



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ- REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

DAVID RUFINO FERREIRA

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA
DE EXTRATOS DAS ALGAS *Hypnea pseudomusciformis*, *Padina gymnospora*
e *Jania adhaerens*.**

**PARNAÍBA
2018**

DAVID RUFINO FERREIRA

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA
DE EXTRATOS DAS ALGAS *Hypnea pseudomusciformis*, *Padina gymnospora*
e *Jania adhaerens*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Linha de Pesquisa: Biologia molecular, Química e Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Leiz Maria Costa Vêras

PARNAÍBA

2018

Ficha Catalográfica elaborada pela Bibliotecária
Christiane Maria Montenegro Sá Lins CRB/3 – 952

F383a

FERREIRA, David Rufino

Avaliação fitoquímica, antimicrobiana, antioxidante e citotóxica de extratos das algas *Hypnea pseudomusciformis*, *Padina gymnospora* e *Jania adhaerens*/ David Rufino Ferreira. – Parnaíba: Universidade Federal do Piauí - UFPI, 2018.

84 p. il.

Orientadora: Dra. Leiz Maria Costa Vêras

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia; Mestrado em Biotecnologia – UFPI, 2018.

1. Biologia molecular. 2. Macroalgas. 3. *Hypnea pseudomusciformis*. 4. *Padina gymnospora*. 5. *Jania adhaerens*. I. Veras, Leiz Maria Costa. II. Universidade Federal do Piauí. III. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título. CDD 574.88

DAVID RUFINO FERREIRA

AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA
DE EXTRATOS DAS ALGAS *Hypnea pseudomusciformis*, *Padina gymnospora* e
Jania adhaerens.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Professora. Dra. Leiz Maria Costa Vêras
Universidade Federal do Piauí (Orientadora)

Professor Dr. Jefferson Soares De Oliveira
Universidade Federal do Piauí

Professor Dr. Klinger Antonio da Franca Rodrigues
Universidade Federal do Piauí

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo o carinho, torcida e apoio durante essa fase tão importante da minha vida. Em especial a minha querida mãe, Maria da Paz, meu pai Anastácio Frota e minha irmã, Laura Tereza. Às minhas cadelas Madonna e Pucca que com todo seu amor foram as melhores companhias nos momentos de escrita desse trabalho.

À minha namorada, Lana Carine por seu amor, companheirismo e pelo grande incentivo não só durante o mestrado, mas em todas as dificuldades cotidianas.

À minha querida orientadora, Professora Dra Leiz Maria Costa Vêras pela amizade, ajuda e por todo o conhecimento compartilhado durante esse tempo de convívio.

Aos amigos de longa data, Delfran, Pedro, Laise, David, Thales, Tauan, Rafael, Viviane e Luan pelo incentivo e pelas resenhas.

Aos amigos maravilhosos que fiz na família do laboratório Biotec, Ayslan, Jessica Teles, Jessica Pires, Fernanda, Taiane, Juliana, Alyne, Joilson, Roberta, Raiane, Marcia, Felipe, João, Flaviane, Emanuel, Erika, Nabyla, Jocélia, Elano, Gabriela e Andressa pelos bons momentos compartilhados e pela constante ajuda nos experimentos.

Ao professor Dr. Delano Marinho, pela ajuda concedida para que fosse possível a realização dos testes de citotoxicidade.

À professora Dra. Tatiane Daboit, pela disponibilidade e grande ajuda nos ensaios antifúngicos.

Ao professor Dr. Fernando Aécio pela ajuda valiosa para que fosse possível a realização dos ensaios de atividade antileishmaniana.

À professora Dra. Janaina Santiago pela ajuda fundamental para a identificação das algas.

RESUMO

O ambiente marinho se destaca pela diversidade de compostos valiosos, obtidos principalmente do metabolismo secundário das algas marinhas. Esses metabolitos secundários são oriundos principalmente de mecanismos de defesa e adaptações às condições ambientais. As leishmanioses e as doenças causadas por bactérias e fungos são uma preocupação mundial devido aos constantes casos documentados de resistência aos agentes antimicrobianos empregados no seu combate, sendo assim o objetivo desse trabalho foi o de realizar uma investigação fitoquímica e avaliar a atividade das frações hidroalcoólica e hexânica das algas *Hypnea pseudomusciformis*, *Padina gymnospora* e *Jania adhaerens* quanto a seu potencial antileishmania, antibacteriano, antifúngico, antioxidante e citotóxico. O estudo fitoquímico foi realizado através de ensaios químicos qualitativos e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A atividade antibacteriana foi determinada pelo método de difusão em ágar. O método colorimétrico da resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) foi o adotado para atividade antileishmania. Para atividade antifúngica foi adotado o método de microdiluição em caldo. A atividade antioxidante foi determinada pelo método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil). Metodologia utilizando o reagente Folin-ciocalteu foi empregada para a quantificação de fenóis e o ensaio de citotoxicidade foi determinado pelo método colorimétrico MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium]. Dentre as algas testadas a fração hidroalcoólica da alga vermelha *Hypnea pseudomusciformis* apresentou a menor concentração inibitória mínima para *Candida krusei* (CIM: 9,76 µg/mL), porém nenhuma atividade para *Candida tropicalis*, *Aspergillus fumigatus* e *Trycophyton interdigitale* foi observada. A fração hidroalcoólica de *Jania adhaerens* testada contra *Candida krusei* apresentou valor de CIM:39,06 µg/mL. Para o teste de difusão em ágar nenhuma fração das algas utilizadas no teste apresentou qualquer atividade na concentração testada (10 mg/mL) para *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*. No ensaio antileishmania foi obtido (CI₅₀: 396,8 µg/mL) para a fração hexânica de *Hypnea pseudomusciformis*. O ensaio antioxidante revelou que a fração hidroalcoólica de *Hypnea pseudomusciformis* apresentou o maior potencial antioxidante (CE₅₀: 256,31 µg/mL) entre as algas testadas. A quantificação de fenóis revelou 18,48 e 12,13 mg de ac. gálico/g de amostra para a fração hidroalcoólica de *Padina gymnospora* e para a fração hexânica de *Hypnea pseudomusciformis* respectivamente. O teste de citotoxicidade revelou que nenhuma fração demonstrou ser citotóxica contra as linhagens de células cancerosas testadas. Neste estudo foi demonstrado que algas vermelhas *Hypnea pseudomusciformis* e *Jania adhaerens* demonstraram um bom desempenho no ensaio antifúngico e moderada atividade antioxidante e antileishmania, o que pode encorajar estudos mais profundos dessas espécies de algas para a busca de componentes terapêuticos para infecções causadas por *Candida krusei* e *Leishmania amazonenses*.

Palavras chave: Prospecção fitoquímica, atividade biológica, algas marinhas, *Candida krusei*, *Leishmania amazonensis*, citotóxicidade.

ABSTRACT

The marine environment is distinguished by the diversity of valuable compounds, obtained mainly from the secondary metabolism of marine algae. These secondary metabolites come mainly from defense mechanisms and adaptations to environmental conditions. Leishmaniasis and diseases caused by bacteria and fungi are a worldwide concern due to the constant documented cases of resistance to antimicrobial agents used in their fight. Therefore, the objective of this work was to carry out a phytochemical investigation and to evaluate the antileishmanial, antibacterial, antifungal, antioxidant and cytotoxic activity of the hydroalcoholic and hexanic fractions of the following algae: *Hypnea pseudomusciformis*, *Padina gymnospora* and *Jania adhaerens*. The phytochemical study was carried out through qualitative tests and by high performance liquid chromatography (HPLC). The antibacterial activity was determined by the agar diffusion method. The colorimetric method of resazurin (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide) was adopted for antileishmania activity. For antifungal activity, the broth microdilution method was adopted. The antioxidant activity was determined by the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method. Methodology using Folin-ciocalteau reagent was used for the quantification of phenols and the cytotoxicity assay was determined by the colorimetric method MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazole)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide]. Among tested algae, the hydroalcoholic fraction of the red alga *Hypnea pseudomusciformis* showed the lowest inhibitory concentration for *Candida krusei* (MIC: 9.76 µg / mL), but no activity for *Candida tropicalis*, *Aspergillus fumigatus* and *Trycophyton interdigitale* was observed. The hydroalcoholic fraction of *Jania adhaerens* tested against *Candida krusei* showed a MIC value: 39.06 µg / mL. For the agar diffusion test no fraction of tested algae showed any activity at the concentration tested (10mg/mL) for *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli*. In the antileishmanial assay was obtained (IC₅₀: 396.8 µg/mL) for the hexane fraction of *Hypnea pseudomusciformis*. The antioxidant assay revealed that the hydroalcoholic fraction of *Hypnea pseudomusciformis* presented the highest antioxidant potential (CE₅₀: 256.31 µg/mL) among the tested algae. The quantification of phenols revealed 18.48 and 12.13 of mg GAE/g, for the hydroalcoholic fraction of *Padina gymnospora* and for the hexanic fraction of *Hypnea pseudomusciformis* respectively. The cytotoxicity test revealed that no fraction was cytotoxic against the tested cancer cell lines. In this study it was shown that red algae *Hypnea pseudomusciformis* and *Jania adhaerens* demonstrated a good performance in the antifungal assay and moderate antioxidant and antileishmanial activity which may encourage deeper studies of these algae species to search for therapeutic components for *Candida krusei* and *L. amazonensis*.

