UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises
Toxicológicas

**Prospecção de bioativos farmacológicos em algas
marinhas Rhodophyta e Heterokontophyta e avaliação de
citotoxicidade**

Daniel Xavier Andregueti

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto

São Paulo

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises
Toxicológicas

Prospecção de bioativos farmacológicos em algas marinhas
Rhodophyta e Heterokontophyta e avaliação de citotoxicidade

Daniel Xavier Andregueti

Versão Corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto

São Paulo
2015

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Andreguetti, Daniel Xavier
A559p Prospeção de bioativos farmacológicos em algas marinhas
Rhodophyta e Heterokontophyta e avaliação de citotoxicidade /
Daniel Xavier Andreguetti. -- São Paulo, 2015.
155p

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Colepicolo Neto, Pio

1. Farmacologia : Pesquisa 2. Produtos naturais 3. Algas
marinhas I. T. II. Colepicolo Neto, Pio, orientador.

615.1072 CDD

Daniel Xavier Andregueti

**Prospecção de bioativos farmacológicos em algas
marinhas Rhodophyta e Heterokontophyta e avaliação de
citotoxicidade**

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do título de DOUTOR

Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto
orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2015

"What is now proved was once only imagined. "

William Blake

*...Ao meu pai Pedro Andrequetti,
o grande incentivador da minha formação.*

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Pio Colepicolo pelas oportunidades oferecidas e inserção no meio científico, foram bons anos constituídos de amizade, confiança, orientação e conhecimentos que possibilitaram meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus pais Pedro (*in memoriam*) e Tânia, e meus irmãos Diego e Pablo que compreenderam minhas escolhas e ausência, sempre me incentivando a alcançar meus objetivos.

À minha noiva Thaísa Sandini por ser minha grande companheira em todos os momentos pessoais e profissionais, pela ajuda científica, por me incentivar sempre, por acreditar em mim!

Aos colegas de laboratório Erika, Leonardo, Levi por toda troca de conhecimento e grande ajuda no desenvolvimento desta tese.

Aos demais colegas de laboratório Aline, Angela, Cícero, Cíntia, Dina, Ed, Eliezer, Helena, Luiz, Luiza, Tati pela convivência, amizade e ajuda.

Aos amigos da república Solar Alex, Alysson, André, Carlos Eduardo, Daniel, Diego, Douglas, Fabriciano, Hildebrando, João, Rodrigo, Tiago e tantos outros.

À pesquisadora Eliana Nakano e aos técnicos Patrícia Aoki e Henrique Roffato do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantã, pela colaboração imprescindível para o desenvolvimento desta tese.

Ao pesquisador Osmar Francisco Gomes do CEPEMA pela colaboração.

À professora Marcia Graminha da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara e seus alunos Fabio Torres, Thais Passalacqua e Letícia de Almeida pela colaboração

À FAPESP pelo apoio financeiro, imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao programa de Toxicologia e Análises Toxicológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e à Universidade de São Paulo.

À todas as pessoas não citadas aqui, mas de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho

RESUMO

ANDREGUETTI, D.X. **Prospecção de bioativos farmacológicos em algas marinhas Rhodophyta e Heterokontophyta e avaliação de citotoxicidade.** 2015. 155f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Muitas drogas terapêuticas produzidas pela indústria farmacêutica são estruturas químicas isoladas de organismos encontrados na natureza ou moléculas baseadas nelas. Podem ser incluídas nesse grupo drogas isoladas de organismos marinhos, como corais, esponjas e algas marinhas, conhecidos como produtores de grandes quantidades de metabólitos secundários. Com base neste fato o presente estudo teve como objetivo realizar a prospecção de moléculas bioativas com propósito farmacológico, em extratos de algas marinhas vermelhas (Rhodophyta) e pardas (Heterokontophyta) coletadas no litoral brasileiro. A prospecção foi realizada por meio de avaliação de seus potenciais antioxidante, antibacteriano, antifúngico, anticancerígeno, e antiparasitário contra organismos causadores de leishmaniose e esquistossomose. Para as avaliações foram empregadas os extratos supercríticos de 5 espécies diferentes, sendo 2 pardas: *Dictyota dichotoma* e *D. menstrualis* e três vermelhas: *Chondria littoralis*, *Spyridia hypnoides* e *Plocamium brasiliense*. Os extratos foram avaliados quanto aos seus potenciais bioativos e os resultados mais promissores foram selecionados para as etapas seguintes do fracionamento. Em uma avaliação geral os extratos apresentaram bons resultados e representam uma potencial fonte de bioativos. Os extratos das espécies de *D. dichotoma* e *D. menstrualis* foram então submetidos a um procedimento de fracionamento bioguiado pela atividade esquistossomocida. Incorporou-se ainda um terceiro extrato de *D. mertensii* aos estudos e todas as etapas do fracionamento foram monitoradas por LC-MS. Comparando-se as massas detectadas em todas as frações que apresentaram atividade, para os 3 extratos, foi verificado que a substância de m/z 271,24 estava presente em todas elas, portanto os procedimentos de isolamento foram direcionados a esta molécula para a qual foi possível isolar 7 mg. Diferentemente do que era esperado a molécula quando avaliada isoladamente não apresentou atividade esquistossomocida, levando a hipótese de que a atividade seja decorrente de uma molécula diferente para cada espécie ou ainda que a mesma seja decorrente de uma interação com outras substâncias por um mecanismo de ação aditivo ou sinérgico. O trabalho avaliado de forma geral apresentou resultados promissores e representa um grande embasamento para servir como base para posteriores trabalho de fracionamento.

Palavras-chave: Bioativos, *Dictyota*, Extrato supercrítico, Heterokontophyta, Rodophyta.

ABSTRACT

ANDREGUETTI, D.X. **Prospection of pharmaceutical bioactive compounds in marine algae Rhodophyta and Heterokontophyta and cytotoxicity evaluation.** 2015. 155f. Thesis (PhD). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Several therapeutic drugs manufactured by the pharmaceutical industry are chemical structures isolated from organisms that are found in nature or molecules based on that. May be included at this group drugs isolated from marine organisms, like corals, sponges and seaweeds, known as great secondary metabolites producers. Based on this facts the objective of the present study is to perform a prospection study to achieve bioactive molecules with pharmaceutical purposes, on extracts made from red (Rhodophyta) and brown (Heterokontophyta) seaweed collected in the Brazilian shore. The prospection studies was performed by means of evaluation of the antioxidant, antibacterial, antifungal, anticancer and antiparasitic (against *Leishmania* and *Schistosoma*) potential. In the evaluation were tested the supercritical extracts of 5 different species, including 2 brown species: *Dictyota dichotoma* and *D. menstrualis* and 3 red species: *Chondria littoralis*, *Spyridia hypnoides* and *Plocamium brasiliense*. The extracts were evaluated by their potential bioactive compounds and the most promising results were selected for the following fractionation steps. Overall the extracts have shown good results and may be represent a potential source of bioactive molecules. The extracts of both *D. dichotoma* and *D. menstrualis* were submitted to a bioguided fractionation process by their antischistosomal activities. It was still included a third extract from *D. mertensii* to the studies and every step was monitored by LC-MS techniques. Comparing the detected mass for each active fraction, it was observed the presence of a substance with m/z 271,24 in all of the extracts, so the isolating procedures were directed to obtain that specific molecule, which was obtained in a biomass of 7 mg. Differently than expected the molecule when evaluated isolated do not show the antischistosomal activity, leading to the hypothesis that the activity was related to different molecules for each species or even the observed effect is resulted by an interaction mechanism with another substances by an additive or synergist mechanism. The overall evaluation of the whole work show some promising results and it represent a great support for future fractionation works.

Key-words: Bioactives, *Dictyota*, Supercritical extract, Heterokontophyta, Rodophyta.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas dos fármacos extraídos de organismos marinhos, salinosporamida A, trabectidina, halimida e ziconotida.	2
Figura 2: Estrutura química do antitumoral Kahalalido F, produzida pela alga <i>Bryopsis</i> spp.....	3
Figura 3: Moléculas ativas extraídas das espécies <i>D. pfaffii</i> (A), <i>D. dichotoma</i> e <i>D. coriacea</i> (B), <i>D. ligulata</i> (C e E), <i>D. menstrualis</i> (D e F), <i>D. fasciola</i> (G), <i>D. friabilis</i> (H e I) e <i>D. sp.</i> (J).	7
Figura 4: Localização das praias onde foram coletadas as espécies algais utilizadas no projeto. 1 – Praia da Baleia; 2 – Bacutia; 3 – Ubu; 4 – Parati; 5 – Castelhanos.	17
Figura 5: Espécies de algas utilizadas nos estudos de prospecção. Acima as espécies heterokontophytas: <i>Dictyota dichotoma</i> , <i>Dictyota menstrualis</i> e <i>Dictyota mertensii</i> . Abaixo as espécies rodophyta: <i>Plocamium brasiliense</i> , <i>Chondria littoralis</i> e <i>Spyridia hypnoides</i> . (SPRINGER, 1961; DE OLIVEIRA et al., 2007; PEREIRA, L., 2014; GUIRY, 2015a)	19
Figura 6: Esquema demonstrando os componentes do sistema extrator por fluido supercrítico. Adaptado de (WATERS, 2015).....	22
Figura 7: Cromatogramas obtidos na análise do extrato de <i>S. hypnoides</i> , monitorado em 3 comprimentos de onda: 331 nm (verde), 281 nm (azul) e 251 nm (rosa), na análise em HPLC-PDA (cromatograma superior) e no modo total ion chromatogram por LC-MS (cromatograma inferior).....	27
Figura 8: Cromatogramas obtidos na análise do extrato de <i>D. menstrualis</i> , monitorado em 3 comprimentos de onda: 331 nm (verde), 281 nm (azul) e 251 nm (rosa), na análise em HPLC-PDA (cromatograma superior) e no modo total ion chromatogram por LC-MS (cromatograma inferior).....	28
Figura 9: Cromatogramas obtidos na análise do extrato de <i>D. dichotoma</i> , monitorado em 3 comprimentos de onda: 331 nm (verde), 281 nm (azul) e 251 nm (rosa), na análise em HPLC-PDA (cromatograma superior) e no modo total ion chromatogram por LC-MS (cromatograma inferior).....	29
Figura 10: Cromatogramas obtidos na análise do extrato de <i>C.littoralis</i> , monitorado em 3 comprimentos de onda: 331 nm (verde), 281 nm (azul) e 251 nm (rosa), na análise em HPLC-PDA (cromatograma superior) e no modo total ion chromatogram por LC-MS (cromatograma inferior).....	30
Figura 11: Cromatogramas obtidos na análise do extrato de <i>P. brasiliense</i> , monitorado em 3 comprimentos de onda: 331 nm (verde), 281 nm (azul) e 251 nm (rosa), na análise em HPLC-PDA (cromatograma superior) e no modo total ion chromatogram por LC-MS (cromatograma inferior). No detalhe da figura superior ainda é demonstrado uma visão mais afastada do cromatograma em 251 nm.	31
Figura 12: Cromatograma em CCD dos extratos supercríticos. Figura à esquerda: luz branca; Figura central: luz UV 253 nm; Figura à direita: placa revelada com <i>p</i> -hidroxibenzaldeído. CL: <i>C. littoralis</i> ; DD: <i>D. dichotoma</i> ; DM: <i>D. menstrualis</i> ; PB: <i>P. brasiliense</i> ; SH: <i>S. hypnoides</i>	34
Figura 13: Reação de redução da molécula de 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH).	39

Figura 14: Curvas dose-resposta relacionando percentual de redução de DPPH com a concentração dos extratos avaliados e das substâncias ácido gálico e α -tocoferol.....	40
Figura 15: Fotomicrografia (40x) demonstrando a inibição de crescimento do fungo <i>C. parapsilosis</i> em exposição a diferentes concentrações do extrato de <i>P. brasiliense</i> . A 500 $\mu\text{g/mL}$ (+++); B 250 $\mu\text{g/mL}$ (++); C 125 $\mu\text{g/mL}$ (+); D controle com 2% etanol, sem inibição do crescimento.	44
Figura 16: Fotografia das placas de CCD após o crescimento do fungo e demonstração dos halos de inibição de crescimento (manchas brancas).	46
Figura 17: Fotografia ilustrativa da placa cromatográfica na análise quantitativa de atividade antifúngica apresentada pelos extratos de <i>D. dichotoma</i> , <i>D. menstrualis</i> e <i>P. brasiliense</i> em diferentes concentrações.....	47
Figura 18: Curvas dose-resposta da exposição das linhagens MES-SA e MES-SA/Dx5 à doxorrubicina.	53
Figura 19: Curvas de sobrevivência de células MES-SA expostas por 72 horas a diferentes concentrações (0,1 a 500 $\mu\text{g/mL}$) dos extratos supercríticos das algas.	54
Figura 20: Curvas de sobrevivência de células MES-SA/Dx5 expostas por 72 horas a diferentes concentrações (0,1 a 500 $\mu\text{g/mL}$) dos extratos supercríticos das algas.	55
Figura 21: Curvas de sobrevivência de células MES-SA expostas por 24 e 72 horas a diferentes concentrações (0,1 a 500 $\mu\text{g/mL}$) do extrato supercrítico da alga <i>D. dichotoma</i>	56
Figura 22: Curvas de sobrevivência de parasitas expostos por 24 horas a diferentes concentrações (1,5 a 100 $\mu\text{g/mL}$) dos extratos supercríticos das algas.	58
Figura 23: Curvas de viabilidade celular da linhagem de fibroblastos humanos P4 após exposição a diferentes concentrações dos extratos supercríticos algais por um período de 24 horas.....	65
Figura 24: Curvas de viabilidade celular da linhagem de fibroblastos murinos NIH-3T3 após exposição a diferentes concentrações dos extratos supercríticos algais por um período de 24 horas.....	65
Figura 25: Aplicação do extrato supercrítico de <i>D. dichotoma</i> em placa de cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa.	70
Figura 26: Placa cromatográfica resultante do procedimento de cromatografia em camada delgada preparativa do extrato supercrítico de <i>D. dichotoma</i>	72
Figura 27: Frações do extrato supercrítico de <i>D. dichotoma</i> . Na tabela à direita estão demonstradas as massas obtidas para cada uma das frações.	73
Figura 28: Cromatogramas obtidos na análise por LC-MS das 9 frações do extrato supercrítico de <i>D. dichotoma</i> obtidas por CCD preparativa.	77
Figura 29: Cromatograma da fração 4 do extrato supercrítico de <i>D. dichotoma</i> , analisado por UFLC-ESI-TOF, demonstrando os 14 picos principais e os espectros de massa relativos a cada um deles.....	80
Figura 30: Placa cromatográfica resultante do procedimento de cromatografia em camada delgada preparativa do extrato supercrítico de <i>D. menstrualis</i>	81

Figura 31: Cromatogramas obtidos na análise por LC-MS das 12 frações do extrato supercrítico de <i>D. menstrualis</i> obtidas por CCD preparativa.	85
Figura 32: Cromatograma da fração 6 do extrato supercrítico de <i>D. menstrualis</i> , analisado por UFLC-ESI-TOF, demonstrando os 17 picos principais e os espectros de massa relativos a cada um deles.	88
Figura 33: Placa cromatográfica resultante do procedimento de cromatografia em camada delgada preparativa do extrato supercrítico de <i>D. mertensii</i>	89
Figura 34: Cromatogramas obtidos na análise por LC-MS das frações 2 a 12 do extrato supercrítico de <i>D. mertensii</i> obtidas por CCD preparativa.	93
Figura 35: Cromatograma da fração 6 do extrato supercrítico de <i>D. mertensii</i> , analisado por UFLC-ESI-TOF, demonstrando os 10 picos principais e os espectros de massa relativos a cada um deles.	95
Figura 36: Cromatogramas obtidos na análise por LC-MS das frações ativas dos extratos de <i>Dictyota</i> , no ensaio de atividade esquistossomocida.	96
Figura 37: Funil sinterizado durante o procedimento de fracionamento do extrato supercrítico de <i>D. mertensii</i>	99
Figura 38: Cromatogramas obtidos na análise por LC-MS das frações 1 a 10 do extrato supercrítico de <i>D. mertensii</i> obtidas por cromatografia em coluna.	101
Figura 39: Cromatograma obtido por HPLC-PDA no processo de isolamento da substância de m/z 271,24. No detalhe em vermelho está demonstrado o tempo de coleta do pico referente a substância alvo.	103
Figura 40: Cromatograma da alíquota coletada no intervalo compreendido entre 14,5 e 15,6 minutos, no procedimento de isolamento da substância de m/z 271,24.	104
Figura 41: Cromatograma obtido por HPLC-PDA no processo de purificação da substância de m/z 271,24. No detalhe em vermelho está demonstrado o tempo de coleta do pico referente a substância alvo.	105
Figura 42: Cromatograma da alíquota coletada no intervalo compreendido entre 31,7 e 32,8 minutos, no procedimento de purificação da substância de m/z 271,24.	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies de algas submetidas a extração por fluido supercrítico, relacionando a biomassa inicial utilizada, massa de extrato obtido e percentual de rendimento para cada extração.	23
Tabela 2: Inibição dos extratos supercríticos das algas, em espécies de fungos patógenos humanos. Dados demonstrados em concentração em µg/mL seguido de escore de inibição entre parênteses	43
Tabela 3: Inibição dos extratos supercríticos das algas, em espécies de bactérias patogênicas humanos gram positivas e negativas. Dados demonstrados em concentração em µg/mL seguido de escore de inibição entre parênteses.	50
Tabela 4: Índices de mortalidade demonstrado em percentual de indivíduos mortos após exposição a 500 µg/mL dos extratos, avaliados em diferentes períodos de tempo.....	61
Tabela 5: Índices de mortalidade demonstrado em percentual de indivíduos mortos após exposição a 100 µg/mL dos extratos, avaliados em diferentes períodos de tempo.....	62
Tabela 6: Avaliação de atividade esquistossomicida das frações de <i>D. dichotoma</i> obtidas por CCD preparativo.	75
Tabela 7: Massa obtida para as fração do extrato de <i>D. menstrualis</i>	82
Tabela 8: Avaliação de atividade esquistossomicida das frações de <i>D. menstrualis</i> obtidas por CCD preparativo.	83
Tabela 9: Massa obtida para as fração do extrato de <i>D. mertensii</i>	90
Tabela 10: Avaliação de atividade esquistossomicida das frações de <i>D. mertensii</i> obtidas por CCD preparativo.	91
Tabela 11: Análise comparativa entre os cromtogramas das frações ativas das 3 espécies de <i>Dictyota</i> , demonstrando as m/z [M + H] ⁺ (em negrito) presentes em mais de uma fração em relação ao tempo de retenção.....	97
Tabela 12: Frações do extrato supercrítico de <i>D. mertensii</i> , obtidas por cromatografia em coluna.	100
Tabela 13: Avaliação de atividade esquistossomicida da substância m/z 271,34 isolada do extrato supercrítico de <i>D. mertensii</i>	107

LISTA DE ABREVIACÕES

ACN:	Acetonitrila
ASE:	“accelerated solvent extractor” – extrator acelerado por solvente
CCD:	cromatografia em camada delgada
CIM:	concentração inibitória mínima
Da:	Dalton
DMEM:	Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium
DPPH:	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EC₅₀:	concentração efetiva em 50%
ERO:	espécies reativas de oxigênio
ESI:	“Electrospray ionization” – ionização por eletrospray
HPLC:	“high performance liquid chromatography” – cromatografia líquida de alta performance
IC₅₀:	concentração inibitória em 50%
m/z:	razão massa carga
MPa:	megapascal
MS:	“mass spectrometry” – espectrometria de massas
MTT:	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
OECD:	“Organisation for Economic Co-operation and Development” - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PDA:	“photo diode array” – arranjo de fotodiodos
PZQ:	praziquantel
QqQ:	triplo quadrupolo
R_f:	Fator de retenção
SFE:	“supercritical fluid extraction” – extração em fluido supercrítico
TOF:	“time-of-flight” – tempo de voo
UFLC:	“ultra flash liquid chromatography” – cromatografia líquida ultra rápida

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1. Algas vermelhas (Rhodophyta)	4
2. Algas pardas (Heterokontophyta)	6
3. Organismos patogênicos	8
4. Células cancerígenas	9
5. Estele oxidativo	10
OBJETIVOS	11
Objetivo geral	11
Objetivos específicos	11
JUSTIFICATIVA	13
METODOLOGIA	14
CAPÍTULO 1: Coleta de material biológico, preparação dos extratos e perfil cromatográfico	16
1. INTRODUÇÃO	16
2. Coleta e identificação do material biológico	17
2.1 Análise morfológica e confirmação taxonômica	18
3. Extração por fluido supercrítico	19
4. Perfil cromatográfico	24
5. Identificação de compostos terpenoides por cromatografia em camada delgada.	33
6. CONCLUSÃO	35
CAPÍTULO 2: Avaliação de atividade biológica dos extratos	37
1. INTRODUÇÃO	37
2. Avaliação de atividade antioxidante	38
3. Avaliação do potencial antifúngico dos extratos	41
3.1 Atividade contra fungos patógenos humanos	42
3.2 Bioautografia direta de fungos fitopatógenos	45
3.2.1 Análise quantitativa	47
4. Avaliação do potencial antibacteriano	49
5. Avaliação da citotoxicidade contra células cancerígenas.	51
6. Avaliação da atividade Leishmanicida	57

7. Avaliação da atividade esquistossomícida	59
8. Avaliação da citotoxicidade em fibroblastos saudáveis	63
9. CONCLUSÃO	66
CAPÍTULO 3: Fracionamento bioguiado pela atividade esquistossomícida	69
1. INTRODUÇÃO	69
2. Fracionamento do extrato supercrítico de <i>D. dichotoma</i> por CCD preparativa	70
2.1 Avaliação da atividade esquistossomícida das frações do extrato de <i>D. dichotoma</i> .	74
2.2 Análise das frações de <i>D. dichotoma</i> por UFLC-ESI-TOF.	76
3. Fracionamento do extrato supercrítico de <i>D. menstrualis</i> por CCD preparativa.	80
3.1 Avaliação da atividade esquistossomícida das frações do extrato de <i>D. menstrualis</i> .	83
3.2 Análise das frações de <i>D. menstrualis</i> por UFLC-ESI-TOF.	85
4. Fracionamento do extrato supercrítico de <i>D. mertensii</i> por CCD preparativa.	89
4.1 Avaliação da atividade esquistossomícida das frações do extrato de <i>D. mertensii</i> .	91
4.2 Análise das frações de <i>D. menstrualis</i> por UFLC-ESI-TOF.	93
5. Análise comparativa entre as frações ativas dos extratos de <i>Dictyota</i> .	96
6. Isolamento da substância de m/z [M + H] ⁺ 271,24.	98
6.1 Fracionamento do extrato supercrítico de <i>D. mertensii</i> em coluna cromatográfica.	98
6.2 Análise das frações de <i>D. mertensii</i> obtidas em coluna por UFLC-ESI-TOF.	100
6.3 Isolamento do pico m/z 271,24 por HPLC semi-preparativo.	102
7. Avaliação da atividade esquistossomícida da substância de m/z 271,24.	107
8. CONCLUSÃO	109
CONCLUSÕES GERAIS	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

INTRODUÇÃO

As águas oceânicas ocupam mais de 70% da superfície do nosso planeta, e abrigam uma vasta biodiversidade de organismos, sendo encontrados no ambiente marinho representantes de 34 dentre os 36 filos conhecidos. Esta grande diversidade se reflete também na gigantesca variedade de substâncias químicas disponível nos oceanos e suas possíveis aplicabilidades. Certamente os organismos marinhos possuem um metabolismo singular, sendo responsáveis pela produção de metabólitos secundários únicos, muitas vezes estruturas químicas singulares, sofisticadas e diferentes das encontradas em organismos terrestres, com potenciais econômicos distintos (CARDOZO *et al.*, 2007). Embora exista esta abundância de diversidade química, o estudo dos produtos naturais de origem marinha, era praticamente desconhecido até pouco menos de 50 anos atrás, principalmente pela dificuldade de acesso a tais organismos, e pela falta de técnicas e infraestrutura necessária. Com o avanço tecnológico e o acesso a técnicas de cultivos em mar aberto de diversos organismos, tornando possível extrações químicas em grande escala e é possível vislumbrar-se ensaios biológicos aplicados as áreas farmacêuticas, médicas, cosméticas, alimentícia, veterinária, bioenergia, agrícola, entre outras (ABAD & BERMEJO, 2001; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009).

Como dito, atualmente existem vários interesses relacionados ao estudo dos organismos marinhos, visando aplicações nas indústrias químicas e alimentícias, agricultura, pecuária, desenvolvimento de cosméticos e medicamentos. Como exemplo de aplicação de uma substância de origem marinha podemos citar a vasta utilização da proteína verde fluorescente (“green fluorescent protein” – GFP) na área da pesquisa básica e aplicada. Esta proteína primeiramente isolada da água-viva *Aequorea victoria* (PAN *et al.*, 2015) revolucionou a biologia molecular e engenharia genética, tornando-se uma das mais poderosas ferramentas de visualização de expressão gênica de diferentes entidades, como hormônios peptídicos, anticorpos, proteínas estruturais e sinalizadores celulares. Na indústria farmacêutica, estudos relacionados aos potenciais farmacológicos que podem ser encontrados nestes organismos vêm crescendo amplamente e recentemente pode-se listar vários

fármacos desenvolvidos a partir destes estudos, como por exemplo, a trabectedina, um fármaco antitumoral extraído do urocordado *Ecteinascidia turbinata* (RINEHART, 2000); a ziconotida, um polipeptídeo antinociceptivo extraído do molusco *Conus magus* (MCINTOSH *et al.*, 1982); a salinosporamida A, utilizada como agente anticancerígeno inibidor do proteassoma, extraído da bactéria marinha *Salinispora tropica* (MOORE *et al.*, 2008); e a halimida, um anticancerígeno inibidor de mitose, isolada do fungo *Aspergillus* sp. uma epífita na alga verde *Halimeda copiosa* (FENICAL, 2000; IMHOFF *et al.*, 2011), demonstrados na figura 1.

Figura 1: Estruturas químicas dos fármacos extraídos de organismos marinhos, salinosporamida A, trabectedina, halimida e ziconotida.

Não raramente as estruturas químicas encontradas em organismos marinhos são constituintes específicos de uma determinada espécie, principalmente em espécies mais altas na cadeia alimentar que tendem a incorporar metabólitos de espécies predadas por elas (MOLINSKI *et al.*, 2009). Como exemplo disto podemos citar a molécula kahalalida F, um depsipeptídeo cíclico com potencial antitumoral, demonstrado na figura 2 (HAMANN & SCHEUER, 1993; GOETZ *et al.*, 1999) inicialmente encontrado na espécie de lesma do mar *Elysia rufescens* que se alimenta exclusivamente da alga *Bryopsis* spp., a qual representa a verdadeira fonte de kahalalida F (HAMANN *et al.*, 1996). Cabe ainda destacar a capacidade de bioacumulação do composto pela *E. rufescens*, o qual constitui 1% do organismo em

comparação aos 0,0002% do composto encontrado na alga (BECERRO *et al.*, 2001). Devemos também enfatizar o fato de que as algas constituem a base da cadeia alimentar de praticamente toda forma de vida marinha, e muitos metabólitos encontrados em espécies superiores da cadeia, sejam similares ou idênticos aos metabólitos encontrados nas algas, já que estes são absorvidos pela dieta (MOLINSKI *et al.*, 2009)

Kahalalido F

Figura 2: Estrutura química do antitumoral Kahalalido F, produzida pela alga *Bryopsis* spp..

Atualmente a principal aplicação comercial das algas marinhas é na extração de ficocolóides (algina, carragenina e ágar) utilizados principalmente nas indústrias alimentícia e cosmética (GRESSLER *et al.*, 2010), contudo existem muitas outras classes de metabólitos produzidos pelas algas que potencialmente apresentem aplicação comercial como por exemplo os ácidos graxos (WEN & CHEN, 2003), esteróis (ILIAS *et al.*, 1985), carotenóides (MAEDA *et al.*, 2008), lectinas (DA CONCEIÇÃO RIVANOR *et al.*, 2014), micosporinas (ANDREGUETTI *et al.*, 2013), compostos halogenados (ANTUNES *et al.*, 2011) e policetídeos, esta última de grande importância farmacológica (PEREIRA, R. C. & COSTA-LOTUFO, 2012).

Devido ao fato da ampla costa litorânea brasileira ser banhada por águas tropicais e temperadas, existe atualmente um grande diversidade de espécies de algas descritas na literatura com ocorrência no Brasil (BÖKER-TORRES *et al.*, 2009; STEIN, 2011). Dentre as algas marinhas, mais especificamente as macroalgas, encontramos centenas de espécies classificadas em três principais grupos: vermelhas (rodófitas ou Rhodophyta), pardas (Heterokontophyta) e verdes (clorófitas ou Chlorophyta), que demonstram grandes variações entre si em parâmetros relacionados a composição química, aspectos reprodutivos e morfológicos (BICUDO & BICUDO, 1970).

1. Algas vermelhas (Rhodophyta)

As algas Rhodophyta, popularmente conhecidas como algas vermelhas são reconhecidamente as maiores produtoras de metabólitos secundários biologicamente ativos dentre as algas, podendo ser encontrado substâncias pertencentes a diversas classes químicas nestes organismos (FENICAL & NORRIS, 1975b). Dentre as principais classes podemos citar hidrocarbonetos de baixo peso molecular, ácidos graxos, compostos fenólicos, acetogeninas, terpenos e terpenos halogenados (CREWS *et al.*, 1978; GONZÁLEZ *et al.*, 1982; LAUS, 2001; GOMES, 2007). Os cloroplastos das rodófitas apresentam além de clorofila *a*, o pigmento ficobilina, que muitas vezes mascara a coloração verde da clorofila e tornam a alga vermelha. Este pigmento é também responsável pela absorção de luz em águas profundas (O'CARRA *et al.*, 1980). Dentre as espécies de algas vermelhas incluídas neste trabalho estão algas dos gêneros *Chondria*, *Spyridia* e *Plocamium*, enquanto que as espécies de algas pardas incluídas são pertencentes ao gênero *Dictyota*.

