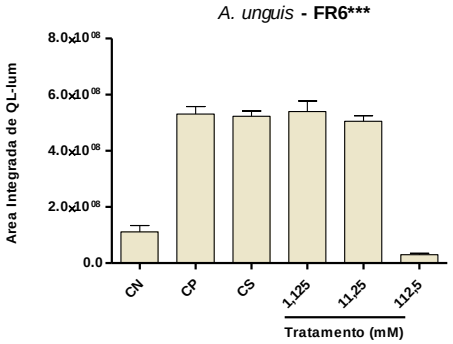

A. unguis - **FR5**
c.p.m
Tempo (s)
CN
CP
CS
0,5625
5,625
56,24

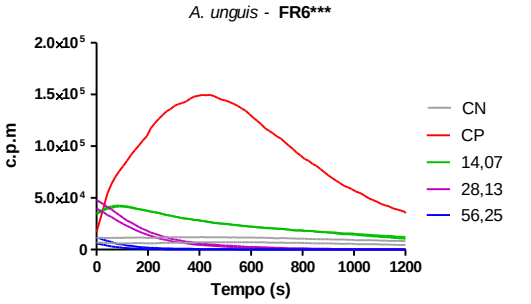

Extrato de *Palmaria decipiens*
Area Integrada de QL-lum
Tratamento (mM)
CN
CP
CS
1,125
11,25
112,5