Key words: Phytochemical prospecting, biological activity, seaweed, *Candida krusei*, *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Floresta de Kelps (<i>Macrocystis pyrifera</i>)	15
Figura 2- Exemplos de algas marrons, vermelhas e verdes: a) <i>Padina gymnospora</i> b) <i>Jania adhaerens</i> c) <i>Codium fragile</i>	16
Figura 3- Esquema simplificado de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	24
Figura 4- Exemplar de <i>Phlebotomus papatasi</i> , vetor responsável pela transmissão da leishmaniose cutânea.....	30
Figura 5- Exemplar de <i>Lutzomyia longipalpis</i> vetor responsável pela transmissão da leishmaniose visceral.....	30
Figura 6- Ciclo de vida e transformação de <i>Leishmania</i>	31
Figura 7- Detalhamento geográfico do local de coleta e fotos dos exemplares coletados das algas, <i>Hypnea pseudomusciformis</i> , <i>Jania adhaerens</i> e <i>Padina gymnospora</i>	38
Figura 8- Esquema das etapas de coleta, fracionamento e testes realizados com os extratos e frações das algas.....	40
Figura 9- Curva de calibração de ácido gálico utilizada para quantificação de fenóis totais.....	49
Figura 10. Cromatograma referente à fração hidro alcoólica da alga <i>Hypnea pseudomusciformis</i>	53
Figura 11. Cromatograma referente à fração Hexânica de <i>Hypnea pseudomusciformis</i>	54
Figura 12- Cromatograma referente a fração hidro-alcoólica da alga <i>Padina gymnospora</i>	54
Figura 13- Cromatograma referente a fração Hexânica da alga <i>Padina gymnospora</i>	55
Figura 14- Cromatograma referente a fração hidro-alcoólica da alga <i>Jania adhaerens</i>	56
Figura 15 –Atividade antileishmania da fração hexânica da alga <i>Hypnea pseudomusciformis</i> , contra as formas promastigotas de <i>L. amazonenses</i> , expressa em porcentagem de inibição de crescimento.....	60
Figura 16 - Atividade antileishmania da fração hidroalcoólica da alga <i>Hypnea pseudomusciformis</i> , contra as formas promastigotas de <i>L. amazonenses</i> , expressa em porcentagem de inibição de crescimento.....	60

Figura 17 - Atividade antileishmania da fração hexânica da alga <i>Padina gymnospora</i> , contra as formas promastigotas de <i>L. amazonenses</i> , expressa em porcentagem de inibição de crescimento.....	61
Figura 18- Atividade antileishmania da fração hidroalcólica da alga <i>Padina Gymnospora</i> , contra as formas promastigotas de <i>L. amazonenses</i> , expressa em porcentagem de inibição de crescimento.....	62
Figura 19- Atividade antileishmania da fração hexânica da alga <i>Jania adhaerens</i> , contra as formas promastigotas de <i>L. amazonenses</i> , expressa em porcentagem de inibição de crescimento.....	63
Figura 20- Gráfico referente a atividade antileishmania da fração hidro alcoólica da alga <i>Jania adhaerens</i> , contra as formas promastigotas de <i>L. amazonenses</i> , expressa em porcentagem de inibição de crescimento.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Diversidade de compostos, tipos de atividade e mecanismos de ação que podem ser observados em um levantamento fitoquímico.....	22
Tabela 2- Dados para Interpretação qualitativa de flavonoides por classes em diferentes faixas de pH.....	42
Tabela 3- Resultado da análise fitoquímica qualitativa para classes de metabólitos das frações hidro alcoolicas (FHA) e hexânicas (FHX) das algas <i>Hypnea pseudomusciformis</i> , <i>Padina Gymnospora</i> e <i>Jania adhaerens</i>	51
Tabela 4- Concentração inibitória mínima (CIM) expressa em µg/mL das frações hidroalcoólicas (FHA) e hexânica (FHE) das algas <i>Jania adhaerens</i> , <i>Hypnea pseudomusciformis</i> e <i>Padina gymnospora</i> contra os fungos <i>Candida Krusei</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Candida tropicalis</i> e <i>Trycophyton interdigitale</i>	57
Tabela 5 - Resultados da avaliação quantitativa de atividade antioxidante para as frações hidro alcóolica (FHA) e hexânica (FHE) das algas <i>Padina gymnospora</i> , <i>Hypnea pseudomusciformis</i> e <i>Jania adhaerens</i> expressos em média e desvio padrão da porcentagem de atividade antioxidante (%AA) e CI ₅₀ (quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%).....	66
Tabela 6- Quantificação de compostos fenólicos totais da fração hidro alcóolica(FHA) da alga <i>Padina gymnospora</i> e fração hexânica (FHE) da alga <i>Hypnea pseudomusciformis</i> expressos em média e desvio padrão de mg equivalente de ácido gálico/g de amostra.....	68
Tabela 7 – Percentual de inibição do crescimento tumoral <i>in vitro</i> na concentração única de 50 µg/mL frente a quatro linhagens de células tumorais após 72 h de tratamento determinado pelo método do MTT. IC – Inibição do Crescimento; DP – Desvio Padrão.....	70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2-REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 Algas e seus metabólitos	15
2.2 Fitoquímica qualitativa e quantitativa	20
2.3 Infecções bacterianas e tratamentos atuais	24
2.4 Infecções fúngicas e tratamentos atuais	27
2.5 Leishmanioses	29
2.6 Atividade antioxidante	33
3 OBJETIVO	36
3.1 OBJETIVO GERAL.....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Coleta das Algas	38
4.2 Preparação do extrato bruto	39
4.3 Preparação da fração Hexânica.....	39
4.4 Avaliação fitoquímica qualitativa	40
4.4.1 Determinação de saponinas	40
4.4.2 Determinação de Fenóis e Taninos	41
4.4.3 Determinação de Polissacarídeos	41
4.4.4 Determinação de Alcaloides	41
4.4.5 Determinação de Flavonoides	42
4.4.6 Determinação de Purinas	42
4.4.7 Determinação de açúcares redutores	43
4.4.8 Determinação de Antraquinonas	43
4.4.9 Determinação de ácidos orgânicos.....	43
4.5 Análise fitoquímica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	43
4.6 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antibacteriana	44
4.6.1 Microorganismos.....	44
4.6.2 Ensaio halo de inibição, difusão em ágar.	44
4.7 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade Antifúngica.	45
4.7.1 Microorganismos.....	45
4.7.2 Ensaio de microdiluição, susceptibilidade antifúngica	45

4.8 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antileishmania	46
4.8.1 Microorganismos.....	46
4.8.2 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antileishmania sobre formas promastigotas	46
4.8.3 Análise estatística	47
4.9 Ensaio avaliação de potencial antioxidante pelo método DPPH	47
5.0 Quantificação de compostos fenólicos	48
Fonte: próprio autor.....	49
5.1 Avaliação de Citotoxicidade <i>in vitro</i>	49
5.1.1 Material	49
5.1.2 Método.....	49
5.1.3 Análise Estatística.....	50
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
6.1 Avaliação fitoquímica qualitativa	51
6.2 Análise fitoquímica por cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE)	52
6.3 Ensaio antibacteriano, difusão em ágar.	56
6.4 Avaliação da susceptibilidade antifúngica.....	57
6.5 Avaliação da atividade antileishmania	59
6.6 Avaliação do potencial antioxidante	65
6.7 Quantificação de compostos fenólicos.....	68
6.8 Avaliação de Citotoxicidade <i>In vitro</i>	69
7. CONCLUSÃO	72
8. PERSPECTIVAS.....	73
REFERÊNCIAS.....	74

1. INTRODUÇÃO

O ambiente marinho é conhecido por ser fonte de grande diversidade, seja em termos de condições ambientais, vida animal e também vegetal. Os oceanos fazem parte de um ambiente ainda pouco explorado, sendo assim o campo para novas descobertas se encontra amplamente aberto. Nesse contexto as algas podem vir a desempenhar um papel importante devido as suas mais variadas aplicações. Em relação a sua classificação as macroalgas podem ser vermelhas (Rhodophyta), marrons (Phaeophyta) e verdes (Chlorophyta), sendo que cada grupo tende a produzir compostos únicos (STENGEL e SOLÈNE, 2015)

É conhecido que as algas marinhas são fonte rica e variada de inúmeros compostos de interesse para as mais diversas áreas. Em muitos países são utilizadas na alimentação humana como alimentos considerados nutraceuticos, termo referente aos seus benefícios para a saúde e seu alto valor nutricional, em que se destacam a grande quantidade de antioxidantes, vitaminas, minerais e fibras. Encontram aplicação na indústria de cosméticos devido ao seu conteúdo de carotenoides e antioxidantes, produtos que entram na formulação de protetores solares e em produtos que auxiliam no tratamento de problemas de pele, tais como problemas de envelhecimento e distúrbios pigmentares (WANG et al., 2014).

No ramo da biotecnologia as algas também ocupam posição de destaque, o ágar (ficocoloide) é utilizado na produção do gel de agarose que é amplamente utilizado em eletroforese e cromatografia por gel. Na indústria alimentícia, a carragenana (polissacarídeo da classe dos ficocoloides) é bastante utilizado devido a sua propriedade espessante, principalmente em produtos que utilizam o leite como base, como os chocolates, sorvetes e pudins. O alginato que é um outro biomaterial derivado de algas que encontra numerosas aplicações devido às suas propriedades favoráveis, por exemplo em forma de hidrogéis, que possuem biocompatibilidade, propriedades cicatrizantes e ainda podem ser utilizados para a administração controlada de fármacos. (LEE e MOONEY, 2012)

Na indústria farmacêutica os compostos provenientes das algas, que incluem os metabólitos secundários, são estudados na busca de novas moléculas com

potencial terapêutico para os mais diversos tipos de enfermidades (CHEN et al., 2004). A produção de metabolitos secundários, compostos que apresentam enorme diversidade estrutural e de rotas metabólicas, faz parte das estratégias que as algas usam para sobreviver ao ambiente extremamente competitivo em que se encontram. Esses compostos são produzidos em resposta as interações sofridas com o meio, como resposta a ataques por organismos como bactérias, fungos, amebas, plantas, insetos e animais. Também são produzidos durante o processo de regulação interna, desencadeado por conta de mudanças nos parâmetros ambientais e da água (PUGLISI et al., 2004).

Os constituintes primários e secundários das algas também têm ganhado crescente destaque em pesquisas que tem como alvo a descoberta de novos compostos que possuem atividade contra doenças causadas por protozoários, bactérias, fungos e vírus. São frequentemente descritos também compostos que possuem propriedades anti-inflamatórias, imunomodulatórias anticoagulantes, antioxidantes e até inseticidas (CARDOSO, 2007). No trabalho de Yamthe et al., (2017) são descritos compostos extraídos de algas marinhas que tem comprovada atividade antileishmania, um dos destaques da pesquisa foram as algas marrons da família *Dictyotaceae* que demonstraram potente atividade (CI_{50} : 0.27 a 81.4 $\mu\text{g/mL}$) contra as formas promastigota, amastigota axenica e amastigota intracelular de *Leishmania donovani* e *Leishmania amazonensis*

Em infecções bacterianas também são descritos bons resultados utilizando compostos derivados de algas, como os componentes voláteis das algas *Actinotrichia fragilis*, *Liagora ceranoides* e *Colpomenia sinuosa*. que possuem atividade contra as bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, além de atividade inseticida para o inseto *Oryzaephilus mercator* *Tribolium castaneum* Pasdaran et al., (2016)

Segundo Stein et al., (2011) a classe dos compostos halogenados é bastante promissora, por apresentar potente atividade antimicrobiana. Esses compostos são encontrados tanto em micro como macroalgas, porém nas algas vermelhas é que se encontram a maior diversidade. Nesse sentido, espécies de algas do gênero *Laurencia* são conhecidas por produzir uma grande diversidade de compostos halogenados. Algas desse gênero apresentam potente atividade antifúngica, em

especial a alga *Laurencia aldingensis* por demonstrar atividade contra os fungos, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida neoformans*.

