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.

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 22
3. Objetivos ..... Erro! Indicador não definido.
3.1. Objetivo Geral ..... **Erro! Indicador não definido.**
3.2. Objetivos Específicos ..... **Erro! Indicador não definido.**
4. Casuística e Metodologia ..... Erro! Indicador não definido.
4.1. Casuística ..... **Erro! Indicador não definido.**
4.2. Delineamento Experimental ..... **Erro! Indicador não definido.**
4.3. Preparo das amostras de alga e fungo ..... **Erro! Indicador não definido.**
4.3.1. Extrato da alga *Palmaria decipiens* e frações do fungo *Aspergillus unguis* ..... **Erro! Indicador não definido.**
4.4. Avaliação da solubilidade das amostras .. **Erro! Indicador não definido.**
4.5. Avaliação do efeito de supressão de fluorescência (efeito *quenching*) dos produtos naturais ..... **Erro! Indicador não definido.**
4.6. Ensaio biológico com neutrófilos humanos Erro! Indicador não definido.
4.6.1. Amostras de sangue para obtenção de neutrófilos ..... Erro! Indicador não definido.
4.6.2. Obtenção dos neutrófilos ..... Erro! Indicador não definido.
4.6.3. Ensaio de citotoxicidade ..... Erro! Indicador não definido.
4.6.4. Estímulo para os neutrófilos ..... Erro! Indicador não definido.

4.6.4.1. Padronização com estímulo independente de receptor..... Erro! Indicador não definido.
4.6.5.Metabolismo oxidativo dos neutrófilos .. Erro! Indicador não definido.
4.6.5.1. Padronização dos ensaios de quimiluminescência .... Erro! Indicador não definido.
4.6.5.2. Ensaio de quimiluminescência dependente de luminol (QLlum) Erro! Indicador não definido.
4.8. Triagem química e separação das amostrasErro! Indicador não definido.
4.8.1.Cromatografia em Camada Delgada (CCD) analítica e preparativa Erro! Indicador não definido.
4.8.2.Análise de separação de compostos por Cromatografia Líquida a Vácuo ..... **Erro! Indicador não definido.**
5. Resultados ..... Erro! Indicador não definido.
5.1. Extrato da alga *Palmaria decipiens* e frações do fungo endofítico *Aspergillus unguis* ..... **Erro! Indicador não definido.**
5.2. Análise da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) analítica .....**Erro! Indicador não definido.**
5.3. Análise da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) preparativa Erro! Indicador não definido.
5.4. Análise de separação por Cromatografia Líquida a Vácuo.....**Erro! Indicador não definido.**
5.5. Avaliação do efeito de supressão de fluorescência (efeito *quenching*) dos produtos naturais ..... **Erro! Indicador não definido.**
5.6. Avaliação da solubilidade dos produtos .. **Erro! Indicador não definido.**
5.8. Avaliação da citotoxicidade do extrato bruto de *Palmaria decipiens* e das frações de *Aspergillus unguis* ..... **Erro! Indicador não definido.**
5.9. *Screening* do efeito dos compostos no metabolismo oxidativo de neutrófilos humanos estimulados por PMA ... **Erro! Indicador não definido.**
6. Discussão..... Erro! Indicador não definido.
7. Conclusão 23
8. Referencial bibliográfico 24
ANEXO 1..... Erro! Indicador não definido.

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).