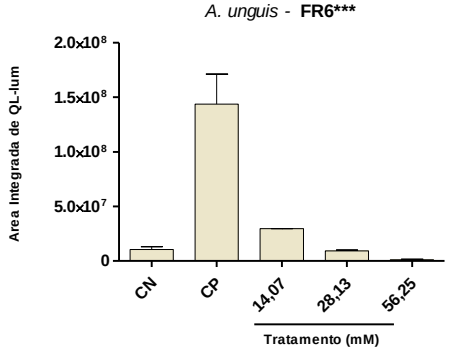

FR6*
c.p.m
Tempo (s)
CN
CP
CS
0,1125
1,125
11,25

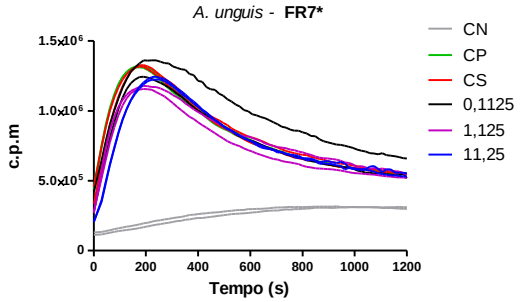

A. unguis - FR6*
Area Integrada de QL-lum
Tratamento (mM)
CN
CP
CS
0,1125
1,125
11,25

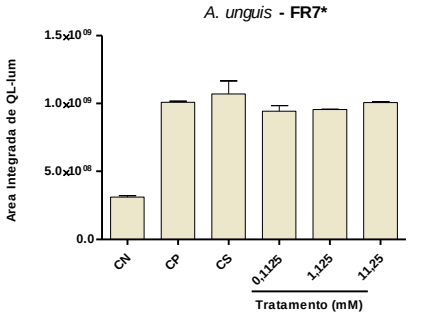

A. unguis - FR6***
c.p.m
Tempo (s)
CN
CP
CS
0,1125
1,125
11,25

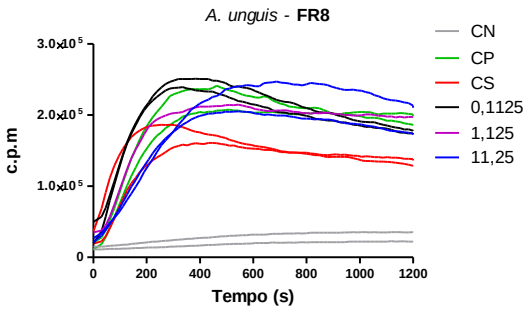

A. unguis - FR6***
Area Integrada de QL-lum
Tratamento (mM)
CN
CP
CS
1,125
11,25
112,5

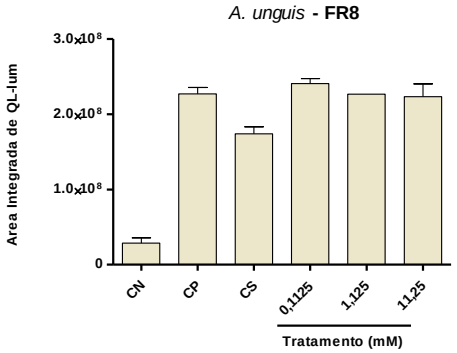

A. unguis - FR6***
c.p.m
Tempo (s)
CN
CP
14,07
28,13
56,25

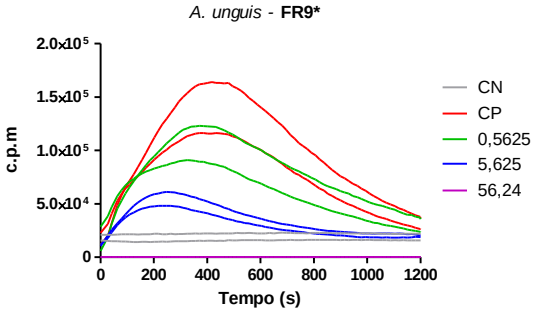

A. unguis - FR6***
Area Integrada de QL-lum
Tratamento (mM)
CN
CP
14,07
28,13
56,25

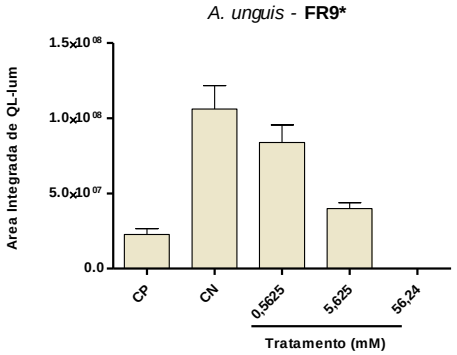

A. unguis - FR7*
c.p.m
Tempo (s)
CN
CP
CS
0,1125
1,125
11,25

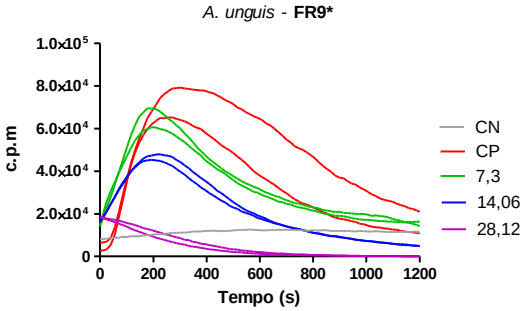

A. unguis - FR7*
Area Integrada de QL-lum
Tratamento (mM)
CN
CP
CS
0,1125
1,125
11,25

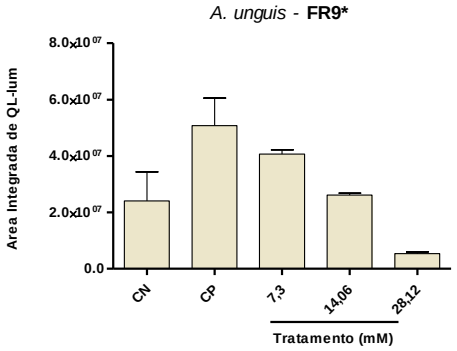

A. unguis - FR8
c.p.m
Tempo (s)
CN
CP
CS
0,1125
1,125
11,25

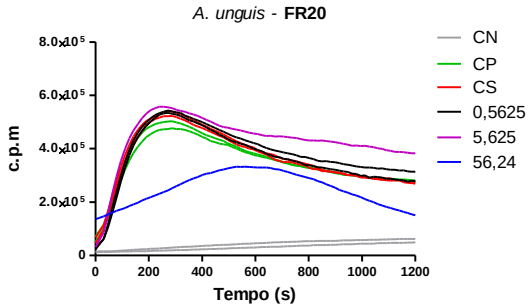

A. unguis - FR8
Area Integrada de QL-lum
Tratamento (mM)
CN
CP
CS
0,1125
1,125
11,25

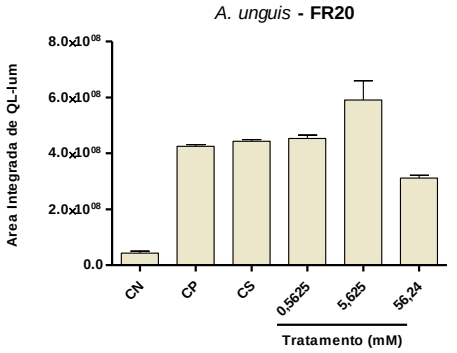

A. unguis - FR9*
c.p.m
Tempo (s)
CN
CP
0,5625
5,625
56,24

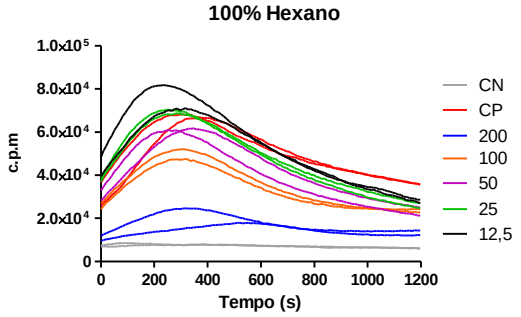

A. unguis - FR9*
Area Integrada de QL-lum
Tratamento (mM)
CP
CN
0,5625
5,625
56,24

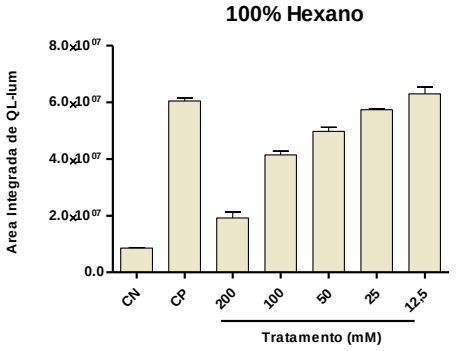

A. unguis - FR9*
c.p.m
Tempo (s)
CN
CP
7,3
14,06
28,12

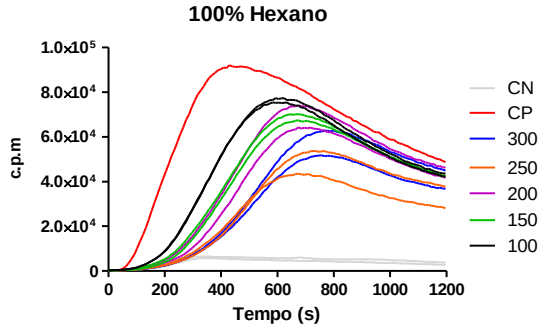

A. unguis - FR9*
Area Integrada de QL-lum
Tratamento (mM)
CN
CP
7,3
14,06
28,12

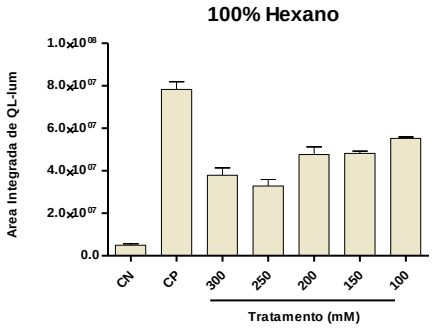

A. unguis - FR20
c.p.m
Tempo (s)
CN
CP
CS
0,5625
5,625
56,24

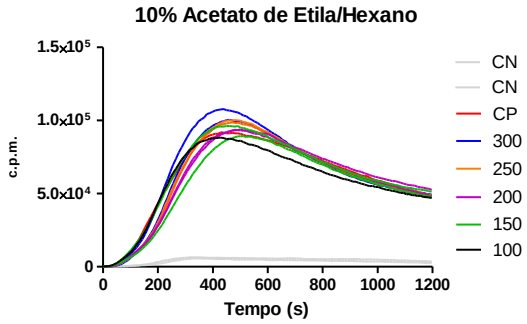

A. unguis - FR20
Area Integrada de QL-lum