Tendo em vista o exposto em relação as algas, é possível ter uma idéia da grande quantidade de utilidades e atividades biológicas que elas possuem. O campo para novas investigações em relação ao seu potencial biológico encontra-se amplamente aberto, em especial no que se refere a prospecção de compostos que possuem atividades antimicrobianas. Sendo assim, o objetivo desse estudo é de realizar uma prospecção fitoquímica, avaliar a atividade antimicrobiana incluindo ensaio contra bactérias, fungos e protozoários, e ainda verificar a atividade antioxidante e citotóxica de espécies de algas encontradas no litoral piauiense.

2-REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Algas e seus metabólitos

As algas são organismos simples, com um longo registro fóssil. Apresentam grande heterogeneidade entre grupos, bem como em relação a tamanho, coloração e compostos constituintes. Podem ser compostas de uma única célula, por um aglomerado de células em colônia ou constituir um organismo multicelular. Em relação ao tamanho, podem ser encontrados exemplares gigantes que podem formar verdadeiras florestas submarinas como a espécie *Macrocystis pyrifera* (Kelps) (figura 1) que pode alcançar até 70 metros, e também exemplares com somente 3 μ m. Quanto as classificações (figura 2), as algas multicelulares ou macroalgas podem ser divididas em vermelhas (Rodofíceas), verdes (Clorofíceas) e marrons (Feofíceas), que geograficamente estão presentes na zona litoral, enquanto as microalgas são encontradas tanto na zona litorânea, zona bentônica e em correntes marítimas (EL GAMAL, 2010). A fisiologia das algas e a complexidade de metabólitos que esses seres são capazes de produzir foi moldada durante sua história evolutiva devido esses organismos fazerem parte de um ambiente em que a competição por nutrientes, luz e espaço é muito grande. Muitos desses componentes estão relacionados a mecanismos de defesa (CABRITA et al., 2010).

Figura 1 - Floresta de algas gigantes conhecidas como Kelps (*Macrocystis pyrifera*)



Figura 2 - Exemplos de algas: a) *Padina gymnospora* (marrom) b) *Jania adhaerens* (vermelha) e c) *Codium fragile* (verde)



Fonte: <http://www.algaebase.org>; http://southafrseaweeds.uct.ac.za/descriptions/red/jania_adhaerens.php; <https://alchetron.com/Codium/>;

A evolução química das macroalgas além de estar intimamente relacionada com modificações fenotípicas também pode ser resultante de pressões biológicas e ambientais. O estado biológico da alga que inclui seu ciclo e estágio de desenvolvimento, bem como as condições encontradas no local de coleta, como disponibilidade de nutrientes, luz e variações de temperatura representam fatores que impactam na quantidade e composição bioquímica das algas. (STENGEL e SOLÈNE, 2015)

Visando a obtenção de um alimento de melhor qualidade, tem sido sugerido que os humanos devem utilizar fontes mais primárias de alimentação. Em muitos países, várias espécies de algas, devido ao seu conteúdo de fibras, vitaminas, minerais e antioxidantes, são utilizadas na alimentação humana desde a antiguidade com destaque aos povos da parte leste da Ásia e Pacífico (GAMAL, 2010). Segundo Cardoso et al., (2007), nas últimas décadas, o foco de obtenção das algas mudou para o cultivo em ambiente controlado em detrimento da prática anterior de coleta diretamente na natureza. As algas têm sido utilizadas para um grande número de

aplicações, sendo fonte de compostos altamente bioativos provenientes de seu metabolismo secundário, bem como para a extração de ficocoloides (agar agar, ácido alginico e carragenana), que são polissacarídeos de alto peso molecular que fazem parte da parede celular das algas e estão relacionados a mecanismos de comunicação entre algas e patógenos. Os Polissacarídeos extraídos de algas tem sido descritos como tendo inúmeras aplicações biomédicas, farmacêuticas, cosméticas, dentre outras. O ágar dependendo do seu grau de pureza encontra diversos usos. O ágar de menor qualidade é usado em alimentos congelados, doces, sucos etc. Já o Agar em sua forma mais pura, sendo assim de melhor qualidade, é empregado como substrato em meio de cultura para testes biológicos e na biologia molecular em forma de gel de agarose para realização de eletroforese (CARDOSO et al., 2007).

Como propriedades importantes dos polissacarídeos podem ser destacados efeitos anti-inflamatórios, antibióticos, antitrombóticos, anticoagulante, atividade imuno modulatória e antioxidante. Cabe ressaltar que também encontram aplicação como carreadores de fármacos (RAPOSO et al., 2015). Recentemente tem crescido o interesse no estudo de isolamento e testes de polissacarídeos sulfatados, dado a sua ampla gama de atividades biológicas. Nesse contexto, as algas verdes têm destaque por produzirem grande quantidade desses compostos em relação as vermelhas e marrons. Há um grande número de investigações para encontrar substitutos seguros para a Heparina, droga anticoagulante utilizada em cirurgias (WANG 2014). No trabalho de Hayakawa et al., 2000 foram analisados 8 polissacarídeos isolados de algas verdes (clorofita) com os testes foi possível constatar que todas os polissacarídeos analisados apresentaram atividade anticoagulante superior à da Heparina, sendo as algas do genero *Codium* as que apresentaram atividade mais potente dentre todas do referido estudo.

Outra atividade marcante dos polissacarídeos encontrados em algas é sua atividade antinociceptiva. No trabalho de Albuquerque et al., (2013) foi investigada uma heterofucana, polissacarídeo da alga *Dictyota menstrualis* quanto à inibição de dor. Nos testes realizados em camundongos, foi constatada uma diminuição em torno de 61,2% da dor, efeito considerado tão potente quanto do fármaco dipirona.

Uma classe de moléculas bastante interessante encontradas nas algas são os carotenoides. Organismos autotróficos não necessariamente sintetizam apenas clorofila para realizar fotossíntese, mas também carotenoides, constituintes essenciais que desempenham papel crucial no aparato fotossintético das algas, atuando como inibidores de oxidação por radicais livres, provocado por excesso de exposição a luz solar, bem como se apresentam como pigmentos auxiliares no processo de coleta de luz durante a fotossíntese (TAKAICHI, 2013).

Os carotenoides são reconhecidos por exercer um importante papel na manutenção da saúde em humanos, são precursores de algumas vitaminas como a vitamina A. Atuam também como agentes na prevenção de doenças como câncer, osteoporose, dentre outras. Esses benefícios são alcançados devido a atenuação do estresse oxidativo promovido por essa classe de moléculas (RAO e RAO, 2007). Segundo Cantrell et al., (2003), ao menos 600 tipos de carotenoides foram identificados até o momento, e em vários estudos tem sido observado o papel crucial dos carotenoides na redução de incidência de várias doenças, principalmente aquelas relacionadas a danos ocasionados por radiação solar. No trabalho de Sousa et al., (2008) foi feita uma investigação sobre quais os carotenoides estão presentes em várias espécies de algas. Foi constatado que as clorofíceas apresentaram α -caroteno e β -caroteno, enquanto as feofíceas apresentaram apenas β -caroteno. Na classe das Rodofíceas algumas apresentaram além do β -caroteno, quantidade significativa de α -caroteno, considerado um supressor de cânceres mais eficaz que o β -caroteno.

Dentre a variada gama de compostos produzidos por algas marinhas, tem destaque os compostos halogenados. A halogenação consiste em uma reação química onde há a substituição de um átomo de hidrogênio por um átomo de halogênio (flúor, cloro, bromo). Esses compostos vêm tendo destaque nas últimas décadas, eles compreendem um conjunto diversificado em termos de atividade biológica, vão desde peptídeos, policetídeos, indóis, terpenos, acetogeninas e fenóis a hidrocarbonetos halogenados voláteis. Das investigações realizadas para elucidar o papel desses componentes, foi possível constatar que estes possuem atividade antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, antiproliferativa, anti-incrustação, anti-nutricional, citotóxica, ictiotóxica e inseticida. É conhecido que a halogenação pode aumentar a atividade de metabólitos secundários e que esses compostos estão relacionados a mecanismos

que as algas utilizam para evitar que outros organismos se alimentem delas (herbivoria) (BLUNT et al., 2009).

Dentre os tipos de algas marinhas, as algas vermelhas são consideradas as maiores produtoras de compostos halogenados enquanto a ocorrência em algas marrons é bastante reduzida. Na investigação química conduzida por Chen et al., (2016) foram descobertos 9 compostos halogenados obtidos da alga vermelha *Laurencia tristicha* que tiveram suas estruturas elucidadas. Também foram conduzidos ensaios antibacterianos, de citotoxicidade e antiinflamatório, com boas respostas. A atividade antifúngica também é observada em compostos halogenados oriundos de algas. No estudo conduzido por Stein et al., 2011 foram testadas várias espécies do gênero *laurencia* contra os fungos *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*. Foi constatado com o teste de microdiluição em caldo que os extratos de *L. aldingensis* tiveram atividade contra todos os fungos testados, enquanto os extratos clorofórmicos e metanólicos de *L. dendroidea*, apresentaram atividade fungistática (CIM < 31,25 µg/mL) contra *Candida albicans*, já o extrato clorofórmico de *L. catarinenses* mostrou atividade fungicida contra *C. albicans* e *C. neoformans* (CIM 303,8 e 600,4 µg/mL) respectivamente.