As espécies marinhas pertencentes ao gênero *Chondria*, da família das Rhodomelaceae integram o filo das Rhodophyta (algas vermelhas), e atualmente contam com 75 espécies, sendo nove destas encontradas em águas litorâneas brasileiras até o presente momento. Dentre os constituintes químicos encontrados nas espécies de *Chondria* podem ser citados os polissulfetos cíclicos, caulerpina, amidas e ácido domóico (FENICAL & NORRIS, 1975a; GOVENKAR & WAHIDULLA, 2000). Segundo Kamat, 1992 (KAMAT *et al.*, 1992) o extrato metanólico da espécie *Chondria armata* apresenta atividade antiviral contra o vírus SFV, além de

demonstrar atividade hipotensiva (NAQVI *et al.*, 1981). Para as espécies deste gênero existe ainda uma escassez de dados na literatura a respeito de possíveis atividades biológicas decorrente dos metabólitos secundários encontrados nestas algas. Essa espécie tem distribuição cosmopolita, podendo ser encontrada principalmente nas regiões caraíbas, nordeste da América do norte, Europa, Mediterrâneo, leste da África e Índia, sudeste da Ásia, ilhas atlânticas, Carolina do Norte, EUA e Filipinas. No Brasil elas são encontradas principalmente na costa sudeste do país (BÖKER-TORRES *et al.*, 2009). Algas do gênero *Spyridia*, são amplamente encontradas em águas tropicais e temperadas quentes (CONKLIN & SHERWOOD, 2012), dentre algumas classes de compostos podem ser encontrados em sua composição química estão as saponinas e taninos (DOMETTILA *et al.*, 2013), que podem ser responsáveis por algumas atividades biológicas como potencial antioxidante e antiinflamatório (ALIYU *et al.*, 2011) a atividade antibiótica (ROBLES-CENTENO *et al.*, 1996).

As algas pertencentes ao gênero *Plocamium* são características de clima temperado a frio, podendo algumas espécies ocorrer em áreas tropicais. São organismos geralmente pequenos, porém algumas espécies podem atingir 50 cm de comprimento a atualmente contam com 108 espécies descritas, porém dentre estas somente 50 são usualmente reconhecidas (GOMES, 2007; GUIRY, 2015c). Quimicamente as espécies de *Plocamium* se caracterizam pela produção de monoterpenos polihalogenados cíclicos e acíclicos, apresentando um grau de halogenação muito alto, incomum para moléculas naturais contendo apenas dez átomos de carbono (DIAS-MARRERO *et al.*, 2002) geralmente ligados a átomos de cloro ou bromo. Dentre algumas atividades biológicas apresentadas por metabólitos encontrados em *Plocamium* podem ser citadas a atividade antioxidante (VALENTÃO *et al.*, 2010), antimicrobiana. (KÖNIG *et al.*, 1999), antipredatória (WHITNEY *et al.*, 1997) anticancerígena (ANTUNES *et al.*, 2011) antimalárico (AFOLAYAN *et al.*, 2009).

2. Algas pardas (Heterokontophyta)

As algas pardas ou feófitas possuem esse tipo de coloração devido ao pigmento fucoxantina, além da presença de clorofila *a* e *c*. Em algumas espécies a

interação destes três tipos de pigmentos podem gerar outras colorações que variam de amarelo a azul (MAEDA *et al.*, 2005). Uma característica específica da família Heterokontophyta diz respeito à produção de uma classe distinta de taninos, os florotaninos, estruturas polifenólicas altamente polares (LI, Y.-X. *et al.*, 2011), que apresentam diversas propriedades biológicas como, por exemplo: potencial antioxidante (HEO *et al.*, 2010), inibidor enzimático (LEE *et al.*, 2009), anticolinesterásico (MASSOULIE *et al.*, 1993), antihipertensivo (LI *et al.*, 2004), inibidor de metaloproteínases (KIM *et al.*, 2006), bactericida (KIM *et al.*, 2006), anti-HIV (AHN *et al.*, 2004) e anticancerígeno (LI, Y. *et al.*, 2011).

As algas marinhas do gênero *Dictyota* são pertencentes à família das Dictyotaceae integrantes do filo das Phaeophyta, e são representadas por 87 espécies atualmente aceitas taxonomicamente (GUIRY, 2015b); é uma das mais abundantes algas em águas tropicais dos oceanos atlântico e Índico. No Brasil sua incidência engloba quase toda a extensão litorânea sendo encontrada em todos os estados entre o Rio Grande do Sul e o Maranhão (NUNES & PAULA, 2001; MANZO *et al.*, 2009; GUIRY, 2015a). Morfologicamente, são algas pluricelulares, unisseriadas, de talo achatado e parenquimatoso, em forma de fita, às vezes torcido em forma de espiral, sem nervura, ramificado dicotomicamente, algumas vezes com aspecto cervicorne, margens lisas ou dentadas. Em corte transversal o talo apresenta três camadas de células, duas corticais externas, com células pequenas, contendo muitos cloroplastos, e uma medular, com células grandes, com poucos cloroplastos (NUNES & PAULA, 2001). Os representantes da família Dictyotaceae são produtores de uma grande quantidade de metabólitos secundários, dentre as classes de estruturas químicas encontradas nas *Dictyotas*, podemos citar os terpenos e diterpenos, como xenicanos, hidroazulenóides, sesquiterpenos e dolabelanos, hidrocarbonetos, polifenóis e ácidos graxos (FLEURY *et al.*, 1994; SIAMOPOULOU *et al.*, 2004; KOLESNIKOVA *et al.*, 2006).

Atualmente existem na literatura muitos estudos, com estruturas químicas de metabólitos secundários encontradas em espécies de *Dictyota*, demonstrando atividades antiviral (**A** e **F**) (BARBOSA *et al.*, 2004b; PEREIRA, H. S. *et al.*, 2004; GARRIDO *et al.*, 2011), antibacteriana (**B** e **E**) (HIRSCHFELD *et al.*, 1973; TRINGALI *et al.*, 1988), antifúngica, antiincrustante, antipredatória (**H**) (BARBOSA *et al.*, 2004a), ictiotóxico (**G**)(DE ROSA *et al.*, 1984), anticoagulante (**D**)(ALBUQUERQUE *et al.*, 2004), anti-hipertensivo (**J**)(PATIL *et al.*, 1993), antitumorogênica (**C**) (BOUAICHA *et al.*, 1993; DURÁN *et al.*, 1997; DE PAULA *et al.*, 2011) e citotóxica contra algumas linhagens de células cancerígenas humanas (**C**) (SIAMOPOULOU *et al.*, 2004; KOLESNIKOVA *et al.*, 2006; MANZO *et al.*, 2009).

Figura 3: Moléculas ativas extraídas das espécies *D. pfaffii* (**A**), *D. dichotoma* e *D. coriacea*(**B**), *D. ligulata* (**C** e **E**), *D. menstrualis* (**D** e **F**), *D. fasciola* (**G**), *D. friabilis* (**H** e **I**) e *D. sp.* (**J**).

Algumas espécies de algas vem sendo extensamente estudadas quanto aos seu potenciais farmacológicos, como exemplificado pelo gênero *Dictyota*, pois são fontes de moléculas diferenciadas e com um alto potencial bioativo em diversas áreas. Entretanto, esta atividade acaba se restringindo a determinadas classes de organismos patogênicos, geralmente por serem estudados por grupos de pesquisa especializados em determinado organismos. Uma forma de expandir as chances de encontrarmos moléculas ativas é trabalhando em equipes multidisciplinares, ampliando dessa forma a gama de atividade diferentes avaliadas. Dentre as

atividades descritas neste trabalho está incluída a utilização de organismos patogênicos envolvidos em diferentes tipos de doenças, e consequentemente com diferentes implicações na saúde pública. Além destas, foram abordadas neste trabalho algumas condições patológicas em que não há um agente etiológico envolvido.

3. Organismos patogênicos

São organismos que apresentam individualidades biológicas, principalmente constitucionais, que os diferenciam de outros organismos na natureza. Geralmente os organismos patogênicos são unicelulares porém em alguns casos podem se apresentar como organismos cenóticos (multinucleados) ou multicelulares, como alguns parasitas por exemplo (COTRAN *et al.*, 2000). Dentre os tipos mais comuns estão as bactérias, fungos, vírus, protozoários e os platelmintos, envolvidos em uma grande variedade de diferentes doenças.

Uma vez que os microorganismos estão em constante evolução, um dos principais problemas relacionados às doenças causadas por esses microorganismos, como por exemplo bactérias e fungos, reside no desenvolvimento de tolerância ou resistência contra as drogas atualmente utilizadas no tratamento destas doenças, justificando desta forma a constante busca por novas alternativas terapêuticas para o tratamento destas enfermidades (WHO, 2015).

Em relação as doenças causadas por protozoários podemos citar a Leishmaniose, um doença crônica ainda considerada negligenciada, causada por cerca de 30 espécies diferentes de *Leishmania* e que afeta aproximadamente 350 milhões de pessoas em todo o mundo (HUNT *et al.*, 2007). O principal tratamento utilizado consiste na administração de antimônio pentavalente, o qual foi desenvolvido a mais de 6 décadas e apresenta uma série de graves efeitos colaterais podendo levar ao óbito pacientes imunocomprometidos (TORRES *et al.*, 2014). Ainda, somando-se a este problema o fato de que a resistência dos protozoários vem aumentando gradativamente durante os últimos 40 anos (CHAKRAVARTY & SUNDAR, 2010) podemos justificar a necessidade de desenvolvimento de nova alternativas para o tratamento.

O fator resistência é também um parâmetro de extrema relevância quando nos referimos a outra doença negligenciada, a esquistossomose. Esta forma de parasitismo, que afeta em torno de 240 milhões de pessoas no mundo (HUNT *et al.*, 2007), é causada por seis espécies diferentes de platelmintos pertencentes ao gênero *Schistosoma* sendo que a espécie *mansoni* é a única dentre elas encontrada no Brasil. O tratamento desta doença é baseado em duas drogas: O praziquantel, que não apresenta atividade contra parasitas jovens, exercendo seus efeitos apenas quando a doença já está implantada; e a oxamniquina, que somente é ativa contra a espécie *S. mansoni*, não sendo efetiva contra as outras espécies causadoras da doença (COLLEY *et al.*, 2014). Além disso, existe ainda um grave problema nestas formas de tratamento associado ao desenvolvimento de resistência nos parasitas, a qual também vem evoluindo ao longo dos anos (DANSO-APPIAH *et al.*, 2013).

4. Células cancerígenas

O câncer é uma doença genética, ou seja, é uma condição patológica em que não existe um organismo patogênico envolvido no seu desenvolvimento. Normalmente as células do corpo humano crescem e se dividem em novas células a medida que o organismo necessita delas, quando a célula envelhece ou sofre algum dano irreparável ela morre e uma nova célula é criada. Quando o câncer se desenvolve, os genes que regulam esse mecanismo de controle são alterados de forma que células velhas permanecem vivas nos tecidos e novas células são formadas. Estas novas células se dividem descontroladamente e formam grandes massas, os tumores (NCI, 2015).

Diferentemente do que ocorre com as doenças negligenciadas, as pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento deste tipo de doença, ocorrem de forma intensa. O grande desafio envolvido no tratamento é atingir somente as células geneticamente alteradas, que apresentam as mesmas características das células saudáveis, uma vez que são derivadas delas. Este fato explica ainda a baixa janela terapêutica que os medicamentos quimioterápicos apresentam (GORE *et al.*). Além disso, há o problema da resistência rapidamente adquirida por essas células que pode ocorrer de forma direta ou mesmo por uma mecanismo de tolerância cruzada, onde a célula não se torna

resistente a somente um fármaco, mas a toda uma classe que apresente atividade pelo mesmo mecanismo de ação (DEMAIN & VAISHNAV, 2011).

5. Estresse oxidativo

A condição de estresse oxidativo ocorre quando um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os mecanismos antioxidantes naturais do organismo, tendendo para o primeiro. As EROs, são moléculas naturalmente produzidas no organismo através de reações com moléculas de oxigênio proveniente da respiração, dependendo da concentração em que se encontram, podem interagir com moléculas essenciais do organismo como por exemplo lipídios, proteínas e DNA, causando danos irreversíveis em diversos tecidos e órgãos como o fígado, músculos, cérebro e tecido adiposo e endotelial. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007)

Quando os efeitos deletérios do estresse oxidativo ocorre sobre as moléculas constitutivas da bicamada lipídica das membranas celulares ocorre o quadro de peroxidação lipídica, que pode levar a destruição das estruturas celulares, alteração da permeabilidade da membrana, debilitação do sistema de troca iônica e morte celular (YAKOVLEVA *et al.*, 2004; OBERMÜLLER *et al.*, 2005). Em situações em que a geração de dano é constante, superando aos mecanismos de reparo, podem ser desenvolvidas diversas patologias como doenças hepáticas, respiratórias, cardíacas, renais, diabetes aterosclerose e doenças neurodegenerativas como a esclerose lateral amiotrófica, doença de parkinson e Alzheimer (PERRY *et al.*, 2002; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007)

Uma vez que os efeitos deletérios são decorrentes de um desequilíbrio das EROs em relação aos antioxidantes, é natural pensarmos que uma suplementação com substâncias altamente antioxidantes produza um efeito profilático com relação às doenças citadas anteriormente (KONTUSH & SCHEKATOLINA, 2004). Na natureza são encontradas inúmeras fontes de substâncias antioxidantes, e mais especificamente em relação às algas marinhas podem ser citados algumas classes químicas que apresentam esse potencial, como por exemplo os florotaninos (SATHYA *et al.*), alguns polissacarídeos (ZHANG *et al.*, 2012), compostos fenólicos (RAJAURIA *et al.*, 2012; MURUGAN & IYER, 2014)

OBJETIVOS

Objetivo geral

Esta tese tem como principal objetivo realizar uma busca dos potenciais bioativos em extratos de algas vermelhas e pardas. As atividades pesquisadas incluíram a busca por potenciais compostos bioativos que apresentassem atividade antioxidante, antibiótico contra bactérias e fungos, citotóxico contra células cancerígenas e antiparasitário contra *Leishmania* e *Schistosoma*, além de avaliar a citotoxicidade dos extratos.

Objetivos específicos

- Coleta de espécies de algas pre-determinadas e identificação das mesmas através de análise morfológica e taxonômicas.
- Obtenção dos extratos das algas através de uma metodologia de extração em fluido supercrítico, com intuito de extrair a maior variedade de estruturas químicas apolares possíveis.
- Avaliação da atividade antioxidante dos extratos obtidos através da metodologia de atividade sequestrante de radicais DPPH.
- Avaliação da atividade antibiótica dos extratos obtidos, em culturas de fungos e bactérias patógenas humanas.
- Avaliação do potencial citotóxico dos extratos obtidos contra linhagens celulares cancerígenas MES-SA, MES-SA/Dx5.
- Avaliação da atividade antiparasitária dos extratos obtidos contra *Leishmania amazonensis* e *Schistosoma mansoni*

- Avaliação da toxicidade dos extratos em linhagens celulares de fibroblastos saudáveis.
- Realização de fracionamento e isolamento de moléculas através de métodos cromatográficos
- Obtenção de frações e moléculas ativas através de uma abordagem de fracionamento bioguiado pela atividade esquistossomicida.

JUSTIFICATIVA

O alto valor agregado a fármacos usados em doenças parasitárias, como *Leishmania* e *Schistosoma*, em tratamento de câncer, e em infecções causadas por microorganismos patogênicos despertam o interesse da busca por novas drogas com estes mecanismos de ação. Ainda, com o aparecimento de organismos patógenos resistentes a antibióticos e células cancerígenas com metabolismos cada vez mais complexos, torna-se fundamental o desenvolvimento de novas drogas, as quais apresentem mecanismos de ação específicos e eficientes no combate as doenças. Recentemente observa-se o crescimento das pesquisas de bioprospecção em organismos marinhos, uma área até então pouco explorada por cientistas, porém com um potencial muito grande. A indústria farmacêutica investe na busca de novas moléculas bioativas, atuando basicamente de duas formas: criando artificialmente em laboratório novas estruturas químicas, ou buscando-as na natureza. As macroalgas produzem substâncias químicas quando submetidas a diferentes estresses ambientais, tais como variação de salinidade, iluminação solar, temperatura e seca, além de compostos distintos para se prevenir de herbivoria. Baseado nos fatos de que estes organismos produzem metabolitos secundários importantes e de sofisticada estrutura química, e sua fácil capacidade de cultivo, seja no mar como em tanques de cultivos integrados, as macroalgas marinhas têm sido consideradas potenciais organismos capazes de preencher as lacunas da pesquisa para novos fármacos.

METODOLOGIA

A metodologia empregada neste trabalho que teve o objetivo principal de prospecção de bioativos dentre os metabólitos secundários de diferentes espécies de algas marinhas, foi demonstrada de forma sequencial, descrito de acordo com o fluxo de trabalho a medida que o mesmo foi sendo desenvolvido. As etapas foram divididas em 3 capítulos diferentes e agrupadas de acordo com a similaridade entre elas de forma a tornar linear a descrição do trabalho. Em cada um dos capítulos está descrita a metodologia empregada, juntamente aos resultados obtidos e a discussão relacionada.

No capítulo 1 estão demonstradas as primeiras etapas, desde o planejamento do projeto, a coleta do material biológico usado durante todas as etapas, a preparação dos extratos das 6 espécies selecionadas, a partir de uma metodologia de extração em CO₂ em estado supercrítico, determinação dos perfis cromatográficos para cada um dos extratos por cromatografia líquida e avaliação da presença de compostos terpenoides nas amostras.

Durante o capítulo 2 foram abordadas as metodologias de avaliação de atividade biológica decorrente dos extratos supercríticos. Dentre as atividades avaliadas foram incluídas a atividade antioxidante, antibiótica contra bactérias e fungos patogênicos humanos, citotóxico contra culturas de células cancerígenas e antiparasitária contra os organismos causadores de leishmaniose e esquistossomose, respectivamente. Foi ainda avaliada a citotoxicidade dos extratos contra linhagens de fibroblastos saudáveis. A partir dos resultados obtidos, foram definidos os extratos e atividades prioritários para o desenvolvimento sequencial do trabalho.

No capítulo 3 estão descritos os procedimentos desenvolvidos através de uma abordagem de fracionamento dos extratos de 3 espécies de *Dictyota* bioguiado pela atividade esquistossomocida até a obtenção de uma única molécula. Dentre os procedimentos empregados estão metodologias preparativas cromatográficas em camada delgada, em coluna e HPLC, monitorados por cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas. Todos os passos de fracionamento e isolamento foram dependentes dos resultados da avaliação da atividade esquistossomocida.

CAPÍTULO 1

Coleta de material biológico, preparação dos extratos e perfil cromatográfico

1. INTRODUÇÃO

A prospecção de moléculas ativas a partir de fontes naturais é um processo longo e que necessita de um planejamento prévio para ser desenvolvido. A forma mais efetiva de realizarmos um planejamento racional é dividindo o processo em etapas, que normalmente são cumpridas de forma sequencial, contudo esses processos podem sofrer alterações durante o seu desenvolvimento. Na base do planejamento está a seleção dos organismos que serão prospectados, processo que geralmente ocorre de duas formas: A primeira delas diz respeito à sua utilização de forma etnofarmacológica, a qual está relacionada mais estritamente com o conhecimento popular do que científico propriamente dito. Na segunda forma, esta sim relacionada ao conhecimento científico, a seleção de uma espécie é determinada pela sua constituição fitoquímica, classificação botânica e outros fatores relacionados à área da farmacognosia.

No planejamento do processo abordado neste trabalho o principal critério de seleção das espécies foi relacionado ao perfil fitoquímico das algas e o potencial bioativo demonstrado de formas distintas na literatura para as classes químicas que provavelmente seriam encontradas nas mesmas.

2. Coleta e identificação do material biológico

As espécies algais utilizadas durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa foram coletados no litoral do estado do Espírito Santo, mais precisamente no município de Anchieta, 80 quilômetros ao sul da capital Vitória, praias de Castelhanos, Parati e Ubu; no município de Nova Guarapari na praia de Bacutia; e no município de Serra, na praia da Baleia (indicadas na figura 4).

Figura 4: Localização das praias onde foram coletadas as espécies algais utilizadas no projeto. 1 – Praia da Baleia; 2 – Bacutia; 3 – Ubu; 4 – Parati; 5 – Castelhanos.

As algas foram coletadas na região entre marés durante a maré baixa, triadas e lavadas exaustivamente com água do mar com o objetivo de eliminar os organismos epifíticos presentes nos espécimes. Um exemplar de cada espécie foi fixado em formol 4% para posterior análise morfológica, confirmação de identificação de espécie e preparo de exsicata para depósito em herbário. Outro exemplar foi

desidratado e mantido em sílica gel para posterior análise de confirmação de espécie por marcadores moleculares, caso fosse necessário. A biomassa restante, que foi utilizada na preparação dos extratos, foi congelada e mantida a 20 °C negativos a fim de minimizar alterações nas propriedades químicas, mantendo-as conservadas até o momento do estudo.

2.1 Análise morfológica e confirmação taxonômica

Os exemplares previamente fixados em formaldeído a 4% foram analisados morfoanatomicamente no laboratório de algas marinhas do Instituto de Botânica de São Paulo com a colaboração da Professora Dra. Mutue Toyota Fujii do Núcleo de pesquisa em Ficologia. A identificação das espécies foi baseada em bibliografia recente através de comparação dos aspectos gerais da espécie, estruturas vegetativas e reprodutivas, além de análise microscópica de cortes transversais e longitudinais dos talos. Através das análises puderam ser confirmadas as seguintes espécies:

- *Dictyota menstrualis* (Hoyt) Schnetter, Hörning & Weber-Peukert, coletada na praia de Ubu, GPS: 20°49'08"S 40°36'50"O.
- *Dictyota dichotoma* (Hudson) J. V. Lamouroux, coletada na praia de Bacutia, GPS: 20°43'60"S 40°31'50"O.
- *Dictyota mertensii* (Martius) Kützinger, coletada na praia da Baleia, Serra, GPS: 20°10'37.4"S 40°11'18.6"O
- *Chondria littoralis* Harvey, coletada na praia de Parati, GPS: 20°49'52"S 40°37'07"O.
- *Plocamium brasiliense* (Greville) M. A. Howe & W. R. Taylor, coletada nas praias de Ubu, GPS: 20°49'08"S 40°36'50"O e Castelhanos, GPS: 20°50'06"S 40°37'23"O.
- *Spyridia hypnoides* (Bory de Saint-Vincent) Papenfuss, coletada na praia de Parati, GPS: 20°49'52"S 40°37'07"O.

Para cada uma das espécies identificadas, apresentadas na figura 5, foi preparado um exemplar de exsicata, os quais foram depositados no Herbário "Maria

Eneida P. Kauffman Fidalgo” do Instituto de Botânica do estado de São Paulo, sob os seguintes números de referência: *Dictyota dichotoma* SP. 469.031, *Dictyota menstrualis* SP. 469.032, *Dictyota mertensii* SP. 469.156, *Plocamium brasiliense* SP. 428.163, *Chondria littoralis* SP. 428.154 e *Spyridia hypnoides* SP. 428.171.

A alíquota total de biomassa algal, referente às diferentes espécies identificadas, reservada para a preparação dos extratos foi mantida congelada até o momento de ser liofilizada para então ser submetida à extração. O material congelado foi dividido em pequenas porções com volume de aproximadamente 100 mL, para facilitar o procedimento de liofilização, que teve o seu desenvolvimento monitorado de acordo com o peso das porções. O material foi considerado ausente de qualquer resquício de umidade, no momento em que o peso se manteve constante em pesagens consecutivas com intervalos de algumas horas entre cada uma delas.

Dictyota dichotoma

Dictyota menstrualis

Dictyota mertensii

Plocamium brasiliense

Chondria littoralis

Spyridia hypnoides

Figura 5: Espécies de algas utilizadas nos estudos de prospecção. Acima as espécies heterokontophytas: *Dictyota dichotoma*, *Dictyota menstrualis* e *Dictyota mertensii*. Abaixo as espécies rodophyta: *Plocamium brasiliense*, *Chondria littoralis* e *Spyridia hypnoides*. (SPRINGER, 1961; DE OLIVEIRA *et al.*, 2007; PEREIRA, L., 2014; GUIRY, 2015a)

Supercrítico é definido como o ponto no qual uma substância se encontra acima de sua temperatura e pressão críticas em um diagrama de fases e se apresenta em um estado intermediário entre o líquido e o gasoso (MAUL *et al.*, 1996; HERRERO *et al.*, 2006a). O fluido formado sob alta pressão e temperatura apresenta características físico-químicas diferentes daquelas apresentadas pela substância em estado líquido ou gasoso, o que auxilia na sua escolha para ser utilizado como agente extrator, demonstrando maior potencial solubilizante em relação aos anteriores. Vários solventes são atualmente empregados como fluidos supercríticos extratores porém os gases possuem uma grande vantagem devido ao fato de a amostra ser facilmente recuperada após a extração simplesmente fazendo com que o fluido volte ao seu estado natural e volatilize (HERRERO *et al.*, 2006a; SOVOVÁ, 2012). Dentre os gases, o CO₂ é o mais comumente descrito, pelo fato de atingir o estado supercrítico facilmente quando em comparação a outros gases, além de apresentar um baixo custo relativo (SUBRA *et al.*, 1991; KLEJDUS *et al.*, 2010; LIAU *et al.*, 2010).

Em comparação aos métodos tradicionais de extração, podemos citar algumas vantagens como por exemplo o fato de a extração por fluido supercrítico (SFE) evitar a utilização de solventes orgânicos, ser um método altamente seletivo, podendo ser realizado em curtos espaços de tempo, facilitar a recuperação do extrato final, evitar que o extrato sofra hidrólise, oxidação, esterificação ou alteração térmica, entre outros. Dentre as desvantagens apresentadas pelo método em relação a outros, está o alto custo do processo, uma vez que o sistema precisa ser preparado para suportar altas pressões, e a limitação em extrair compostos polares. O CO₂ supercrítico tem como característica a extração de substâncias apolares ou pouco polares, porém pode ser adicionado um solvente modificador, o que modifica as características do fluido, a fim de também extrair compostos de polaridade intermediária (MAUL *et al.*, 1996; HERRERO *et al.*, 2006a), fator que justifica a utilização concomitante de etanol durante o processo extrativo, buscando-se obter compostos com diferentes polaridades, variando de uma polaridade intermediária a pouco polares.

Para a preparação dos extratos, uma aliquota de aproximadamente 150 g de cada uma das espécies que estava sendo mantido congelado a 20°C negativos, foi liofilizada com o intuito de remover qualquer traço de umidade presente no material vegetal, fator que poderia influenciar negativamente no

procedimento extrativo. Posteriormente o material liofilizado, resultando em aproximadamente 15 g, foi pulverizado em moinho de bolas e conservado em sacos herméticos sob resfriamento até o momento da extração.

A extração dos compostos por fluido supercrítico foi realizada no Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio-ambiente (CEPEMA POLI-USP) localizado no município de Cubatão-SP, em colaboração com o Prof. Dr. Reinaldo Camino Bazito do Instituto de Química IQ-USP. O equipamento extrator utilizado da marca Thar Process© é composto de quatro módulos principais: O módulo de refrigeração de CO₂, a câmara extratora, a bomba de regulação da pressão automática e a câmara de recuperação do extrato. É necessário que todos os módulos estejam muito bem conectados uns aos outros, uma vez que o CO₂ necessita de altas pressões e temperatura controlada para atingir o estado supercrítico. Um diagrama do processo está mostrado na figura 6.

O material algal previamente liofilizado e pulverizado, em alíquotas de aproximadamente 15 g para cada espécie, foi empacotado em sacos ("sleeves") confeccionados com um tecido sintético de nylon termooestável, de forma a apresentar exatamente as mesmas dimensões da parte interna da câmara extratora. Os sacos apresetam dimensões suficientes para acondicionar aproximadamente 15 g de biomassa pulverizada. Nos casos em que não houve material suficiente para o preenchimento, o espaço restante foi completado com pérolas de vidro.

Figura 6: Esquema demonstrando os componentes do sistema extrator por fluido supercrítico. Adaptado de (WATERS, 2015).

Na literatura são encontradas diversas referências relacionadas ao emprego de fluidos supercríticos, principalmente CO₂, como metodologia de extração de bioativos, entretanto quando relacionada ao propósito específico de extração em algas marinhas a literatura é extremamente escassa. Uma vez que não existiam metodologias estabelecidas para este propósito, foram necessários fazer alguns testes de otimização do processo antes de realizarmos as extrações propriamente ditas. Foram avaliados diferentes condições de parâmetros como pressão de trabalho, temperatura da câmara de extração, concentração de solvente modificador e tempo total do processo para verificarmos a melhor condição de extração.

A partir destes testes iniciais (dados não mostrados) determinou-se as condições de trabalho em que foi obtido o maior rendimento de extrato e também a maior diversidade de picos no monitoramento do perfil cromatográfico. O procedimento de extração foi realizado com CO₂ a uma pressão de trabalho de 28 MPa, a temperatura de 45°C, com a adição de 4% de solvente modificador (álcool etílico) por um período de 3 horas contados a partir do momento em que o equipamento atinge as condições de temperatura e pressão supracitadas. Sob tais condições o CO₂ apresenta uma densidade de aproximadamente 0,875 g.cm⁻³ (HAGHBAKHSI *et al.*, 2013), o que representa um fator determinante, uma vez que

a eficiência extrativa é diretamente proporcional à densidade do fluido supercrítico. A pressão foi escolhida respeitando-se o limite suportado pelo equipamento, com uma ampla margem de segurança. A temperatura de processo foi definida como um valor intermediário, onde o CO₂ certamente se encontraria no estado supercrítico e que não houvesse decomposição térmica dos compostos presentes na amostra, o que poderia ocorrer sob temperaturas mais altas.

Tabela 1: Espécies de algas submetidas a extração por fluido supercrítico, relacionando a biomassa inicial utilizada, massa de extrato obtido e percentual de rendimento para cada extração.

Espécie	Biomassa (g)	Extrato (g)	Rendimento (%)
<i>Dictyota dichotoma</i>	6,53	0,406	6,22
<i>Dictyota menstrualis</i>	8,25	0,863	10,46
<i>Dictyota mertensii</i>	9,759	0,6887	7,06
<i>Plocamium brasiliense</i>	6,004	0,273	4,55
<i>Spyridia hypnoides</i>	15,55	0,099	0,64
<i>Chondria littoralis</i>	12,6	0,0944	0,75

Na tabela 1, estão demonstrados as biomassas submetidas à extração, as massas de extrato obtidas em cada procedimento e o rendimento relativo a cada uma delas. O índice de rendimento representa o percentual do extrato em relação à biomassa inicial, e serve como um parâmetro de comparação entre os procedimentos realizados. Os maiores rendimentos foram encontrados para as espécies de *Dictyota* em índices que variaram de 6,2 a 10,4%, seguido da espécie *P. brasiliense* que atingiu um índice de, 4,5% e por último as espécies *S. hypnoides* e *C. littoralis* com índices de rendimento de 0,6 e 0,7%, respectivamente. Em uma das poucas referências demonstradas na literatura, (PIRAS *et al.*, 2014) relata um rendimento de 9,3% para a extração de uma alga parda *Undaria pinnatifida*, compatível com os valores obtidos para as algas pardas descritas neste trabalho.