Tratamento (mM)
CN
CP
CS
0,5625
5,625
56,24

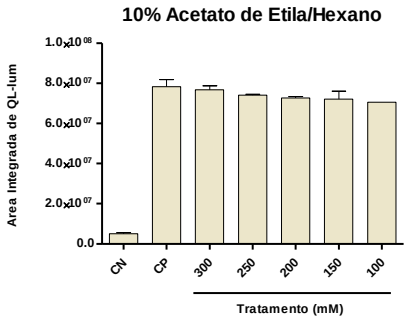

100% Hexano
c.p.m
Tempo (s)
CN
CP
200
100
50
25
12,5

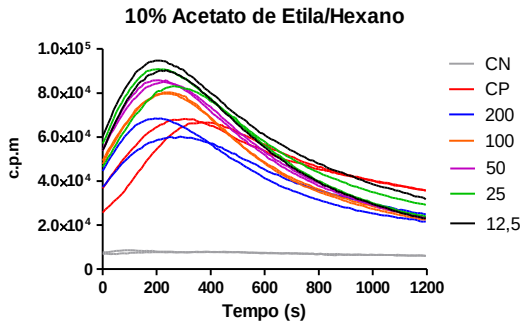

100% Hexano
Area Integrada de QL-lum
Tratamento (mM)
CN
CP
200
100
50
25
12,5

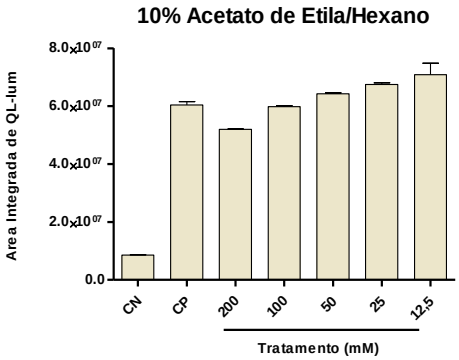

100% Hexano
c.p.m
Tempo (s)
CN
CP
300
250
200
150
100

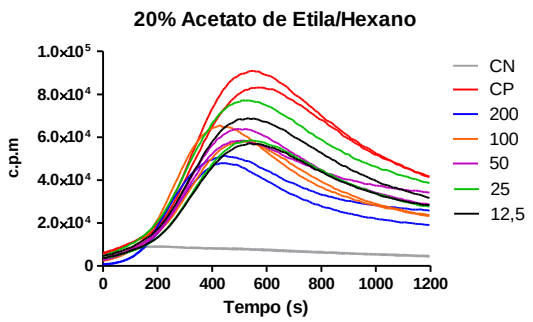

100% Hexano
Area Integrada de QL-lum
Tratamento (mM)
CN
CP
300
250
200
150
100

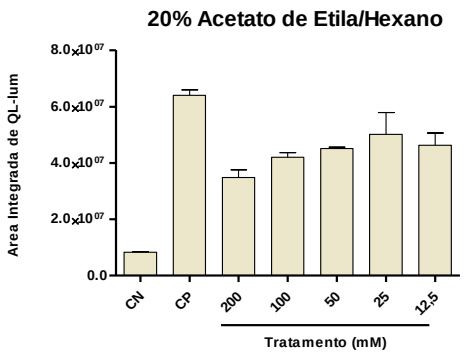

10% Acetato de Etila/Hexano
c.p.m.
Tempo (s)
CN
CN
CP
300
250
200
150
100

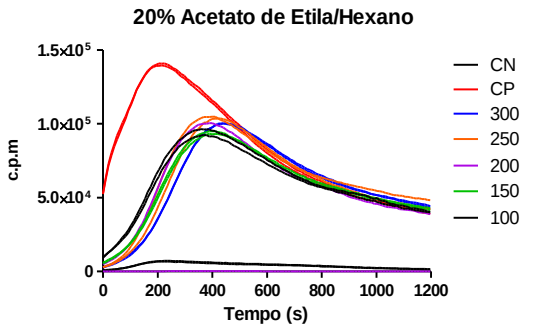

10% Acetato de Etila/Hexano
Area Integrada de QL-lum
Tratamento (mM)
CN
CP
300
250
200
150
100

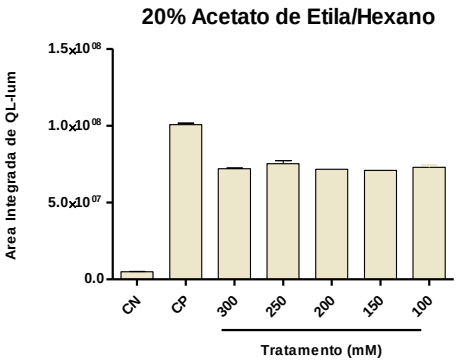

10% Acetato de Etila/Hexano
c.p.m
Tempo (s)
CN
CP
200
100
50
25
12,5

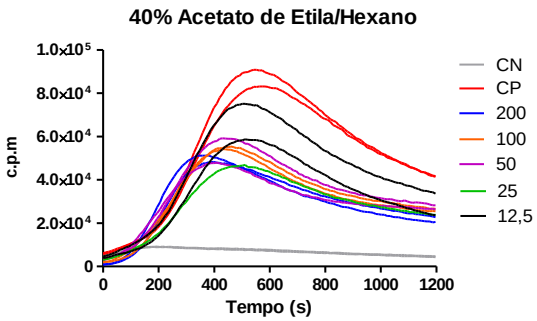

10% Acetato de Etila/Hexano
Area Integrada de QL-lum
Tratamento (mM)
CN
CP
200
100
50
25
12,5

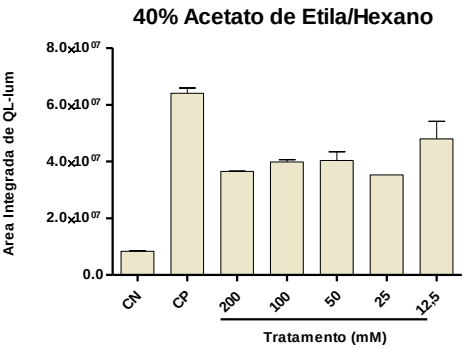

20% Acetato de Etila/Hexano
c.p.m
Tempo (s)
CN
CP
200
100
50
25
12,5

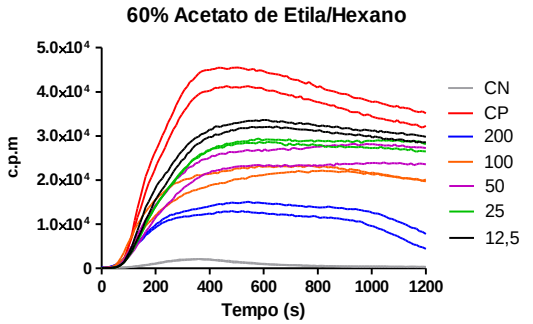

20% Acetato de Etila/Hexano
Area Integrada de QL-lum
Tratamento (mM)
CN
CP
200
100
50
25
12,5

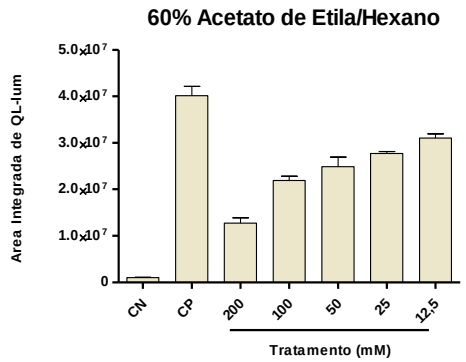

20% Acetato de Etila/Hexano
c.p.m
Tempo (s)
CN
CP
300
250
200
150
100


20% Acetato de Etila/Hexano
Area Integrada de QL-lum
Tratamento (mM)
CN
CP
300
250
200
150
100


40% Acetato de Etila/Hexano
c.p.m
Tempo (s)
CN
CP
200
100
50
25
12,5


40% Acetato de Etila/Hexano
Area Integrada de QL-lum
Tratamento (mM)
CN
CP
200
100
50
25
12,5


60% Acetato de Etila/Hexano
c.p.m
Tempo (s)
CN
CP
200
100
50
25
12,5


60% Acetato de Etila/Hexano
Area Integrada de QL-lum
Tratamento (mM)
CN
CP
200
100
50
25
12,5