Estudos apoiados na medicina tradicional e no conhecimento das propriedades dos metabólitos secundários produzidos pelas algas tem revelado novos compostos bioativos promissores contra doenças causadas por protozoários (leishmaniose, doença de chagas, e tripanossomíase) (TORRES et al., 2014). No caso das espécies do gênero *Sargassum*, já era descrito em manuscritos da medicina tradicional chinesa suas propriedades anti-helmínticas. Baseado em técnicas modernas, investigações recentes atestam o potencial tripanomicida e leishmamicida das espécies *Sargassum natan* e *Sargassum oligocystum* respectivamente (ORHAN, 2006; FOULADVAND et al., 2011)

De Felício et al. (2010) obteve resultados significativos estudando as frações hexano e diclorometano da alga *Bostrychia tenella* (Rhodophyta) presente na costa brasileira. obteve valores de CI₅₀ (16.8 e 19.1 µg/ml), respectivamente para *Tripanossoma cruzi* e valores de CI₅₀ (1.5 2.7 4.4 e 4.3 µg/ml), contra *L. amazonenses*, para 4 subfrações nas quais as duas primeiras foram subfrações da hexânica e duas da fração diclorometano.

Santos et al., (2011) conduziram investigação a cerca de um diterpeno (4-Acetoxydolastane) isolado da fração diclorometano da alga marrom *Canistrocarpus cervicornis*. Nesse estudo foi obtido ótimo resultado de inibição para as formas promastigostas, amastigota axenica e intracelular amastigota de *L. amazonenses*, com CI_{50} de 2.0 $\mu\text{g/mL}$ para a forma promastigota. Ainda foi constatado que esse composto apresentou 93 vezes menos toxicidade para os macrófagos do que para o protozoário, o que de acordo com os investigadores é um forte indicio de que o diterpeno é seguro para o uso em humanos.

2.2 Fitoquímica qualitativa e quantitativa

Plantas são conhecidas desde tempos imemoriais como fontes de compostos que possuem propriedades terapêuticas, tendo grande importância na fitomedicina. Os constituintes de interesse podem ser encontrados em diversas partes das plantas como folhas, raízes, flores, sementes, cascas e frutas. Muito do que se tem conhecimento sobre quais plantas e quais partes usar para determinado fim, é proveniente de conhecimentos da etnomedicina, caracterizada pelos conhecimentos tradicionais de povos tribais, geralmente repassados entre gerações. Mais e mais substâncias derivadas de plantas tem ganhado crescente interesse devido a versatilidade de suas aplicações que subsidiam a produção de fármacos utilizados na medicina moderna, bem como aplicação na indústria alimentícia, na forma de alimentos nutraceuticos (alimento que nutre e trata concomitantemente), (PRASHANT TIWARI et al., 2011)

Os constituintes das plantas por natureza consistem em uma matriz complexa com vários componentes, sabendo assim para que seja possível aproveitar os benefícios trazidos por eles, é preciso lançar mão de técnicas de extração que consistem na separação dos compostos bioativos dos componentes inativos e inertes das diversas partes das plantas, por meio da utilização de solventes e procedimentos padronizados. Durante um procedimento de extração o solvente se difunde nas partes sólidas do material vegetal solubilizando os componentes que apresentem polaridade similar à do solvente. Os principais solventes que podem ser utilizados são: água, etanol, metanol, acetona, hexano, éter e diclorometano. Após um determinado

material vegetal ter sido submetido a um procedimento de extração ele pode ser utilizado como agente terapêutico em forma de tinturas, extratos fluidos, capsulas dentre outros (NCUBE, AFOLAYAN e OKOH, 2008)

Usualmente o material vegetal passa por um processo de secagem até atingir peso constante antes de se proceder a extração, após isso é necessário que o material vegetal seja moído até atingir a forma de pó ou o máximo de finura. Esse procedimento é capaz de aumentar a área de superfície pela qual o solvente irá atuar, melhorando assim a eficiência da extração. Em se tratando de técnicas de separação, podem ser citadas a maceração, percolação, infusão, decocção, extração por ultrassom (sonicação), extração auxiliada por micro-ondas, extração contínua a quente (SOXHLET), extração por fluido supercrítico, dentre outras. Alguns fatores como temperatura, tempo de extração, natureza e tipo de solvente podem influenciar na quantidade e composição dos metabolitos obtidos em um processo de extração (HANDA et al., 2008). Sabe-se que o produto final obtido por extração contém traços de solvente, sendo assim é de fundamental importância a escolha correta do solvente de acordo com a destinação final do produto. Apresentar baixa toxicidade e não interferir nos ensaios biológicos estão entre as características desejáveis para um solvente. A escolha do solvente correto também está relacionada ao tipo de constituinte que se quer extrair, a taxa de extração dos mesmos, a facilidade de evaporação, facilidade de absorção fisiológica e também impedir que o extrato complexe e se dissocie (ELOFF, 1998)

A análise sistemática de espécies de plantas com o objetivo de descobrir novos compostos bioativos é uma atividade rotineira em muitos laboratórios. De posse de um determinado extrato é possível através de diversos métodos químicos e cromatográficos realizar a investigação dos diversos compostos presentes em um extrato (PRASHANT TIWARI et al., 2011). A tabela 1 fornece uma ideia das diversas classes de compostos, bem como sua atividade biológica e mecanismo de ação.

Tabela 1 - Diversidade de compostos, tipos de atividade e mecanismos de ação que podem ser observados em um levantamento fitoquímico.

Fitoquímicos	Atividade	Mecanismo de ação
Quinonas	Antimicrobiana	-Se liga a adesinas, complexa com a parede celular, inativa enzimas
Flavonoides	Antimicrobiana	-Se liga a adesinas, complexa com a parede celular. Inibe a liberação de autacoides e prostaglandinas, Inibe as contrações causadas por espasmógenos,
	Antidiarreica	-Estimula a normalização do transporte de água derrubada através das células da mucosa, -Inibe a liberação de acetilcolina
Polifenóis e Taninos	Antimicrobiana	-Vincula-se a adesinas, inibição enzimática, privação de substrato, complexa com parede celular, ruptura de membrana, complexação de íons metálicos
	Antidiarreica	-Aumenta a resistência da mucosa intestinal, estimula a normalização do transporte de água derrubada através das células da mucosa e a redução do trânsito intestinal, bloqueia a ligação da subunidade B de enterotoxina termo lábil a GM1, resultando na supressão de diarreia induzida por enterotoxina.
Cumarinas	Anti-helmíntico	-Aumenta o suprimento de proteínas digeríveis por animais formando complexos protéicos no rúmen, interfere com a geração de energia por desacoplamento da fosforilação oxidativa, causa uma diminuição no metabolismo G.I.
	Antiviral	-Interação com DNA eucariótico
Terpenoides e óleos essenciais	Antimicrobiana	-Quebra de membrana
	Antidiarreica	-Inibe a liberação de autacoides e prostaglandinas -Intercala na parede celular e DNA de parasitas
Alcaloides	Antimicrobiana	-Inibe a liberação de autacoides e prostaglandinas
	Antidiarreica	-Possui efeitos antioxidantes, reduz a geração de nitrito que é útil para a síntese protéica, suprime a transferência de sacarose do estômago ao intestino delgado, diminuindo o suporte de glicose para helmintos
Lectinas e Polipeptídeos	Antiviral	-Bloqueia a fusão ou adsorção viral, forma pontes dissulfeto
Glicosídeos	Antidiarreica	-Inibe a liberação de autacoides e prostaglandinas
	Antidiarreica	-Inibe a liberação de histamina in vitro
Saponinas	Anticâncer	-Possui propriedades de permeabilização de membranas
	Anti-helmíntico	-Leva à vacuolização e desintegração de tegumentos
Esteroides	Antidiarreica	-Melhora a absorção intestinal de Sódio e água

Fonte: Adaptado de PRASHANT TIWARI et al., (2011)

É muito comum que uma planta apresente uma diversidade grande de compostos, entretanto isso não quer dizer necessariamente que todos possam ser

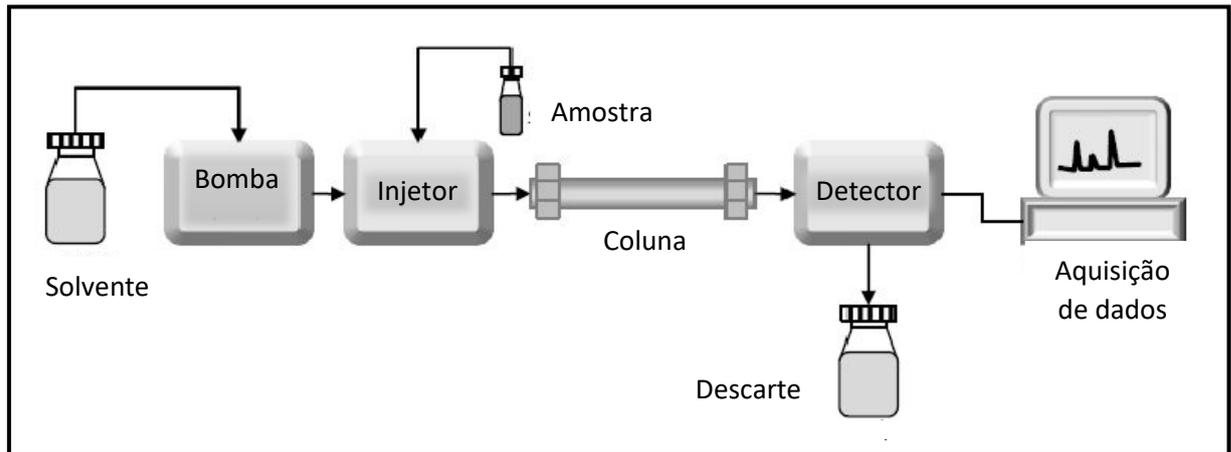
bioativos, sendo assim, é essencial a correta identificação e quantificação desses constituintes alvo, para que se conhecer a fundo o potencial que determinado material vegetal possa apresentar. Nesse contexto, as técnicas de cromatografia tem sido importantes aliados na identificação e quantificação dos mais diversos compostos (WU et al., 2013). A cromatografia tem como princípio base, obter a separação e identificação de substâncias, através da passagem da amostra a ser analisada com ajuda de uma fase móvel (usualmente na forma gasosa ou líquida) por uma fase estacionária, conhecida também como fase sólida. A identificação dependerá do comportamento entre os analitos em relação a fases móvel e estacionária, bem como de características moleculares, forças intermoleculares, incluindo iônica, polar, apolar, e efeitos de afinidade e solubilidade. Por conta dessas diferenças alguns componentes da mistura tendem a ficar mais tempo retidos na fase estacionaria, enquanto outros terão uma facilidade maior de passagem e terão uma passagem mais facilitada pela mesma, conseqüentemente saindo do sistema cromatográfico mais rapidamente. O objetivo da aplicação da cromatografia é conseguir uma separação satisfatória dentro de um intervalo de tempo adequado (COSKUN, 2016).