Devido ao fato de que as extrações foram realizadas a partir de um procedimento inédito e haver poucos trabalhos na literatura relacionados com o tema, é extremamente difícil realizar uma análise comparativa, tanto em relação ao

rendimento quanto à composição dos extratos obtidos e principalmente com os gêneros de macroalgas descritas nessa tese. Como dito anteriormente, o nosso procedimento experimental visa a extração de substância menos polares e portanto podemos afirmar que substâncias que apresentam esse caráter estão presente em maior quantidade nas espécies de *Dictyota* em relação as outras estudadas. Dentre as classes de substâncias extraídas em CO₂ supercrítico, comumente encontrada em algas marinhas podem ser citadas os lipídios, carotenóides, clorofila (MACÍAS-SÁNCHEZ *et al.*, 2010; MÄKI-ARVELA *et al.*, 2014), ácidos graxo poliinsaturados, polifenóis (KLEJDUS *et al.*, 2014; HERRERO *et al.*, 2015) e terpenoides (CAPUZZO *et al.*, 2013). Neste sentido, para conhecermos melhor a composição química de nossas extrações, as mesmas foram submetidas a diferentes metodologias cromatográficas.

4. Perfil cromatográfico

A análise cromatográfica dos extratos foi realizada primeiramente com o propósito de obtermos um perfil dos extratos supercríticos. A determinação deste parâmetro nos permite avaliar, ainda que superficialmente, a complexidade dos extratos, avaliar a estabilidade dos mesmos quando necessário e serve também como base para posteriores procedimentos de fracionamento dos extratos e isolamento de compostos por metodologias cromatográficas preparativas. Inicialmente foram avaliados cromatograficamente os extratos de *D. dichotoma*, *D. menstrualis*, *P. brasiliense*, *S. hypnoides* e *C. littoralis*, os quais tiveram as atividades biológicas avaliadas (mostrada no capítulo 2) enquanto o extrato supercrítico de *D. mertensii* somente foi incorporado ao trabalho durante os estudos de fracionamento bioguiado (capítulo 3) e portanto será abordado novamente durante o capítulo referente

Os perfis cromatográficos dos extratos supercríticos das diferentes espécies algais foram obtidos por duas metodologias distintas, por HPLC-PDA e UFLC-ESI-TOF. Primeiramente os extratos foram analisadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) Shimadzu® composto de duas bombas LC6-AD, sistema de injeção automática SIL-10AF acoplado a um detector de arranjo de fotodiodo PDA), utilizando coluna de fase reversa Phenomenex Luna C-18 (4,6 x 250 mm, 5 µM),

com detecção realizada através de varredura de comprimentos de onda compreendidos entre 190 e 800 nm. Para o método foi utilizado um gradiente de concentração de uma solução aquosa de ácido fórmico 0,01% (fase A) e álcool metílico (fase B) em um fluxo de trabalho de 1 mL/min, utilizando o seguinte gradiente de concentração, demonstrado em minutos (% de fase B): 0 - 10 min (20 - 50), 10 - 15 min (50 - 80), 15 - 30 min (80), 30 - 36 min (80 - 20), 36 - 42 min (20). Uma vez que os cromatogramas obtidos são tridimensionais (relacionam varredura dos comprimentos de onda (λ) compreendidos entre 190 e 800 nm, tempo de retenção e intensidade do sinal) dificulta dessa forma uma ilustração efetiva em um plano bidimensional, os cromatogramas foram analisados quanto às faixas de comprimento de onda nos quais foram verificados a presença de uma maior quantidade de picos. Nos cromatogramas apresentados a seguir, nas figuras 7 a 11 superiores, estão demonstrados os cromatogramas correspondentes aos comprimentos de onda de 251, 281 e 331 nm.

Posteriormente os extratos foram analisados por cromatografia líquida ultra rápida acoplado a ionização por eletrospray e detecção em espectrômetro de massas por tempo de voo (UFLC-ESI-TOF). As análises foram realizadas em cromatografo líquido ultra rápido Shimadzu composto de duas bombas LC-20AD, auto injetor SIL-20Aht com “loop” de 100 μ L, degaseificador DGU 20A3r e compartimento de forno de coluna CTO-20A. O sistema de detecção de massas de tempo de voo (“time of flight” – TOF) utilizado foi o Bruker microTOF II com ionização por eletrospray. As separações foram realizadas em coluna Phenomenex® Luna 3 μ C18(2) 100A (150 x 2.0 mm) a 30°C, utilizando uma solução aquosa de acetato de amônio 20 mM e 0,1% de ácido fórmico (pH 6,4) como fase móvel A e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico como fase móvel B. O gradiente de eluição empregado nas análises foi o seguinte, demonstrado em minutos (concentração de fase B): 0 – 2 min (0%); 2 – 75 min (0 – 100%); 75 – 80 min (100%); 80 – 80,1 min (100 – 0%); 80,1 – 90 min (0%); com um fluxo de trabalho de 0,2 mL/min e injeção de 10 μ L de amostra a cada corrida. O espectrômetro de massas foi configurado de modo a fazer uma varredura de m/z compreendidas entre 50 e 1100 em modo positivo seguindo os seguintes parâmetros: voltagem do capilar 4500 V; diferença do potencial -500 V; pressão do gás de nebulização 2.0 Bar; temperature de secagem 180°C; e fluxo de gás de secagem 8 L/min. Os chromatogramas foram gerados a partir do sinal obtido

pelo modo TIC “total ion chromatogram”, no qual os picos correspondem ao somatório de todas as relações massa carga m/z $[M + H]^+$ analisadas em um determinado tempo, relacionado ao tempo de retenção, demonstrado em minutos.

Em um processo de fracionamento dos extratos é importante que ambas as metodologias sejam realizadas simultaneamente, pois os sinais são gerados de formas diferentes. O detector PDA gera um sinal no momento em que uma substância que absorve radiação entre 200 e 800 nm passa por ele, enquanto o espectrômetro de massas detecta substâncias capazes de se ionizar. Idealmente o procedimento deve ser realizado seguindo parâmetros cromatográficos similares entre as duas metodologias, com o intuito de comparar os picos de acordo com os tempos de retenção, entretanto, como as análises foram realizados em períodos de desenvolvimento da tese muito distintos essa similaridade não foi seguida.

Os cromatogramas obtidos a partir da análise dos extratos supercríticos de *S. hypnoides* (figura 7), *D. menstrualis* (figura 8), *D. dichotoma* (figura 9), *C. littoralis* (figura 10) e *P. brasiliense* (figura 11) a partir de injeções de aliquotas de 10 μ L (extratos a 10 mg/mL em etanol) em cromatógrafo líquido para uma análise da composição química dos mesmos, demonstram a grande diversidade de substâncias constituintes dos extratos, indicando deste forma que o procedimento extrativo se mostrou ser extremamente eficiente nas condições empregadas.

No detector de arranjo de diodos o sinal é gerado dentro de um espectro de radiação que abrange uma ampla faixa de comprimentos de onda. Ele pode ser uma importante ferramenta para identificação de algumas classes químicas que apresentam algumas faixas de absorção características, como por exemplo os terpenos que apresentam absorção máxima em comprimentos de onda por volta de 250 nm (WALKER & HAWKINS, 1952), taninos por volta de 280 nm (GORINSTEIN *et al.*, 1993) e as micosporinas e polifenóis por volta de 330 nm (KOLODZIEJCZYK *et al.*, 1998; CARRETO & CARIGNAN, 2011), entretanto o comprimento de onda com máxima absorção é um fator intrínseco de cada molécula e varia de acordo com as diferentes configurações que as mesmas podem se apresentar (SILVERSTEIN *et al.*, 1997)

Figura 7: Cromatogramas obtidos na análise do extrato de *S. hypnoides*, monitorado em 3 comprimentos de onda: 331 nm (verde), 281 nm (azul) e 251 nm (rosa), na análise em HPLC-PDA (cromatograma superior) e no modo total ion chromatogram por LC-MS (cromatograma inferior).

Figura 8: Cromatogramas obtidos na análise do extrato de *D. menstrualis*, monitorado em 3 comprimentos de onda: 331 nm (verde), 281 nm (azul) e 251 nm (rosa), na análise em HPLC-PDA (cromatograma superior) e no modo total ion chromatogram por LC-MS (cromatograma inferior).

Figura 9: Cromatogramas obtidos na análise do extrato de *D. dichotoma*, monitorado em 3 comprimentos de onda: 331 nm (verde), 281 nm (azul) e 251 nm (rosa), na análise em HPLC-PDA (cromatograma superior) e no modo total ion chromatogram por LC-MS (cromatograma inferior).

Figura 10: Cromatogramas obtidos na análise do extrato de *C. littoralis*, monitorado em 3 comprimentos de onda: 331 nm (verde), 281 nm (azul) e 251 nm (rosa), na análise em HPLC-PDA (cromatograma superior) e no modo total ion chromatogram por LC-MS (cromatograma inferior).

Figura 11: Cromatogramas obtidos na análise do extrato de *P. brasiliense*, monitorado em 3 comprimentos de onda: 331 nm (verde), 281 nm (azul) e 251 nm (rosa), na análise em HPLC-PDA (cromatograma superior) e no modo total ion chromatogram por LC-MS (cromatograma inferior). No detalhe da figura superior ainda é demonstrado uma visão mais afastada do cromatograma em 251 nm.

O método cromatográfico em ambas as metodologias foi desenvolvido utilizando-se uma coluna de fase reversa Luna C18, que apresenta uma maior afinidade por compostos menos polares, o que representa um maior tempo de retenção para compostos que apresentam tal característica em relação aos compostos mais polares. Como podemos verificar em todos os cromatogramas, a maior parte dos picos apresentou um tempo de retenção mais próximo ao tempo de esgotamento da coluna, onde a proporção de solvente orgânico atinge o seu ápice, fato que já era esperado uma vez que o CO₂ em estado supercrítico empregado nos procedimentos extrativos apresenta um caráter extremamente apolar, devido à baixa constante dielétrica e momento dipolar molecular nulo (RAVEENDRAN *et al.*, 2005). A adição de álcool etílico ao fluído supercrítico na proporção de 4% fez com que algumas substâncias menos apolares fossem também extraídas, como pode ser visualizado em regiões centrais do cromatograma onde a proporção de solvente aquoso/orgânico é semelhante. Extrações de substâncias que apresentem essas características são encontradas na literatura (ZOUGAGH *et al.*, 2004).

O detector de arranjo de fotodiodos (PDA) apresenta uma grande vantagem em relação ao espectrômetro de massas (MS), devido ao fato de ser considerado um detector do tipo não destrutivo, ou seja, a amostra pode ser recuperada integralmente após o procedimento, enquanto no espectrômetro de massas, considerado destrutivo, não é possível recuperarmos as amostras. Por outro lado a seletividade do espectrômetro de massas é consideravelmente menor em relação ao detector PDA (SKOOG *et al.*, 2006), como pode ser verificado pela presença de uma quantidade muito maior de picos nos cromatogramas obtidos em LC-MS em relação ao PDA.

Avaliando de modo geral, os cromatogramas obtidos tanto em HPLC-PDA quanto UFLC-ESI-TOF apresentaram uma boa separação das substâncias constituintes dos extratos, uma vez que estes representam amostras extremamente complexas, contendo diversos metabólitos secundários com estruturas químicas semelhantes, sendo considerados desta forma um ponto de partida para futuros procedimentos de fracionamento dos extratos e isolamento de compostos de interesse.

5. Identificação de compostos terpenoides por cromatografia em camada delgada.

Dentre as classes de metabólitos secundários encontrados em algas marinhas pertencentes a todos as divisões de gêneros, estão os terpenos ou terpenóides (PERES *et al.*, 2012b) uma classe química bastante citada na literatura devido aos seus diferentes potenciais bioativos, como por exemplo antibiótico (DOS SANTOS *et al.*, 2013), antifúngico (KOLESNIKOVA *et al.*, 2006), antiviral (BARBOSA *et al.*, 2004a), citotóxico e antitumoral (ANTUNES *et al.*, 2011). Quimicamente essa classe de compostos é derivada de um precursor comum a todos, o isopreno (C_5H_8)_n, e o grau de conjugação do mesmo é o que define os diferentes tipos de terpenos: monoterpeno (n = 2), sesquiterpeno (n = 3), diterpeno (n = 4), triterpeno (n = 6), tetraterpeno ou carotenóide (n = 8), entetanto, bioquimicamente a biossíntese dele tem como precursores o ácido mevalônico e o metileritritol fosfato, que por sua vez são derivados da acetil-CoA e piruvato e gliceraldeído-3P, respectivamente (DEWICK, 2002).

Em uma tentativa de verificarmos a presença de compostos terpenoides nos extratos prospectados neste trabalho, foram realizadas uma avaliação por cromatografia em camada delgada seguidas de revelação com *p*-hidroxibenzaldeído, específica para terpenos, de acordo com a metodologia proposta por (MATOS, 2009). Os extratos supercríticos foram aplicados em uma placa de sílica gel F254 com 20 cm de altura, na concentração de 100 µg/mL e eluídos em cuba cromatográfica saturada com fase móvel constituída de diclorometano:tolueno na proporção de 9:1. Após a eluição a placa foi observada sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm, e posteriormente submetida a revelação com *p*-hidroxibenzaldeído seguida por aquecimento em chapa de metal. A presença de bandas de coloração azul, rosa ou violeta é indicativo da presença de compostos terpenóides.

Na figura 12 está demonstrada a placa cromatográfica de 3 formas distintas: na primeira à esquerda a placa imediatamente após o procedimento de eluição, demonstrando a maior parte das bandas cromáticas, em todos os extratos, em regiões de *R_f* baixas, compreendidas no intervalo de 0 – 0.3 de *R_f*, referente a substâncias mais polares; A figura central representa a mesma placa visualizada sob radiação ultravioleta em 254 nm, onde é possível verificar bandas, com *R_f* próximos

a 1 (região mais alta da placa), nos extratos de *P. brasiliense* e *C. littoralis* referente a substâncias não cromáticas; e a direita a representação da placa após o procedimento de revelação com *p*-hidroxibenzaldeído, na qual as bandas de coloração azul, rosa e violeta são referentes aos compostos terpenoides presentes nos extratos.

Figura 12: Cromatograma em CCD dos extratos supercríticos. Figura à esquerda: luz branca; Figura central: luz UV 253 nm; Figura à direita: placa revelada com *p*-hidroxibenzaldeído. CL: *C. littoralis*; DD: *D. dichotoma*; DM: *D. menstrualis*; PB: *P. brasiliense*; SH: *S. hypnoides*.

Como pode ser visualizada na figura 10, onde está demonstrada a placa nas três formas de avaliação, os pigmentos (mais polares) contidos nos extratos apresentaram um baixo *R_f*, por volta de 2, e não interferiram na revelação dos terpenos, que apresentaram valores de *R_f* mais altos variando de 0.3 a 1. A partir da revelação podemos verificar a grande quantidade de terpenos presentes em todos os extratos, com uma abundância consideravelmente maior presente nos cromatogramas das duas espécie de *Dictyota*, aonde são visualizadas bandas e com uma intensidade de cor mais pronunciada em relação às demais, resultado condizente com a avaliação em HPLC-PDA, na qual as espécies de *Dictyota* apresentaram o maior número de picos no cromatograma analisado em 251 nm, região de absorção referente a terpenos em geral (MANASSA, 2014). Ainda para esses dois cromatogramas podemos verificar a presença de diversas bandas de coloração azul-violeta apresentando valores de *R_f* semelhantes, indicando desta

forma a possível presença de moléculas comuns ao gênero e não somente moléculas específicas de cada espécie.

6. CONCLUSÃO

As espécies inicialmente selecionadas para o desenvolvimento do projeto, devido ao potencial que seus metabólitos possivelmente apresentariam, *Dictyota menstrualis*, *Chondria littoralis* e *Spyridia hypnoides* puderam ser coletadas em quantidade suficiente e a essas somaram-se as espécies *Dictyota dichotoma*, *Dictyota mertensii* e *Plocamium brasiliense*. As duas primeiras por representarem espécies pertencentes ao mesmo gênero da *D. menstrualis*, o que poderia representar um excelente parâmetro comparativo pelo fato de compartilharem diversos metabólitos secundários em comum, e a terceira por representar uma fonte interessante de possíveis bioativos, uma vez que são conhecidos por produzirem uma classe peculiar de metabólitos, os terpenos halogenados; além do fato de ter sido encontrada um grande volume da mesma, o que representa um fator determinante nos procedimentos posteriores de isolamento de moléculas específicas.

Os procedimentos de extração por fluido supercrítico apresentaram excelentes resultados, principalmente em relação as espécies de *Dictyota* onde foram obtidos índices de rendimento dos extratos bastante representativos e com a obtenção de uma grande quantidade de diferentes moléculas, como pode ser verificado nas análises por cromatografia líquida. As extrações realizadas com as espécies *C. littoralis* e *S. hypnoides* apresentaram índices de rendimento muito baixos em comparação aos outros e possivelmente outras metodologias extrativas fossem mais indicadas para atingir maiores índices de rendimento nessas espécies. Por outro lado, a utilização desta técnica em detrimento as metodologias convencionais de extração praticamente impossibilita a caracterização dos compostos com base na literatura, uma vez que referências relacionadas a esse tipo de extração em algas marinha é extremamente escassa.

A partir dos cromatogramas pode ser verificada a vasta diversidade de compostos para todos os extratos, representado pela grande quantidade de picos. Nos extratos das espécies de *Dictyota* sugere-se ainda, que grande parte destes

picos sejam referentes a compostos terpenoides de acordo com a grande quantidade de sinais verificados na análise dos extratos por CCD e nos cromatogramas obtidos em 251 nm.

CAPÍTULO 2

Avaliação de atividade biológica dos extratos

1. INTRODUÇÃO

A diversidade química apresentada pelas algas marinhas no que diz respeito aos seus metabólitos secundários se reflete também na grande quantidade de aplicações dos mesmos em diversas áreas como agricultura, indústria naval, construção civil, indústria de alimentos, laboratorial e principalmente com propósitos farmacológicos (CARDOZO *et al.*, 2007; PEREIRA, R. C. & COSTA-LOTUFO, 2012).

Como citado anteriormente, esta tese tem como objetivo principal realizar a prospecção de bioativos farmacológicos, e tal objetivo foi abordado de diversas formas: avaliando as atividades antioxidantes, citotóxicas contra células cancerígenas, antiparasitária e contra uma grande variedade de microorganismos patogênicos, como está descrito no presente capítulo. Além da avaliação destas atividade foi também avaliada a citotoxicidade dos extratos frente a culturas de fibroblastos saudáveis. A avaliação das atividades biológicas foi realizada com os extratos das algas provenientes da primeira coleta: *D. dichotoma*, *D. menstrualis*, *C. littoralis*, *S. hypnoides* e *P. brasiliense*. O extrato supercrítico de *D. mertensii* foi incorporado posteriormente e utilizado apenas nos estudos de fracionamento bioguiados, abordados no capítulo 3, e portanto não será descrito neste capítulo.

2. Avaliação de atividade antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila), em uma microplaca de 96 poços diferentes concentrações dos extratos solubilizados em álcool etílico foram incubados com 1 mmol.L⁻¹ de DPPH, em um volume final de 200 µL por poço. Posteriormente os extratos foram incubados em condições afóticas, à temperatura de 25°C e mantidos por 30 minutos. Após esse tempo foi realizada a leitura da placa no comprimento de onda de $\lambda = 517$ nm. As medidas foram realizadas em leitor de microplacas Tecan Ltda. Infinite® M200 onde a variação da absorção foi mensurado. Para todas as leituras foi descontado o branco (amostra sem DPPH). Os testes foram realizados em triplicata para cada concentração (YOKOZAWA *et al.*, 1998; PELLATI *et al.*, 2004; FERRERES *et al.*, 2006) e os resultados foram expressos relacionando-se a concentração com a redução da molécula de DPPH. Como controles positivo reacional foram utilizadas soluções de ácido gálico e α -tocoferol, substâncias com propriedades antioxidantes bem estabelecidas, que ainda serviram como parâmetro de comparação da atividade.

O cálculo da porcentagem de redução se deu através da equação:

$$\% \text{ Redução} = \frac{(\text{Abs}_{\text{DPPH}} - \text{Abs}_{\text{amostra}})}{\text{Abs}_{\text{DPPH}}} \times 100$$

Em que: Abs_{DPPH} é a absorção sem solução teste

Abs_{amostra} é a absorção da solução teste

O EC₅₀ é definido como sendo a concentração necessária para a redução de 50% da moléculas de DPPH. A partir do índices percentuais de redução este valor pode ser calculado através de análise estatística de regressão não linear.

Atualmente sabe-se que várias doenças que acometem os seres humanos, principalmente as neurodegenerativas, e o processo natural de envelhecimento estão intrinsicamente ligadas ao estresse oxidativo e o desequilíbrio entre os processos redox, onde a presença de antioxidantes não é suficiente para causar inibição da atividade de espécies reativas. (VELLOSA *et al.*, 2007; NAZEMIYEH *et al.*, 2009; SAMAK *et al.*, 2009). Nas algas marinhas são encontradas diversas

substâncias que exercem essa função antioxidante, portanto os extratos foram avaliados quanto a essa atividade, pois sabe-se que a suplementação com antioxidantes naturais pode constituir uma importante ferramenta na prevenção destas doenças e do envelhecimento precoce, justificando a busca por tais moléculas.

O ensaio antioxidante utilizando DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila, radical livre estável) fundamenta-se na propriedade deste radical extrair um átomo de hidrogênio de moléculas doadoras, reduzindo-se (figura 16). O elétron desemparelhado na molécula de DPPH é responsável pela absorção em 517 nm e pela coloração violeta da substância. Após reação com moléculas que apresentem potencial antioxidante, o DPPH recebe o elétron doado e a absorção neste comprimento de onda é diminuída, desencadeando uma mudança na coloração violeta para amarelo claro (MOLYNEUX, 2004; NAZEMIYEH *et al.*, 2009). É um ensaio amplamente utilizado como método de triagem de substâncias antioxidantes por ser um método simples, facilmente reproduzível, com um baixo custo, e apropriado para substâncias solúveis em solventes orgânicos (SUN *et al.*, 2012; KUSUMAWATI & INDRAYANTO, 2013).

Figura 13: Reação de redução da molécula de 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH).

O potencial antioxidante dos extratos foi avaliado em uma faixa de concentração que variou de 4 a 0,031 mg/mL, preparada por meio de diluição seriada e então incubados com a solução de DPPH. As avaliações foram realizadas em triplicata. Como parâmetros de comparação foram testadas soluções de ácido gálico e α -tocoferol em concentrações que variaram entre 4 e 0,0005 mg/mL. Os resultados estão demonstrados na figura 14, apresentados em formato de curvas dose-resposta, relacionando as concentrações testadas com o percentual de

redução do radical DPPH. Quando possível foi determinado o EC_{50} , definido como a concentração necessária para reduzir 50% das moléculas de DPPH.

A partir da análise da figura 14 podemos observar uma moderada atividade antioxidante, de acordo com esta metodologia, para todos os compostos. Dentre os extratos testados somente para o de *S. hypnoides* foi possível calcular o EC_{50} , que foi de 1,034 mg/mL, entretanto em todos os extratos pode ser observado um padrão de crescimento das curvas, os quais provavelmente atingirão o índice de EC_{50} em concentrações mais altas.

Figura 14: Curvas dose-resposta relacionando percentual de redução de DPPH com a concentração dos extratos avaliados e das substâncias ácido gálico e α-tocoferol.

Ainda para o extrato de *S. hypnoides* devemos enfatizar, o percentual máximo de redução de 98% das moléculas de DPPH, nível que não foi atingido nem mesmo pelas substâncias controle ácido gálico e α-tocoferol, os quais atingiram um máximo de redução de 90%, contudo, apresentando valores de EC_{50} bem menores, de 1,756 e 9,613 µg/mL, respectivamente.

Na literatura podem ser encontradas diversas descrições de moléculas provenientes das algas marinhas demonstrando atividade antioxidante (SATHYA *et al.*; ZHANG *et al.*, 2012; MURUGAN & IYER, 2014) incluindo dentre estas algumas espécies pertencentes ao gênero *Spyridia*, as quais exercem atividade

aparentemente devido aos compostos fenólicos que produzem (MARTINS *et al.*, 2013). Em um estudo realizado com extratos de *Spyridia fusiformis* obtidos com extratos de diferentes polaridades (BHUVANESWARI *et al.*, 2013) demonstrou ainda que a atividade foi mais pronunciada com extratos mais polares em relação aos menos polares. A partir desse fato pode-se enfatizar que as atividades demonstradas podem ainda ser aumentadas potencializadas a partir de outros tipos de extração, já que os compostos extraídos por CO₂ apresentam um caráter mais apolar.

Devemos destacar também o fato de que avaliamos extratos constituídos de inúmeras substâncias, que podem estar causando atividade mesmo estando em pequenas quantidades, ou mesmo o efeito ser decorrente de mais de uma substância concomitantemente. As substâncias antioxidantes podem ser classificadas de acordo com seu mecanismo de ação como sequestrantes de radicais livres, quelantes de íons metálicos envolvidos na peroxidação lipídica ou sequestrantes de espécies de oxigênio (FOROUMADI *et al.*, 2007; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; DE VASCONCELOS *et al.*, 2012), portanto outras metodologias de avaliação de atividade antioxidante devem ser avaliadas para verificarmos o real potencial dos extratos das algas marinhas.

3. Avaliação do potencial antifúngico dos extratos

Os extratos foram avaliados quanto aos seus potenciais antifúngicos através de duas metodologias distintas, empregando diferentes classes de fungos. A primeira metodologia utilizou fungos patógenos causadores de doença em humanos, como forma de avaliação do potencial farmacológico propriamente dito, enquanto a segunda metodologia avaliou o potencial dos extratos contra uma linhagem de fungos fitopatógenos. Embora a linhagem empregada neste segundo estudo não esteja relacionado a doenças em humanos ele é considerado um importante parâmetro de comparação com os resultados obtidos na primeira avaliação, além disso pode facilitar uma futura elucidação de mecanismo de ação pelo o qual os metabólitos estariam exercendo seu potencial.

3.1 Atividade contra fungos patógenos humanos

Nos ensaios de avaliação da atividade antifúngica contra organismos patógenos humanos, os extratos foram testados contra as espécies *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 29212, e *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112, seguindo a metodologia proposta no protocolo da NCCLS M27-A2 (NCCLS, 2002).

O crescimento dos fungos foi realizado em caldo Sabouraud dextrose em estufa a 35°C a partir de uma cultura estoque mantida a -80 °C. Após um período de incubação de 48 horas para as duas espécies de *Candida* e 72 horas para a espécie *C. neoformans*, os fungos foram semeados em placas de ágar Sabouraud 4%, e mantidos sob as mesmas condições citadas anteriormente, para a seleção das colônias de fungos a serem plaqueadas. O período de incubação nas placas foi de 24 horas para as espécies de *Candida* e 48 horas para a *C. neoformans*. Na preparação dos inóculos utilizados nos testes, duas ou três colônias são retiradas da placa e solubilizadas em aproximadamente 3 mL de solução salina 0,85% de modo a alcançar um índice turbidimétrico de 0,5 na escala de McFarland, correspondente a uma concentração de 1×10^6 UFC/mL (absorbância de 0,1 em leitura espectrofotométrica a 530 nm) (HAMMER *et al.*, 1999; BURT, 2004). A suspensão de trabalho é preparada com uma diluição 1:200 em meio de cultura RPMI 1640, resultando em uma concentração de 5×10^2 UFC/mL (NCCLS, 2002).

Os extratos supercríticos das algas foram testados em concentrações que variaram de 500 a 15,6 µg/mL, obtidos por diluição seriada, expostos a uma suspensão de trabalho contendo a concentração final de $2,5 \times 10^2$ UFC/mL em um volume final de 200 µL para cada poço de uma microplaca de 96 poços. Os extratos foram solubilizados em álcool etílico, o qual se manteve em uma concentração final de 2%, na concentração mais alta dos extratos. Nos ensaios antifúngicos contra as espécies de *C. albicans* e *C. parapsilosis* os extratos foram expostos por um período de 24 horas, enquanto no ensaio envolvendo a espécie *C. neoformans* o período de exposição foi de 48 horas. Após a incubação as placas foram avaliadas quanto ao índice turbidimétrico nos poços, para os quais foram atribuídos escores de inibição para cada grupo, sendo considerado (+) como inibição leve do crescimento das leveduras, (++) inibição moderada, (+++) inibição significativa e (+++++) inibição total do crescimento dos fungos. Como controle positivo para o ensaio foi utilizado

Fluconazol em concentrações variando de 64 a 2 µg/mL, enquanto o grupo controle negativo foi incubado com 2% de álcool etílico.

Os resultados obtidos demonstraram que nenhum dos extratos apresentou atividade contra a espécie *C. neoformans* nas concentrações testadas. Nos testes realizados contra as duas espécies de *Cândida*, o extrato de *P. brasiliense* apresentou melhores resultados em relação aos demais, e foi o único extrato a demonstrar potencial contra as duas espécies de *Cândida*, resultando em inibição significativa do crescimento de *C. parapsilosis* na concentração de 500 µg/mL e inibição moderada para as espécies *C. parapsilosis* e *albicans*, nas concentrações de 250 e 500 µg/mL, respectivamente, contudo mesmo na concentração mais alta testada não alcançou inibição total do crescimento de nenhuma das espécies. Os índices de inibição para todas as espécies estão demonstradas na tabela 2. Na figura 15 estão demonstradas as fotografias obtidas em microscópio em um aumento de 40X, referentes aos índices atribuídos para o teste empregando o extrato de *P. brasiliense*.