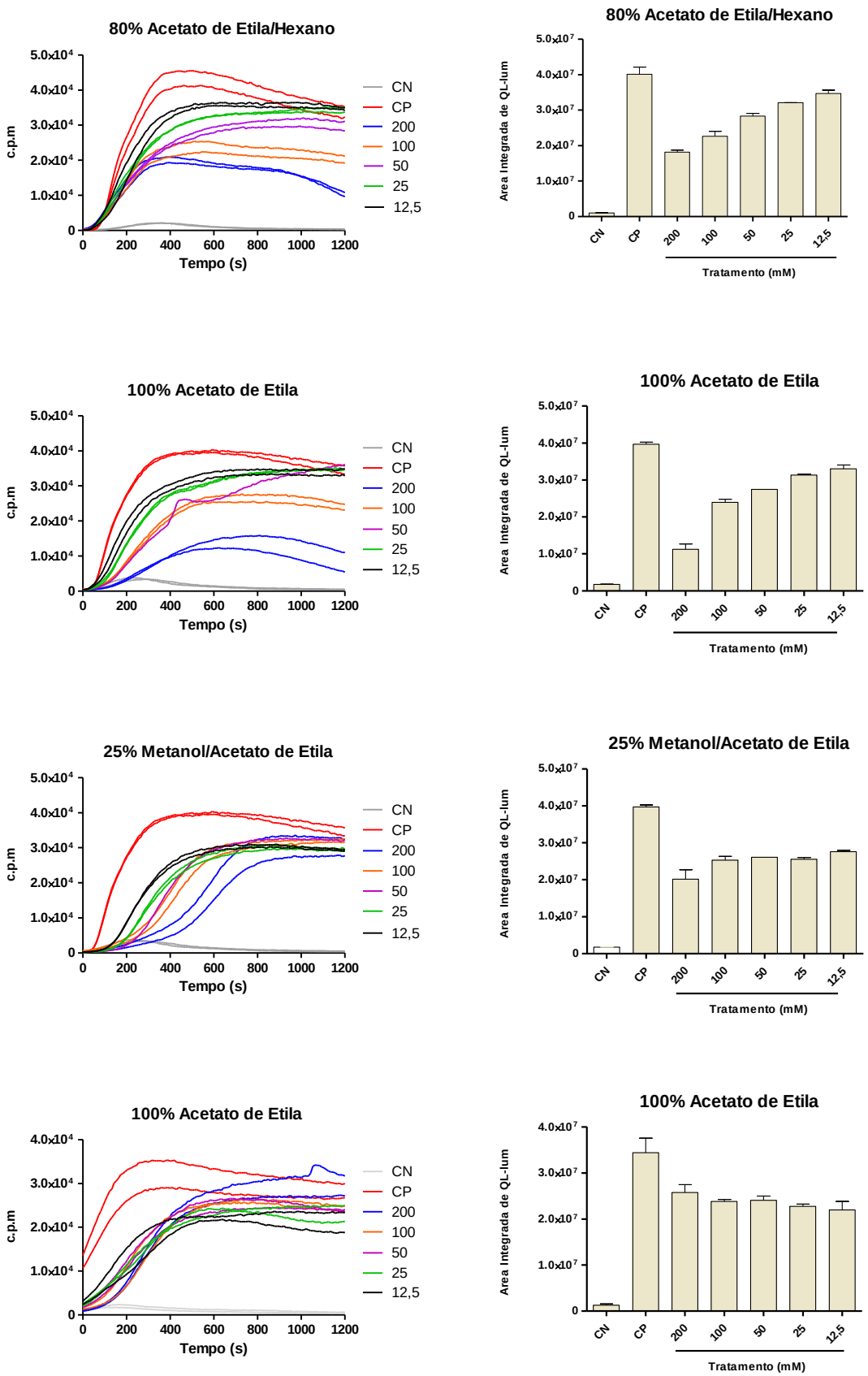


Figura 19 – Perfil de inibição da QLlum de neutrófilos humanos. As amostras representam ensaio realizado com concentração de 1x10^{6}células/mL para as amostras: FR3; FR4; FR5; FR6*; FR6***; FR7*; FR8; FR9*; FR20 e amostras obtidas por CLV que possuem a maior concentração de 300 µg/mL, e concentração de 5x10^{6}células/mL para as amostras obtidas por CLV com a maior concentração de 200

µg/mL. Os neutrófilos foram estimulados com PMA 10^{-7}M, na presença das amostras (3min a 37ºC). Os valores de QL foram obtidos mediante leitura em luminômetro por 20min a 37ºC. Os gráficos apresentados representam o perfil cinético e a área integrada dos ensaios. Os resultados são representativos de dois ensaios independentes realizados em duplicata. **cpm**: Contagem de fótons por minuto; Tempo em segundos; tratamento em mM.

Para cada curva de QLlum foi determinado o valor da área sob a curva de 0 a 20min (1200s). A partir destes valores, foi calculada a porcentagem de inibição de QL para cada concentração utilizada nos experimentos, utilizando o resultado de PMA como 100% de produção de ERO. Os valores de porcentagem de inibição encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 – Porcentagem de inibição da produção de ERO por neutrófilos expostos às diferentes amostras na máxima concentração de experimento

Espécie	**Amostra**	**Concentração final (µg/mL)**	**Porcentagem de inibição (%)**
Palmaria decipiens	Extrato bruto	100	99,9
Aspergillus unguis	FR3	10	31
	FR4	10	43
	FR5	50	51
	FR6*	10	20
	FR6***	100	95
	FR7*	10	5
	FR8	100	2
	FR9*	50	94
	FR20	50	27
Amostras obtidas por CLV	100% Acetato de Etila	200	67
		300	51
	10% Acetato de Etila:Hexano	200	13
		300	1
	20% Acetato de Etila:Hexano	200	42
		300	29
	40% Acetato de Etila:Hexano	200	38
	60% Acetato de Etila:Hexano	200	68
	80% Acetato de Etila:Hexano	200	55
	100% Acetato de Etila	200	73
	25% Metanol:Acetato de Etila	200	50
	100% Metanol	200	35

FR**, Fração; *;*****,** Sobrenadante**; CLV**, Cromatografia Líquida a Vácuo.

6. Discussão

Dentre as funções desempenhadas pelos neutrófilos, destacamos neste trabalho a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), um conjunto de substâncias oxidantes e não oxidantes altamente reativas. Estas substâncias interagem com moléculas nos sistemas biológicos, modificando suas estruturas e funções, o que pode – dependendo das circunstâncias - ter caráter benéfico ou deletério aos organismos (AMULIC *et al*. 2012).

Considerando-se patógenos e partículas indesejáveis ao organismo, as ERO contribuem para a sua eliminação e manutenção da homeostase. Contudo, nos processos inflamatórios crônicos, a produção contínua e excessiva de ERO pode por si ser o agressor indesejável dos tecidos. Motivo este que incentiva pesquisas sobre as possibilidades de regulação da produção de ERO pelos neutrófilos (SMALL *et al*., 2012)

Assim, o neutrófilo como alvo de estudo neste trabalho surge a partir do papel fundamental que esta célula desempenha no cenário de processos inflamatórios crônicos. Em exemplos clássicos como o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) há deposição de imunocomplexos (complexos antígeno-anticorpo) nos tecidos, resultando em fagocitose ineficiente. Neste cenário, a ativação dos neutrófilos resulta na ativação do complexo NADPH-oxidase para geração das ERO e na desgranulação. Consequente à fagocitose ineficiente, os arsenais tóxicos – ERO e conteúdo dos grânulos – são liberados para o meio extracelular, em um processo retroalimentado pela ativação de inúmeros mediadores inflamatórios, constante influxo de neutrófilos e consumo de sistemas antioxidantes. O resultado é o desequilíbrio redox no local e estabelecimento de inflamação crônica com lesão tecidual (revisado por MARZOCCHI-MACHADO e LUCISANO-VALIM (1997). Surge a partir desta abordagem um sólido e importante nicho para estudos farmacognósticos.