Existe uma gama de técnicas cromatográficas nas quais podem ser citadas: a cromatografia de camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), eletroforese capilar (EC), cromatografia em coluna, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), dentre outras (WU et al., 2013). A CG tem ótima resolução, uma das suas utilidades em medicina é a detecção de barbitúricos e esteroides, porém suas análises são restritas a compostos voláteis. A cromatografia líquida de alta eficiência encontra aplicação em diversas áreas, como por exemplo na indústria alimentícia para controle de qualidade e até detecção de inseticidas e micotoxinas. A (CLAE) é considerada um sistema muito poderoso e um marco na química analítica pelo fato de ter suprido uma série de critérios e demandas que os outros sistemas cromatográficos mais antigos não eram capazes de alcançar, como a capacidade de separar componentes solúveis em água, termo lábeis e não voláteis com alta precisão, resolução e velocidade (MARSTON, 2007)

Em se tratando de componentes e funcionamento, na figura 3 é demonstrado um esquema dos principais componentes de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, que consiste em um reservatório de solvente (fase móvel), a bomba que é responsável por impelir o solvente junto com a amostra (inserida em um injetor),

com fluxo ajustável e grande pressão através da coluna (fase estacionaria) que por sua vez interage com os componentes da amostra os liberando em diferentes tempos de retenção, após isso os componentes são identificados por um detector e por final o material analisado é acondicionado em um recipiente de descarte. (KOSKUN, 2016)

Figura 3- Esquema simplificado de um sistema de cromatografia liquida de alta eficiência (CLAE)



Fonte: traduzido de: <https://laboratoryinfo.com/hplc/>

2.3 Infecções bacterianas e tratamentos atuais

Infecções causadas por bactérias são uma das maiores preocupações no cenário mundial por conta da dificuldade nos tratamentos e a crescente resistência que esses organismos vêm adquirindo durante o passar dos anos. Os antibióticos utilizados para o combate bacteriano podem atuar sendo citotóxicos ou citostáticos para os microrganismos, permitindo assim que as defesas naturais do corpo, como o sistema imunológico, os eliminem. Eles geralmente agem inibindo a síntese de uma célula bacteriana, síntese de proteínas, de (DNA), e (RNA), por um agente desorganizador da membrana ou outras ações específicas. Quando as bactérias passam a driblar esses mecanismos surgem as cepas resistentes, que são um problema de saúde pública de grandes proporções principalmente em ambiente hospitalar. A resistência bacteriana pode ocorrer de forma ativa, quando a bactéria em resposta a um antibiótico desenvolve mecanismos de contra-ataque, que atuam em três vias: (1) efluxo do antibiótico através de membranas associadas a proteínas de

bombeamento; (2) Modificação do alvo do antibiótico através de mutação ou reprogramação de rotas metabólicas e (3) via síntese de enzimas modificadas que destroem seletivamente os antibióticos. A resistência também pode ser passiva, nesse caso ocorrem adaptações, porém não diretamente ligadas a um antibiótico ou a uma classe de antibióticos (ZAMAN, 2017)

A penicilina revolucionou o tratamento para bactérias Gram positivas, ela foi introduzida para uso em 1940, a partir daí novas drogas surgiram, mas em paralelo ao surgimento desses novos fármacos a resistência bacteriana se fazia sempre presente. Entre as bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Enterococcus* são as que possuem maior destaque em termos de desafios para a solução do problema da resistência. Bactérias resistentes não são somente preocupantes em termos de mortalidade, mas também em relação ao tratamento dos pacientes, bem como a dificuldade de se implementar medidas de controle, tornando assim o tratamento muito mais dispendioso. Cepas de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus spp* são encontradas frequentemente em hospitais e tem chamado atenção devido a sua resistência. O *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, geralmente referido pela sigla “SARM” está ao longo dos anos aumentando a sua resistência e virulência, tornando o seu tratamento muito mais complexo. Recentemente foram identificadas em pessoas que trabalham em contato com animais de fazenda, cepas resistentes dessa bactéria, com a capacidade de produzir enterotoxinas. A presença desse tipo de toxina configura um fator de extremo risco de contaminação dos alimentos manuseados por essas pessoas (LAYER et al., 2012)

Outro problema que surge em relação a infecções bacterianas é a presença em casos de infecções hospitalares de bactérias que não eram tidas como patogênicas, como por exemplo o caso da bactéria *Staphylococcus epidermidis*, anteriormente conhecida por habitar a pele humana de forma inócua e que geralmente mantém uma relação benigna com o hospedeiro. Essa bactéria tem frequentemente sido relacionada a casos de infecção hospitalar, *S. epidermidis* juntamente com *Staphylococcus aureus* representam as fontes mais comuns de infecções em dispositivos médicos internos. Isso decorre da alta probabilidade de contaminação do dispositivo durante a inserção e a capacidade de formação de biofilme que essas bactérias possuem (OLIVEIRA et al., 2017)

O desenvolvimento de novos antibióticos tem um papel importante para a manutenção do combate a infecções, no entanto é necessário a busca por novas estratégias de combate, nesse contexto se destaca o desenvolvimento de sistemas nano estruturados surgem como nova linha de atuação contra cepas resistentes, esses nano materiais tem obtido bons resultados mostrando efetividade contra várias bactérias resistentes como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *enterococcus* resistente à vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina e outras (SINGH et al., 2014). A prata tem sido utilizada desde a antiguidade em tratamentos de infecções bacterianas, queimaduras e feridas. A sulfadiazina de Prata, um fármaco criado em 1968 através da combinação de nitrato de prata foi muito usado para tratamento de queimaduras, tem a propriedade de proporcionar uma lenta liberação de prata no ferimento, possui atividade antifúngica e antiviral, também atua como antibiótico de largo espectro contra *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.* Já as nano partículas de prata (AgNP) tem como mecanismo de ação antimicrobiana sua grande área superficial, a prata tem capacidade de desnaturar DNA e RNA bacteriano, também possui a capacidade de se ligar a membrana bacteriana penetrando-a, liberando íons de prata que causam mudanças estruturais na mesma e na membrana nuclear, iniciando assim a morte celular por ataque a cadeia respiratória e divisão celular do micro-organismo. Outras nano partículas metálicas com as de óxido de zinco (ZnO) e dióxido de titânio (TiO₂) também apresentam atividade antibacteriana, porém o mecanismo de ação é por oxidação de espécies reativas de oxigênio, diferente do observado em nano partículas de prata (RAI et al., 2009)

Uma linha de combate a infecções bacterianas que tem ganhado destaque é a dos antimicrobianos derivados de extratos de plantas, eles têm surgido como uma nova via de combate a cepas bacterianas resistentes, essa abordagem tem sido considerada muito promissora como tratamento eficaz de infecções incuráveis. Geralmente as substâncias que dão origem ao potencial antimicrobiano são originárias de metabólitos secundários das plantas, nessa classe de compostos podem ser citados os compostos aromáticos incluídos os alcaloides, glicosídeos, terpenóides, saponinas, esteróides, flavonóides, taninos, quinonas e cumarinas. A vantagem desses compostos quando utilizados como antimicrobianos se devem as suas propriedades de evitar a resistência bacteriana, driblando seus mecanismos, bem

como a possibilidade de efeito sinérgico com antibióticos comerciais (SRIVASTAVA et al., 2014)

2.4 Infecções fúngicas e tratamentos atuais

A incidência de doenças relacionadas com fungos tem aumentando nos últimos anos, o aparecimento de organismos com sensibilidade variada as drogas antifúngicas, a descoberta de novas espécies e o aumento da distribuição geográfica desses organismos são fatores preocupantes. Os grupos de pessoas em risco incluem: bebês prematuros, pacientes imuno deprimidos, pacientes com idade avançada, pacientes com câncer, pacientes que passaram por transplantes dentre outros. As infecções causadas por *Candida albicans* na década de 80 eram as mais comuns, com o advento do fármaco fluconazol a incidência de infecções invasivas causadas por esse tipo de fungo diminuiu significativamente, porém em contrapartida aumentaram os casos de infecção por *Candida glabrata* que anteriormente se acreditava não ser patogênica (NUCCI e MARR, 2005). Os fatores de virulência da infecção por *Candida glabrata* são ainda pouco conhecidos assim como os mecanismos de defesa do hospedeiro. O tratamento mais usual é feito com azólicos e anfotericina B (FIDEL et al., 1999). Existem casos descritos em que a espécie *C. tropicalis* tem sido identificada em pacientes imunocomprometidos que apresentam candidíase muco cutânea crônica, essa espécie também está relacionada comumente a casos de candidíase invasiva em pacientes transplantados e também nos portadores de leucemia aguda. Também é relatado para essa espécie a resistência ao fármaco fluconazol (DIXON et al., 2004). Taxas altas de mortalidade e disseminação sistêmica de candidíase em pacientes com malignidades no sangue tem sido observadas quando as espécies *Candida albicans* e *Candida tropicalis* estão presentes em concomitância, sendo que é atribuída a *Candida tropicalis* a piora no quadro geral de saúde do indivíduo portador, nos portadores de *Candida tropicalis* são observados ainda vários níveis de complicações intestinais como casos de colite ulcerativa (KOTHAVADE et al., 2010)

A espécie *Candida krusei* é reconhecida como potencialmente multirresistente, devido à sua resistência intrínseca ao fluconazol, existem também relatos de

susceptibilidade diminuída tanto à flucitosina quanto à anfotericina B. Casos de complicações causadas por ela vêm ganhando destaque, apesar de sua ocorrência não ser tão comum, no leste da Europa há uma maior incidência, já na América latina, na Ásia e no Pacífico experimentam um menor número. Essa espécie é mais comumente encontrada em pacientes com algum tipo de neoplasia hematológica ou casos de pacientes submetidos a transplante de medula óssea. Para o seu tratamento é utilizado o voriconazol tendo em vista que esse fungo é bem suscetível ao fármaco. O tratamento com Caspofunginas também apresenta bons resultados, porém por ser resistente existe uma demanda pela busca de novos compostos que auxiliem em seu combate (PFALLER et al., 2008).