Tabela 2: Inibição dos extratos supercríticos das algas, em espécies de fungos patógenos humanos. Dados demonstrados em concentração em µg/mL seguido de escore de inibição entre parênteses

	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. neoformans</i>
<i>C. littoralis</i>	n.d.	n.d.	n.d.
<i>D. dichotoma</i>	n.d.	500 (++)	n.d.
<i>D. menstrualis</i>	n.d.	500 (++) 250 (+)	n.d.
<i>P. brasiliense</i>	500 (++) 250 (+)	500 (+++) 250 (++) 125 (+)	n.d.
<i>S. hypnoides</i>	n.d.	n.d.	n.d.
Fluconazol	64 - 8 (++++) 4 (+++) 2(++)	64 - 8 (++++) 4 (+++) 2(++)	64 - 8 (++++) 4 (+++) 2(++)

n.d. não determinada; (+) leve inibição; (++) inibição moderada; (+++) inibição significativa; (++++ inibição total

Os extratos obtidos a partir das espécies de *Dictyota*, tanto da espécie *dichotoma* quanto da *menstrualis*, demonstraram inibição moderada do crescimento do fungo *C. parapsilosis* nas concentrações de 500 µg/mL, enquanto os extratos de *C. littoralis* e *S. hypnoides* não demonstraram qualquer inibição contra nenhuma das espécies de fungo avaliadas, mesmo nas concentrações mais altas. O controle positivo fluconazol reduziu qualquer crescimento dos fungos nas concentrações variando de 64 a 8 µg/mL apresentando redução significativa (+++) quando testado em concentração de 4 µg/mL e moderada (++) nos grupos expostos a 2 µg/mL da droga.

Figura 15: Fotomicrografia (40x) demonstrando a inibição de crescimento do fungo *C. parapsilosis* em exposição a diferentes concentrações do extrato de *P. brasiliense*. **A** 500 µg/mL (+++); **B** 250 µg/mL (++); **C** 125 µg/mL (+); **D** controle com 2% etanol, sem inibição do crescimento.

Na literatura podem ser encontrados diversos estudos demonstrando potencial antifúngico de extratos obtidos de fontes naturais, como plantas e algas marinhas, contra fungos patogênicos humanos, como diversas espécies de *Candida* (PRABHAKAR *et al.*, 2008; GUEDES *et al.*, 2012), entretanto nenhum trabalho

relacionando especificamente a susceptibilidade da espécie *Candida parapsilosis* a extratos de algas marinhas foi encontrada. Alguns autores ainda citam a atividade antifúngica em outras espécies de candida derivada de algumas classes químicas encontradas nas algas marinhas como os terpenos (PERES *et al.*, 2012a) os florotaninos (LOPES *et al.*, 2013) e as saponinas (TSUZUKI *et al.*, 2007). Cabe ainda mencionar o fato de que as avaliações foram realizadas utilizando como parâmetro de comparação o fluconazol, uma substância com potencial antifúngico comprovado, fator que dificulta uma comparação, já que o extrato corresponde a uma grande quantidade de substâncias em concentrações muito baixas.

3.2 Bioautografia direta de fungos fitopatógenos

A metodologia da bioautografia direta tem como princípio básico a separação cromatográfica dos constituintes de uma mistura seguida de avaliação do potencial antifúngico das frações, na própria placa cromatográfica. Cepas do fungo *Cladosporium sphaerospermum* (SPC-491 da micoteca do Instituto de Botânica de São Paulo), foram cultivadas durante 12 dias em meio BDA (Difco™), em estufa úmida a uma temperatura de 28°C. Após esse período foi feita a extração dos esporos com solução de sais e glicose (6:1), a solução foi filtrada e armazenada a 18°C para posterior nebulização nas placas cromatográficas.

Soluções etanólicas dos extratos supercríticos foram aplicadas (400 µg de extrato) em formato de bandas em placas cromatográficas de sílica gel 60 GF254 Merck© e eluídas em cuba cromatográfica empregando uma mistura de diclorometano/metanol 99:1 como fase móvel. Após a eluição dos extratos a placa foi seca a temperatura ambiente, nebulizada com a solução contendo os esporos e posteriormente mantida em estufa úmida por 72 horas a uma temperatura de 28°C. Após o fungo crescer sobre a placa a formação de halos brancos indicam a presença de substâncias com potencial antifúngico (AGRIPINO *et al.*, 2004; MURAKAMI, 2009).

Na avaliação dos extratos contra a espécie *Cladosporium sphaerospermum*, demonstrado na figura 16, podemos visualizar a presença de halos de inibição de crescimento para 3 extratos diferentes, *P. brasiliense*, *D. dichotoma* e *D. menstrualis*,

sendo que na análise das duas espécies de *Dictyota* foi verificada a presença de mais de um halo de inibição.

Figura 16: Fotografia das placas de CCD após o crescimento do fungo e demonstração dos halos de inibição de crescimento (manchas brancas).

Para o extrato de *D. dichotoma*, pode ser verificada a presença de 3 halos fracos com R_f s de 0,75; 0,67 e 0,55, e um halo com atividade bastante pronunciada, com R_f de 0,32. O extrato de *D. menstrualis* demonstrou atividade em duas bandas, uma mais fraca com R_f de 0,65 e outra mais forte, em R_f de 0,36. Possivelmente a substância mais ativa nos extratos em ambas as espécies de *Dictyota*, sejam a mesma, uma vez que apresentam valores de R_f e intensidade dos halos de inibição bastante similares, além do fato de se tratar de duas espécies do mesmo gênero, com composição química similares e compartilhar diversos metabólitos específicos do gênero. Na avaliação do extrato supercrítico de *P. brasiliense* foi verificada a

presença de somente um halo de inibição, porém com atividade bastante pronunciada em Rf de 0,75. Os extratos obtidos a partir das espécies *C. littoralis* e *S. hypnoides* não apresentaram atividade pronunciada contra o fungo testado.

3.2.1 Análise quantitativa

Os extratos de *P. brasiliense*, *D. dichotoma* e *D. menstrualis*, que demonstraram a presença de ao menos uma banda ativa contra a proliferação das cepas de *C. Sphaerospermum* foram submetidas à análise quantitativa contra o mesmo fungo testado anteriormente. Na placa de CCD foram aplicadas diferentes concentrações dos extratos (50, 25, 15, 10 e 5 mg), porém não houve eluição cromatográfica dos mesmos. Posteriormente as placas foram nebulizadas com a solução de esporos na concentração de 10^5 esporos/mL de meio e mantidas em estufa sob as mesmas condições supracitadas. A formação de halos de inibição de crescimento indicaram as concentrações nas quais foi verificada atividade antifúngica.

Figura 17: Fotografia ilustrativa da placa cromatográfica na análise quantitativa de atividade antifúngica apresentada pelos extratos de *D. dichotoma*, *D. menstrualis* e *P. brasiliense* em diferentes concentrações.

Como podem ser verificado na figura 17 os três extratos demonstraram algum grau de intensidade de atividade, em todas as concentrações testadas, porém, noss extratos de *D. menstrualis* e *P. brasiliense* foram verificadas atividades muito fracas nas concentrações mais baixas testadas (10 e 5 mg). Na análise do extrato supercrítico de *D. dichotoma* podemos verificar a ausência de desenvolvimento do fungo em todas as concentrações, podendo esta atividade ser decorrente do efeito aditivo ou sinérgico das substâncias contidas no extrato, uma vez que este extrato apresentou o maior número de bandas de inibição de crescimento, com 3 bandas de fraca inibição e uma de atividade bastante intensa, no ensaio de bioautografia direta qualitativo.

Embora a metodologia não seja considerada um método de avaliação antifúngica muito sensível e realizado contra o fungo *C. sphaerospermum*, uma espécie não usualmente patógena humana (atua como patógeno somente em casos de imunodeficiência severa), a avaliação nos serve como base para as posteriores avaliações contra fungos patógenos, realizada por métodos qualitativos mais sensíveis.

Na literatura são encontradas inumeras referências relacionando o potencial antifungico a organismos marinhos (EL AMRAOUI *et al.*, 2014), entretanto são poucos os relatos deste potencial decorrente de extratos ou mesmo metabólitos produzidos por algas marinhas (STIRK *et al.*, 2007). Em relação à extração, existem relatos na literatura demosntrando a extração de susbtâncias antifúngicas por CO₂ supercritico (PIRAS *et al.*, 2014) porém as mesmas foram obtidas em plantas terrestres.

Avaliando ambos os ensaios, de uma maneira geral, verificamos que o extrato de *P. brasiliense* apresentou os melhores resultados, principalmente em relação às duas espécies de candida, onde atingiu índices de intensidade de inibição do crescimento moderado a significativo. Quimicamente, algas pertencentes ao gênero *Plocamium* diferem dos outros gêneros utilizadas neste trabalho, principalmente pela sua capacidade de incorporar halógenos de baixo peso molecular, como o cloro (Cl) e bromo (Br) à estrutura dos seus metabólitos secundários (ANTUNES *et al.*, 2011; MACHADO *et al.*, 2014). Na constituição da *P. brasiliense* são encontradas diversas moléculas halogenadas, principalmente monoterpénos, com átomos de cloro e bromo ligados a estrutura principal (GOMES, 2007), os quais possivelmente sejam

responsáveis por desencadear a atividade antifúngica de acordo com resultados citados na literatura (BRENNAN & ERICSON, 1978)

4. Avaliação do potencial antibacteriano

Nos ensaios de avaliação da atividade antibacteriana para organismos patógenos humanos, os extratos foram avaliados por exposição direta contra as espécies gram negativas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10231, e as espécies gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. A metodologia empregada foi desenvolvida seguindo o protocolo da NCCLS M7-A7 (NCCLS, 2006).

As bactérias foram cultivadas em Caldo Mueller Hinton II com cátions ajustados em estufa a 35°C, partindo de uma cultura estoque mantida a 80°C negativos, durante 24 horas. A partir da verificação da turvação do meio, indicativo de proliferação bacteriana, as bactérias foram semeadas em placas contendo ágar nutriente para a realização de uma seleção de colônias a serem utilizadas nos testes. Após um período de 24 horas os inóculos utilizados nos testes foram preparados solubilizando 3 ou 4 colônias retiradas da placa em 3 mL solução salina 0,85%. Depois de duas horas a turbidez do meio foi mensurada e caso necessário, corrigida com adição de solução salina ou mais uma alíquota de bactérias, de forma a atingir um índice de 0,5 na escala de McFarland (absorbância de 0,1 em leitura espectrofotométrica a 625 nm). A solução ajustada, contendo 1×10^8 UFC/mL, é diluída 1:100 em meio de cultura Mueller Hinton II, de forma a apresentar uma concentração final de 1×10^5 UFC/mL (HAMMER *et al.*, 1999; BURT, 2004).

De forma semelhante ao ensaio de determinação do potencial antifúngico, os extratos foram testados em concentrações variando de 500 a 15,6 µg/mL, porém a concentração final do número de bactérias expostas aos extratos foi de 5×10^4 UFC/mL em um volume final de 200 µL para cada poço de uma microplaca de 96 poços. Os extratos foram solubilizados em álcool etílico a uma concentração final de 2%, na concentração mais alta dos extratos. O tempo de exposição para todas as espécies testadas foi de 24 horas a 35°C. Após este período de incubação a

turbidimetria dos poços é avaliada, e são atribuídos os mesmos escores citados anteriormente, sendo considerado (+) como inibição leve do crescimento das bactérias, (++) inibição moderada, (+++) inibição significativa e (+++++) inibição total do crescimento das bactérias. Como controle positivo foi utilizado tetraciclina em concentrações de 64 a 2 µg/mL, enquanto o grupo controle negativo foi incubado com 2% de álcool etílico.

Dentre todas as espécies bacterianas avaliadas frente aos extratos supercríticos das algas, somente a gram positiva *Enterococcus faecalis* se mostrou sensível aos extratos, enquanto todas as outras espécies apresentaram crescimento normal, semelhante ao verificado no controle de crescimento avaliado pelo nível de turvação do meio. Os resultados obtidos estão mostrados na tabela 3.

Comparando a atividade demonstrada pelos extratos, podemos destacar as espécies *P. brasiliense* e *D. dichotoma* que levaram a uma inibição moderada da proliferação bacteriana na concentração mais alta testada, enquanto os extratos obtidos das espécies *D. menstrualis* e *S. hypnoides* atingiram uma inibição do crescimento considerada leve, na concentração de 500 µg/mL. O extrato supercrítico da espécie *C. littoralis* não resultou em qualquer índice de inibição do crescimento das bactérias.

Tabela 3: Inibição dos extratos supercríticos das algas, em espécies de bactérias patogênicas humanas gram positivas e negativas. Dados demonstrados em concentração em µg/mL seguido de escore de inibição entre parênteses.

	Gram -		Gram +		
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>C. littoralis</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>D. dichotoma</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	500 (++)
<i>D. menstrualis</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	500 (+)
<i>P. brasiliense</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	500 (++) 250 (+)
<i>S. hypnoides</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	500(+)
Tetraciclina	(++++)*	(++++)*	(++++)*	(++++)*	64 - 32 (++++) 16 (+++)

n.d. não determinada; (+) leve inibição; (++) inibição moderada;

(+++) **inibição significativa**; (++++) **inibição total**

*a tetraciclina inibiu totalmente o crescimento em todas as concentrações testadas

O resultado obtido é compatível com dados mostrados na literatura, que citam as algas como potenciais fontes de substâncias antibacterianas (AL-SAIF *et al.*, 2014). O estudo ainda cita atividade de extratos etanólico e clorofórmico de uma espécie pertencente ao gênero *Dictyota* contra a espécie *E. faecalis* entretanto outras espécies em comum também se mostraram sensíveis a esses extratos, a *S. aureus* e a *E. coli*. No trabalho realizado por (RAMALINGAM & AMUTHA, 2013) foi demonstrado ainda uma variação na atividade de acordo com a polaridade dos extratos de 4 espécies de algas, onde a bactéria *E. faecalis* se mostrou mais suscetível às frações menos polares, enquanto verificou uma maior atividade nas outras espécies de bactérias com extratos mais polares.

Em relação aos resultados, onde somente foi verificada atividade nos testes contra a espécie *E. faecalis*, podemos enfatizar o fato de esta espécie bacteriana ter sido a única, dentre as testadas, que apresentou resistência, em determinado grau, à tetraciclina, um fármaco amplamente utilizado como tratamento para infecções bacterianas, indicando desta forma que o mecanismo de ação pelo qual as moléculas demonstraram sua atividade pode ser diferente do mecanismo da tetraciclina e pode representar futuramente uma alternativa a cepas resistentes a esse antibiótico.

5. Avaliação da citotoxicidade contra células cancerígenas.

As linhagens celulares utilizadas na avaliação da atividade citotóxica são derivadas de sarcoma uterino humano e denominadas MES-SA (ATCC CRL-1976™) e sua variável resistente MES-SA/Dx5 (ATCC CRL-1977™). Estas células foram cultivadas em meio de cultura McCoy's 5A suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina 100 U/mL e 100 µg/mL de estreptomicina, pH 7,4, temperatura de 37°C e 5% de CO₂. A linhagem resistente é cultivada com a adição de doxorrubicina 0,5 µM ao meio de cultura, para a manutenção da resistência (HUA *et al.*, 2005).

Na avaliação da citotoxicidade as células foram expostas, por períodos de 24 e 72 horas a concentrações crescentes dos extratos algais, seguido de avaliação de

viabilidade celular através do ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (HERRERO *et al.*, 2006b). Inicialmente as células foram plaqueadas em microplacas de 96 poços a uma densidade celular de 5×10^3 células/poço para os grupos expostos aos extratos durante 72 horas e 10×10^3 células/poço nos grupos submetidos a 24 horas de exposição. Após um período de recuperação das células de 24 horas, o meio de cultura contendo os diferentes extratos foi incubado juntamente às células e permanece durante os períodos de exposição citados anteriormente. Os extratos supercríticos foram solubilizados em etanol, resultando em uma concentração final de 1% de etanol no meio de cultura, a mesma concentração utilizada nos grupos controle para estes testes. Paralelamente foram realizados os testes de citotoxicidade para a determinação de IC_{50} da doxorrubicina nas duas linhagens celulares MES-SA e MES-SA/Dx5 utilizando as mesmas condições experimentais dos testes com os extratos, a fim de ser empregado como parâmetro de comparação de atividade.

No ensaio de viabilidade o MTT, que apresenta coloração amarela, é reduzido por enzimas mitocondriais a formazana na presença de células viáveis, formando cristais de coloração violeta. O meio de cultura contendo os extratos é substituído por meio de cultura contendo o MTT na concentração de 500 mg/mL. Após um período de 4 horas o meio de cultura é retirado e os cristal de formazana, aderidos ao fundo da placa, são solubilizados em DMSO para a realização da leitura em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 570 nm. O Resultado final é expresso em percentual de células viáveis em relação a um grupo controle que não sofreu exposição aos extratos.

Para este ensaio de avaliação da atividade citotóxica, os extratos supercríticos das algas foram testados frente a culturas de células MES-SA, células cancerígenas derivadas de sarcoma uterino humano descritas primeiramente por Harker, 1983 (HARKER *et al.*, 1983). Esta linhagem celular possui duas variáveis mutantes comercialmente disponíveis, resistentes a doxorrubicina (MES-SA/Dx5) e mitoxantrona (MES-SA/MX2) o que as torna interessantes do ponto de vista do desenvolvimento de novos fármacos, pois em caso de atividade pronunciada podemos avaliar diferentes mecanismos de ação em relação aos apresentados pelas drogas para as quais as células demonstram resistência (WESOLOWSKA *et*

al., 2005). Em um primeiro ensaio foram determinadas as curvas dose-resposta da atividade citotóxica da doxorrubicina nas linhagens selvagem (MES-SA) e na variável resistente a doxorrubicina (MES-SA/Dx5). Esse ensaio tem como objetivos verificar a manutenção da resistência na variável Dx5, bem como a obtenção de um valor de IC₅₀, correspondente à dose necessária para reduzir uma população celular à metade, para posteriores fins de comparação com possíveis ativos isolados das algas.

Figura 18: Curvas dose-resposta da exposição das linhagens MES-SA e MES-SA/Dx5 à doxorrubicina.

O padrão de resistência na curva obtida para a Dx5 em comparação à curva da SA, verificado na figura 18, pode ser exemplificado na condição de exposição a 10 μ M de doxorrubicina, o qual resulta em um percentual de somente 5,6% de células viáveis da linhagem SA enquanto 93,4% das células, permanecem viáveis na cultura de Dx5. Os valores de IC₅₀ de ambas as curvas foram obtidos através da equação da curva empregando o cálculo de ajuste sigmoidal e correspondem a 232 ± 22 nM para a linhagem MES-SA e 110 ± 7 μ M para MES-SA/Dx5.

Nos ensaios envolvendo os extratos algais foram testadas concentrações compreendidas em uma faixa bastante ampla, englobando 4 ordens de magnitude, em concentrações que variaram de 100 ng até 0,5 mg de extrato algal dissolvidos

em 1 mL de meio de cultura. Nos ensaios onde as células foram expostas às concentrações mais altas dos extratos supercríticos foi verificado a mortalidade de praticamente 100% das células, tanto SA quanto Dx5, a exceção do ensaio foi na exposição ao extrato de *S. hypnoides* onde foi verificado um índice de mortalidade de 92% das células SA e 90% das células Dx5. Analisando-se as figuras 19 e 20 podemos verificar o padrão de atividade nas curvas dose-respostas obtidas, onde é verificada uma atividade mais pronunciada nas espécies *D. dichotoma*, *D. menstrualis* e *P. brasiliense* em relação à atividade demonstrada pelas espécies *C. littoralis* e *S. hypnoides*.

Figura 19: Curvas de sobrevivência de células MES-SA expostas por 72 horas a diferentes concentrações (0,1 a 500 µg/mL) dos extratos supercríticos das algas.

Realizando-se uma análise comparativa das duas figuras podemos verificar um padrão similar de sobrevivência tanto da linhagem selvagem SA quanto na variável resistente Dx5, somando-se a isto o fato de que as concentrações mais altas dos extratos levaram a uma alteração da coloração do meio de cultura, supõe-se que a sobrevivência celular pode estar ligada a uma possível alteração da composição do meio de cultura com modificação de pH do mesmo, fator que tem uma grande influência no metabolismo das células (TANNOCK & ROTIN, 1989). Uma vez que são verificadas estas alterações, impossibilita a inferência de que a

atividade citotóxica é decorrente da atividade das substâncias contidas nos extratos, contudo não podemos excluir a hipótese de que seja este mesmo a causa da morte celular. Em uma análises futuras este parâmetro deve ser monitorado durante todo o desenvolvimento do ensaio, pois dependendo do resultado obtido poderemos confirmar ou excluir tal hipótese. Outro ponto que deve ser levado em conta em caso de confirmação da hipótese é o fato que a linhagem resistente Dx5 demonstra uma maior sensibilidade à alteração de composição e pH em relação à linhagem SA, pois nas concentrações mais altas (50, 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$) dos ensaios com *C. littoralis* e *S. hypnoides*, é evidente o menor índice de sobrevivência celular. Fato que também é verificado na exposição ao extrato de *D. dichotoma*, porém neste caso foi verificada a diferença em concentrações muito mais baixas, onde após a exposição a uma concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ restaram 75% de células Dx5 contra 91% de células SA viáveis.

Figura 20: Curvas de sobrevivência de células MES-SA/Dx5 expostas por 72 horas a diferentes concentrações (0,1 a 500 $\mu\text{g/mL}$) dos extratos supercríticos das algas.

Como esta concentração de extrato dificilmente modificaria o meio em intensidade suficiente para causar morte celular, surge à hipótese de que diferença nos índices de mortalidade celular deve-se à presença de alguma substância citotóxica que apresente um mecanismo de ação diferente da doxorrubicina, uma

vez que esta linhagem também apresenta resistência a análogos da doxorubicina e substâncias que atuam de forma similar (WESOLOWSKA *et al.*, 2005).

Com relação aos diferentes tempos de exposição dos extratos às células, 24 e 72 horas, não é verificada diferença significativa de atividade com uma ação levemente pronunciada para os maiores tempos de exposição somente em alguns extratos, como pode ser exemplificado na figura 21 onde são demonstradas as curvas de sobrevivência após exposição ao extrato de *D. dichotoma* pelos diferentes tempos. Analisando todos os ensaios de uma maneira geral as curvas são bastante similares demonstrando assim que a atividade ocorre somente durante as primeiras horas de exposição.

Figura 21: Curvas de sobrevivência de células MES-SA expostas por 24 e 72 horas a diferentes concentrações (0,1 a 500 µg/mL) do extrato supercrítico da alga *D. dichotoma*.

Dentre todos os tipos de atividade descritos no presente trabalho, a atividade citotóxica contra células cancerígenas, também descrita por alguns autores como atividade anti-cancer, é certamente a mais estudada. Na literatura podem ser encontradas milhares de referências relacionadas a esse tema, inclusive sobre estudos de moléculas de fontes naturais (MONDAL *et al.*, 2012). A grande diversidade de estruturas químicas empregadas com esse propósito é proporcional

aos mais de 100 tipos de câncer existentes (NCI, 2015). Dentre as drogas de origem vegetal, uma das mais conhecidas é o paclitaxel, uma droga empregada no tratamento de diferentes tipos de câncer que foi isolada a mais de 5 décadas da casca da árvore *Taxus brevifolia* (EXPÓSITO *et al.*, 2009). Em relação aos metabólitos produzidos pelas algas são descritas como potenciais ativos contra células cancerígenas os terpenoides, as laminarinas, os fucoidanos, compostos polifenólicos (BOOPATHY & KATHIRESAN, 2010; MOUSSAVOU *et al.*, 2014) e os carotenóides (BOOMINATHAN & MAHESH, 2015). Esta última classe citada é conhecida por ser produzida por todas as espécies de algas e possivelmente estejam presentes nos extratos avaliados neste trabalho, pois sabe-se que são extraídos por CO₂ supercrítico nas mesmas condições utilizadas no processo (MENDES *et al.*, 1995).

6. Avaliação da atividade Leishmanicida

O ensaio de avaliação do potencial leishmanicida *in vitro* dos extratos supercríticos das algas foi realizado contra a forma promastigota de *L. amazonensis* por meio de exposição direta, de acordo com a metodologia descrita por (DUTRA *et al.*, 2014). O ensaio foi realizado em colaboração com a Prof. Dr. Márcia A. S. Graminha da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, campus Araraquara.

A forma promastigota do parasita *Leishmania amazonensis*, que corresponde a forma infectante do mesmo, foi mantidos em cultivo em meio de cultura LIT (liver infusion tryptose) a 28°C, e utilizados durante a fase logarítmica do crescimento. Os extratos foram testados em concentrações variando de 100 a 1,56 µg/mL, preparados por diluição seriada e dispostos em placas de 96 poços contendo os parasitas em concentração de 8×10^6 parasitas/mL com um volume final de 100 µL por poço. Os extratos foram solubilizados em álcool etílico resultando em uma concentração final máxima de 3% de etanol e testados em triplicata para cada concentração. Após um período de exposição de 72 horas a viabilidade dos parasitas foi avaliada através de contagem em câmara de Neubauer. O Resultado final é expresso em percentual de células viáveis em relação a um grupo controle

que não sofreu exposição aos extratos. O valor referente ao IC₅₀ é correspondente à concentração necessária para redução de 50% do número de parasitas.

Na figura 22, estão demonstradas as curvas dose resposta relacionando as diferentes concentrações, variando de 100 a 1,56 µg/mL, com os índices de mortalidade alcançados pelas mesmas. A partir das curvas foram calculados os índice de IC₅₀ para os diferentes extratos através de regressão linear.

Figura 22: Curvas de sobrevivência de parasitas expostos por 24 horas a diferentes concentrações (1,5 a 100 µg/mL) dos extratos supercríticos das algas.

Como pode ser visualizada no gráfico mostrando as curvas dose resposta, todos os extratos testados apresentaram atividade leishmanicida até a concentração mais baixa testada, de 1,56 µg/mL, onde foi verificado um percentual de viabilidade de 90% dos parasitas para o extrato de *P. brasiliense* e 52% para o extrato de *D. dichotoma*, o percentual mais alto e baixo, respectivamente. Os extratos das espécies *Dictyota* atingiram os melhores resultados dentre todos os extratos, onde foram verificados os menores índices de sobrevivência nas menores concentrações testadas, 52 e 68% de sobrevivência para os extratos de *D. dichotoma* e *D. menstrualis*, respectivamente, correspondendo a valores de IC₅₀ de 2,83 e 1,84

µg/mL, contudo os demais extratos também apresentaram valores de IC₅₀ bastante satisfatórios de 3,51 e 5,72 µg/mL para os extratos de *P. brasiliense* e *C. littoralis*, e 28,3 para o extrato de *S. hypnoides*.

A possível presença de moléculas terpenóides nos extratos de *Dictyota* e *P. brasiliense*, nesta última em menor quantidade em relação as primeiras, como foi demonstrado no capítulo anterior, pode ser a responsável pela atividade leishmanicida, bem como descrito recentemente na literatura para esta classe de compostos (CHAN-BACAB & PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001; RAMOS *et al.*, 2014). Como descrito por TORRES *et al.*, 2014, atualmente são conhecidas diversas moléculas produzidas por algas marinhas com o potencial de apresentar essa atividade contra parasitas do gênero *Leishmania*, incluído entre essas moléculas o dolabeladienotriol, um diterpeno produzido pela espécie *Dictyota pfaffii* (SOARES *et al.*, 2012), molécula que possivelmente apresente algum análogo como constituinte das espécies *D. dichotoma* e *D. mentrualis* descritas neste trabalho

7. Avaliação da atividade esquistossomicida

Na avaliação da atividade esquistossomicida a ação dos extratos foi avaliado contra casais adultos de *Schistosoma mansoni* por meio de exposição direta. Esta etapa do ciclo de vida dos parasitas corresponde a doença já implantada em humanos (NCI, 2015) e a intenção primordial da avaliação é o desenvolvimento de novas formas de tratamento para a doença. Os ensaios foram realizados em colaboração com a pesquisadora Eliana Nakano do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan.

Os parasitas adultos de *Schistosoma mansoni* foram obtidos por perfusão do sistema porta-hepático de hamster-sírio *Mesocricetus auratus* infectados com cercárias (forma infectante) 45 dias anteriormente a perfusão. Os vermes foram separados em um casal a cada poço de uma placa de 24 poços contendo os extratos solubilizados em 2 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina 100 U/mL e 100 µg/mL de estreptomicina e mantidos a 37°C. Os extratos foram solubilizados em DMSO resultando em uma concentração final de 1,5% de DMSO no meio de cultura. O índice de sobrevivência dos vermes foi avaliada nos tempos de 2, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a exposição aos extratos,

sendo considerada como morte a ausência de motilidade. A cada tempo citado foi avaliado ainda o índice de separação dos casais e ao final das 120 horas avaliada a ovoposição. Os resultados de índice de mortalidade são demonstrados em percentual de vermes mortos. Em um primeiro ensaio os extratos foram testados em uma concentração de 500 µg/mL, e em caso de resultado positivo os ensaios foram repetidos na concentração de 100 µg/mL.

Na primeira avaliação da atividade dos extratos supercríticos, em concentração de 500 µg/mL, sete casais foram testados para cada extrato, e cinco para os controles negativo e positivo. Como controle negativo os vermes foram incubados em meio de cultura contendo 1% de DMSO, seguindo as mesmas condições de exposição aos extratos solubilizados neste solvente. Os grupos controle positivo foram expostos a 1,5 µg/mL de praziquantel, um fármaco anti-helmíntico utilizado no tratamento de infecções por *S. mansoni*. Outros parâmetros como a separação dos casais e o índice de ovoposição também foram avaliados no estudo, entretanto como estes fatores estão frequentemente associados à mortalidade do parasita, eles não foram incluídos na tabela de avaliação e foram citados separadamente quando a ocorrência foi relevante. Após cada período de incubação foi observada a motilidade dos parasitas. Foi considerado mortalidade quando os vermes não apresentaram movimento, porém são atribuídos outros índices quando existe uma motilidade levemente reduzida ou redução significativa.

Dentre os extratos testados, demonstrados na tabela 4, podemos destacar as espécies *D. menstrualis* e *P. brasiliense*, uma vez que não foi verificado qualquer índice de sobrevivência após 24 horas de exposição, ainda, todos parasitas destes grupos já demonstravam uma redução significativa dos movimentos durante a primeira avaliação, 2 horas após a incubação, fato que também foi verificado no grupo exposto ao extrato de *D. dichotoma*, porém a mortalidade total do grupo exposto a esse extrato só foi verificada após 48 horas de exposição.

Para o grupo tratado com o extrato de *C. littoralis*, a mortalidade total dos parasitas foi verificada somente após 96 horas de incubação, no entanto a separação dos casais já pode ser observada logo nas primeiras 24 horas, fator que pode ser considerado limitante para a continuidade do ciclo reprodutivo dos parasitas. O extrato de *S. hypnoides* alcançou o índice de 50% de mortalidade ao final do ensaio, índice considerado baixo quando em comparação aos demais

extratos testados e somente foi verificada a separação total dos casais após 96 horas, contudo o número médio de ovos contados ao final do ensaio foi de 5, valor muito inferior à média de 289 ovos contados no grupo controle negativo. Em todos os outros grupos não foi verificado a presença de ovos nos poços ao final do ensaio.