Neste sentido, os produtos naturais de origem marinha representam uma fonte em potencial de compostos bioativos. Tendo em vista a importância dos neutrófilos como potenciais produtores de substâncias oxidantes e a necessidade do controle redox em determinadas situações, este trabalho avaliou o potencial antioxidante do extrato bruto da alga *Palmaria decipiens* e de diferentes frações e subfrações do fungo endofítico *Aspergillus unguis*.

Estas espécies - alga *Palmaria decipiens* e fungo endofítico *Aspergillus unguis* - encontram-se em condições extremas de sobrevivência, como baixa

luz, alta pressão, baixos níveis de oxigênio e a necessidade de adaptação bioquímica, o que possibilita a biossíntese de novos compostos (SKROPETA & WEI, 2014) . Estes autores discutem a necessidade de estudos biológicos com metabólitos isolados. No entanto, a escolha das amostras para este trabalho – em se tratando de um estudo inicial - teve a perspectiva de uma maior possibilidade de se encontrar alguma atividade biológica a partir do extrato da *Palmaria decipiens* e das diferentes frações do fungo endofítico *Aspergillus unguis*.

Em um estudo piloto sobre a capacidade de compostos se comportarem como antioxidantes em um sistema *in vitro* é necessário o conhecimento de suas características químicas. A etapa de extração é fundamental na triagem de compostos para estudos biológicos. El-Hady e colaboradores (2015), em estudo realizado com o extrato de *Aspergillus unguis* demonstraram o maior número de picos cromatográficos no sobrenadante quando analisado por CG-MS em relação aos encontrados no extrato micelar. Para o presente estudo não foi possível realizar extração do meio de cultivo por indisponibilidade deste. As frações estudadas aqui foram obtidas a partir do fracionamento do extrato micelar de *Aspergillus unguis*, como descrito no trabalho de dissertação de Moraes (2017).

Para triagem inicial das amostras, o efeito de supressão de fluorescência (efeito *quenching*) dos produtos naturais foi analisado, a fim de conhecer o perfil de absorção na região ultravioleta e visível (200 a 700nm) (SIGALA *et al*., 2015). Os resultados mostraram que não houve sobreposição para nenhuma das amostras analisadas. Este ensaio excluiu a possibilidade de gerar resultados falso-positivos na avaliação da atividade *scavenger* e na medida de ERO por quimiluminescência, considerando-se os espectros de absorção do radical estável DPPH e da sonda quimiluminescente luminol, respectivamente.

Para avaliação da capacidade *scavenger*, foi utilizada a técnica de DPPH, um ensaio clássico que se baseia na redução de um radical livre estável, em que há mudança na coloração e possibilita a quantificação por espectrofotometria (KEDARE; SINGH, 2011). Um estudo realizado por Abdelhamid e colaboradores (2018) evidenciou a capacidade antioxidante e anti-inflamatória de amostras de algas marrons sobre o radical DPPH. Apesar de serem amostras de ambiente aquático natural (obtidas na costa da Tunísia),

a partir deste resultado foi sugerida a capacidade de produtos marinhos apresentarem efeito direto sobre radicais livres.

As amostras estudadas neste trabalho não apresentaram atividade *scavenger* sobre o radical DPPH. Contudo, este resultado não descartou a hipótese de que as amostras poderiam apresentar atividade sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos por vias metabólicas não envolvendo atividades antioxidantes, tais como bloqueio enzimático, interação com receptores ou interação com vias de sinalização. Por exemplo, Alamillo e colaboradores (2017) sugeriram a regulação positiva de genes responsáveis pela transcrição de proteínas presentes no estado ativo do *burst* oxidativo de leucócitos de peixes quando expostos a uma espécie fúngica de origem marinha.

A segunda etapa de triagem neste estudo se baseou no ensaio de quimiluminescência dependente de luminol, sendo esta uma das sondas luminescentes mais utilizadas por sua sensibilidade, disponibilidade e baixo custo (KHAN *et al*., 2014). Este ensaio possibilitou um novo *screening* da possível atividade biológica das amostras estudadas, desta vez considerando a provável interação dos componentes nas amostras com moléculas envolvidas no metabolismo oxidativo do neutrófilo.

Nos ensaios de quimiluminescência utilizou-se como estímulo o PMA, o qual é capaz de ativar o *burst* respiratório a partir da ligação direta com a proteína PKC, levando à ativação da maquinaria celular responsável pela formação do complexo NADPH-oxidase (PAVELKOVA; KUBALA; 2004).

Em paralelo ao ensaio de quimiluminescência, foi realizada a avaliação da citotoxicidade das amostras para os neutrófilos. Para este ensaio foi utilizada a maior concentração das amostras aplicada no ensaio de quimiluminescência.

Os resultados para *Palmaria decipiens* demonstram a invialibidade da utilização do extrato bruto da espécie. O valor encontrado de inibição na área integrada para a produção de ERO pelos neutrófilos foi 99,9% e está diretamente relacionado à citotoxicidade da amostra quando em contato com as células (viabilidade 2%). Contudo, esta amostra não deve ser descartada para estudos futuros, despertando o interesse para o fracionamento da amostra, o que não foi possível neste trabalho por se tratar de uma massa limitada e insuficiente para continuidade.

Para as frações do fungo endofítico *Aspergillus unguis*, baseando-se em estudo realizado por Figueiredo-Rinhel e colaboradores (2017), os quais consideraram viabilidade aceitável acima de 95% para neutrófilos humanos expostos a um extrato vegetal, no presente estudo somente as frações FR8, FR5 e FR6* apresentaram viabilidade acima de 90% e foram consideradas para a continuação das análises. Embora a amostra FR8 tenha apresentado baixa citotoxicidade, ela não apresentou atividade sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, apenas 2% de inibição da produção de ERO foi observada.

Dentre as amostras FR3, FR4, FR5, FR6* e FR6***, somente as amostras FR5 e FR6* apresentaram viabilidade acima de 90% e com inibição da medida de ERO por neutrófilos no ensaio de quimiluminescência (51% e 20%, respectivamente). Apesar da baixa citotoxicidade (viabilidade 90%), optamos por não aumentar as concentrações para o estudo. Sendo a massa disponível o maior fator limitante neste estudo, a decisão foi reunir as frações FR3, FR4, FR5 e FR6* a fim de otimizar a massa, considerando que as amostras apresentavam o mesmo perfil cromatográfico em CCD-analítica.