Fungos do gênero *Aspergillus* são responsáveis pelos casos de aspergilose invasiva, esses casos têm ganhado notoriedade principalmente após o advento de tratamentos continuados para doenças autoimunes como o Lúpus, com o aumento no número de transplantes de órgãos e quimioterapia para tratamento de tumores. A aspergilose tem relação direta com o número de óbitos em tratamentos para leucemia e em transplantes de pulmão e fígado. Dentre os tratamentos disponíveis está utiliza-se a anfotericina B, porém com taxas de sucesso baixas. Resultados mais satisfatórios são obtidos com o fármaco voriconazol, antifúngico triazolico de amplo espectro, que tem como uma das vantagens poder ser ministrado por via venosa e também oral (DENNING et al., 2002)

Os fungos dermatófitos são outra classe importante de fungos que causam infecções em humanos em que os tratamentos estão se tornando cada vez mais dificultosos. Essa classe tem como característica invadir e se multiplicar em tecidos que possuem queratina (cabelo, unhas, pele). O mecanismo de invasão consiste na produção da enzima queratinase, com ela o patógeno invade o estrato córneo da pele (camada morta mais externa) e induz a reação inflamatória no local da infecção. Os sinais habituais de reações inflamatórias, como vermelhidão, inchaço, calor e alopecia (perda de cabelo) são vistos no local onde a infecção se instala. A inflamação faz com que o patógeno se mova para longe do local da infecção e fixe residência em um novo local, o que explica o fato da infecção “caminhar” (SUGANTHI, 2017).

É possível classificar a infecção de acordo com o local do corpo afetado, as mais comuns são: cabeça (*tinea capitis*), nas mãos (*tinea manus*), na barba (*tinea*

barbae), no corpo (*tinea corporis*), nos pés (*tinea pedis*). Em relação ao gênero os dermatófitos são classificados em três grupos: *Trichophyton* (causa infecção na pele, unhas e cabelos), *Epidermophyton* (causa infecção na pele e unhas), *Microsporum* (causa infecção nos cabelos e pele) e *Tinea* (unhas) (SOARES et al., 2017)

Em termos de tratamentos para dermatofitoses está disponível uma grande variedade de fármacos (anfotericina B, caspofungina, itraconazol, fluconazol e voriconazol) que podem ser utilizados na forma de tratamentos tópicos, orais ou uma combinação dos dois. O tratamento combinado se torna mais benéfico por evitar resistência e obter uma taxa de erradicação do fungo em menor tempo (SUNGHATI, 2017).

2.5 Leishmanioses

As leishmanioses são um espectro de doenças originalmente tropical e subtropical, endêmicas da Ásia, Américas, África e mediterrâneo. No entanto, atualmente já se encontra distribuída globalmente, dados apontam a ocorrência em cerca de 89 países. As Leishmanioses são apontadas como zoonose predominantemente de regiões de selva, porém pode ser adquirida também em regiões frias e semi desertas. A infecção é causada por um parasita intracelular flagelado pertencente ao gênero *Leishmania*, transmitido pela picada das fêmeas do mosquito palha pertencentes principalmente aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (figura 4 e 5 respectivamente). Em se tratando do comportamento do vetor, sabe-se que durante o dia esses insetos tendem a ficar em locais escuros e úmidos, se alimentam de sangue e tem hábitos noturnos (TORRES-GUERRERO et al., 2017)

Figura 4- Exemplar de *Phlebotomus papatasi*, vetor responsável pela transmissão da leishmaniose cutânea



Fonte: https://diptera.info/photogallery.php?photo_id=4789

Figura 5- Exemplar de *Lutzomyia longipalpis* vetor responsável pela transmissão da leishmaniose visceral

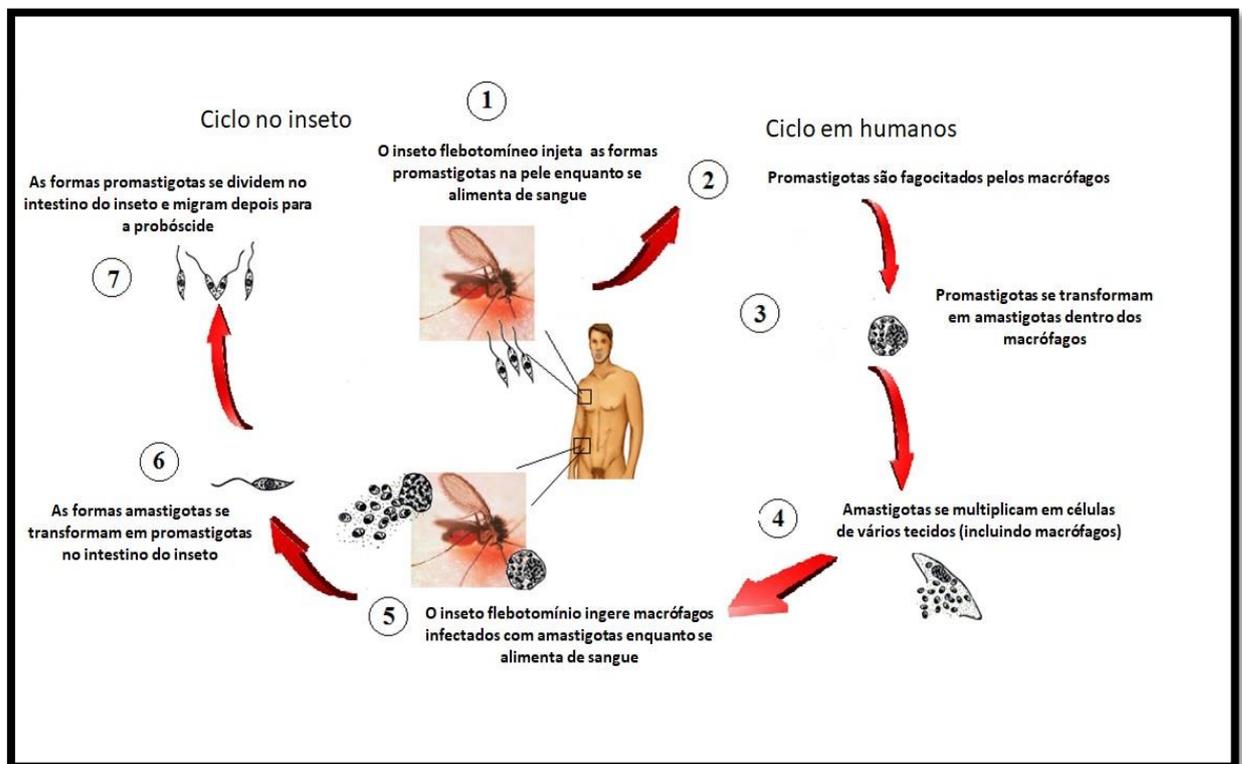


Fonte: <http://www.insect-genome.com/data/detail.php?id=138>

O ciclo de vida da leishmania passa por dois estágios bem definidos, a figura 6 fornece um esquema desse ciclo. A forma Promastigota é aquela em que o vetor ao se alimentar do sangue acaba por a inocular no hospedeiro, essa forma possui flagelo

e mede cerca de 12 a 20 μm , permanecendo ainda cerca de 4 a 25 dias no intestino do mosquito transmissor. O segundo estágio referente a outra forma denominada Amastigota (não flagelada) mede cerca de 2,5 a 3,5 μm . A forma amastigota é a forma intracelular obrigatória do parasita, encontradas nos macrófagos do hospedeiro, essa forma é originada da transformação da forma promastigota. O mosquito ao picar um humano ou mamífero que já tenha a doença ingere a forma amastigota que com o decorrer do tempo passa por um processo de transformação em seu intestino, transformando-se na forma promastigota procíclica e posteriormente metacíclica, que é a forma que tem capacidade infectante (REITHINGER, 2007)

Figura 6. Ciclo de vida e transformação de *Leishmania*



Fonte: adaptado de Job et al., 2014

Considerada uma das sete doenças tropicais mais importantes, as Leishmanioses são um problema de saúde mundial, sendo enquadradas na categoria das doenças negligenciadas. Sua distribuição está intimamente correlacionada a abundância do vetor, que por sua vez está relacionada a fatores ambientais. Cerca de 12 a 15 milhões de pessoas no mundo estão infectadas atualmente, estima-se que em torno de 250 milhões correm o risco de adquirir a doença, sendo que as mulheres, idosos e crianças configuram o grupo de maior risco. Em termos de mortalidade a

leishmaniose responde por um número médio de 70.000 óbitos anuais, (BRAVO, 2003; REITHINGER, 2007)

Em se tratando da forma de manifestação clínica, a doença pode se manifestar em diversos níveis de gravidade, que vão depender da espécie de *Leishmania* e da resposta imunológica do indivíduo infectado. As formas em que se apresentam os quadros de leishmaniose podem ser dos tipos: cutânea, muco cutânea e visceral (Calazar). As lesões na forma cutânea são causadas pelas espécies: *L. mexicana*, *L. major*, *L. braziliensis*, *L. tropica* e *L. panamensis*, e começam na forma de um pequeno eritema causado pela picada do inseto que com o passar do tempo (2 semanas a 6 meses) torna-se uma úlcera, no entanto não são raros os casos em que a infecção permanece assintomática (DOWNLATI, 1996).