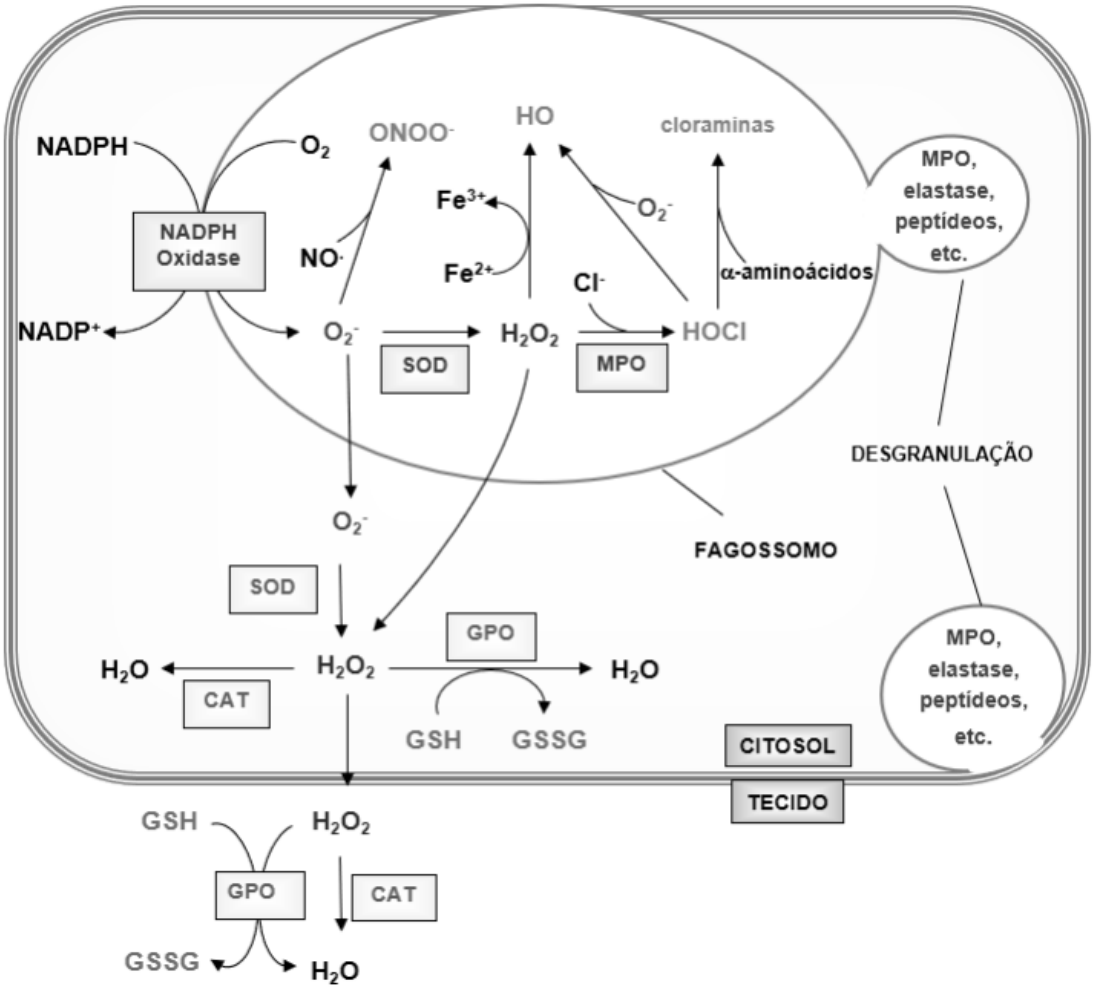

Figura 1 – Representação esquemática do metabolismo oxidativo de neutrófilos. Após formação do complexo enzimático NADPH-oxidase, há conversão do O_2 em ânion superóxido (O^-), que pode ser submetido a duas transformações: reagindo com o óxido nítrico (NO^-) é capaz de formar peroxinitrito, ou sofrer 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.

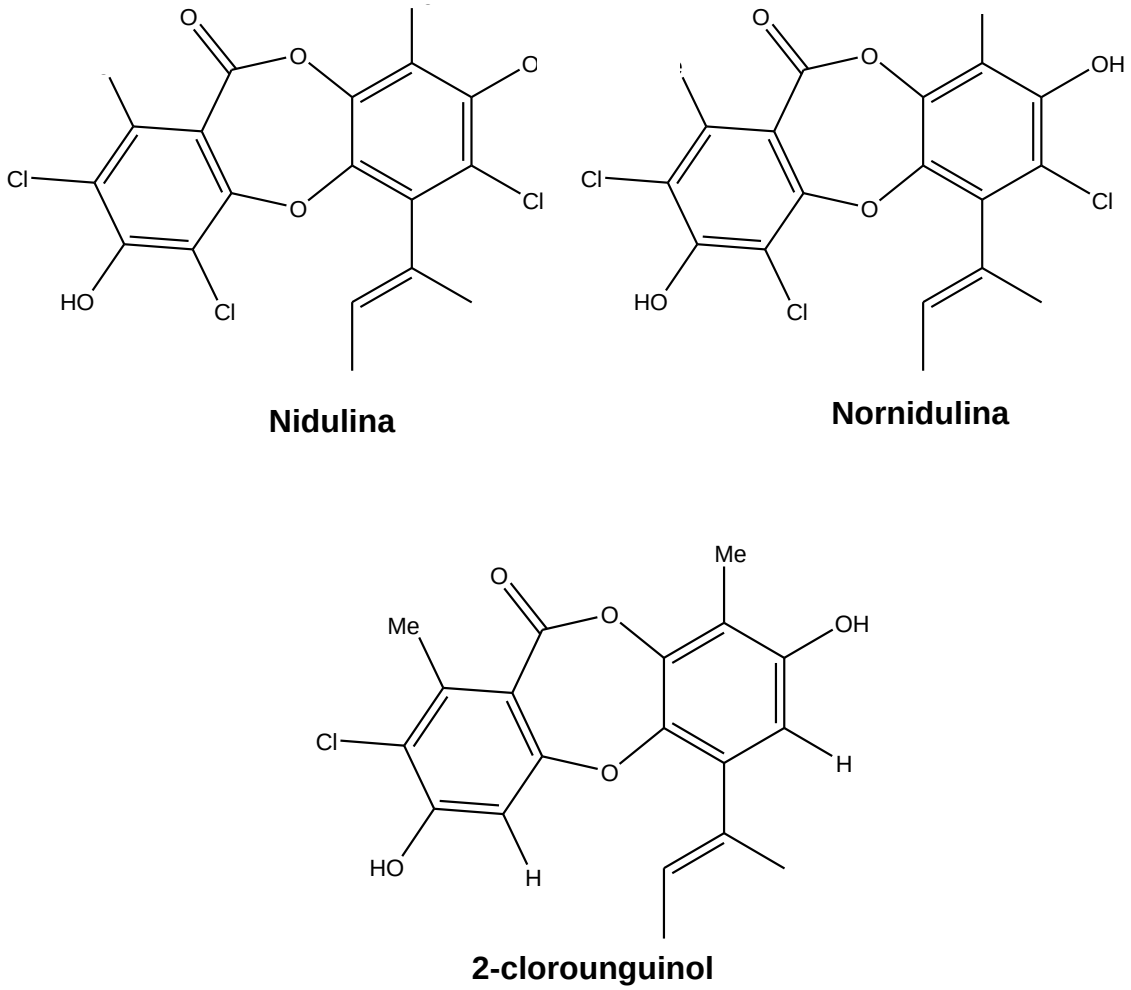

Figura 2 – Estruturas de depsidonas descritas no fungo *Aspergillus unguis* (adaptado a partir de MORAES, 2017).

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. 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.

3. 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.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

SCIENTIA VINCES