As amostras reunidas, apresentando o mesmo perfil cromatográfico quando analisados por CCD-analítica foram submetidas a diferentes sistemas de solvente, parte desta amostra reunida seguiu para CCD-preparativa, a fim de separar os compostos que apresentavam probabilidade de maior concentração na amostra. Este estudo foi limitado pela baixa massa resultante, não sendo possível a continuação. A segunda parte da amostra reunida foi submetida à cromatografia líquida a vácuo (CLV), a fim de separar os compostos por polaridade, como descrito por Targett, Killcoyne e Green (1979).

As amostras obtidas por CLV foram chamadas neste trabalho de subfrações, e os resultados mostraram que somente as 4 subfrações mais apolares (100% Hexano, 10% Acetato de Etila:Hexano, 20% Acetato de Etila:Hexano 40% Acetato de Etila:Hexano) apresentaram baixa citotoxicidade para os neutrófilos, com resultados de viabilidade superior a 90%.

A amostra contendo 100% Hexano apresentou 67% de inibição quando incubado com 200µg da subfração, enquanto que com 300µg a inibição foi de 51%. Apesar do resultado expressivo, não foi possível a análise da viabilidade das células utilizando a concentração de 300µg, considerando a

indisponibilidade de massa. Contudo, a triagem para esta subfração será alvo de estudos futuros, após nova coleta e disponibilidade de amostra.

Para a amostra contendo 20% Acetato de Etila:Hexano é observada uma inibição de 42% para a reação com 200µg e 29% para 300µg e baixa citotoxicidade com resultado de viabilidade igual a 93%. Para a amostra contendo 40% Acetato de Etila:Hexano a inibição da liberação de ERO foi 38% e a citotoxicidade baixa com viabilidade igual a 94%. Estes resultados sugerem que estas amostras sejam alvo de novos estudos com concentrações superiores as estudadas. A continuação do estudo no presente trabalho com estas subfrações foi limitada a indisponibilidade de massa.

Para a amostra contendo 60% Acetato de Etila:Hexano há inibição de 68% da liberação de ERO, entretanto não foi possível realizar o ensaio de citotoxicidade, considerando a baixa quantidade de massa da amostra para a realização dos ensaios. Apesar disso, há uma expectativa para a viabilidade celular, considerando os resultados de baixa citotoxicidade das amostras anteriores (mais apolares) descritas acima.

A amostra obtida a partir da extração com 100% Acetato de Etila foi a que apresentou a maior inibição da produção de ERO pelos neutrófilos (73%), porém o ensaio de citotoxicidade não foi satisfatório, evidenciado por um baixo valor de viabilidade dos neutrófilos igual a 73%. Por apresentar pouca massa, essa amostra foi armazenada para posterior análise química e possível elucidação dos compostos constituintes.

As subfrações, apesar de possuírem limitação de massa, limitando a continuidade do estudo, sugerem fortemente o potencial destas amostras em regular a produção/liberação de ERO pelos neutrófilos, sendo necessária a continuidade dos estudos para elucidação de compostos e novas análises biológicas em diferentes condições.

O presente trabalho mostra a versatilidade e importância de neutrófilos enquanto alvo terapêutico, e a investigação de produtos naturais como ferramenta na descoberta de novos fármacos que possuam ação imunomoduladora.

Apesar do envolvimento do neutrófilo na fisiopatologia de inúmeros processos, diante da importância fisiológica deste para a homeostase, é plausível considerar que a inibição total das respostas efetoras desta célula seja de longe indesejável. A regulação parcial das respostas dos neutrófilos é o

objetivo da busca de moléculas bioativas, capazes de restabelecerem o seu equilíbrio funcional, diminuindo os efeitos nocivos sem prejuízo de suas funções para a homeostase. Neste contexto, os resultados deste estudo trazem perspectivas de para encontrar moléculas bioativas para a regulação da produção de ERO pelos neutrófilos a partir da *Palmaria decipiens* e do fungo endofítico *Aspergillus unguis*.

7. Conclusão

- ✓ As amostras – extrato da *Palmaria decipiens* e frações do fungo endofítico *Aspergillus unguis* - estudadas neste trabalho não apresentaram atividade antioxidante, quando analisadas quanto à atividade *scavenger* sobre o radical DPPH.

- ✓ As 4 subfrações mais apolares do fungo *Aspergillus unguis* (100% Hexano, 10% Acetato de Etila:Hexano, 20% Acetato de Etila:Hexano 40% Acetato de Etila:Hexano) obtidas por cromatografia líquida a vácuo (CLV), não apresentaram citotoxicidade para os neutrófilos, os quais mantiveram viabilidade superior a 90%, e inibição da formação/liberação de ERO pelos neutrófilos.

8. Referencial bibliográfico

ABDALLAH, D.S. *et al.* Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. **International Immunology.** v. 23, n. 5, p. 317-326, 2011.

ABDELHAMID, A. *et al*. Phytochemical Analysis and Evaluation of the Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antinociceptive Potential of Phlorotannin-Rich Fractions from Three Mediterranean Brown Seaweeds. **Marine Biotechnology**, v. 20, n. 1, p.60-74, 2018.

ABDOU, R. *et al*. Botryorhodines A–D, antifungal and cytotoxic depsidones from Botryosphaeria rhodina, an endophyte of the medicinal plant Bidens pilosa. **Phytochemistry,** v. 71, n. 1, p. 110-116, 2010.

ALAMILLO, E. *et al*. Marine yeast *Yarrowia lipolytica* improves the immune responses in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) leukocytes. **Fish & Shellfish Immunology,** v. 70, p. 48-56, 2017.

ALVES, C.M.; *et al*. Application of the chemiluminescence systems to evaluate the role of Fcγ and complement receptors in stimulating the oxidative burst in neutrophils. **Talanta**, v. 60, n. 2-3, p. 601-608, 2003.

AMULIC, B. *et al*. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. **Annual Review Of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 459-489, 2012.

BECKER, S.; *et al.* The biology of an Antarctic rhodophyte, *Palmaria decipiens*: recent advances. **Antarctic Science,** v. 23, n. 05, p. 419-430, 2011.

BHADURY, P; MOHAMMAD, B.T.; WRIGHT, P.C. The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. **Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology,** v. 33, n. 5, p. 325-337, 2006.

BISCHOFF, V. **Antártica**. Trabalho de pesquisa apresentado como requisito para a obtenção do diploma de aprovação do curso superior de Defesa Continental- Colégio Interamericano de Defesa. Washington DC, 1996.

BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**. v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity,** v. 33, n. 5, p. 657-670, 2010.

BLUNT J. W. *et al.* Marine natural products. **Natural product reports**, v. 31, n. 2, p. 160-258, 2014.

BUCOLO, P.; AMSLER, C. D. MCCLINTOCK, J. B. Effects of Macroalgal Chemical Extracts on Spore Behavior of the Antarctic Epiphyte *Elachista antarctica* Phaeophyceae. **Journal of Phycology,** v. 48, n. 6, p. 1403-1410, 2012.

BURTON H.S.; ABRAHAM E.P. Isolation of antibiotics from a species of *Cephalosporium*. Cephalosporins P1, P2, P3, P4, and P5. **Biochemistry**, v. 50, n. 6, p. 168-74, 1951.