A leishmaniose cutânea em algumas ocasiões pode evoluir para a forma muco cutânea (conhecida como espúndia), que é a forma mais preocupante da doença, aqui ocorre a destruição gradual da mucosa mucofaríngea. Quando fica restrita a cavidade nasal causa destruição das cartilagens do septo causando desfiguração e em casos extremos pode ser fatal. Normalmente esses casos se tornam evidentes após o período de 5 anos em que houve cura da forma cutânea. As espécies responsáveis pela apresentação muco cutânea da enfermidade são: *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. major*, *L. tropica*, *L. infantum*, e *L. braziliensis* (REITHINGER, 2007; DINIZ, COSTA e GONÇALVES, 2011;)

A forma visceral conhecida como Calazar causada por *L. chagasi*, and *L. tropica* na América do Sul tem um período de incubação que varia entre 3 e 8 meses, os grupos de risco para esse tipo de infecção são crianças e pessoas que possuem sistema imune debilitado. É relativamente alta a quantidade de sintomas que são observados nessa forma em particular, nos quais podem ser citados: linfadenopatia (anormalidade dos nódulos linfáticos), hepatomegalia (aumento do fígado), esplenomegalia (aumento do volume do baço), palidez, anemia, leucopenia (redução no número de leucócitos), trombocitopenia (redução do número de plaquetas), febre, suores noturnos, fraqueza, anorexia, astenia (fadiga física), pigmentação cutânea e perda de peso. Além disso crianças afetadas apresentam diarreia crônica característica e retardo de crescimento (DESJEUX, 2004)

Os principais fármacos disponíveis para o tratamento de leishmaniose são agentes sistêmicos como os baseados em antimônio, a pentamidina, anfotericina B, paromomicina e a miltefosina. A pentamidina, é considerada relativamente eficaz na terapia da leishmaniose, comercializada sob o nome de Lomidina no tratamento da leishmaniose visceral, a pentamidina foi usada com sucesso, se mostrando útil em pacientes com sensibilidade as drogas antimoniais, porém existe a questão da alta toxicidade da droga que deve ser levada em conta no tratamento. Bons resultados também são obtidos com a paromomicina especialmente em casos onde os antimoniais não surtiram efeitos (RATH et al., 2003)

A anfotericina pode ser apresentada em duas formas: Anfotericina B e Anfotericina B lipossomal. Ambas têm ótima atividade contra o parasita, porém a forma lipossomal apresenta eficiência em doses mais baixas, tem melhor penetração tecidual e a menor ocorrência de efeitos colaterais como febres, hipocalcemia e queda dos níveis de hemoglobina (MOORE e LOCKWOOD, 2010). A miltefosina primeiramente utilizada como agente anticâncer, tem a vantagem de poder ser administrada por via oral e sua taxa de sucesso é tão boa quanto a da anfotericina B lipossomal, porém no caso da miltefosina ela é contraindicada para utilização em mulheres grávidas. Nos tratamentos com esse fármaco ainda são relatados casos de desconfortos gastrointestinais (SUNDAR et al., 2002). Recentemente foi demonstrado em ratos que a miltefosina causa danos no DNA, apoptose e necrose in vitro, evidenciado assim os efeitos colaterais perigosos que esse fármaco pode apresentar (CASTELO BRANCO et al., 2016)

2.6 Atividade antioxidante

O estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (radicais livres) está relacionado a vários tipos de doenças e é responsável por causar uma série de danos nos tecidos vivos, bem como desregulação de algumas funções celulares. Além dos fatores citados, os radicais livres podem atacar o DNA e outras macromoléculas como lipídeos, proteínas e etc. A sequência de eventos e mecanismos pelos quais os radicais livres afetam as funções celulares ainda não estão claramente elucidados, mas sabe-se que a peroxidação de lipídeos é uma das mais importantes por estar

intimamente relacionada com danos na membrana celular. Como consequências desses processos, o estresse oxidativo pode levar ao desenvolvimento de doenças degenerativas, autoimunes, acarretar problemas cardíacos, complicar quadros de diabetes, favorecer o surgimento de doenças neurológicas, malignidades, doenças renais, problemas inflamatórios, doenças da pele, envelhecimento, doenças respiratórias, doenças hepáticas e diferentes tipos de infecções virais (SINDHI et al., 2013)

Como resultado de reações metabólicas no corpo são gerados alguns tipos de espécies reativas de oxigênio que podem se apresentar na forma de radicais livres e não radicais. A alta reatividade com membranas reside no fato de que os radicais livres possuem um elétron não pareado na sua camada mais externa. Os compostos que antagonizam o estresse oxidativo são conhecidos como antioxidantes, tendo como definição qualquer substância que em baixa concentração atrasa a oxidação de proteínas, carboidratos, lipídios e DNA. Sendo assim o stress oxidativo pode ser entendido como resultado do balanço incorreto entre espécies reativas de oxigênio e os antioxidantes presentes no meio. Nesse sentido e no decorrer de sua evolução, o corpo humano desenvolveu gradualmente mecanismos de defesa mais refinados contra o estresse oxidativo (NIJVELDT et al., 2001; SINDHI et al., 2013)

Antioxidantes podem ser produzidos internamente no corpo ou adquiridos na dieta, eles estão presentes em vegetais, frutas e especiarias. Compostos considerados antioxidantes incluem os minerais como Se, Mn, Cu e Zn, vitaminas como as vitaminas: A, C e E. Algumas enzimas como a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, e outros compostos como os flavonóides, glutathione, bilirrubina e ácido úrico também se enquadram como antioxidantes. Dentre os compostos citados, os flavonoides podem ser considerados um dos mais importantes, o sequestro dos radicais livres, realizado pelos flavonoides se dá por sua oxidação e por conta da alta reatividade do seu grupo hidroxila (OH). Portanto os flavonoides possuem assim a capacidade de estabilizar os radicais livres os tornando menos reativos. Os flavonoides pertencem a um grupo de substâncias naturais presentes em frutas, vegetais, grãos, raízes, chás e vinhos, possuem estruturas fenólicas variadas, dentre essas as flavononas e as catequinas são

consideradas os flavonoides mais potentes em termos de atividade antioxidante (NIJVELDT et al., 2001)

Em se tratando de modos de ação, a atividade antioxidante apresenta mecanismos que atuam por meio de várias vias, tais como: interrupção da cadeia de auto oxidação; inibindo a formação de radicais lipídicos livres; sequestrante de oxigênio através de sinergismos com outros antioxidantes; inibição de lipooxigenases (enzimas pro-oxidativas); e finalmente quelante de metais pro-oxidantes como ferro e cobre. Para a medição da atividade antioxidante são empregadas diversas metodologias, cada um com seu mecanismo de aferição e também suas vantagens e desvantagens. Dentre os métodos podem ser citados: Método ABTS (2,20-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) baseado na quantificação de sequestro de radical, o método FOX (ferrous oxidation-xylenol) que mensura a taxa de inibição da peroxidação lipídica, o método FRAP (poder antioxidante redutor de ferro) que tem como mecanismo mensurar o poder redutor. Outro método que pode ser destacado é o ensaio pelo método DPPH (2,2-diphenil-1-picrilhidrazil) (CAROCHO e FERREIRA, 2013).

O método DPPH é um dos mais utilizados para ensaios preliminares, esse método colorimétrico utiliza o radical sintético DPPH, baseado no princípio que a substância antioxidante testada contra esse radical é um doador de hidrogênio. Na presença do antioxidante o radical DPPH apresenta variação do espectro de cor e dependendo do grau de atividade antioxidante irá alterar sua coloração do roxo intenso para o amarelo pálido. Esse radical altamente instável apresenta absorvância máxima na faixa de 517 nm e conforme sofre atividade antioxidante ocorre a variação para o amarelo, nesse momento seus valores de absorção tendem a cair (MOLYNEUX, 2004)

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar investigação para elucidar o perfil fitoquímico, potencial antimicrobiano, antioxidante e citotóxico das algas *Hypnea pseudomusciformis*, *Padina gymnospora* e *Jania adhaerens* coletadas no litoral piauiense.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar análise fitoquímica qualitativa e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) das frações das algas.
- Realizar ensaio antibacteriano contra as bactérias patogênicas *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) utilizando as frações das algas.
- Realizar ensaio antifúngico das frações das algas, contra os fungos patogênicos *Candida krusei* (ATCC6258), *Aspergillus fumigatus* (USP2), *Candida tropicalis* (ATCC750) e *Trichophyton interdigitale* (ATCC75896)
- Realizar ensaio antileishmania contra as formas promastigotas da espécie *Leishmania amazonenses* (IFLA/BR/67/PH-8) utilizando as frações das algas.
- Verificação do potencial antioxidante das frações das algas pelo método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)
- Quantificação de compostos fenólicos presentes nas frações das algas pelo método Folin ciocalteau

- Verificação da citotoxicidade das frações das algas frente a 4 linhagens de células tumorais (HCT-116; SF-295; PC-3 e HL-60).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das Algas

Exemplares frescos das Algas *Hypnea pseudomusciformis*, *Padina gymnospora* e *Jania adherens* foram coletadas em fevereiro de 2017 na praia do Coqueiro (Coordenadas: 2°53'58.3"S; 41°34'18.2"W) localizada no município de Luís correia-PI (figura 7). As amostras foram coletadas a mão em período de maré baixa, acondicionadas em sacos plásticos e levadas a laboratório onde foi realizada a triagem e limpeza com água destilada para a retirada de algas epífitas e material associado. Após a limpeza, as algas foram secas em estufa a 60°C durante 3 dias. Posteriormente o material foi pulverizado em Moinho (modelo IKA A11) e estocado para posterior utilização.

Figura 7- Detalhamento geográfico do local de coleta e fotos dos exemplares coletados das algas, *Hypnea pseudomusciformis*, *Jania adhaerens* e *Padina gymnospora*.



Fonte: adaptado de google maps e algae base.