Tabela 4: Índices de mortalidade demonstrado em percentual de indivíduos mortos após exposição a 500 µg/mL dos extratos, avaliados em diferentes períodos de tempo.

Tempo de exposição (h)	500 µg/mL (% de mortalidade)				
	<i>C. littoralis</i>	<i>D. dichotoma</i>	<i>D. menstrualis</i>	<i>P. brasiliense</i>	<i>S. hypnoides</i>
2	0	0	0	0	0
24	0	80	92,8	100	0
48	0	100	100	100	0
72	85,7	100	100	100	0
96	100	100	100	100	7,1
120	100	100	100	100	50

Como os resultados obtidos se mostraram promissores, principalmente em relação os extratos das duas espécies *Dictyota* e para a espécie *P. brasiliense*, o ensaio foi repetido usando concentrações de 100 µg/mL. Nesta segunda avaliação da atividade esquistossomicida, o ensaio foi conduzido de forma semelhante ao ensaio realizado anteriormente alterando-se somente o número de casais testados para 5. Os resultados de índice de mortalidade obtidos neste segundo ensaio estão demonstrados na tabela 5.

De forma semelhante ao resultado obtido no primeiro ensaio, os extratos que mais se destacaram foram provenientes das espécies *D. dichotoma*, *D. menstrualis* e *P. brasiliense*. Ambas as espécies alcançaram 100% de mortalidade porém em tempos diferentes, após 72 horas para o extrato supercrítico de *P. brasiliense*, 96 horas para *D. dichotoma* e 48 horas para a espécie *D. menstrualis*. Para esta última espécie citada cabe ainda salientar que após 24 horas do início do ensaio, o índice

de mortalidade atingido foi de 80%, e somente um dos casais expostos ainda demonstrava motilidade com uma redução significativa.

Tabela 5: Índices de mortalidade demonstrado em percentual de indivíduos mortos após exposição a 100 µg/mL dos extratos, avaliados em diferentes períodos de tempo.

Tempo de exposição (h)	100 µg/mL (% de mortalidade)				
	<i>C. littoralis</i>	<i>D. dichotoma</i>	<i>D. menstrualis</i>	<i>P. brasiliense</i>	<i>S. hypnoides</i>
2	0	0	0	0	0
24	0	0	80	0	0
48	0	30	100	80	0
72	0	80	100	100	0
96	0	100	100	100	0
120	0	100	100	100	0

Os extratos das espécies *C. littoralis* e *S. hypnoides* testados na concentração de 100 µg/mL não ocasionaram a morte de nenhum dos indivíduos expostos, apenas desencadearam uma leve redução de motilidade após 120 horas de exposição. No grupo tratado com extrato de *C. littoralis* foi apenas verificada uma redução do número de ovos ao final do experimento para 89, enquanto na contagem para o grupo tratado com o extrato de *S. hypnoides* não foi verificada diferença.

Uma vez que estes dois últimos extratos demonstraram resultados inferiores aos apresentados pelos extratos das espécies *P. brasiliense*, *D. dichotoma* e *D. menstrualis*, eles não foram considerados como prioridade na continuidade dos ensaios. As etapas posteriores dos ensaios incluíram a avaliação das frações dos extratos ativos das espécies *D. dichotoma*, *D. menstrualis* e ainda foi incluída uma terceira espécie pertencente ao gênero, a *D. mertensii*. Os procedimentos seguintes foram realizados a partir de uma abordagem que segue o fracionamento bioquímico dos extratos e estão demonstradas no capítulo 3 subsequente.

8. Avaliação da citotoxicidade em fibroblastos saudáveis

Os ensaios de avaliação de toxicidade representam um ponto crucial no desenvolvimento de qualquer produto que tenha como finalidade o seu emprego farmacológico e atualmente, com o controle cada vez mais rigoroso em relação à utilização de animais de laboratório, os ensaios empregando culturas celulares representam uma alternativa bastante viável de avaliação deste parâmetro (ROGERO *et al.*, 2003). Para avaliarmos a toxicidade dos extratos supercríticos das algas utilizadas neste trabalho foi empregada uma metodologia de avaliação de citotoxicidade contra linhagens de fibroblastos saudáveis.

Para a determinação deste parâmetro foram utilizados culturas de fibroblastos murinos NIH-3T3 (ATCC® CLR-1658™) e fibroblastos humanos derivados de cultura primária isolada de tecido de prepúcio humano, denominadas “P4”. Ambas as linhagens foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 4 mM glutamina, penicilina (100 IU), estreptomicina (100 µg/mL) e anfotericina B (0,25 µg/mL), sob condições controladas, temperatura de 37°C e atmosfera saturada com 5% de CO₂. As culturas celulares foram mantidas em garrafas de 75 cm² até atingirem a densidade de 1 x 10⁵ células/mL, quando foram transferidas para placas de 96 poços, a uma densidade de 1 x 10⁴ células/poço, e incubadas por um período de 24 horas. Após esse tempo os extratos solubilizados no meio de cultura foram incorporados em concentrações que variaram de 500 a 0,1 µg/mL e mantidos durante um período de exposição total de 24 horas. Os extratos supercríticos foram solubilizados em etanol atingindo uma concentração final máxima de 1% de etanol no meio de cultura, mesma concentração utilizada nos grupos controle negativo para estes testes. Posteriormente ao período de exposição aos extratos, as células foram lavadas com PBS e avaliado o índice de viabilidade celular através da metodologia do MTT, de forma semelhante à descrita na avaliação de citotoxicidade contra células cancerígenas. O Resultado final foi expresso em percentual de células viáveis em relação a um grupo controle que não sofreu exposição aos extratos. Todas as avaliações foram realizadas em triplicata e os desvios obtidos estão demonstrados na figura relacionada.

A faixa de concentração dos extratos testada neste ensaio compreende concentrações superiores ou equivalentes às empregadas nas determinações dos diversos potenciais biológicos descritos neste trabalho, justificando assim a importância deste estudo como um parâmetro de comparação. Nas figuras 23 e 24 podemos verificar as curvas de viabilidade celular dos fibroblastos NIH-3T3 e P4, respectivamente, após exposição de 24 horas aos extratos supercríticos algais. Comparando-se os resultados obtidos para as duas linhagens celulares é verificado um sensibilidade ligeiramente maior da linhagem 3T3 aos extratos, para a qual foi verificada valores de IC₅₀ (concentração necessária para diminuir a viabilidade celular em 50%) menores em relação aos obtidos para a linhagem de fibroblasto humano. Os valores de IC₅₀ para as duas linhagens foram os seguintes: Fibroblasto humano P4 (µg/mL): *C. littoralis* 435,15 ± 8,59, *D. dichotoma* 48,81 ± 1,37, *D. menstrualis* 10,52 ± 0,23, *P. brasiliense* 43,64 ± 1,60, para o extrato *S. hypnoides* não foi possível determinar uma vez que a maior concentração testada (500 µg/mL) não atingiu um índice de 50% de mortalidade celular. Para a linhagem de fibroblasto NIH-3T3 foram obtidos os seguinte valores de IC₅₀ (µg/mL): *C. littoralis* 96,52 ± 4,01, *D. dichotoma* 50,17 ± 0,15, *D. menstrualis* 5,56 ± 0,23, *P. brasiliense* 10,55 ± 0,13, *S. hypnoides* 435,25 ± 7,59.

Figura 23: Curvas de viabilidade celular da linhagem de fibroblastos humanos P4 após exposição a diferentes concentrações dos extratos supercríticos algais por um período de 24 horas.

Figura 24: Curvas de viabilidade celular da linhagem de fibroblastos murinos NIH-3T3 após exposição a diferentes concentrações dos extratos supercríticos algais por um período de 24 horas.

Em uma análise geral comparativa dos extratos, o maior índice de citotoxicidade foi verificado na exposição das células ao extrato de *D. menstrualis*, seguido pelos extratos de *P. brasiliense* e *D. dichotoma*, nesta ordem, justamente os extratos nos quais foram obtidos os melhores resultados na avaliação dos potenciais biológicos, contudo os valores de IC₅₀ encontrados no ensaio citotóxico são em alguns casos maiores do que a concentração efetiva nos ensaios biológicos, como por exemplo a atividade contra a forma promastigota de *Leishmania amazonensis* na qual foram encontrados valores de IC₅₀ inferiores a 3 µg/mL para os extratos das espécies de *D. menstrualis* e *D. dichotoma*, concentração na qual o índice de citotoxicidade é praticamente zero. Em relação às outras atividades os índices de toxicidade acabam se sobrepondo sobre as concentrações efetivas, contudo, como os extratos representam amostras bastante complexas existe ainda a possibilidade de a possível substância ativa nos ensaios biológicos não apresentar potencial citotóxico quando avaliada isoladamente. Para isso, os testes deverão necessariamente ser repetidos posteriormente aos procedimentos de fracionamento e isolamento de constituintes que apresentem bioatividade.

9. CONCLUSÃO

Analizando os resultados obtidos na avaliação das atividades biológicas descritas nesse capítulo podemos verificar alguns pontos importantes:

Todos os extratos demonstraram potencial antioxidante em algum grau de intensidade, enfatizando aqui o extrato de *Spyridia hypnoides*, para o qual se obteve índices de atividade maiores do que os alcançados pelas substâncias ácido gálico e α -tocoferol utilizadas como controle positivo. Contudo, para podermos avaliar mais profundamente esse potencial devem ser incluídas outras metodologias complementares, como a avaliação de atividade seuquestrante de oxigênio e proteção contra a peroxidação lipídica, demonstrando desta forma a atividade antioxidante por outros mecanismos.

Na avaliação do potencial antifúngico tanto para fungos fitopatógenos quanto para patógenos humanos, podemos destacar os extratos de *D. dichotoma*, *D. menstrualis* e principalmente o extrato de *P. brasiliense*, os quais atingiram os

maiores índices de atividade para as duas classes de fungos e representam uma potencial fonte de substâncias antifúngicas.

Em relação à atividade antibacteriana, os extratos demonstraram atividade contra apenas uma das cinco espécies avaliadas, *E. faecalis*, para esta avaliação podemos destacar novamente as espécies de *Dictyota* e a *P. brasiliense*. Contudo em nenhuma dos testes pode ser verificada uma atividade muito pronunciada, e portanto ensaios futuros com este propósito não são considerados prioritários.

Nos testes de atividade citotóxica contra células cancerígenas MES-SA e MES-SA/Dx5, os resultados apresentados demonstram uma maior atividade, mais uma vez, para os extratos de *Dictyota* e *P. brasiliense* em relação aos demais. O destaque maior ficou para o extrato supercrítico da espécie *D. dichotoma*, que apresentou para a variável resistente um valor de IC₅₀ inferior ao valor obtido para a própria linhagem selvagem. Porém para podermos afirmar, com embasamento teórico, uma possível atividade contra células resistentes devemos aprofundar os estudos.

No ensaio de avaliação do potencial leishmanicida todos os extratos se mostraram promissores. Em todos os grupos testados pode ser verificado um índice de pelo menos 10% de morte dos parasitas mesmo na menor concentração testada. Os menores valores de IC₅₀ foram obtidos para as duas espécies de *Dictyota*.

Todos os extratos demonstraram atividade esquistossomicida porém, com diferentes intensidades. Os extratos das espécies *C. littoralis* e *S. hipnoides* somente apresentaram atividade na concentração mais alta testada, enquanto os demais extratos apresentaram atividade bastante pronunciada mesmo em concentrações cinco vezes menor, e em um baixo tempo de exposição. O extrato de *D. menstrualis* apresentou a maior atividade dentre todos os testados e foi considerado como prioritário nos procedimentos posteriores de fracionamento bioguiado.

Na avaliação da citotoxicidade dos extratos, realizado através de avaliação *in vitro* em duas linhagens distintas de fibroblastos saudáveis, foram determinados índices de IC₅₀ em concentrações equivalentes ou superiores às concentrações efetivas dos extratos nas atividades biológicas citadas anteriormente. Dentre todas as espécies extrato de *D. menstrualis* apresentou os maiores índices de toxicidade contra as células seguidos dos extratos de *P. brasiliense* e *D. dichotoma*, respectivamente.

Em uma avaliação geral das atividades biológicas, os extratos supercríticos que atingiram os melhores resultados foram das espécies *Dictyota dichotoma*, *Dictyota menstrualis* e *Plocamium brasiliense*, representando potenciais fontes de compostos bioativos. Os extratos das espécies *Chondria littoralis* e *Spyridia hypnoides* também demonstraram alguma intensidade de atividade, mas em intensidade muito menor.

Uma das principais dificuldades em avaliar atividades biológicas de extratos está relacionada à complexidade química apresentada pelos mesmos, uma vez que uma atividade de intensidade moderada pode estar relacionada a um baixo nível de atividade de várias substâncias simultaneamente, a partir de um efeito sinérgico ou aditivo ou mesmo a uma atividade pronunciada de uma única substância que se encontra em baixa concentração. Somando-se a isso o fato de que a citotoxicidade dos mesmos pode ser decorrente de uma substância diferente da molécula ativa, justifica-se desta forma a necessidade de avaliarmos isoladamente as frações e os constituintes isolados das amostras. Uma vez que os processos de fracionamento e isolamento demandam uma grande carga de trabalho e tempo, foi necessário estipular prioridades. Desta forma, o processo de fracionamento foi iniciado com os extratos de duas das espécies que apresentaram os melhores resultados *Dictyota dichotoma* e *Dictyota menstrualis* e a elas foi agregada ainda uma terceira espécie a *Dictyota mertensii*, como será descrito no capítulo 3.

CAPÍTULO 3

Fracionamento bioguiado pela atividade esquistossomicida

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas metodologias cromatográficas e analíticas mais robustas e sofisticadas, tem se mostrado um grande aliado no processo de descoberta e desenvolvimento de novas drogas oriundos de fontes naturais (WELLER, 2012). A descoberta de uma nova molécula com propriedades terapêuticas é um processo extremamente complexo, caro e que demanda uma grande quantidade de tempo para ser finalizado (CHANDRAKANT *et al.*, 2012). Como forma de simplificar este processo, algumas abordagens podem ser empregadas como por exemplo o estudo químico das fontes de compostos terapêuticos orientados pela análise da atividade biológica, também conhecido como “fracionamento bioguiado” (CALIXTO, 2001). Neste tipo de abordagem cada etapa do procedimento de fracionamento de um extrato, até o isolamento de uma determinada substância, é dependente do resultado obtido na avaliação da atividade biológica e somente é passível de ser realizado quando são aliadas diferentes técnicas. A principal vantagem desta abordagem está na relação custo-benefício, tanto em relação ao tempo quanto ao gasto de materiais (CASSIANO, 2014).

Os procedimentos empregados para a realização do fracionamento bioguiado dos extratos supercríticos das espécies de *Dictyota*, descritos a seguir, foram realizados de maneira sequencial e está descrito desta maneira, empregando extratos de diferentes espécies cujas frações foram analisadas comparativamente através de técnicas cromatográficas e de espectrometria de massas.

2. Fracionamento do extrato supercrítico de *D. dichotoma* por CCD preparativa

Os procedimentos de fracionamento dos extratos supercríticos foram realizados através de metodologias cromatográficas preparativas em camada delgada utilizando placas Techware Analtech Inc., medindo 20 x 20 cm e 500 μm de espessura de fase estacionária de sílica gel GF. O extrato supercrítico de *D. dichotoma* (60 mg) solubilizado em 500 μL de álcool etílico, foi aplicado em uma linha horizontal 2 centímetros acima da borda inferior da placa com o auxílio de um tubo capilar, da forma mais homogênea possível, para que todos os pontos da linha apresentassem concentrações semelhantes de extrato. A aplicação de uma linha inteira consumiu aproximadamente 100 μL da solução, portanto o procedimento foi repetido por 5 vezes com um intervalo de tempo entre cada uma delas para a evaporação do solvente. Na figura 25, está demonstrada uma placa de cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa após a aplicação do extrato e antes de ser eluída na cuba cromatográfica.

Figura 25: Aplicação do extrato supercrítico de *D. dichotoma* em placa de cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa.

Após a evaporação completa do solvente, a placa contendo somente a estreita faixa de extrato foi posicionada na cuba cromatográfica, saturada previamente, durante 30 minutos, com uma mistura de diclorometano e tolueno na proporção de 9:1. Foram utilizados 200 mL de fase móvel, volume necessário para atingir uma altura de aproximadamente 1 centímetro na cuba cromatográfica, de forma que o extrato aplicado na placa ficasse acima do nível do solvente e não fosse dissolvido pelo mesmo. A placa foi mantida em contato com a fase móvel durante o tempo necessário para que o solvente da fase móvel eluísse até aproximadamente 1 cm da borda superior da placa, contudo devido à utilização de um volume de solvente menor que o necessário não foi possível atingir uma eluição completa da placa, procedimento que levou em torno de 30 minutos. A placa foi então retirada da cuba cromatográfica e mantida dentro da capela de exaustão até a completa evaporação do solvente residual da placa.

Posteriormente a corrida cromatográfica, a placa foi então analisada visualmente em relação a separação de bandas de diferentes colorações e tonalidades e também em câmara de ultravioleta para a verificação de bandas formadas por compostos fluorescentes. Como pode ser observado na placa da figura 26, a eluição da banda não ocorreu de forma homogênea, fato que pode ser hipoteticamente explicado pela diferença na concentração do extrato em cada ponto de aplicação. O extrato localizado na região esquerda da placa, que aparentava estar menos concentrado apresentou um deslocamento muito maior em comparação à região direita, principalmente nas secções 2 e 3 da placa. Esta diferença na concentração ao longo da aplicação reflete a dificuldade de se fazer manualmente uma aplicação de forma totalmente homogênea, entretanto o resultado final não foi prejudicado, já que a delimitação das bandas foi facilmente visualizada durante o processo de raspagem das bandas de sílica. Outro problema ocorrido durante o procedimento cromatográfico foi a utilização de um volume muito pequeno de solvente, propositalmente para evitar que atingisse a altura da banda de aplicação do extrato, contudo, o mesmo acabou se mostrando insuficiente, pois a placa não teve uma eluição completa, fazendo com que as bandas cromáticas apresentassem um baixo R_f , justificando assim a presença da banda de intensa coloração na secção 1. Ambos os problemas foram contornados nos procedimentos de fracionamento realizados posteriormente

Figura 26: Placa cromatográfica resultante do procedimento de cromatografia em camada delgada preparativa do extrato supercrítico de *D. dichotoma*.

Todas as bandas foram demarcadas digitalmente, como pode ser visualizado na figura 30 e a sílica correspondente a cada uma delas foi retirada da placa individualmente por meio de raspagem e separadas em diferentes tubos tipo Falcon com capacidade de 50 mL devidamente numerados. A sílica contida nos tubos foi extraída com 30 mL de álcool etílico P.A. mantidos sob agitação constante durante 4 horas a temperatura ambiente. Após o período de agitação os tubos foram então centrifugados a 7000 rpm para concentração da sílica no fundo dos tubos e o solvente sobrenadante foi separado e filtrado em papel filtro para retenção das partículas de sílica remanescentes. O procedimento foi repetido 3 vezes até o esgotamento da sílica, verificado pela ausência de coloração, principalmente nos

tubos 1, 2, 3 e 4, onde a presença de coloração era mais intensa. O solvente proveniente dos 3 procedimentos foram reunidos e removidos em “speed vac” restando nos tubos, as respectivas frações do extrato supercrítico de *D. dichotoma*, como demonstrado na figura 27. Na tabela da figura 27 estão demonstrados a massa final obtida para cada uma das frações, calculados através da diferença entre o peso do tubo contendo a fração e o mesmo tubo anteriormente pesado.

Fração	massa (mg)
9	1,6
8	2,5
7	2,9
6	3,0
5	3,0
4	5,9
3	6,6
2	3,3
1	12,3

Figura 27: Frações do extrato supercrítico de *D. dichotoma*. Na tabela à direita estão demonstradas as massas obtidas para cada uma das frações.

A fração 1 foi a que apresentou o maior rendimento, representando aproximadamente 20% do extrato inicial utilizado, 60 mg, contudo esse alto rendimento em uma região de baixo R_f foi resultado da eluição incompleta da placa. As frações 3 e 4 representaram aproximadamente 10% de recuperação cada uma delas, com rendimentos de 6,6 e 5,9 mg, respectivamente. O restante das frações apresentaram por volta de 5% de recuperação, exceto a fração 9 que teve o menor rendimento dentre todas, com aproximadamente 2,5%.

2.1 Avaliação da atividade esquistossomicida das frações do extrato de *D. dichotoma*.

Após a realização do fracionamento do extrato supercrítico de *D. dichotoma* por CCD preparativa, as 9 frações obtidas foram avaliadas quanto à sua atividade esquistossomicida, que já havia sido verificada na avaliação do extrato bruto. O ensaio foi realizado da mesma forma como descrito anteriormente no item 8. do capítulo 2. Cada uma das nove frações foi exposta a um casal de vermes durante 96 horas em concentração de 50 µg/mL, e a motilidade dos vermes foi avaliada após 2 horas de exposição e a cada 24 horas. Todas as avaliações foram realizadas em quintuplicatas utilizando como controle negativo do ensaio 1,5% de DMSO e controle positivo praziquantel na concentração de 15 mg/mL.

Na tabela 6 estão demonstrados os índices de mortalidade e redução de motilidade em relação ao tempo de exposição dos extratos aos parasitas e número médio de ovos nos poços ao final do experimento. Dentre as frações, o destaque principal foi para a fração 4, que atingiu um índice bastante expressivo de 100% de mortalidade dos parasitas logo após 24 horas de exposição, representando a única fração ativa do extrato, se levado em conta somente este parâmetro. As frações 2 e 3 desencadearam uma redução significativa de motilidade em 60 e 80% dos parasitas, respectivamente, contudo não ocasionaram a morte de nenhum parasita exposto a eles. Nos vermes expostos às outras frações somente foi verificada uma leve redução de motilidade ou nem isso. Ainda, pode-se destacar a inibição da ovoposição observada nos grupos expostos às frações 6 e 7, nos quais foram encontrados uma média de 0,8 e 0,4 ovos nos 5 poços, respectivamente, em comparação aos 138,6 por poço do grupo controle, fator que pode representar uma forma de controle do parasita, já que ele não conseguiria completar o ciclo de vida.

Tabela 6: Avaliação de atividade esquistossomícida das frações de *D. dichotoma* obtidas por CCD preparativo.

Fração <i>D. dichotoma</i> (50 µg/mL)	tempo de incubação (h)	Mortalidade (%)	Redução de motilidade (%)		Ovoposição (n)*
			significante	leve	
1	2	0	0	0	277,8
	24	0	0	0	
	48	0	0	0	
	72	0	0	0	
	96	0	0	0	
2	2	0	0	0	75,2
	24	0	0	80	
	48	0	0	100	
	72	0	10	90	
	96	0	60	40	
3	2	0	0	0	19,6
	24	0	0	100	
	48	0	30	70	
	72	0	40	60	
	96	0	80	20	
4	2	0	0	0	1,6
	24	100	0	0	
	48	100	0	0	
	72	100	0	0	
	96	100	0	0	
5	2	0	0	20	98,8
	24	0	0	40	
	48	0	0	0	
	72	0	0	30	
	96	0	0	40	
6	2	0	0	20	0,8
	24	0	0	20	
	48	0	0	0	
	72	0	0	10	
	96	0	0	20	
7	2	0	0	0	0,4
	24	0	0	10	
	48	0	0	0	
	72	0	0	20	
	96	0	0	40	
8	2	0	0	0	161
	24	0	0	0	
	48	0	0	0	
	72	0	0	0	
	96	0	0	20	
9	2	0	0	0	161
	24	0	0	0	
	48	0	0	0	
	72	0	0	20	
	96	0	0	0	
DMSO 1,5%	2	0	0	0	138,6
	24	0	0	0	
	48	0	0	0	
	72	0	0	0	
	96	0	0	0	
Praziquantel (1,5 µg/mL)	2	0	0	0	0
	24	60	40	0	
	48	60	40	0	
	72	60	40	0	
	96	60	40	0	

* média do número de ovos contados nos poços ao final do experimento

2.2 Análise das frações de *D. dichotoma* por UFLC-ESI-TOF.

As frações 1 a 9, obtidas a partir do extrato supercrítico de *D. dichotoma* foram submetidas à análise por UFLC-ESI-TOF para determinação do perfil cromatográfico de cada fração isoladamente. As análises foram realizadas em cromatografo líquido ultra rápido Shimadzu composto de duas bombas LC-20AD, auto injetor SIL-20Aht com “loop” de 100 μ L, degaseificador DGU 20A3r e compartimento de forno de coluna CTO-20A. O sistema de detecção de massas de tempo de voo (“time of flight” – TOF) utilizado foi o Bruker microTOF II com ionização por eletrospray. As separações foram realizadas em coluna Phenomenex® Luna 3 μ C18(2) 100A (150 x 2.0 mm) a 30°C, utilizando uma solução aquosa de acetato de amônio 20 mM e 0,1% de ácido fórmico (pH 6,4) como fase móvel A e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico como fase móvel B. O gradiente de eluição empregado nas análises foi o seguinte, demonstrado em minutos (concentração de fase B): 0 – 2 min (0%); 2 – 75 min (0 – 100%); 75 – 80 min (100%); 80 – 80,1 min (100 – 0%); 80,1 – 90 min (0%); com um fluxo de trabalho de 0,2 mL/min e injeção de 10 μ L de amostra a cada corrida. O espectrômetro de massas foi configurado de modo a fazer uma varredura de m/z compreendidas entre 50 e 1100 em modo positivo seguindo os seguintes parâmetros: voltagem do capilar 4500 V; diferença do potencial -500 V; pressão do gás de nebulização 2.0 Bar; temperature de secagem 180°C; e fluxo de gás de secagem 8 L/min. Os cromatogramas foram gerados a partir do sinal obtido pelo modo TIC “total íon chromatogram”, no qual os picos correspondem ao somatório de todas as relações massa carga m/z $[M + H]^+$ analisadas em um determinado tempo, relacionado ao tempo de retenção, demonstrado em minutos. Na figura 28, podemos visualizar os cromatogramas obtidos para as 9 frações do extrato demonstrados de forma empilhada, para facilitar uma análise comparative entre eles.

Figura 28: Cromatogramas obtidos na análise por LC-MS das 9 frações do extrato supercrítico de *D. dichotoma* obtidas por CCD preparativa.

A partir da análise dos cromatogramas obtidos para as 9 frações, que embora complexas em relação às suas composições químicas, é possível verificar as diferenças e algumas similaridades entre elas. Uma vez que as frações maiores (mais próximas da fração 9) foram coletadas na região de maior R_f da placa, já era esperado que apresentassem a maior concentração de picos com maiores tempos de retenção em relação às frações mais baixas, já que representam às substâncias menos polares presentes no extrato supercrítico. Diversos picos podem ser visualizados em mais de uma fração, devido ao fato de que o deslocamento pela placa cromatográfica não acontece de forma totalmente homogênea. O pico em 67,6 min é comum a todas as frações e possivelmente seja causado pela presença de alguma substância interferente na fase móvel.

Todas as frações foram injetadas no cromatógrafo a partir de uma alíquota retirada do procedimento de “lavagem” da sílica raspada da placa, na qual foi utilizado o mesmo volume de solvente para todas as frações, portanto, a intensidade dos picos detectados é proporcional à concentração das substâncias nas respectivas frações, levando-se em conta a capacidade de ionização de cada

molécula. A fração 4, para a qual foi verificada mortalidade de 100% dos parasitas expostos, apresentou a maior quantidade de picos de grande intensidade dentre todas as frações, com pelo menos 6 deles considerados como majoritários, contudo não podemos descartar a hipótese de que a atividade esquistossomicida pode ser resultante de uma molécula presente em um dos picos de menor intensidade. O cromatograma da fração 4, bem como os espectros de massas relativos a cada um dos 14 principais picos está demonstrado na figura 29, onde podem ser visualizados as principais relações massa carga m/z $[M + H]^+$. Como pode ser observado nos espectros de massas, as m/z majoritárias em todos os espectros são compatíveis com moléculas de relativamente baixo peso molecular, sendo a maior delas 319,22, obtida no pico 2 do cromatograma e a menor 271,24, demonstrada no pico 10. Alguns picos apresentam valores de m/z bastante similares porém em tempos de retenção diferentes, como por exemplo os picos 3, 4 e 5, que apresentam m/z de 299,1991; 299,1984 e 299,1982 (com uma pequena variação de 9 unidades na quarta casa decimal) em tempos de retenção de 41,4 min; 46,9 min e 48,3 min, respectivamente, o que representa um forte indício de que se tratam de isômeros estruturais (DELA CRUZ *et al.*, 2005).

Comparando os cromatogramas da fração ativa 4 e a fração 3, a qual também apresentou uma atividade pronunciada na motilidade porém não causou a morte dos parasitas, podem ser verificados alguns picos da mesma substância em ambas as frações, confirmadas pela similaridade do tempo de retenção e m/z , como por exemplo os picos dos tempos 25,9 min (m/z 298,21); 35,2 min (m/z 319,22 e 359,21); 41,4 min (m/z 299,19); 60 min (m/z 271,24). Estas moléculas comuns entre as duas frações podem ser responsáveis pelo efeito de redução da motilidade para a fração 3 e mortalidade para a fração 4, uma vez que se encontram em uma concentração muito mais elevada na fração 4.

Figura 29: Cromatograma da fração 4 do extrato supercrítico de *D. dichotoma*, analisado por UFLC-ESI-TOF, demonstrando os 14 picos principais e os espectros de massa relativos a cada um deles.

3. Fracionamento do extrato supercrítico de *D. menstrualis* por CCD preparativa.

O extrato supercrítico de *D. menstrualis*, que havia demonstrado uma atividade esquistossomicida ainda mais pronunciada em relação o extrato de *D. dichotoma* nos ensaios preliminares utilizando extratos supercríticos brutos, foi submetida ao procedimento de fracionamento por cromatografia em camada delgada da mesma forma como descrito anteriormente, com algumas adaptações. Para este procedimento foi aplicado, em uma placa com 1000 μm de espessura, uma alíquota contendo 120 mg do extrato supercrítico de *D. menstrualis* solubilizado em 1 mL de álcool etílico e a placa foi mantida na cuba pelo tempo necessário para que a fase móvel eluisse até próximo a borda superior da placa.