CHOMCHEON, P. *et al*. Aromatase inhibitory, radical scavenging, and antioxidant activities of depsidones and diaryl ethers from the endophytic fungus Corynespora cassiicola L36. **Phytochemistry**. v. 70, n. 3, p. 407-413, 2009.

CLAYTON, M.N. Evolution of the Antarctic benthic algal flora. **Journal Phycology**. v. 30, n. 6, p. 897-904, 1994.

COSTA, M. F. *et al*. *Eugenia aurata* and *Eugenia punicifolia* HBK inhibit inflammatory response by reducing neutrophil adhesion, degranulation and NET release. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.16, n. 1, p. 403, 2016.

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

DEROCHETTE, S. *et al.* Curcumin and resveratrol act by different ways on NADPH oxidase activity and reactive oxygen species produced by equine neutrophils. **Chemico-biological Interactions,** v. 206, n. 2, p. 186-193, 2013.

EL-HADY, F. K. A. *et al.* Antioxidant, Acetylcholinesterase and α-Glucosidase Potentials of Metabolites from the Marin Fungus *Aspergillus unguis* RSPG_204 Associated with the Sponge (*Agelas* sp.). **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research.** v. 30, p. 272. 2015.

FERNANDES, M. R. V. *et al.* Assessment of Antioxidant Activity of Spray Dried Extracts of *Psidium guajava* Leaves by DPPH and Chemiluminescence Inhibition in Human Neutrophils. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

FERREIRA F. **O sistema do Tratado da Antártica: evolução do regime e seu impacto na política externa brasileira.** Brasília: Fundação Alexandre de Gusmão, 2009.

FIGUEIREDO-RINHEL, A.S.G. *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) selectively modulates the effector functions of human neutrophils. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 12, p. 1829-1845, 2017.

FLANNAGAN, R. S.; *et al.* The cell biology of phagocytosis. **Annual Review of Pathology - Mechanisms of Disease,** v. 7, n. 1, p. 61-98, 2012.

FRANCISCO-CRUZ, A.; *et al*. Granulocyte–macrophage colony-stimulating factor: not just another haematopoietic growth factor. **Medical Oncology**. Tlalpan, v. 31, n. 1, p. 774, 2014.

GAMAL, A. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal,** v. 18, n. 1, p. 1-25, 2010.

GAUTSCHI J. T. *et al.* Expanding the strategies in natural product studies of marine-derived fungi: a chemical investigation of penicillium obtained from deep water sediment. **Journal of Natural Products**, v.67, n. 3, p. 362–367, 2004.

GODINHO, V. M.; *et al.* Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. **The Isme Journal**, v. 7, n. 7, p.1434-1451, 2013.

HANDY, D. E.; LOSCALZO, J. Redox Regulation of Mitochondrial Function. **Antioxidants & Redox Signaling,** v. 16, n. 11, p. 1323-1367, 2012.

HAWKSWORTH, D.I. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. **Mycological Research**, v. 95, n. 6, p. 641-55, 1991.

HMOTEH, J.; MUSTHAFA, K.S.; VORAVUTHIKUNCHAI, S.P. Effects of *Rhodomyrtus tomentosa* extract on virulence factors of *Candida albicans* and human neutrophil function. **Archives of Oral Biology,** v. 87, p. 35-42, 2018.

HOMMERSAND, M.; MOE, R. L., AMSLER, C. D.; FREDERICQ, S.. Notes on the systematics and biogeographical relationships of Antarctic and sub-Antarctic Rhodophyta with descriptions of four new genera and five new species. **Botanica Marina**, v. 52, n. 6, p. 509–534, 2009.

HORDIJK, P. L. Regulation of NADPH Oxidases: The Role of Rac Proteins. **Circulation Research,** v. 98, v. 8, p. 453-462, 2006.

HYDE K. D. *et al*. Role of fungi in marine ecosystems. **Biodiversity and Conservation**, v. 7, p. 1147-1161, 1998.

JOHANSSON, S*. et al.* A Neutrophil Multitarget Functional Bioassay to Detect Anti-inflammatory Natural Products. **Journal of Natural Products,** v. 65, p.1, p. 32-41, 2002.

KABEYA, L. M. **Estudo do efeito modulatório de derivados de 3-fenilcumarinas nas funções de neutrófilos estimulados por imunocomplexos e análise da relação estrutura atividade.** 2006. 192f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2006.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science Technology,** v. 48, n. 4, p. 412-422, 2011.

KELECOM, A. Secondary metabolites from marine microorganisms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências,** v. 74, n. 1, p. 151-170, 2002.

KHAN, P. *et al*. Luminol-Based Chemiluminescent Signals: Clinical and Non-clinical Application and Future Uses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 2, p.333-355, 2014.

KHUMKOMKHET, P. *et. al.* Antimalarial and cytotoxic depsidones from the fungus *Chaetomium brasiliense*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 8, p. 1487–91, 2009.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159-175, 2013.

KINGSTON, D.G. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal of Natural Products,** v. 74, n. 3, p. 496-511, 2011.

KJER, J. *et al.* Methods for isolation of marinederived endophytic fungi and their bioactive secondary products. **Nature Protocols**, v. 5, n. 3, p. 479–90, 2010.

KOHLMEYER, J., VOLKMANN-KOHLMEYER, B. Fungi from coral reefs: a commentary. **Mycological Research**, v. 107, p. 386-387, 2003.

KORINEK, M. *et al.* Anti-allergic potential of *Typhonium blumei*: Inhibition of degranulation via suppression of PI3K/PLCγ2 phosphorylation and calcium influx. **Phytomedicine,** v. 23, n. 14, p. 1706-1715, 2016.

LI, K.; *et al.* Isolation, Characterization, and Antioxidant Activity of Bromophenols of the Marine Red Alga Rhodomela confervoides. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry,** v. 59, n. 18, p. 9916-9921, 2011.

LUCISANO, Y.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release polymorphonuclear leucocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. **Journal of Immunology**, v. 132, n. 4, p. 2015-2020, 1984.

LUCISANO-VALIM, Y.M. *et al*. A simple method to study the activity of natural compounds on the chemiluminescence of neutrophils upon stimulation by immune complexes. **Journal Of Pharmacological And Toxicological Methods**, v. 47, n. 1, p. 53-58, 2002.

MA, Y; YABLUCHANSKIY, A; LINDSEY, M.L. Neutrophil roles in left ventricular remodeling following myocardial infarction. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, v. 6, n. 1, p. 11, 2013.

MCDOWELL, R. E. *et al*. Reactive oxygen species and the Antarctic macroalgal wound response. **Journal of Phycology,** v. 50, n. 1, p.71-80, 2013.

MELO, L L. **Ação imunomoduladora do ácido cafeico, um metabólito secundário da *Baccharis dracunculifolia*, sobre os neutrófilos humanos estimulados por agentes solúveis e particulados.** 2015. 162p. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Clearance de imunocomplexos: papel do complemento e dos polimorfonucleares neutrófilos. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 30, n. 2, p.234-242, 1997.

MARZOCCHI-MACHADO, C. M. *et al*. Fcgamma and complement receptors: expression, role and co-operation in mediating the oxidative burst and degranulation of neutrophils of Brazilian systemic lupus erythematosus patients. **Lupus**, v. 11, n. 4, p. 240-248, 2002.

MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; *et al.* CR1 on erythrocytes of Brazilian systemic lupus erythematosus patients: the influence of disease activity on expression and ability of this receptor to bind immune complexes opsonized with complement from normal human serum. **Journal of Autoimmunity**, v. 25, n. 4, p. 289-297, 2005.

McDONALD, B. Neutrophils in critical illness. **Cell and Tissue Research,** p. 1-9, 2017.

MITTAL, M. *et al.* Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. **Antioxidants & Redox Signaling,** v. 20, n. 7, p. 1126-1167, 2014.

MORAES, V. R. **Prospecção química e avaliação do potencial biológico do fungo endofítico *Aspergillus unguis* obtido da alga Palmaria decipiens proveniente da Antártica.** 2017. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G.M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products,** v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

OLIVEIRA. A. L. L. *et al.* Marine natural products: chemical and biological potential of seaweeds and their endophytic fungi. **Brazilian Journal of Pharmacognosy,** v. 22, n. 4, p. 906-20, 2012.

PAVELKOVA, M., KUBALA, L. Luminol-, isoluminol- and lucigenin-enhanced chemiluminescence of rat blood phagocytes stimulated with different activators. **Luminescence**, v. 19, n. 1, p. 37-42, 2004.

RAGHUKUMAR C. Algal-fungal interactions in the marine ecosystem: symbiosis to parasitism. In: **Recent Advances on Applied Aspects of Indian Marine Algae with Reference to Global Scenario.** Central Salt and Marine Chemicals Research Institute, p. 366- 385, 2006.

ONOFRI, S. *et al.* Evolution and adaptation of fungi at boundaries of life. **Advances in Space Research**, v. 40, n. 11, p. 1657-1664, 2007.

SHIVAJI, S.; PRASAD, G.S. Antarctic Yeasts: Biodiversity and Potential Applications. **Yeast Biotechnology: Diversity and Applications,** p. 3-18, 2009.

SIGALA, P. A. *et al.* Deconvoluting heme biosynthesis to target blood-stage malaria parasites. **eLife**, 4, e09143, 2015.

SKROPETA, D.; WEI, L. Recent advances in deep-sea natural products. **Natural Products Reports**, v. 31, n. 8, p.999-1025, 2014.

SMALL, D. M. *et al.* Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. **Nephrology**, v. 17, n. 4, p. 311-321, 2012.

SILVA E. V. *et al.* **Avaliação da distribuição de macroalgas encontradas nas praias de barra de Catuama – Pernambuco.** Oceanografia e mudanças globais. Simpósio Brasileiro de Oceanografia. 2008.

SURERAM S. *et al.* Depsidones, aromatase inhibitors and radical scavenging agents from the Marine-Derived Fungus Aspergillus unguis CRI282-03. **Planta Medica,** v. 78, n. 6, p. 582-588, 2012.

SURYANARAYANAN T. S. Fungal endosymbionts of seaweeds. **Progress in Molecular and Subcellular Biology,** v. 53, p. 53-60, 2012.

TAKAO, L. K. *et al.* Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna). **Brazilian Journal Of Biology,** v. 75, n. 4, p. 948-952, 2015.

TARGETT, N. M.; KILCOYNE, J. P.; GREEN, B.. Vacuum liquid chromatography: an alternative to common chromatographic methods. **The Journal Of Organic Chemistry,** v. 44, n. 26, p.4962-4964, 1979.

TAVARES, R. S. N. **Potencial fotoprotetor de extratos e substâncias isoladas de fungos endofíticos da alga marinha vermelha *Bostrychia radicans* e de algas originárias da Antártica**. 2016. 111 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2016.

TOLLER-KAWAHISA, J. E. *et al.* The variant of CD11b, rs1143679 within ITGAM, is associated with systemic lupus erythematosus and clinical manifestations in Brazilian patients. **Human Immunology**, v. 75, n. 2, p. 119-123, 2014.

TOLLER-KAWAHISA, J. E. *et al.* Systemic lupus erythematosus onset in lupus-prone B6.MRL/lpr mice is influenced by weight gain and is preceded by

an increase in neutrophil oxidative burst activity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 86, p. 362-373, 2015.

UZAIR, B. *et al.* Exploring marine cyanobacteria for lead compounds of pharmaceutical importance. **Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

URBACZEK, A. C. *et al.* M. Influence of FcγRIIIb polymorphism on its ability to cooperate with FcγRIIa and CR3 in mediating the oxidative burst of human neutrophils. **Human Immunology**, v. 75, n. 8, p. 785-790, 2014.

VIGATO-FERREIRA, I. C. FcγRIIa and FcγRIIIb polymorphisms and associations with clinical manifestations in systemic lupus erythematosus patients. **Autoimmunity**, v. 47, n. 7, p. 451-458, 2014.

WARD, A.E.; ROSENTHAL, B.M. Evolutionary responses of innate immunity to adaptive immunity. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 492-496, 2014.

WIENCKE C.; CLAYTON, M. **Antarctic seaweeds.** A.R.G Gantner Verlag: University of California, 2002.

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 5, p.278-286, 2008.

ZEINALI, M. *et al*. An overview on immunoregulatory and anti-inflammatory properties of chrysin and flavonoids substances. **Biomedicine & Pharmacotherapy,** v. 92, p. 998-1009, 2017.

ZUCCARO A.; MITCHELL J.I. Fungal communities of seaweeds. The fungal community. **CRC Press**, p. 533-579, 2005.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 045/2017
kms

Ribeirão Preto, 10 de outubro de 2017.

Ao pós-graduando
Gabriel Antonio Nogueira
Orientadora: Profª. Drª. Cleni Mara Marzocchi Machado
FCFRP/USP

Prezado Pesquisador,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado "**ESTUDO DO METABOLISMO OXIDATIVO E DA DESGRANULAÇÃO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS EXPOSTOS A PRODUTOS NATURAIS MARINHOS PROVENIENTES DA ANTÁRTICA**", apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 446 – CAAE nº 70079517.8.0000.5403,** foi aprovado *ad referendum* do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em 02/10/2017, conforme Parecer Consubstanciado do CEP nº , sendo referendado na 171ª reunião ordinária, realizada em 10/10/2017.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local".

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Profª. Drª. Elisa Maria de Sousa Russo
Vice-Coordenadora do CEP/FCFRP

Comitê de Ética em Pesquisa FCFRP/USP
Avenida do Café s/n - Monte Alegre – CEP 14040-903 – Ribeirão Preto – SP
Fone: (16) 3315-4213 – Fax: (16) 3315-4892 - cep@fcfrp.usp.br

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

SCIENTIA VINCES