Figura 30: Placa cromatográfica resultante do procedimento de cromatografia em camada delgada preparativa do extrato supercrítico de *D. menstrualis*.

Como pode ser visualizado na placa resultante da eluição, na figura 30, ambos os problemas ocorridos no procedimento anterior não se repetiram. Uma vez que a aplicação ocorreu de forma mais homogênea, com quantidades similares de extrato ao longo da faixa de aplicação, as bandas eluíram de maneira semelhante em toda a extensão da placa, facilitando assim o procedimento de marcação das bandas e remoção da sílica por raspagem da placa. Ainda, a utilização de um volume correto de fase móvel na preparação da cuba cromatográfica tornou possível a eluição completa da placa, fazendo com que as bandas cromáticas, utilizadas como controle visual de eluição e separação, apresentassem um R_f em torno de 0,5, considerado um valor ideal em procedimentos de cromatografia em camada

delgada. As bandas cromatográficas poderiam ter ficado mais distantes umas das outras, entretanto apresentaram uma boa separação e foi possível delimitar e separá-las de maneira fácil. Na revelação da placa em câmara de UV254 foi delimitada a banda 10, formada por uma substância fluorescente a qual foi isolada das frações vizinhas 9 e 11, as quais não apresentaram coloração nem fluorescência e pode ser desta forma avaliada individualmente.

Tabela 7: Massa obtida para as fração do extrato de *D. menstrualis*.

Fração	massa (mg)
12	1,0
11	1,7
10	1,4
9	2,0
8	2,9
7	18,3
6	18,2
5	11,3
4	16,7
3	23,3
2	15,9
1	12,3

Na tabela 7 estão demonstrados as massas obtidas para as diferentes frações isoladas da placa preparativa. Levando-se em conta de que foi aplicado na placa uma alíquota de 120 mg de extrato, pode-se calcular o rendimento de cada uma das frações. O destaque foi a fração 3, que apresentou um rendimento de aproximadamente 20% da concentração aplicada, seguido pelas frações 6 e 7 que representaram 15% do total, cada uma delas. As frações de alto *R_f*, 8 a 12 apresentaram os menores índices de rendimento que variaram de 0,8 a 2,4% enquanto para o restante das frações foram obtidos valores intermediários de rendimento. As frações obtidas foram então avaliadas quanto à atividade esquistossomocida, os resultados estão apresentados na tabela 8.

3.1 Avaliação da atividade esquistossomicida das frações do extrato de *D. menstrualis*.

A avaliação da atividade esquistossomicida das 12 frações obtidas a partir do extrato supercrítico de *D. menstrualis* foi realizada da mesma forma como descrita anteriormente na concentração de 50 µg/mL de meio de cultura. Na tabela 8 estão demonstrados os resultados obtidos.

Tabela 8: Avaliação de atividade esquistossomicida das frações de *D. menstrualis* obtidas por CCD preparativo.

Fração <i>D. menstrualis</i> (50 µg/mL)	tempo de incubação (h)	Mortalidade (%)	Redução de motilidade (%)		Ovoposição (n)*
			significante	leve	
1	2	0	0	0	254
	24	0	0	0	
	48	0	0	0	
	72	0	0	0	
	96	0	0	0	
2	2	0	0	0	178,6
	24	0	0	0	
	48	0	0	0	
	72	0	0	0	
	96	0	0	0	
3	2	0	0	20	191,8
	24	0	0	10	
	48	0	0	0	
	72	0	0	0	
	96	0	0	0	
4	2	0	0	0	34,8
	24	0	0	80	
	48	0	0	80	
	72	0	0	80	
	96	0	0	70	
5	2	0	0	0	0,4
	24	40	50	10	
	48	70	30	0	
	72	80	20	0	
	96	80	20	0	
6	2	0	0	0	0,8
	24	100	0	0	
	48	100	0	0	
	72	100	0	0	
	96	100	0	0	
7	2	0	0	0	1,8
	24	0	0	0	
	48	0	0	0	
	72	0	0	0	
	96	0	0	0	
8	2	0	0	0	209,8
	24	0	0	0	
	48	0	0	0	
	72	0	0	0	
	96	0	0	20	
9	2	0	0	40	197,6
	24	0	0	0	

	48	0	0	0	
	72	0	0	0	
	96	0	0	20	
10	2	0	0	0	
	24	0	0	20	
	48	0	0	0	207,8
	72	0	0	0	
	96	0	0	0	
11	2	0	0	0	
	24	0	0	0	
	48	0	0	0	216,8
	72	0	0	40	
	96	0	0	0	
12	2	0	0	0	
	24	0	0	0	
	48	0	0	0	0
	72	0	0	0	
	96	0	0	0	
DMSO 1,5%	2	0	0	0	
	24	0	0	0	
	48	0	0	0	244
	72	0	0	0	
	96	0	0	0	
Praziquantel (1,5 µg/mL)	2	0	100	0	
	24	50	60	0	
	48	60	40	0	0
	72	70	30	0	
	96	70	30	0	

* média do número de ovos contados nos poços ao final do experimento

Analisando comparativamente a tabela pode-se avaliar que a **fração 6** apresentou o resultado mais relevante dentre as frações, atingindo um índice de mortalidade de 100% dos parasitas durante as primeiras 24 horas de exposição, seguido da fração 5 que ocasionou a morte de 40% dos vermes nas primeiras 24 horas, atingindo um índice de mortalidade de 80% após 72 horas de exposição. A partir desses dados podemos afirmar que a substância ativa apresenta uma polaridade intermediária quando em comparação com o restante das substâncias encontradas no extrato bruto, já que as frações ativas foram coletadas das regiões da placa de Rf próximo a 0,5. Para as outras frações somente foi verificado uma leve redução da motilidade nas frações 3 e 4 e a inibição da ovoposição nas frações 7 e 12, sendo que neste última, não foram encontrados ovos em nenhum dos poços.

3.2 Análise das frações de *D. menstrualis* por UFLC-ESI-TOF.

As frações obtidas por CCD preparativa, a partir do extrato supercrítico de *D. menstrualis* foram submetidas a análise cromatográfica líquida com detecção por espectrometria de massas de acordo com o procedimento descrito na análise das frações de *D. dichotoma*. Na figura 31 estão demonstrados os cromatogramas das 12 frações, a partir dos quais podemos verificar a complexidade das frações intermediárias (4 a 8), com valores de *R_f* mais próximos de 0,5, em relação às frações de *R_f*s próximos de 0 e 1, coletadas das regiões da placa mais próximas a base (1 a 3) e o topo da placa (9 a 12), respectivamente.

Ainda em relação a complexidade das frações, podemos verificar a maior quantidade de picos na análise da fração 6, que apresentou os melhores índices de mortalidade no ensaio de avaliação de atividade esquistossomocida, contudo essa atividade não foi verificada para a fração 7, que apresenta diversos picos em comum com a fração 6, como por exemplo os picos de tempo de retenção 41, 47,5, 51, 53 e 53,5 min.

Figura 31: Cromatogramas obtidos na análise por LC-MS das 12 frações do extrato supercrítico de *D. menstrualis* obtidas por CCD preparativa.

Quando comparamos os cromatogramas obtidos para todas as amostras, podemos verificar a presença de diversos picos em comum a todos eles, como por exemplo o pico com tempo de retenção de 57 minutos e quase todos os picos com tempos de retenção compreendidos entre 74 e 85 minutos. Esses picos podem ser decorrentes de uma falha no procedimento cromatográfico de fracionamento ou mesmo ocasionados pelo excesso de corridas sucessivas no UFLC sem a realização de um procedimento de limpeza da coluna a cada determinado numero de corridas.

Analisando o cromatograma da fração 6 isoladamente, verificamos a presença de 3 picos majoritários e pelo menos 10 picos com intensidade equivalente a 30% dos primeiros. Na figura 32 pode ser visualizada a posição de cada pico e o espectro de massas referente a cada um deles. Assim como foi observado no cromatograma da fração ativa de *D. dichotoma*, os espectros de massa revelam valores de relações massa carga m/z $[M + H]^+$ compatíveis com moléculas de relitivamente baixo peso molecular, compreendidos entre 271,24 e 319,22, entretanto nesta fração de *D. menstrualis* são também verificados alguma moléculas de maior peso molecular, a partir do pico 13, apresentando valores de m/z $[M + H]^+$ entre 403,23 e 610,18. Ainda, picos de diferentes tempos de retenção apresentam espectros de massa com valores de m/z similares, reforçando a teoria de que a fração é composta por diversos isômeros de uma mesma molécula. Como exemplo podemos citar os picos 2 e 4 que compartilham a m/z de 299,20; nos picos 3, 5, 6 e 8 pode ser visualizada a m/z 301,21; os picos 7 e 9 apresentam a m/z 285,22, e os picos 10 e 12 em que ambos são encontrados a m/z 287,23.

Comparando os cromatogramas das frações 6 e 5, que também apresentou mortalidade no ensaio esquistossomicida, são encontrados dois picos em comum entre as duas frações: no tempo de retenção 41,2 min com m/z 299,20 e no tempo de 59,6 min com m/z 271,24, este ultimo com uma intensidade significativametnte menor na fração 5 em relação a 6, fator que pode explicar a mortalidade dos parasitas porém em menor intensidade, se levarmos em conta a hipótese de que a m/z 271,24 corresponde a molécula com atividade esquistossomicida. Contudo a atividade apresentada pode ser decorrente da ação de qualquer outra molécula constituinte do extrato.

Figura 32: Cromatograma da fração 6 do extrato supercrítico de *D. menstrualis*, analisado por UFLC-ESI-TOF, demonstrando os 17 picos principais e os espectros de massa relativos a cada um deles.

4. Fracionamento do extrato supercrítico de *D. mertensii* por CCD preparativa.

Em uma tentativa de ampliarmos as alternativas de possíveis agentes com potencial esquistossomicida, foi realizada a extração com uma terceira espécie de *Dictyota*, a *D. mertensii*, uma vez que os extratos das outras duas espécies, *D. dichotoma* e *D. menstrualis* já haviam demonstrado esse potencial e restava apenas uma pequena quantidade dos mesmos, para um eventual procedimento de purificação de uma determinada substância. O extrato supercrítico de *D. mertensii*, obtido de maneira semelhante ao procedimento utilizado na preparação dos demais extratos, foi então submetido ao mesmo procedimento de fracionamento descrito anteriormente para o extrato de *D. menstrualis*. Na figura 33 está demonstrada a

Figura 33: Placa cromatográfica resultante do procedimento de cromatografia em camada delgada preparativa do extrato supercrítico de *D. mertensii*.

placa após a eluição da mesma, onde podem ser visualizada a disposição das bandas cromáticas após a eluição da mesma na cuba cromatográfica. Ao contrário do extrato de *D. menstrualis*, não foi verificada nenhuma banda fluorescente na revelação em câmara de UV e as bandas não apresentaram um deslocamento homogêneo, indicando uma aplicação do extrato de forma heterogênea, contudo elas apresentaram uma boa separação e são facilmente diferenciadas entre si. As bandas cromáticas tiveram um deslocamento considerado ideal e permaneceram em regiões de R_f próximo a 0,5.

Em relação ao rendimento das frações demonstradas na tabela 9, somente a fração 8 teve uma recuperação acima dos 10% do total do extrato aplicado na placa (138 mg), atingindo um índice de 11,2%, seguido da fração 9, para a qual se obteve um rendimento de 9,4%. Ainda, as frações 1, 6, 10 e 11, apresentaram massas acima de 10 mg após o procedimento, enquanto para o restante das frações foram verificados rendimentos abaixo de 5%, sendo a fração 3 a de menor rendimento dentre todas com somente 1% de recuperação.

Tabela 9: Massa obtida para as fração do extrato de *D. mertensii*.

Fração	massa (mg)
12	2,3
11	11,6
10	12,2
9	13
8	15,5
7	7,1
6	10,9
5	6,1
4	4,3
3	1,4
2	4,1
1	11,3

Após obtenção das frações as mesmas foram submetidas a avaliação de atividade esquistossomícida, seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente.

4.1 Avaliação da atividade esquistossomicida das frações do extrato de *D. mertensii*.

Na tabela 10 estão demonstrados os índices de mortalidade e redução de motilidade, relativos a cada um dos tempos de avaliação, e número médio de ovos contados nos poços ao final do experimento, quando expostos os casais de parasitas às frações do extrato de *D. mertensii*.

Tabela 10: Avaliação de atividade esquistossomicida das frações de *D. mertensii* obtidas por CCD preparativo.

Fração <i>D. mertensii</i> (50 µg/mL)	tempo de incubação (h)	Mortalidade (%)	Redução de motilidade (%)		Ovoposição (n)*
			significante	leve	
1	2	0	0	20	19
	24	0	20	40	
	48	0	90	10	
	72	0	90	10	
	96	0	80	20	
2	2	0	0	20	0,8
	24	0	70	30	
	48	0	100	0	
	72	0	100	0	
	96	100	0	0	
3	2	0	40	40	0,6
	24	90	10	0	
	48	90	10	0	
	72	90	10	0	
	96	100	0	0	
4	2	0	0	40	2
	24	20	80	0	
	48	80	20	0	
	72	80	20	0	
	96	100	0	0	
5	2	0	0	0	0,6
	24	40	60	0	
	48	90	10	0	
	72	100	0	0	
	96	100	0	0	
6	2	0	0	0	1,6
	24	100	0	0	
	48	100	0	0	
	72	100	0	0	
	96	100	0	0	
7	2	0	0	0	1,4
	24	70	30	0	
	48	100	0	0	
	72	100	0	0	
	96	100	0	0	
8	2	0	0	0	1
	24	0	80	20	
	48	0	80	20	

	72	60	40	0	
	96	90	10	0	
9	2	0	0	0	151,2
	24	0	0	0	
	48	0	0	0	
	72	0	0	0	
	96	0	0	0	
10	2	0	0	0	217,4
	24	0	0	0	
	48	0	0	0	
	72	0	0	0	
	96	0	0	0	
11	2	0	0	40	233,4
	24	0	0	0	
	48	0	0	0	
	72	0	0	0	
	96	0	0	0	
12	2	0	0	0	153,8
	24	0	0	10	
	48	0	0	0	
	72	0	0	0	
	96	0	0	0	
DMSO 1,5%	2	0	0	0	244
	24	0	0	0	
	48	0	0	0	
	72	0	0	0	
	96	0	0	0	
Praziquantel (1,5 µg/mL)	2	0	100	0	0
	24	50	60	0	
	48	60	40	0	
	72	70	30	0	
	96	70	30	0	

Analizando a tabela é possível visualizar a mortalidade total do grupo de parasitas, ao tempo final de avaliação, quando expostos a todas as frações compreendidas entre 2 e 7, contudo estes índices foram alcançados diferentes tempo para cada uma das frações. Dentre estas frações a atividade mais pronunciada foi relativa à fração 6, que promoveu a mortalidade durante as primeiras 24 horas de exposição, seguida da fração 7 (entre 24 e 48 horas) e da fração 5 (entre 48 e 72 horas). As frações 2, 3 e 4 apresentaram a atividade total somente na última avaliação realizada. Nos grupos expostos às frações de maior Rf, de 9 a 12, foram avaliadas somente pequenas reduções de motidade, enquanto a fração 8 causou a morte de somente parte dos parasitas. A redução da ovoposição foi somente observada nos grupos que apresentaram algum indício de toxicidade, como mortalidade ou redução de motilidade, indicando uma redução possivelmente causada pela debilidade dos vermes e não pela ação de uma determinada substância em si.

4.2 Análise das frações de *D. menstrualis* por UFLC-ESI-TOF.

Na análise cromatografica das frações do extrato de *D. mertensii*, demonstrado na figura 34, realizado por UFLC-ESI-TOF, pode ser verificado a maior complexidade de algumas frações em relação a outras, demonstrado pela abundância de picos visualizados no cromatograma, como pode ser visto na fração 8, por exemplo, que apresenta a maior quantidade de picos dentre todas as frações. A maior intensidade demonstrada nos picos da fração 8, entretanto, se devem ao fato de que a alíquota injetada para cada uma das frações foi retirada diretamente do procedimento de “lavagem” da sílica da placa de CCD preparativa, na qual esta fração se encontrava em concentração muito superior as outras, uma vez que apresentou os maiores índices de rendimento.

Figura 34: Cromatogramas obtidos na análise por LC-MS das frações 2 a 12 do extrato supercrítico de *D. mertensii* obtidas por CCD preparativa.

Alguns picos foram detectados em todas as frações e, da mesma forma como descrito anteriormente para as corridas das frações de *D. menstrualis*, podem ser resultantes de algum problema na corrida preparativa ou pela presença de

contaminantes na coluna cromatográfica utilizada nos procedimentos analíticos. Dentre esses picos podem ser citados os picos com tempo de retenção de 57,9 min, 73,8 min e 76,9 min, contudo deve ser considerada a hipótese de que os mesmos podem ser derivados de outras substâncias que apresentem sobreposição de picos.

Com relação a análise da fração 6 do extrato, demonstrada na figura 35, que demonstrou a principal atividade no ensaio de avaliação de atividade esquistossomocida, foram obtidos 10 picos. O pico majoritário obtido (pico 6) teve um tempo de retenção de 59,9 min e apresentou uma m/z de 271,24, seguido de 3 picos de intensidade intermediária, os picos 5 (57,9 min; m/z 287,23), 7 (60,6 min; m/z 283,20) e 10 (76,9 min; m/z 149,02 e 391,28).

Figura 35: Cromatograma da fração 6 do extrato supercrítico de *D. mertensii*, analisado por UFLC-ESI-TOF, demonstrando os 10 picos principais e os espectros de massa relativos a cada um deles.

Quando foram comparados os espectros de massas dos picos obtidos para todas as frações que apresentaram atividade esquistossomicida, podem ser verificados diversos picos em comum para diferentes frações, indicando uma falha no processo de separação por CCD e formação de cauda na banda cromatográfica, que pode ter sido causado pela aplicação de uma quantidade excessiva de extrato, extrapolando o limite da placa ou por um defeito na fase estacionária decorrente de más condições de armazenamento, como excesso de umidade, por exemplo. Se levarmos em conta as frações 4, 5, 6 e 7 as quais apresentaram atividade tóxica aos parasitas de forma mais intensa, podem ser verificadas as m/z $[M + H]^+$ 285,22; 283,20; 287,23; 239,23 e 267,26 em mais de uma fração, enquanto o pico com tempo de retenção de 60 minutos e m/z $[M + H]^+$ 271,24 foi encontrado em todas elas, fato que leva esta molécula a se tornar um dos potenciais candidatos a exercer a atividade tóxica contra *S. mansoni*.

5. Análise comparativa entre as frações ativas dos extratos de *Dictyota*.

Como proposta alternativa ao procedimento tradicional de fracionamento bioguiado, foi realizada uma análise cruzada entre os cromatogramas obtidos na análise de cada uma das frações que apresentaram atividade mais pronunciada de cada um dos extratos, as frações 6 dos extratos de *D. menstrualis* e *D. mertensii*, e a fração 4 do extrato de *D. dichotoma*. Uma vez que são extratos obtidos a partir de espécies pertencentes ao mesmo gênero, possivelmente diversas estruturas químicas de metabólitos secundários possam ser relativas ao gênero e produzidas por mais de uma espécie diferente. Na figura 36 estão demonstrados de forma empilhada os cromatogramas das 3 frações, de forma a facilitar a comparação dos picos em relação aos tempos de retenção dos mesmos.

Figura 36: Cromatogramas obtidos na análise por LC-MS das frações ativas dos extratos de *Dictyota*, no ensaio de atividade esquistossomocida.

Como pode ser verificado através dos cromatogramas, a fração ativa do extrato de *D. dichotoma* apresenta alguns constituintes mais polares em relação aos outras 2 frações, justificado pela presença de uma grande quantidade de picos em menores tempo de retenção (15 a 40 minutos), enquanto as frações de *D. menstrualis* e *D. mertensii* apresentam alguns picos relativos a substâncias menos polares, que não são verificados na primeira fração, em tempos de retenção acima de 70 minutos, consequentemente a verificação de picos de substâncias similares

entre as frações ativas das 3 espécies diferentes ocorreu quase que exclusivamente na região intermediária do cromatograma, em tempos de retenção compreendidos entre 40 e 70 minutos, salvo algumas exceções.

Na tabela 11, estão relacionados os picos referentes as substância presentes em amostras diferentes, definidas como sendo a mesma substância por apresentarem o mesmo tempo de retenção e espectro de massas. Todas as substâncias encontradas em mais de uma fração dentro do período analisado, estava presente na fração ativa de *D. menstrualis*, sendo 4 delas em comum com a fração de *D. dichotoma* e 3 delas em comum com a fração de *D. mertensii*. Apenas uma substância comum a todas as 3 frações foi detectada, em um tempo de retenção de 59,8 a 60,1 minutos e m/z $[M + H]^+$ 271,24.

Tabela 11: Análise comparativa entre os cromatogramas das frações ativas das 3 espécies de *Dictyota*, demonstrando as m/z $[M + H]^+$ (**em negrito**) presentes em mais de uma fração em relação ao tempo de retenção.

Espécie (nº da fração)	Tempo de retenção (minutos)							
	35	41,3	51,1	53,1	58,1	60	60,9	76,5
<i>D. mertensii</i> (6)				285,22	287,23	271,24		391,28
<i>D. menstrualis</i> (6)	319,22	299,19	301,21	285,22	287,23	271,24	287,23	391,28
<i>D. dichotoma</i> (4)	319,22	299,19	301,21			271,24	287,23	

Analisando os resultados obtidos anteriormente, na avaliação da atividade esquistossomicida das frações dos 3 extratos, nos casos em que a atividade foi verificada em mais de uma fração, como por exemplo as frações 3 a 7 do extrato de *D. mertensii* e nas frações 5 e 6 do extrato de *D. menstrualis*, a substância referente a m/z $[M + H]^+$ 271,24, foi uma das substâncias detectadas em todas as frações. Somando isto ao fato de que foi a única substância detectada em todas as frações ativas sugere-se que a atividade esquistossomicida, no caso de ser desencadeada por uma substância isoladamente, pode ser decorrente da exposição dos casais de vermes à esta substância, portanto os procedimentos de isolamento foram direcionados para a obtenção da mesma.

6. Isolamento da substância de m/z [M + H]⁺ 271,24.

Uma vez que foi definida a substância constituinte dos extratos supercríticos das algas do gênero *Dictyota* com a maior probabilidade de exercer a atividade tóxica contra os parasitas do gênero *Schistosoma mansoni*, quando exposto isoladamente, metodologias cromatográficas foram conduzidas de forma a obtermos a substância de m/z [M + H]⁺ 271,24 pura, ou pelo menos apresentando um alto grau de pureza.

6.1 Fracionamento do extrato supercrítico de *D. mertensii* em coluna cromatográfica.

A metodologia de fracionamento por cromatografia em camada delgada demonstrou ser uma técnica efetiva como o primeiro passo na obtenção de frações menos complexas em relação à composição química do extrato bruto, contudo apresento uma restrição em relação a utilização de grandes quantidades de extrato a cada aplicação. Como forma de contornar esse problema e agilizar esse primeiro passo referente a uma “limpeza” da amostra, foi empregada uma metodologia de fracionamento em coluna seca, na qual pode ser realizado o procedimento com uma quantidade maior de extrato.

Para o procedimento foi utilizado o extrato supercrítico de *D. mertensii* no qual havia sido encontrado um pico referente a m/z 271,24 em maior intensidade em relação aos extratos de *D. dichotoma* e *D. menstrualis*, indicando que está em maior concentração no extrato dessa espécie. Outro motivo da escolha por este extrato, foi a maior disponibilidade do mesmo em relação aos outros dois.

O procedimento foi realizado em funil de vidro sinterizado, preenchido com aproximadamente 300 mL de uma mistura de sílica gel 60 e hexano, repousado durante um tempo para que a sílica se depositasse no fundo do funil de forma homogênea, após esse tempo o solvente foi removido a vácuo em kitassato enquanto a coluna de sílica permaneceu com uma altura aproximada de 10

centímetros. Uma alíquota de 480 mg de extrato de *D. mertensii* foi misturado a uma pequena quantidade de sílica e solvente de modo a formar uma pasta, a qual foi depositada de forma homogênea sobre a coluna cromatográfica. Acima do extrato foi colocado um disco de papel filtro para evitar que a fase estacionária sofresse alguma deformação quando o solvente fosse vertido sobre a mesma. O sistema completo pode ser visualizado na figura 37.

Figura 37: Funil sinterizado durante o procedimento de fracionamento do extrato supercrítico de *D. mertensii*.

A separação das frações foi realizada passando através da coluna alíquotas de 500 mL de uma mistura de hexano e acetato de etila, em ordem crescente de polaridade, iniciando com 100% hexano e aumentando 10% de acetato de etila a cada alíquota sequencial até atingirmos a razão de 1:9 hexano: acetato de etila. Como forma de esgotar qualquer resquício de extrato da coluna foi passado ao final do procedimento uma alíquota de 500 mL de álcool etílico. Todas as alíquotas tiveram o solvente removido em rotaevaporador, as massas obtidas estão demonstradas na tabela 12.

Tabela 12: Frações do extrato supercrítico de *D. mertensii*, obtidas por cromatografia em coluna.

Fração	Hexano: acetato de etila	massa (mg)
1	10:0	233,7
2	9:1	37,1
3	8:2	35,8
4	7:3	35,9
5	6:4	30,9
6	5:5	35,3
7	4:6	30,9
8	3:7	19,6
9	2:8	17,9
10	1:9	3,30
11	EtOH	n.d.

Como pode ser visualizados na tabela 12, praticamente metade (233,7; 48,5%) do extrato utilizado no procedimento foi recuperada na primeira alíquota de solvente passado através da coluna, constituído somente de hexano. Por se tratar da fração mais polar, não era esperado que fosse eluído uma fração considerável do extrato, já que a maior parte dos picos apresentados nas análises cromatográficas em UFLC, realizadas anteriormente com as frações do extrato de *D. mertensii* (figura 34) apresentaram um tempo de retenção entre 40 e 60 minutos intervalo na qual a proporção de H₂O: ACN variou de 50:50 até 20:80, portanto não representava a fração mais apolar das análises, que chegou a 100% de ACN nos 75 minutos de corrida cromatográfica. As frações sequenciais, nas quais foi incorporado 10% de acetato de etila a cada fração sequencial, foram verificados aproximadamente 7% de recuperação em cada uma das frações de 2 a 7, 4% para as frações 8 e 9 e menos de 1% na fração 10, levando praticamente ao esgotamento da coluna, já que para a fração de limpeza de álcool etílico, foi verificada uma recuperação praticamente nula.

6.2 Análise das frações de *D. mertensii* obtidas em coluna por UFLC-ESI-TOF.

A presença do substância de m/z 271,24 foi monitorada, através de análise em UFLC, nas frações obtidas através do procedimento de cromatografia em coluna da mesma forma como descrito anteriormente para os fracionamentos por CCD

preparativo. Os cromatogramas obtidos para as diferentes frações estão demonstrados na figura 38, onde é possível verificar a distribuição dos picos ao longo das frações.

O Pico de interesse foi encontrado nas 3 primeiras frações (indicados pela seta na figura 38), com a maior intensidade verificada na fração 1, contudo nessa fração foram também verificados a maior parte das substâncias presentes no extrato. Por outro lado, quando analisamos a tabela 12, sabendo que a substância alvo se encontra nas frações 1 e 2, que foram agrupadas para a realização dos procedimentos posteriores, verificamos que praticamente metade das outras substâncias presentes no extrato, frações 3 a 10, foram separadas das fração de interesse, e acabou sendo considerado uma etapa decisiva nas etapas posteriores do procedimento de isolamento do pico m/z 271,24.

Figura 38: Cromatogramas obtidos na análise por LC-MS das frações 1 a 10 do extrato supercrítico de *D. mertensii* obtidas por cromatografia em coluna.

A primeira alternativa cromatográfica testada para o procedimento de isolamento do pico m/z 271,24, antes mesmo da realização deste procedimento em

coluna, foi a utilização de HPLC com uma coluna semi-preparativa Luna C18(2), entretanto a presença de uma grande quantidade de picos sobrepostos ao pico de interesse (dados não mostrados), justificou a escolha de uma etapa anterior de limpeza da amostra. Mesmo que esta etapa do fracionamento em coluna não tenha sido considerada ideal, com uma distribuição mais homogênea de substâncias presentes em cada uma das frações, ela acabou se mostrando de extrema importância, já que solucionou o problema de sobreposição de picos nos procedimentos preparativos em HPLC.

6.3 Isolamento do pico m/z 271,24 por HPLC semi-preparativo.

Como citado anteriormente, o procedimento de isolamento por HPLC semi-preparativo foi a primeira alternativa testada na tentativa de isolamento da substância de m/z 271,24, contudo a complexidade do extrato supercrítico representou um fator limitante no emprego desta técnica. Diversas condições cromatográficas haviam sido testadas mas em nenhuma delas ocorreu a recuperação da substância de interesse de forma isolada. A etapa de fracionamento fez com que as substâncias que causavam sobreposição fossem separadas das frações 1 e 2, onde se encontrava a substância de m/z 271,24, deixando-as desta forma apta ao procedimento de isolamento.

Para a realização do procedimento foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu composto de duas bombas LC6-AD, sistema de injeção automática SIL-10AF, detector de arranjo de fotodiodo PDA SPD-M10A e coletor de frações FRC-10A, equipado com coluna Luna C18 (2), medindo 250 x 10 mm, e 5 Å de tamanho de partícula. A fase móvel A utilizada foi H₂O ultrapura com 0,1% de ácido fórmico enquanto para a fase B utilizada foi álcool metílico grau HPLC, em um fluxo de 5 mL/min, necessário para gerar uma pressão de trabalho inicial de aproximadamente 200 bar. O gradiente de concentração da fase móvel utilizado foi o seguinte (descrito com o percentual de fase móvel B): 0 min (60%); 0 – 17 min (60 - 100%); 17 – 20 min (100%); 20 – 20,1 min (100 - 60%); 20,1 – 25 min (60%). Os espectros foram obtidos realizando-se uma varredura dos comprimentos de onda compreendidos entre 200 e 800 nm, portanto estão demonstrados de forma tridimensional,

relacionando tempo de retenção (eixo das abcissas), comprimento de onda (eixo das ordenadas) e intensidade de absorção (escala cromática).

Primeramente foi realizada a injeção de uma alíquota da fração, solubilizada em álcool etílico, para a determinação do perfil cromatográfico a partir desse novo método, para então serem definidos os períodos em que o coletor automático realizaria a coleta das determinadas frações. A partir do cromatograma (figura 39), os picos foram demarcados com uma margem de segurança de aproximadamente 6 segundos antes do início e 6 segundos depois do término dele. Como se tratava de uma amostra ainda bastante complexa e não tínhamos certeza de que a substância alvo absorveria radiação (em caso negativo não haveria a geração de sinal), os tempos de retenção aonde não foram gerados picos foram também coletados em alíquotas máximas correspondentes a 5 minutos. Após a coleta, todas as alíquotas obtidas foram analisadas por UFLC-ESI-TOF, de modo semelhante ao descrito anteriormente nas análises das frações dos extratos.

Figura 39: Cromatograma obtido por HPLC-PDA no processo de isolamento da substância de m/z 271,24. No detalhe em vermelho está demonstrado o tempo de coleta do pico referente a substância alvo.

Uma vez que as amostras analisadas nesta etapa, correspondem a misturas muito menos complexas em relação as análises anteriores, as corridas cromatográficas foram adaptadas, diminuindo o tempo de corrida, de modo a tornar mais ágil o processo de monitoramento dos picos isolados, mantendo o padrão de separação adequado. As análises foram realizadas em corridas cromatográficas de 20 minutos, fase A: H₂O, 20 mM acetato de amônio e 0,1% ácido fórmico; fase B: ACN 0,1% ácido fórmico; de acordo com o seguinte gradiente de concentração (percentual de fase móvel B): 0 – 2 min (60%); 2 - 12 min (60 – 100%); 12 – 16 min (100%); 16 – 16,1 min (100 – 60%); 16,1 – 20 min (60%).

Na figura 40 está demonstrado o cromatograma da alíquota coletada entre 14,5 e 15,6 minutos, onde pode ser verificada a presença do pico correspondente à substância de m/z 271,24, em um tempo de retenção de 12,8 minutos. Como podemos verificar no cromatograma a fração coletada apresenta ainda uma grande quantidade de contaminantes, referentes aos picos detectados nos tempos de retenção compreendidos entre 8 e 12,5 minutos; e 13 e 18 minutos, justificando portanto a necessidade de uma etapa posterior para o isolamento da substância.

Figura 40: Cromatograma da alíquota coletada no intervalo compreendido entre 14,5 e 15,6 minutos, no procedimento de isolamento da substância de m/z 271,24.

O restante da fração 1 obtida no procedimento de fracionamento em coluna foi então solubilizado em 4 mL de etanol e injetada em alíquotas de 400 μ L em 10 corridas sequenciais. As frações coletadas no tempo 14,5 – 15,6 minutos foram reunidas e o solvente foi removido em “speed vac”.

Diversas condições cromatográficas foram avaliadas até chegarmos em uma condição na qual a separação dos picos apresentassem uma intensidade de resolução suficiente para que os picos fossem coletados de forma isolada. A separação ideal foi alcançada em uma corrida cromatográfica, demonstrada na figura 41, com 60 minutos de tempo total de acordo com o seguinte gradiente: 0 – 50 min (60 – 100% B); 50 – 55 min (100%); 55 – 55,01 (100 – 60%), 55,01 – 60 min (60%).

Figura 41: Cromatograma obtido por HPLC-PDA no processo de purificação da substância de m/z 271,24. No detalhe em vermelho está demonstrado o tempo de coleta do pico referente a substância alvo

Da mesma forma como realizado anteriormente, o monitoramento das frações coletadas foi realizada por UFLC-ESI-TOF, onde foi verificada a presença da substância de m/z 271,24 no pico coletado entre 31,7 e 32,8 minutos.

Como pode ser verificado no cromatograma da figura 42, onde é verificado a presença de somente um pico de grande intensidade, a metodologia cromatográfica preparativa se mostrou efetiva e a proposta de isolamento da substância referente a m/z 271,24 foi atingida.

Figura 42: Cromatograma da alíquota coletada no intervalo compreendido entre 31,7 e 32,8 minutos, no procedimento de purificação da substância de m/z 271,24.

O procedimento cromatográfico foi realizado com o restante da fração isolada anteriormente, com injeções no cromatógrafo de alíquotas de 400 μL e coleta do pico compreendido entre 31,7 e 32,8 minutos para todas as corridas. Após reunir todas as alíquotas coletadas, o solvente foi removido e verificamos a recuperação final de aproximadamente 7 mg da substância alvo, determinado por pesagem em balança analítica.

Se levarmos em conta que o procedimento de isolamento foi iniciado com 480 mg de extrato supercrítico, para o qual foi necessário uma massa de 6,816 g de biomassa algal liofilizada, para chegarmos a um volume recuperado da substância alvo de 7 mg, podemos inferir que a substância de m/z 271, 24 corresponde a 0,1% do peso total, contudo, durante as etapas do processo podem ocorrer perdas, dificultando a realização de um cálculo específico e fazendo com esse valor possa ser apenas estimado.

7. Avaliação da atividade esquistossomícida da substância de m/z 271,24.

Após isolarmos a substância alvo do nosso extrato, a mesma teve o seu potencial esquistossomícida avaliado por exposição direta aos vermes. Uma vez que foi a única substância detectada em todos os extratos e frações ativas das espécies de *Dictyota* todo o procedimento de isolamento foi direcionado para a sua obtenção, para então ser avaliada de maneira isolada. A avaliação da substância seguiu a mesma metodologia citada anteriormente na avaliação dos extratos e frações, com a diferença de que foram avaliadas diferentes concentrações da substância de forma a ser verificada uma relação dose-resposta, como demonstrado na tabela 13.

Tabela 13: Avaliação de atividade esquistossomícida da substância m/z 271,34 isolada do extrato supercrítico de *D. mertensii*.

Substância m/z 271 (µg/mL)	tempo de incubação (h)	Mortalidade (%)	Redução de motilidade (%)		Ovoposição (n)*
			significante	leve	
0,5	2	0	0	0	308
	24	0	0	0	
	48	0	0	0	
	72	0	0	0	
	96	0	0	0	
1,0	2	0	0	0	253
	24	0	0	0	
	48	0	0	0	
	72	0	0	0	
	96	0	0	0	
5,0	2	0	0	0	261
	24	0	0	0	
	48	0	0	0	
	72	0	0	0	
	96	0	0	0	
10,0	2	0	0	11	225
	24	0	0	11	
	48	0	0	33	
	72	0	0	0	
	96	0	0	11	
50,0	2	0	0	44	186
	24	0	0	66	
	48	0	0	100	
	72	0	0	88	
	96	0	0	55	
DMSO 1,5%	2	0	0	0	306
	24	0	0	0	
	48	0	0	0	
	72	0	0	0	
	96	0	0	0	
Praziquantel (1,5 µg/mL)	2	10	90	0	0
	24	60	40	0	
	48	70	30	0	
	72	70	30	0	
	96	70	30	0	

A substância de m/z 271,24 isolada foi avaliada em concentrações que variaram de 50 a 0,5 µg/mL e diferentemente do resultado que era esperado, uma vez que a substância esteve presente em todas as amostras positivas testadas, apenas um baixo índice de toxicidade foi visualizado quando exposto aos casais de *S. mansoni* verificada pela diminuição da ovoposição, reduzido a 60% em relação ao grupo controle, no grupo de maior concentração 50 µg/mL. Como pode ser visualizado na tabela 13, onde estão demonstrados os resultados do experimento, as únicas alterações nos vermes foram verificados nas duas concentrações mais altas testadas, 10 e 50 µg/mL, na forma de uma leve redução de motilidade em 33 e 100% dos parasitas, respectivamente para cada dose. Os resultados obtidos são muito inferiores quando comparados às avaliações das frações dos extratos, na qual a fração foi avaliada na mesma concentração de 50 µg/mL, porém ocasionou 100% de mortalidade dos parasitas.

Uma vez que a fração ativa continha a substância alvo em concentração menor do que as concentrações avaliadas com a substância isolada, e ainda assim levou um índice de mortalidade que não foi verificado neste último teste, sugere-se que a atividade apresentada pelos extratos das diferentes espécies de *Dyctyota* seja decorrente da ação de moléculas diferentes para cada extrato, uma vez que a substância de m/z 271,24 foi a única molécula comum a todas as frações.

Outra hipótese que poderia explicar a ausência de mortalidade desta molécula isolada seria o fato de ela estar atuando em conjunto com outra molécula constituinte do extrato, de maneira aditiva ou mesmo sinérgica. Na literatura são descritas inúmeras interações deste tipo, aonde há uma exacerbação de efeito pela atuação simultânea de duas substâncias contra *S. mansoni* (BUEDING et al., 1982), inclusive envolvendo terpenos, uma classe química produzida como metabólitos secundários de algas do gênero *Dictyota*, com finalidade antiparasitária (IZUMI et al., 2012)

8. CONCLUSÃO

O procedimento de fracionamento por CCD preparativa se mostrou adequado ao propósito de triagem de uma molécula ativa, já que a atividade esquistossomicida foi verificada em somente uma das frações, dentre 9 testadas, no primeiro teste

realizado com o extrato supercrítico de *D. dichotoma*. Esta atividade exclusiva voltou a ocorrer predominantemente em uma fração, no procedimento seguinte realizado com o extrato de *D. menstrualis*, porém não foi atingida no terceiro procedimento, desta vez com o extrato de *D. mertensii*, devido a ocorrência de problemas metodológicos.

No primeiro procedimento foram observados alguns problemas de desenvolvimento metodológico, como a utilização de uma quantidade insuficiente de fase móvel e a heterogeneidade da aplicação do extrato na placa, contudo estes problemas foram corrigidos nos procedimentos realizados posteriormente. O segundo procedimento foi considerado ideal pois a eluição ocorreu de forma completa e resultou em uma placa com bandas uniformes e bem definidas. No terceiro procedimento outro problema ocorreu, desta vez pela aplicação de uma quantidade de extrato superior ao limite de resolução da placa cromatográfica, o que resultou em formação de cauda cromatográfica, verificado pela presença de uma substância em uma região ampla do cromatograma e não em um único ponto, como idealmente deveriam ser.

A metodologia cromatográfica em LC-MS empregada no monitoramento do procedimento de fracionamento foi considerado satisfatório, uma vez que foi possível avaliar as diferentes frações quanto a complexidade de metabólitos, demonstrados pela quantidade de picos no cromatograma, e a polaridade relativa dos constituintes das frações, demonstrado pelo deslocamento dos picos nos cromatogramas.

O procedimento de fracionamento em coluna, empregado com o intuito de fracionarmos uma grande quantidade de extrato com um único procedimento, em um primeiro momento não pareceu de grande utilidade, já que a fração contendo o suposto ativo apresentou a maior quantidade de picos dentre todas as frações obtidas, contudo acabou se mostrando de extrema importância posteriormente. A metodologia de fracionamento por HPLC preparativo havia sido avaliada de diversas maneiras mas em todas ocorreu uma sobreposição de picos junto ao suposto ativo, que acabaram sendo removidos da fração principal no procedimento de fracionamento em coluna, possibilitando desta forma o isolamento da substância alvo empregando dois procedimentos cromatográficos sequenciais em HPLC preparativo.

A idéia de realizar um monitoramento dos espectros de massa dos picos obtidos na análise cromatográfica das frações ativas, e posteriormente cruzar os dados avaliando picos em comum a todas as frações, se mostrou eficiente até determinado ponto, uma vez que foram avaliados extratos provenientes de espécies pertencentes ao mesmo gênero, e portanto compartilham metabólitos secundários comuns ao gênero.

Partindo do princípio de que a atividade estava sendo desenvolvida a partir de uma molécula única, com o objetivo de alcançarmos uma molécula bioativa proveniente dos extratos das algas, supôs-se que esta atividade era decorrente da molécula referente à m/z 271,24, já que foi a única molécula identificada em todas as frações que mostraram atividade esquistossomicida. Contudo esta atividade não foi verificada quando a molécula foi avaliada individualmente, levando a duas hipóteses que explicassem a atividade: a primeira delas seria uma atividade decorrente de moléculas distintas, como se cada espécie produzisse um bioativo próprio; e a segunda é de que a atividade esteja sendo desencadeada pela ação de mais de uma substância concomitantemente, de acordo com algum mecanismo de ação aditivo ou sinérgico.

Cabe salientar ainda o fato de que a concentração da fração ativa avaliada nos testes bioguiados apresentou atividade em uma concentração relativamente baixa quando comparada à concentração do grupo controle tratado com praziquantel, já que esse é utilizada na sua forma isolada. Soma-se a isso o fato de que a resistência do parasita a esse tipo de tratamento vez crescendo ininterruptamente durante as últimas décadas para justificar a utilização destas algas marinhas como fonte de alternativas terapêuticas contra a esquistossomose.

Embora os extratos demonstrem um grande potencial como fonte farmacológica, o desenvolvimento de uma alternativa para o tratamento de esquistossomose não se mostrou possível até o presente momento de acordo com os resultados obtidos e para atingirmos este propósito serão necessários outros estudos voltados à elucidação de mecanismos de ação das moléculas atuando em conjunto ou a avaliação da atividade de outros metabólitos isoladamente.

CONCLUSÕES GERAIS

Para o desenvolvimento desta trabalho foram selecionadas as espécies algais para a prospecção de acordo com dados prévios sobre constituição química dos mesmos, na tentativa principal de obtermos uma molécula bioativa produzida por algas vermelhas ou pardas. Algumas espécies foram acertadamente selecionadas, outras nem tanto, como pode ser visto a partir dos resultados mostrados aqui, as espécies *Spyridia hypnoides* e *Chondria littoralis* não se mostraram promissoras para as atividades biológicas para as quais foram testadas, mas cabe ressaltar a promissora atividade antioxidante demonstrada pelo extrato de *S. hypnoides*, que certamente poderá se tornar estudos mais aprofundados, uma vez que não há na literatura citações de que esta espécie produza metabólitos que apresentem atividade antioxidante.

Certamente esta tese alerta que as macroalgas marinhas têm um grande potencial farmacológico, visto que foram abordados ensaios biológicos de relevante importância para a saúde pública. Porém, como estudo inicial e exploratório de prospecção, esta tese usou algas coletadas de bancos naturais, especialmente encontradas no Espírito Santo. Neste sentido, para o avanço e exploração comercial, deve-se considerar fortemente o cultivo em média e larga escala das espécies com estes potenciais. A formação de Associações, como já existentes em outros países e em algumas regiões do Brasil, para o cultivo e comercialização deve ser estimulada. Estas Associações de cultivo e comércio de macroalgas com potenciais tecnológico certamente ajudarão a desenvolver regiões mais carentes, aumentando a inserção social, juntamente com o aumento de renda familiar.

O desafio de desenvolvermos extrações por fluido supercrítico para diferentes algas de diferentes gêneros e portanto diferentes composições químicas, foi grande e inédito. Metodologicamente a extração por fluido supercrítico se mostrou bastante efetiva para os extratos apresentados nesta tese, pois na maioria dos casos gerou elevados índices de rendimento extrativo e extratos com uma ampla diversidade química. Por ser uma tecnologia relativamente recente aplicada à preparação de extratos biológicos, a disponibilidade de dados na literatura é ainda escassa. E, quando se busca a aplicação desta tecnologia para produção de extratos de

macroalgas marinhas, não são encontrados dados significativos publicados. Vale lembrar aqui que as macroalgas marinhas têm em sua composição, acima de 70% de água, o que as diferem sensivelmente das plantas terrestres. Este fato, certamente gera um comportamento químico de extração, por qualquer metodologia, bem distinto que as de plantas terrestres. Neste sentido, o uso da extração por fluido supercrítico, nesta tese, gera uma gama grande e interessante de resultados inéditos. Por outro lado, é natural isso torne mais difícil a discussão do que foi obtido nesta tese com o descrito na literatura.

Um ponto relevante que deve ser citado é a toxicidade relativa dos extratos preparados e descritos nesta tese. Fato este que valoriza sensivelmente a sua aplicabilidade nas áreas farmacológicas, visto que muitas das drogas usadas hoje, principalmente em doenças parasitárias, são ultrapassadas e produzem diversos efeitos colaterais.

A espécie *P. brasiliense*, conhecida por ser uma espécie produtora de metabólitos halogenados, principalmente compostos terpenoides e justamente selecionada para o presente trabalho pelo potencial que tal classe de metabólitos pudesse apresentar, foi a espécie mais facilmente coletada dentre todas e apresentou um rendimento satisfatório na extração por CO₂ supercrítico. Em relação às atividades biológicas foi uma das espécies que mais se destacou e apresenta um grande potencial e é considerado um forte candidato para futuros estudos. O prosseguimento da avaliação de suas atividades biológicas e procedimentos de fracionamento e isolamento de metabólitos não foi desenvolvido neste trabalho pelo fato de termos priorizado as espécies de *Dictyota*, contudo apresenta um grande potencial e embasamento mecanístico para ser desenvolvido.

As espécies pertencentes ao gênero *Dictyota*, *dichotoma* e *menstrualis* apresentaram bons resultados desde o momento em que foram coletadas, embora a dificuldade em serem propriamente identificadas. Elas foram obtidas em grande quantidade e apresentaram ótimos índices de rendimento no procedimento extativo. Este gênero mostra bons resultados nas avaliações das atividades biológicas, muito provavelmente devido a presença de compostos terpenoides, que são frequentemente descritos na literatura para este gênero, e estes foram alguns dos fatores pelos quais os extratos destas espécies foram priorizados. Outro ponto importante referente à seleção destas espécies para o desenvolvimento da etapa subsequente residiu no fato da possibilidade de estarmos prospectando um bioativo

específico ao gênero, portanto produzido por ambas as espécies e isso facilitaria uma análise comparativa. Posteriormente foi incluída ainda uma terceira espécie, a *Dictyota mertensii* que se mostrou fundamental por apresentar uma atividade biológica equivalente às outras duas espécies e pelo fato de termos obtido uma grande biomassa da mesma, fator que se mostrou decisivo nos procedimentos de isolamento da molécula alvo.

Os procedimentos de isolamento foram efetivos no objetivo de isolarmos uma das moléculas presente em todas as frações ativas, tratado durante o desenvolvimetno do trabalho como m/z 271,24, correspondente ao seu espectro de massas, em uma massa final de 7 mg demosntrando que o mesmo se encontrava em concentração de aproximadamente 0,1% em relação à biomassa seca da alga posteriormente ao processo de liofilização.

De maneira geral esta tese atinge o resultado esperado, pois são apresentadas atividades biológicas distintas e importantes do ponto de vista farmacológico, com diferentes macroalgas obtidas da costa brasileira. Este estudo é pioneiro de prospecção com estas algas e atividades bactericida, fungicida, anticâncer, antioxidante e parasitarias como antileishmania e esquistossomicida. Como pode ser observado nos resultados descritos aqui, linhagens específicas de algas tem potencialidade distinta de atividade biológica, o que remete principalmente para as diferentes composições químicas das mesmas. As macrolgas são submetidas constantemente a diferentes estresses ambientais (variações de radiação UV, salina, pH e temperatura) e como resposta elas sintetizam diferentes metabólitos secundários para se protegem. Certamente estes metabólitos merecem ter seus estudos aprofundas e a busca de sua aplicação tenológica estimulada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M. J.; BERMEJO, P. Bioactive natural products from marine sources. In: ATTA UR, R. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**: Elsevier, v. Volume 25, Part F, 2001. p.683-755. ISBN 1572-5995.

AFOLAYAN, A. F.; MANN, M. G. A.; LATEGAN, C. A.; SMITH, P. J.; BOLTON, J. J.; BEUKES, D. R. Antiplasmodial halogenated monoterpenes from the marine red alga *Plocamium cornutum*. **Phytochemistry**, v. 70, n. 5, p. 597-600, 2009.

AGRIPINO, D. G.; LIMA, M. E. L.; MORENO, P. R. Screening of Brazilian Plants for Antimicrobial and DNA-damaging activities. I. Atlantic Rain Forest - Ecological Station Juréia-Itatins. **Biota Neotropica**, v. 4, n. 2, p. 15, 2004.

AHN, M. J.; YOON, K. D.; MIN, S. Y.; LEE, J. S.; KIM, J. H.; KIM, T. G.; KIM, S. H.; KIM, N. G.; HUH, H.; KIM, J. Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and protease by phlorotannins from the brown alga *Ecklonia cava*. **Biol Pharm Bull**, v. 27, n. 4, p. 544-547, 2004.

AL-SAIF, S. S. A.-L.; ABDEL-RAOUF, N.; EL-WAZANANI, H. A.; AREF, I. A. Antibacterial substances from marine algae isolated from Jeddah coast of Red sea, Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 1, p. 57-64, 2014.

ALBUQUERQUE, I. R. L.; QUEIROZ, K. C. S.; ALVES, L. G.; SANTOS, E. A.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. O. Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulant activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 167-171, 2004.

ALIYU, A. B.; MUSA, A. M.; ABDULLAHI, M. S.; IBRAHIM, M. A.; TIJJANI, M. B.; ALIYU, M. S.; OYEWALE, A. O. Activity of saponin fraction of *Anisopus mannii* against some pathogenic microorganisms. **Journal of medicinal plants research**, v. 5, n. 31, p. 6709-6713, 2011.

ANDREGUETTI, D.; STEIN, E. M.; PEREIRA, C. M. P.; PINTO, E.; COLEPICOLO, P. Antioxidant Properties and UV Absorbance Pattern of Mycosporine-Like Amino Acids Analogs Synthesized in an Environmentally Friendly Manner. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 27, n. 6, p. 305-312, 2013.

ANTUNES, E. M.; AFOLAYAN, A. F.; CHIWAKATA, M. T.; FAKEE, J.; KNOTT, M. G.; WHIBLEY, C. E.; HENDRICKS, D. T.; BOLTON, J. J.; BEUKES, D. R. Identification and in vitro anti-esophageal cancer activity of a series of halogenated monoterpenes isolated from the South African seaweeds *Plocamium suhrii* and *Plocamium cornutum*. **Phytochemistry**, v. 72, n. 8, p. 769-772, 2011.

BARBOSA, J. P.; PEREIRA, R. C.; ABRANTES, J. L.; SANTOS, C. C. C. D.; REBELLO, M. A.; PAIXÃO, I. C. P.; TEIXEIRA, V. L. In vitro antiviral diterpenes from Brazilian brown algae *Dictyota pfaffii*. **Planta Med**, v. 70, p. 856 - 860, 2004a.

BARBOSA, J. P.; TEIXEIRA, V. R. L.; PEREIRA, R. C. A dolabellane diterpene from the brown alga *Dictyota pfaffii* as chemical defense against herbivores. **Botanica Marina**, v. 47, n. 2, p. 147-151, 2011/07/27 2004b.

BECERRO, M.; GOETZ, G.; PAUL, V.; SCHEUER, P. Chemical Defenses of the Sacoglossan Mollusk *Elysia rufescens* and Its Host Alga *Bryopsis* sp. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, n. 11, p. 2287-2299, 2001/11/01 2001.

BHUVANESWARI, S.; MURUGESAN, S.; SUBHA, T. S.; DHAMOTHARAN, R.; SHETTU, N. In vitro antioxidant activity of marine red algae *Chondrococcus*

hornemanni and Spyridia fusiformis. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 3, p. 82-85, 2013.

BICUDO, C. E. M.; BICUDO, R. M. T. **Algas de águas continentais brasileiras: chave ilustrada para identificação de gêneros**. São Paulo: 1970.

BÖKER-TORRES, M.; HORTA, P. A.; SALLES, J.; OURIQUES, L.; FUJII, M. T.; BOUZON, Z. Morfologia e reprodução de Chondria curvilineata F.S. Collins & Hervey (Rhodomelaceae, Rhodophyta), uma adição à flora brasileira. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, p. 73-78, 2009.

BOOMINATHAN, M.; MAHESH, A. Seaweed Carotenoids for Cancer Therapeutics. In: KIM, S.-K. (Ed.). **Handbook of Anticancer Drugs from Marine Origin**: Springer International Publishing, 2015. cap. 10, p.185-203. ISBN 978-3-319-07144-2.

BOOPATHY, N. S.; KATHIRESAN, K. Anticancer Drugs from Marine Flora: An Overview. **Journal of Oncology**, v. 2010, p. 214186, 2010.

BOUAICHA, N.; PESANDO, D.; PUEL, D.; TRINGALI, C. Cytotoxic Diterpenoids from the Brown Alga *Dilophus ligulatus*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 10, p. 1747-1752, 1993.

BRENNAN, M. R.; ERICSON, K. L. Polyhalogenated indoles from the marine alga *rhodophyllis membranacea harvey*. **Tetrahedron Letters**, v. 19, n. 19, p. 1637-1640, // 1978.

BUEDING, E.; DOLAN, P.; LEROY, J. P. The antischistosomal activity of oltipraz. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol.**, v. 37, n. 2, p. 293-303, 1982.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica de química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

CAPUZZO, A.; MAFFEI, M.; OCCHIPINTI, A. Supercritical Fluid Extraction of Plant Flavors and Fragrances. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 7194, 2013.

CARDOZO, K. H. M.; GUARATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R.; TONON, A. P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A. O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1-2, p. 60-78, 2007/8// 2007.

CARRETO, J. I.; CARIGNAN, M. O. Mycosporine-Like Amino Acids: Relevant Secondary Metabolites. Chemical and Ecological Aspects. **Marine Drugs**, v. 9, n. 3, p. 387-446, 2011.

CASSIANO, D. S. A. **Estudo bioguiado através da atividade anticolinesterásica e da análise por CLAE-DAD e CLAE-DAD-EM/EM de *Ocotea* spp. (Lauraceae)** 2014. 162 (Doutorado). Biotecnologia, UEFS

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 167-176, May-Aug 2010.

CHAN-BACAB, M. J.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 6, p. 674-688, 2001.

CHANDRAKANT, K.; ARUN, G.; SATYAJYOTI, K.; SHEFALI, K. Drug discovery from plant sources: An integrated approach. **Ayu**, v. 33, n. 1, p. 10-19, 2012.

COLLEY, D. G.; BUSTINDUY, A. L.; SECOR, W. E.; KING, C. H. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253-2264, 2014.

CONKLIN, K. Y.; SHERWOOD, A. R. Molecular and morphological variation of the red alga *Spyridia filamentosa* (Ceramiales, Rhodophyta) in the Hawaiian Archipelago. **Phycologia**, v. 51, n. 3, p. 347-357, 2012.

COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; EPIFANIO, R. D. A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 703-716, 2009.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V. S.; COLLINS, T. **Robbins: Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

CREWS, P.; KHO-WISEMAN, E.; MONTANA, P. Halogenated alicyclic monoterpenes from the red algae *Plocamium*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 116-120, 1978/01/01 1978.

DA CONCEIÇÃO RIVANOR, R. L.; CHAVES, H. V.; DO VAL, D. R.; DE FREITAS, A. R.; LEMOS, J. C.; RODRIGUES, J. A. G.; PEREIRA, K. M. A.; DE ARAÚJO, I. W. F.; BEZERRA, M. M.; BENEVIDES, N. M. B. A lectin from the green seaweed *Caulerpa cupressoides* reduces mechanical hyper-nociception and inflammation in the rat temporomandibular joint during zymosan-induced arthritis. **International Immunopharmacology**, v. 21, n. 1, p. 34-43, 7// 2014.

DANSO-APPIAH, A.; OLLIARO, P. L.; DONEGAN, S.; SINCLAIR, D.; UTZINGER, J. Drugs for treating *Schistosoma mansoni* infection (review). **Cochrane Database Syst Rev**, v. 28, n. 2, 2013.

DE OLIVEIRA, E. C.; HORTA, P. A.; DA SILVA, B. N. T. et al. 2007. *Algae Maris Brasilis: A catalogue of Brazilian Marine Algae*. UFSC, www.algaemarisbrasilis.ccb.ufsc.br/algaemarisbrasilis.html (acessado em: 15dez2011).

DE PAULA, J. C.; VALLIM, M. A.; TEIXEIRA, V. R. L. What are and where are the bioactive terpenoids metabolites from Dictyotaceae (Phaeophyceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 216-228, 2011.

DE ROSA, S.; S. DE STEFANO, T.; MACURA, S.; TRIVELLONE, E.; ZAVODNIKŠ, N. Chemical studies of north adriatic seaweeds-I new dolabellane diterpenes from the brown alga *dilophus fasciola*. **Tetrahedron**, v. 40, n. 23, p. 4991-4995, 1984.

DE VASCONCELOS, A.; OLIVEIRA, P. S.; RITTER, M.; FREITAG, R. A.; ROMANO, R. L.; QUINA, F. H.; PIZZUTI, L.; PEREIRA, C. M. P.; STEFANELLO, F. M.; BARSCHAK, A. G. Antioxidant capacity and environmentally friendly synthesis of dihydropyrimidin-(2H)-ones promoted by naturally occurring organic acids. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 26, n. 4, p. 155-161, 2012.

DELA CRUZ, J. M.; LOZOVY, V. V.; DANTUS, M. Quantitative Mass Spectrometric Identification of Isomers Applying Coherent Laser Control. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 109, n. 38, p. 8447-8450, 2005/09/01 2005.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Natural products for cancer chemotherapy. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 687-699, 2011.

DEWICK, P. M. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. **Natural Product Reports**, v. 19, n. 2, p. 181-222, 2002.

DIAS-MARRERO, A. R.; ROVIROSA, J.; DARIAS, J.; SAN-MARTIN, A.; CUETO, M. Plocamenols A-C, novel linear polyhalohydroxylated monoterpenes from *Plocamium cartilagineum*. **Journal of Natural Products**, v. 5, p. 585-588, 2002.

DOMETTILA, C.; JOSELIN, J.; JEEVA, S. Phytochemical analysis of some south Indian seaweeds. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 4, p. 275-278, 2013.

DOS SANTOS, V.; LEITE, K.; DA COSTA SIQUEIRA, M.; REGASINI, L.; MARTINEZ, I.; NOGUEIRA, C.; GALUPPO, M.; STOLF, B.; PEREIRA, A.; CICARELLI, R.; FURLAN, M.; GRAMINHA, M. Antiprotozoal Activity of Quinonemethide Triterpenes from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 1053-1062, 2013.

DURÁN, R.; ZUBÍA, E.; ORTEGA, M. J.; SALVÁ, J. New diterpenoids from the alga *Dictyota dichotoma*. **Tetrahedron**, v. 53, n. 25, p. 8675-8688, 1997.

DUTRA, L. A.; DE ALMEIDA, L.; PASSALACQUA, T. G.; REIS, J. S.; TORRES, F. A. E.; MARTINEZ, I.; PECCININI, R. G.; CHIN, C. M.; CHEGAEV, K.; GUGLIELMO, S.; FRUTTERO, R.; GRAMINHA, M. A. S.; DOS SANTOS, J. L. Leishmanicidal Activities of Novel Synthetic Furoxan and Benzofuroxan Derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4837-4847, August 1, 2014 2014.

EL AMRAOUI, B.; EL AMRAOUI, M.; COHEN, N.; FASSOUANE, A. Anti-Candida and anti-Cryptococcus antifungal produced by marine microorganisms. **Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology**, v. 24, n. 4, p. e149-e153, 12// 2014.

EXPÓSITO, O.; BONFILL; MOYANO; ONRUBIA; MIRJALILI; CUSIDÓ; PALAZÓN, J. Biotechnological Production of Taxol and Related Taxoids: Current State and Prospects **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 109-121, 2009.

FENICAL, W. **Halimide, a cytotoxic marine natural product, and derivatives thereof.** United States Patent: The Regents of the University of California. 6,069,146 2000.

FENICAL, W.; NORRIS, J. N. Chemotaxonomy in marine algae: Chemical separation of some *Laurencia* species (Rhodophyta) from the gulf of California **Journal of Phycology**, v. 11, n. 1, p. 104-108, 1975a.

FENICAL, W.; NORRIS, J. N. Chemotaxonomy in marine algae: chemical separation of some *Laurencia* species (Rhodophyta) from the gulf of California. **Journal of Phycology**, v. 11, p. 104-108, 1975b.

FERRERES, F.; SOUSA, C.; VRCHOVSKÁ, V.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J.; SEABRA, R.; ANDRADE, P. Chemical composition and antioxidant activity of *Tronchuda cabbage* internal leaves. **European Food Research and Technology**, v. 222, n. 1, p. 88-98, 2006.

FLEURY, B. G.; KELECOM, A.; PEREIRA, R. C.; TEIXEIRA, V. L. Polyphenols, Terpenes and Sterols in Brazilian Dictyotales and Fucales (Phaeophyta). **Botanica Marina**, v. 37, p. 457-462, 1994.

FOROUMADI, A.; SAMZADEH-KERMANI, A.; EMAMI, S.; DEHGHAN, G.; SORKHI, M.; ARABSORKHI, F.; HEIDARI, M. R.; ABDOLLAHI, M.; SHAFIEE, A. Synthesis and antioxidant properties of substituted 3-benzylidene-7-alkoxychroman-4-ones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 24, p. 6764-6769, 2007.

GARRIDO, V. R.; TEIXEIRA, G. A. P. B.; TEIXEIRA, V. R. L.; OCAMPO, P.; FERREIRA, W. J.; CAVALCANTI, D. N.; CAMPOS, S. M. N.; PEDRUZZI, M. D. M. B.; OLAYA, P.; SANTOS, C. C. C. D.; GIONGO, V.; PAIXÃO, I. C. P. Evaluation of the acute toxicity of dolabelladienotriol, a potential antiviral from the brown alga *Dictyota paffii*, in BALB/c mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 209-215, 2011.

GOETZ, G.; YOSHIDA, W. Y.; SCHEUER, P. J. The absolute stereochemistry of Kahalalide F. **Tetrahedron**, v. 55, n. 25, p. 7739-7746, 1999.

GOMES, M. A. V. **A química de *Plocamium brasiliense* (Greville) Howe & Taylor: abordagens sistemáticas e ecológicas**. 2007. 95 dissertação (Mestre). Departamento de Biologia Marinha, Universidade Federal Fluminense

GONZÁLEZ, A. G.; DARIAS, V.; ESTÉVEZ, E. Chemotherapeutic Activity of Polyhalogenated Terpenes from Spanish Algae. **Planta Med**, v. 44, n. 01, p. 44-46, 29.03.2007 1982.

GORE, L.; DEGREGORI, J.; PORTER, C. C. Targeting developmental pathways in children with cancer: what price success? **The Lancet Oncology**, v. 14, n. 2, p. e70-e78,

GORINSTEIN, S.; WIEISZ, M.; ZEMSER, M.; TILIS, K.; STILLER, A.; FLAM, I.; GAT, Y. Spectroscopic Analysis of Polyphenols in White Wines. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 2, p. 115-120, 1993.

GOVENKAR, M. B.; WAHIDULLA, S. Constituents of Chondria armata. **Phytochemistry**, v. 54, n. 8, p. 979-981, 2000.

GRESSLER, V.; YOKOYA, N. S.; FUJII, M. T.; COLEPICOLO, P.; FILHO, J. M.; TORRES, R. P.; PINTO, E. Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 585-590, 2010.

GUEDES, E.; DOS SANTOS ARAÚJO, M.; SOUZA, A.; DE SOUZA, L.; DE BARROS, L.; DE ALBUQUERQUE MARANHÃO, F.; SANT'ANA, A. Antifungal Activities of Different Extracts of Marine Macroalgae Against Dermatophytes and Candida Species. **Mycopathologia**, v. 174, n. 3, p. 223-232, 2012/09/01 2012.

GUIRY, M. D. *AlgaeBase*. **World-wide eletronic publication**, Galway, 2015a.

Disponível em: <

http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=51&-

[session=abv4:8F6BFC320c617238DDIUV3EC9781](http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=51&-session=abv4:8F6BFC320c617238DDIUV3EC9781) >. Acesso em: 07 May 2011.

GUIRY, M. D. et al. 2015b. Dictyota J.V.Lamouroux, 1809. Galway, National University of Ireland,

http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=E7b3728496f0a5cd

[d&-session=abv4:8F6B34D211c0b31933INB2A84995](http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=E7b3728496f0a5cd&-session=abv4:8F6B34D211c0b31933INB2A84995) (acessado em: 27jul2015).

GUIRY, M. D. et al. 2015c. Plocamium J.V.Lamouroux, 1813. Galway, National University of Ireland,

http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=E7b3728496f0a5cd

[d&-session=abv4:8F6B34D211c0b31933INB2A84995](http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=E7b3728496f0a5cd&-session=abv4:8F6B34D211c0b31933INB2A84995) (acessado em: 27jul2015).

HAGHBAKHS, R.; HAYER, H.; SAIDI, M.; KESHTKARI, S.; ESMAEILZADEH, F. Density estimation of pure carbon dioxide at supercritical region and estimation solubility of solid compounds in supercritical carbon dioxide: Correlation approach based on sensitivity analysis. **Fluid Phase Equilibria**, v. 342, p. 31-41, 3/25/ 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: New York, 2007. 888

HAMANN, M. T.; OTTO, C. S.; SCHEUER, P. J.; DUNBAR, D. C. Kahalalides: Bioactive Peptides from a Marine Mollusk *Elysia rufescens* and Its Algal Diet *Bryopsis* sp.1. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 61, n. 19, p. 6594-6600, 1996/01/01 1996.

HAMANN, M. T.; SCHEUER, P. J. Kahalalide F: a bioactive depsipeptide from the sacoglossan mollusk *Elysia rufescens* and the green alga *Bryopsis* sp. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 13, p. 5825-5826, 1993/06/01 1993.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-990, 1999.

HARKER, W. G.; MACKINTOSH, F. R.; SIKIC, B. I. Development and Characterization of a Human Sarcoma Cell Line, MES-SA, Sensitive to Multiple Drugs. **Cancer Research**, v. 43, n. 10, p. 4943-4950, October 1, 1983 1983.

HEO, S.-J.; YOON, W.-J.; KIM, K.-N.; AHN, G.-N.; KANG, S.-M.; KANG, D.-H.; AFFAN, A.; OH, C.; JUNG, W.-K.; JEON, Y.-J. Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8–9, p. 2045-2051, 2010.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 136-148, 2006a.

HERRERO, M.; JAIME, L.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Optimization of the Extraction of Antioxidants from *Dunaliella salina* Microalga by Pressurized Liquids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 15, p. 5597-5603, 2006/07/01 2006b.

HERRERO, M.; SÁNCHEZ-CAMARGO, A. D. P.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 2015.

HIRSCHFELD, D. R.; FENICAL, W.; LIN, G. H. Y.; WING, R. M.; RADLICK, P.; SIMS, J. J. Marine natural products. VIII. Pachydictyol A, an exceptional diterpene alcohol from the brown alga, *Pachydictyon coriaceum*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 95, n. 12, p. 4049-4050, 1973.

HUA, J.; MUTCH, D. G.; HERZOG, T. J. Stable suppression of MDR-1 gene using siRNA expression vector to reverse drug resistance in a human uterine sarcoma cell line. **Gynecologic Oncology**, v. 98, n. 1, p. 31-38, 2005.

HUNT, P.; STEWART, R.; MESQUITA, J.; OLDRING, L. **Neglected diseases: A human right analysis**. WHO 2007.

ILIAS, A. M.; CONNOR, W. E.; LIN, D. S.; AHMAD, M. U. Sterol Composition of Some Seaweeds. **Fette, Seifen, Anstrichmittel**, v. 87, n. 9, p. 345-346, 1985.

IMHOFF, J. F.; LABES, A.; WIESE, J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. **Biotechnology Advances**, v. In Press, Corrected Proof, 2011.

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Terpenes from *Copaifera* Demonstrated in Vitro Antiparasitic and Synergic Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2994-3001, 2012/04/12 2012.

KAMAT, S. Y.; WAHIDULLA, S.; DÂ€™SOUZA, L.; NAIK, C. G.; AMBIYE, V.; BHAKUNI, D. S.; GOEL, A. K.; GARG, H. S.; SRIMAL, R. C. Bioactivity of Marine Organisms. VI. Antiviral Evaluation of Marine Algal Extracts from the Indian Coast. **Botanica Marina**, v. 35, n. 2, p. 161-164, 2011/08/30 1992.

KIM, M.-M.; TA, Q. V.; MENDIS, E.; RAJAPAKSE, N.; JUNG, W.-K.; BYUN, H.-G.; JEON, Y.-J.; KIM, S.-K. Phlorotannins in *Ecklonia cava* extract inhibit matrix metalloproteinase activity. **Life Sciences**, v. 79, n. 15, p. 1436-1443, 2006.

KLEJDUS, B.; LOJKOVÁ, L.; PLAZA, M.; ŠNÓBLOVÁ, M.; ŠTĚRBOVÁ, D. Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: Ultrasound-assisted supercritical fluid extraction followed by fast

chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 51, p. 7956-7965, 2010.

KLEJDUS, B.; LOJKOVÁ, L.; VLČEK, J. Hyphenated solid phase extraction/supercritical fluid extraction methods for extraction of phenolic compounds from algae. **Current Analytical Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 86-98, 2014.

KOLESNIKOVA, S. A.; KALINOVSKY, A. I.; FEDOROV, S. N.; SHUBINA, L. K.; STONIK, V. A. Diterpenes from the Far-eastern brown alga *Dictyota dichotoma*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 19, p. 2115-2119, 2006.

KOŁODZIEJCZYK, P. P.; WANG, X.; MARIANCHUK, M.; LU, W.; AMAROWICZ, R. et al. 1998. Phenolics in rapeseed: capillary electrophoresis as a novel analytical method for detection of sinapine, sinapic acid esters and ferulates. <http://www.regional.org.au/au/gcirc/1/479.htm> (acessado em: 29jul15).

KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D.; DE NYS, R. Halogenated Monoterpenes from *Plocamium costatum* and Their Biological Activity¹. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 2, p. 383-385, 1999/02/01 1999.

KONTUSH, A.; SCHEKATOLINA, S. Vitamin E in Neurodegenerative Disorders: Alzheimer's Disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1031, n. 1, p. 249-262, 2004.

KUSUMAWATI, I.; INDRAYANTO, G. Chapter 15 - Natural Antioxidants in Cosmetics. In: ATTA UR, R. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**: Elsevier, v. Volume 40, 2013. p.485-505. ISBN 1572-5995.

LAUS, G. Biological activities of natural halogen compounds. In: ATTA UR, R. (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**: Elsevier, v. Volume 25, Part F, 2001. p.757-809. ISBN 1572-5995.

LEE, S.-H.; YONG, L.; KARADENIZ, F.; KIM, M.-M.; KIM, S.-K. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of phloroglucinal derivatives from edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 9, p. 1552-1558, 2009.

LI, G.-H.; LE, G.-W.; SHI, Y.-H.; SHRESTHA, S. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. **Nutrition Research**, v. 24, n. 7, p. 469-486, 2004.

LI, Y.-X.; WIJESEKARA, I.; LI, Y.; KIM, S.-K. Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 2219-2224, 2011.

LI, Y.; QIAN, Z.-J.; KIM, M.-M.; KIM, S.-K. Cytotoxic activities of phlorethol and fucophlorethol derivatives isolated from laminariaceae *Ecklonia cava*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, n. 2, p. 357-369, 2011.

LIAU, B.-C.; SHEN, C.-T.; LIANG, F.-P.; HONG, S.-E.; HSU, S.-L.; JONG, T.-T.; CHANG, C.-M. J. Supercritical fluids extraction and anti-solvent purification of carotenoids from microalgae and associated bioactivity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, n. 1, p. 169-175, 2010.

LOPES, G.; PINTO, E.; ANDRADE, P. B.; VALENTÃO, P. Antifungal Activity of Phlorotannins against Dermatophytes and Yeasts: Approaches to the Mechanism of Action and Influence on *Candida albicans* Virulence Factor. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e72203, 2013.

MACHADO, L. P.; MATSUMOTO, S. T.; CUZZUO, G. R. F.; JR, L. F. G. O. Influence of laboratory cultivation on species of Rhodophyta physiological evaluations

and antifungal activity against phytopathogens. **Revista de Ciências Agronômicas**, v. 45, 2014.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D.; FERNANDEZ-SEVILLA, J. M.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; GARCÍA, M. C. C.; GRIMA, E. M. Supercritical fluid extraction of carotenoids from *Scenedesmus almeriensis*. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 928-935, 12/1/ 2010.

MAEDA, H.; HOSOKAWA, M.; SASHIMA, T.; FUNAYAMA, K.; MIYASHITA, K. Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 332, n. 2, p. 392-397, 2005.

MAEDA, H.; TSUKUI, T.; HOSOKAWA, M.; MIYASHITA, K. Seaweed carotenoid, fucoxanthin, as a multi-functional nutrient. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 17, n. 1, p. 196-199, 2008.

MÄKI-ARVELA, P.; HACHEMI, I.; MURZIN, D. Y. Comparative study of the extraction methods for recovery of carotenoids from algae: extraction kinetics and effect of different extraction parameters. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 89, n. 11, p. 1607-1626, 2014.

MANASSA, G. Structural elucidation of Terpenoids by spectroscopic techniques. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences** v. special issue, n. 5, p. 36-37, 2014.

MANZO, E.; CIAVATTA, M. L.; BAKKAS, S.; VILLANI, G.; VARCAMONTI, M.; ZANFARDINO, A.; GAVAGNIN, M. Diterpene content of the alga *Dictyota ciliolata* from a Moroccan lagoon. **Phytochemistry Letters**, v. 2, n. 4, p. 211-215, 2009.

MARTINS, C. L.; RAMLOV, F.; NOCCHI CARNEIRO, N.; GESTINARI, L.; DOS SANTOS, B.; BENTO, L.; LHULLIER, C.; GOUVEA, L.; BASTOS, E.; HORTA, P.; SOARES, A. Antioxidant properties and total phenolic contents of some tropical seaweeds of the Brazilian coast. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 4, p. 1179-1187, 2013/08/01 2013.

MASSOULIE, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S.; KREJCI, E.; VALLETTE, F. M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Prog Neurobiol**, v. 41, n. 1, p. 31-91, 1993.

MATOS, F. J. A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: ABEU, 2009.

MAUL, A. A.; WASICKY, R.; BACCHI, E. M. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, p. 185-200, 1996.

MCINTOSH, M.; CRUZ, L. J.; HUNKAPILLER, M. W.; GRAY, W. R.; OLIVERA, B. M. Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail *Conus magus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 218, n. 1, p. 329-334, 1982.

MENDES, R. L.; FERNANDES, H. L.; COELHO, J.; REIS, E. C.; CABRAL, J. M. S.; NOVAIS, J. M.; PALAVRA, A. F. Supercritical CO₂ extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. **Food Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 99-103, // 1995.

MOLINSKI, T. F.; DALISAY, D. S.; LIEVENS, S. L.; SALUDES, J. P. Drug development from marine natural products. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 8, n. 1, p. 69-85, 2009.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 9, 2004.

MONDAL, S.; BANDYOPADHYAY, S.; GHOSH, M. K.; MUKHOPADHYAY, S.; ROY, S.; MANDAL, C. Natural Products: Promising Resources for Cancer Drug Discovery. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 49-75, 2012.

MOORE, B. S.; EUSTÁQUIO, A. S.; MCGLINCHEY, R. P. Advances in and applications of proteasome inhibitors. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 4, p. 434-440, 2008.

MOUSSAVOU, G.; KWAK, D.; OBIANG-OBONOU, B.; MARANGUY, C.; DINZOUNA-BOUTAMBA, S.-D.; LEE, D.; PISSIBANGANGA, O.; KO, K.; SEO, J.; CHOO, Y. Anticancer Effects of Different Seaweeds on Human Colon and Breast Cancers. **Marine Drugs**, v. 12, n. 9, p. 4898, 2014.

MURAKAMI, C. **Estudo da composição química e atividades biológicas de óleos voláteis de *Chromolaena laevigata* (Lam.) King & Rob. em diferentes fases fenológicas**. 2009. 95 (Mestrado). Instituto de Botânica

MURUGAN, K.; IYER, V. V. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Extracts of Selected Red and Brown Seaweeds from the Mandapam Coast of Tamil Nadu. **Journal of Food Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 92-101, 2014.

NAQVI, S. S. W. A.; KAMAT, S. Y.; FERNANDES, L.; REDDY, C. V. G.; BHAKUNI, D. S.; DHAWAN, B. N. Screening of Some Marine Plants from the Indian Coast for Biological Activity. **Botanica Marina**, v. 24, n. 1, p. 51-56, 2011/08/30 1981.

NAZEMIYEH, H.; DELAZAR, A.; MOVAHEDIN, N.; JODARI, M.; IMANI, Y.; GHAHRAMANI, M.-A.; NAHAR, L.; SARKER, S. D. Free radical scavengers from the aerial parts of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. & Hausskn. (Apiaceae) and GC-MS analysis of the essential oils from its fruits. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 914-918, 2009.

NCCLS. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard M27-A2**. NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards. ISBN 1-56238-469-4 2002.

NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard. M7-A7.** NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards. ISBN 1-56238-486-4 2006.

NCI et al. 2015. What is Cancer. NIH website, National Cancer Institute <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer> (acessado em: 27jul15).

NUNES, J. M. C.; PAULA, E. J. O gênero *Dictyota* Lamouroux (Dictyotaceae - Phaeophyta) no litoral do estado da Bahia, Brasil. **Acta Botanica Malacitana**, v. 26, p. 5-18, 2001.

O'CARRA, P.; MURPHY, R. F.; KILLILEA, S. D. The native forms of the phycobilin chromophores of algal biliproteinas **Biochem. J.**, v. 187, p. 303-309, 1980.

OBERMÜLLER, B.; KARSTEN, U.; ABELE, D. Response of oxidative stress parameters and sunscreens compounds in Arctic amphipods during experimental exposure to maximal natural UVB radiation. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 323, n. 2, p. 100-117, 10/12/2005.

PAN, S.; ODABAS, N.; SISSOLAK, B.; IMENDÖRFFER, M.; ZELGER, M.; JUNGBAUER, A.; HAHN, R. Engineering batch and pulse refolding with transition of aggregation kinetics: An investigation using green fluorescent protein (GFP). **Chemical Engineering Science**, v. 131, p. 91-100, 7/28/ 2015.

PATIL, A. D.; BERRY, D.; BROOKS, D. P.; HEMLING, M. E.; KUMAR, N. V.; MITCHELL, M. P.; OHLSTEIN, E. H.; WESTLEY, J. W. A diterpene epoxide from the marine brown alga *Dictyota* sp.: Possible vasopressin V1 receptor antagonist. **Phytochemistry**, v. 33, n. 5, p. 1061-1064, 1993.

PELLATI, F.; BENVENUTI, S.; MAGRO, L.; MELEGARI, M.; SORAGNI, F. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea* spp. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 2, p. 289-301, 2004.

PEREIRA, H. S.; LEÃO-FERREIRA, L. R.; MOUSSATCHÉ, N.; TEIXEIRA, V. L.; CAVALCANTI, D. N.; COSTA, L. J.; DIAZ, R.; FRUGULHETTI, I. C. P. P. Antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazilian marine alga *Dictyota menstrualis* against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). **Antiviral Research**, v. 64, n. 1, p. 69-76, 2004.

PEREIRA, L. et al. 2014. MACOI, Portuguese Seaweed Website. University of Coimbra, <http://macoi.ci.uc.pt> (acessado em: 21jul15).

PEREIRA, R. C.; COSTA-LOTUFO, L. V. Bioprospecting for bioactives from seaweeds: potential, obstacles and alternatives. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 894-905, 2012.

PERES, J. C. F.; CARVALHO, L. R. D.; GONÇALEZ, E.; BERIAN, L. O. S.; FELICIO, J. D. A. Evaluation of antifungal activity of seaweed extracts **Ciência Agrotécnica**, v. 36, n. 3, p. 294-299, 2012a.

PERES, J. C. F.; CARVALHO, L. R. D.; GONÇALEZ, E.; BERIAN, L. O. S.; FELICIO, J. D. A. Evaluation of antifungal activity of seaweed extracts. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, p. 294-299, 2012b.

PERRY, G.; CASH, A. D.; SMITH, M. A. Alzheimer Disease and Oxidative Stress. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 120-123, 2002.

PIRAS, A.; FALCONIERI, D.; BAGDONAITÉ, E.; MAXIA, A.; GONÇALVES, M. J.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L.; PORCEDDA, S. Chemical composition and

antifungal activity of supercritical extract and essential oil of *Tanacetum vulgare* growing wild in Lithuania. **Natural Product Research**, v. 28, n. 21, p. 1906-1909, 2014/11/02 2014.

PRABHAKAR, K.; KUMAR, L. S.; RAJENDRAN, S.; CHANDRASEKARAN, M.; BHASKAR, K.; SAJIT KHAN, A. K. Antifungal Activity of Plant Extracts against *Candida* Species from Oral Lesions. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, n. 6, p. 801-803, 2008.

RAJAURIA, G.; JAISWAL, A. K.; ABU-GANNAM, N.; GUPTA, S. Antimicrobial, antioxidant and free radical-scavenging capacity of brown seaweed *himanthalia elongata* from western coast of ireland **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 322-335, 2012.

RAMALINGAM, A.; AMUTHA, C. Antibacterial Activity of Four Seaweeds Collected from Thondi Coast, Tamilnadu, India. **International Journal of Research in Biological Sciences**, v. 3, n. 1, p. 60-64, 2013.

RAMOS, E. H. S.; MORAES, M. M.; NERYS, L. L. D. A.; NASCIMENTO, S. C.; MILITÃO, G. C. G.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. D.; CÂMARA, C. A. G. D.; SILVA, T. G. Chemical Composition, Leishmanicidal and Cytotoxic Activities of the Essential

Oils from *Mangifera indica* L. var. Rosa and Espada. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 9, 2014.

RAVEENDRAN, P.; IKUSHIMA, Y.; WALLEN, S. L. Polar Attributes of Supercritical Carbon Dioxide. **Accounts of Chemical Research**, v. 38, n. 6, p. 478-485, 2005/06/01 2005.

RINEHART, K. L. Antitumor compounds from tunicates. **Medicinal Research Reviews**, v. 20, n. 1, p. 1-27, 2000.

ROBLES-CENTENO, P.; BALLANTINE, D.; GERWICK, W. Dynamics of antibacterial activity in three species of Caribbean marine algae as a function of habitat and life history. In: LINDSTROM, S. e CHAPMAN, D. (Ed.). **Fifteenth International Seaweed Symposium**: Springer Netherlands, v.116, 1996. cap. 66, p.457-462. (Developments in Hydrobiology). ISBN 978-94-010-7242-7.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, Á. S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, p. 317-320, 2003.

SAMAK, G.; SHENOY, R. P.; MANJUNATHA, S. M.; VINAYAK, K. S. Superoxide and hydroxyl radical scavenging actions of botanical extracts of *Wagatea spicata*. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 631-634, 2009.

SATHYA, R.; KANAGA, N.; SANKAR, P.; JEEVA, S. Antioxidant properties of phlorotannins from brown seaweed *Cystoseira trinodis* (Forsskål) C. Agardh. **Arabian Journal of Chemistry**,

SIAMOPOULOU, P.; BIMPLAKIS, A.; ILIOPOULOU, D.; VAGIAS, C.; COS, P.; VANDEN BERGHE, D.; ROUSSIS, V. Diterpenes from the brown algae *Dictyota dichotoma* and *Dictyota linearis*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 14, p. 2025-2030, 2004.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. **Spectrometric identification of organic compounds**. New York: Wiley, 1997.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentals of Analytical Chemistry**. Independence: Brooks Cole, 2006.

SOARES, D. C.; CALEGARI-SILVA, T. C.; LOPES, U. G.; TEIXEIRA, V. L.; DE PALMER PAIXÃO, I. C. N.; CIRNE-SANTOS, C.; BOU-HABIB, D. C.; SARAIVA, E. M. Dolabelladienetriol, a Compound from Dictyota pfaffii Algae, Inhibits the Infection by Leishmania amazonensis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, p. e1787, 2012.

SOVOVÁ, H. Steps of supercritical fluid extraction of natural products and their characteristic times. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 66, n. 0, p. 73-79, 2012.

SPRINGER, V. G. et al. 1961. Chondria littoralis Harvey Florida Museum of Natural History, University of Florida, (acessado em:

STEIN, E. M. **Avaliação das atividades biológicas e composição química dos extratos de algas vermelhas do gênero *Laurencia* (Rhodomelaceae, Ceramiales) do litoral do Espírito Santo, Brasil.** 2011. (mestre). instituto de Biociências, USP

STIRK, W.; REINECKE, D.; VAN STADEN, J. Seasonal variation in antifungal, antibacterial and acetylcholinesterase activity in seven South African seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, n. 3, p. 271-276, 2007/06/01 2007.

SUBRA, P.; TUFEU, R.; GARRABOS, Y.; BOISSINOT, P. Supercritical fluid extraction from a mediterranean brown alga. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 4, n. 4, p. 244-249, 1991.

SUN, H.; GE, X.; LV, Y.; WANG, A. Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. **Journal of Chromatography A**, v. 1237, n. 0, p. 1-23, 2012.

TANNOCK, I. F.; ROTIN, D. Acid pH in tumor and its potential for therapeutic exploitation. **Cancer Research**, v. 49, p. 4373-4384, 1989.

TORRES, F. A. E.; PASSALACQUA, T. G.; VELÁSQUEZ, A. M. A.; DE SOUZA, R. A.; COLEPICOLO, P.; GRAMINHA, M. A. S. New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 3, p. 265-276, 5// 2014.

TRINGALI, C.; ORIENTE, G.; PIATTELLI, M.; GERACI, C.; NICOLOSI, G.; BREITMAIER, E. Crenuladial, an antimicrobial diterpenoid from the brown alga *Dilophus ligulatus*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 66, n. 11, p. 2799-2802, 1988.

TSUZUKI, J. K.; SVIDZINSKI, T. I. E.; SHINOBU, C. S.; SILVA, L. F. A.; RODRIGUES-FILHO, E.; CORTEZ, D. A. G.; FERREIRA, I. C. P. Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, p. 577-583, 2007.

VALENTÃO, P.; TRINDADE, P.; GOMES, D.; GUEDES DE PINHO, P.; MOUGA, T.; ANDRADE, P. B. *Codium tomentosum* and *Plocamium cartilagineum*: Chemistry and antioxidant potential. **Food Chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1359-1368, 2010.

VELLOSA, J. C. R.; BARBOSA, V. D. F.; KHALIL, N. M.; SANTOS, V. A. D. F. F. M. D.; FURLAN, M.; BRUNETTI, I. L.; OLIVEIRA, O. M. M. D. F. Profile of *Maytenus aquifolium* action over free radicals and reactive oxygen species. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 447-453, 2007.

WALKER, R. D.; HAWKINS, J. E. The Ultraviolet Absorption Spectra of Some Terpene Hydrocarbons. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, n. 16, p. 4209-4210, 1952/08/01 1952.

WATERS. Supercritical Fluid Extraction (SFE) systems. www.waters.com, 2015.

Disponível em: < http://www.waters.com/waters/pt_BR/Supercritical-Fluid-Extraction-%28SFE%29-Systems/nav.htm?cid=10146521&locale=pt_BR >.

WELLER, M. G. A Unifying Review of Bioassay-Guided Fractionation, Effect-Directed Analysis and Related Techniques. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 7, p. 9181-9209, 2012.

WEN, Z.-Y.; CHEN, F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 21, n. 4, p. 273-294, 7// 2003.

WESOLOWSKA, O.; PAPROCKA, M.; KOZLAK, J.; MOTOHASHI, N.; DUS, D.; MICHALAK, K. Human Sarcoma Cell Lines MES-SA and MES-SA/Dx5 as a Model for Multidrug Resistance Modulators Screening. **Anticancer Research**, v. 25, n. 1A, p. 383-389, January 1, 2005 2005.

WHITNEY, J. M.; PARNES, J. S.; SHEA, K. J. Total Synthesis of a Plocamium Monoterpene Marine Natural Product. Synthetic Applications of Bridgehead Allylsilanes. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 62, n. 26, p. 8962-8963, 1997/12/01 1997.

WHO et al. 2015. Antimicrobial resistance. World Health Organization website, (acessado em:

YAKOVLEVA, I.; BHAGOOI, R.; TAKEMURA, A.; HIDAKA, M. Differential susceptibility to oxidative stress of two scleractinian corals: antioxidant functioning of mycosporine-glycine. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 139, n. 4, p. 721-730, 12// 2004.

YOKOZAWA, T.; CHEN, C. P.; DONG, E.; TANAKA, T.; NONAKA, G.-I.; NISHIOKA, I. Study on the Inhibitory Effect of Tannins and Flavonoids against the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, n. 2, p. 213-222, 1998.

ZHANG, C.-Y.; WU, W.-H.; WANG, J.; LAN, M.-B. Antioxidant Properties of Polysaccharide from the Brown Seaweed *Sargassum graminifolium* (Turn.), and Its Effects on Calcium Oxalate Crystallization. **Marine Drugs**, v. 10, n. 1, p. 119-130, 2012.

ZOUGAGH, M.; VALCÁRCEL, M.; RÍOS, A. Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 399-405, 2004.