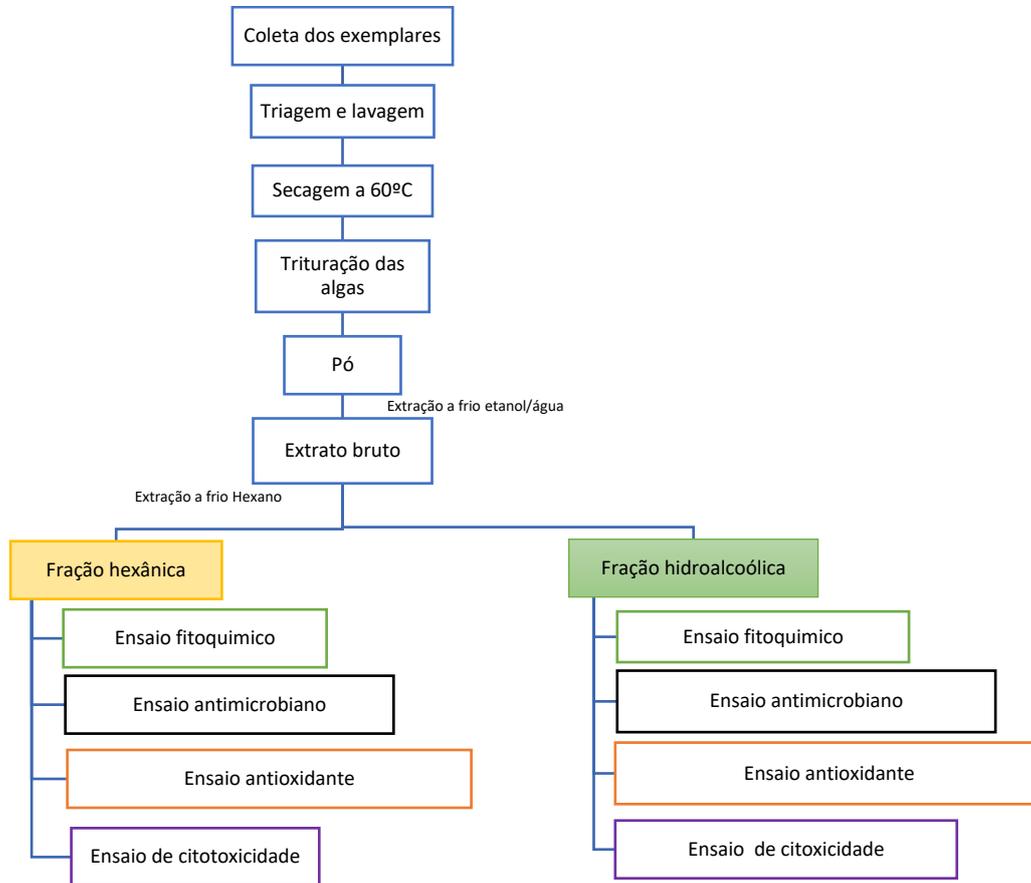
4.2 Preparação do extrato bruto

A partir do pó das algas, obtido após secagem, foi utilizada uma solução de 1:4 água destilada/etanol (v/v) e uma proporção de 1:10 do pó de alga/solvente (p/v), a partir daí então a solução final passou por um processo de maceração a frio onde foi homogeneizada durante 2 horas por dia em agitador magnético, durante 3 dias. Após o período de maceração a solução foi filtrada com auxílio de bomba a vácuo. O filtrado foi colocado em banho maria com temperatura estabilizada em 60°C até evaporação total do solvente, procedeu-se então após a evaporação, a transferência do material para recipiente adequado e acondicionamento em freezer para posterior fracionamento.

4.3 Preparação da fração Hexânica

Inicialmente foi feita a ressuspensão do extrato hidroalcolico (bruto) das algas em 30 mL de uma solução água/etanol (1:1 v/v). Para o fracionamento foi utilizado funil de separação (squibb) onde foi vertida a amostra já ressuspensa, acrescentando 30 mL de Hexano, procedendo agitação manual (10x) para aumentar a eficiência de separação. Após esse procedimento aguarda-se a formação de fase entre os solventes. Feito isso procedeu-se a coleta da fração hexânica e repetiu-se o procedimento para a fração hidro alcólica. Para a secagem das frações foi utilizado concentrador. Um resumo dos procedimentos de coleta, extração e testes realizados encontram-se detalhados na figura 8.

Figura 8- Esquema das etapas de coleta, fracionamento e testes realizados com os extratos e frações das algas



Fonte:próprio autor

4.4 Avaliação fitoquímica qualitativa

Os testes para a avaliação fitoquímica dos extratos e frações foram realizados segundo metodologia proposta por Barbosa et al., (2001)

4.4.1 Determinação de saponinas

Para a determinação de saponina espumidica foram diluídos 4,0 mg de cada extrato e fração em 5 mL de água destilada, em seguida diluídos para 15 mL

colocando sobre agitação vigorosa durante 2 minutos, o resultado é considerado positivo se houver formação de espuma e essa se manter estável por até 30 min.

4.4.2 Determinação de Fenóis e Taninos

Para a determinação de Fenóis e Taninos foram dissolvidos 4,0 mg de cada extrato e fração em 5mL de água destilada, adicionar I a II gotas de solução alcoólica de FeCl_3 a 1%. A reação positiva é caracterizada pela observação de qualquer mudança na coloração ou formação de precipitado quando comparado com o teste em branco (água + Sol. de FeCl_3).

observações:

- Coloração inicial entre o azul e o vermelho, é indicativo da presença de fenóis, quando o teste em branco for negativo.
- Precipitado escuro de tonalidade azul, indica presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e verde, presença de taninos catéquicos.

4.4.3 Determinação de Polissacarídeos

Para a determinação de Polissacarídeos foram dissolvidos 4,0 mg do extratos e frações de cada alga em 5mL de água destilada. Em seguida foram adicionadas duas gotas de lugol. Aparecimento de coloração azul, indica resultado positivo.

4.4.4 Determinação de Alcaloides

Foram dissolvidos 4,0 mg do extratos e frações de cada alga em 5mL de solução de HCl a 5%, posteriormente foram separadas quatro porções de 1.0 mL de cada alga e fração a ser testada em tubos de ensaio, adicionou-se gotas do reativo de Bouchardat. Sendo resultado positivo para alcaloides se houver formação de precipitado laranja avermelhado, também foi feito o mesmo procedimento adicionando

gotas do reativo de Dragendorff que resulta em positivo se houver formação de um precipitado vermelho tijolo.

4.4.5 Determinação de Flavonoides

Para a determinação de flavonoides por classes foram dissolvidos 5,0 mg dos extratos e frações de cada alga em 20mL de água destilada. Foram transferidos para três tubos de ensaio, alíquotas de 3,0 mL da solução (para cada tubo). Acidulou-se um a pH 3, os dois restantes foram alcalinizados a pH 8.5 e 11. Os resultados que indicam positivo são interpretados de acordo com a cor apresentada em cada faixa de Ph (tabela 2):

Tabela 2- Dados para Interpretação qualitativa de flavonoides por classes em diferentes faixas de pH.

	Ph 3,0	Ph 8,5	Ph 11
Antocianinas e Antocianidinas	vermelho	lilás	Azul purpura
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	-----	-----	amarelo
Chalconas e auronas	vermelho	-----	Vermelho purpura
Flavanonóis	-----	-----	Vermelho laranja

Fonte: Barbosa et al., (2001)

4.4.6 Determinação de Purinas

Em cápsulas individuais de porcelana foram colocados 4,0 mg dos extrato e frações de cada alga, acrescentou-se III gotas de solução de HCl (6N) e duas gotas de H₂O₂ concentrado (30%). Procedese a evaporação em banho maria, observar a formação de um resíduo corado de vermelho, se houver formação juntar 3 gotas de solução de NH₄OH (6N). O surgimento de coloração violeta, indica reação positiva.

4.4.7 Determinação de açúcares redutores

Foram dissolvidos 4.0 mg dos extratos e frações de cada alga em 5,0 mL de água destilada. Adicionou-se 2.0 mL do reativo de FEHLING A e 2,0 mL do reativo de FEHLING B. A partir daí as amostras foram aquecidas em banho maria em ebulição durante 5.0 min. O aparecimento de um precipitado vermelho tijolo, indica resultado positivo para a presença de açúcares redutores.

4.4.8 Determinação de Antraquinonas

Alíquotas de 5.0 mg de cada fração e extrato foram diluídos em 5,0 mL de Tolueno, posteriormente foram adicionados 2,0 mL de solução de NH_4OH a 10%, agitando suavemente até a formação de duas fases. Se constatado o aparecimento de coloração rósea, vermelha ou violeta na fase aquosa, indica reação positiva.

4.4.9 Determinação de ácidos orgânicos

Procedeu-se a dissolução de 4,0 mg dos extratos e frações de cada alga em 5,0 mL de água destilada, realizar a transferência de 2 mL para um tubo de ensaio, ou 1,0 mL e adicionar gotas do reativo de Pascová. A reação é positiva se houver descoloração do reativo.

4.5 Análise fitoquímica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para a obtenção do cromatograma foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu LC-6AD) com detector UV-vis. A separação foi realizada em coluna C18 Luna, 100 A (50 x 4,6mm, 10 μm), com utilização de pré coluna, vazão de 0,8 mL/min, forno não utilizado. Para a preparação das amostras foi utilizado 5,0 mg de cada fração diluída em metanol (grau HPLC), homogeneizadas em vortex e

filtradas em membrana de polietileno com 0,45 µm de poro. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL de forma manual. Os extratos e frações foram eluídos com um gradiente de eluição das fases móveis A e B. Para a análise das frações de *Hypnea pseudomusciformis* o Solvente A consistiu de água + 0,1% de ácido acético e o solvente B consistiu em metanol (grau HPLC) e ácido acético a 0,1%. Para as frações de *Padina gymnospora* e *Jania adhaerens* o solvente A consistiu de água + ácido fórmico 0,1% e o solvente B somente acetonitrila. Os espectros foram adquiridos em 350 e 269 nm para *Hypnea pseudomusciformis* e *Padina gymnospora*, e 216 e 269 nm para *Jania adhaerens*.

4.6 Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana

4.6.1 Microorganismos

As bactérias utilizadas para o teste de difusão em ágar foram: *Staphylococcus epidermidis* (ATCC12228) e *Escherichia coli* (ATCC 25922).

4.6.2 Ensaio halo de inibição, difusão em ágar.

Foram preparadas previamente 10 placas com meio Mueller Hinton acrescido de 1.2% de ágar. Posteriormente as placas foram retiradas da geladeira até atingir a temperatura ambiente. Foi solubilizado uma quantidade de 5.0 mg de fração das algas a ser testada, em 50 µL de DMSO + 450 µL de água destilada. Foram perfurados 16 poços de 6,0 mm de diâmetro nas placas. Utilizando um swab estéril, a partir daí foi feita a distribuição uniforme do inóculo bacteriano padronizado sobre a superfície do ágar em todas as placas, que foram em sequência deixadas em repouso por aproximadamente 5 minutos. Em cada poço perfurado foi adicionado 50µL (concentração de 10 mg/ml) de cada fração a ser testada, todas as frações foram filtradas utilizando filtro de seringa de 0.22 µm. As placas foram incubadas em estufa a 35±1°C por 24 horas. Obedecido o tempo de incubação procedeu-se a inspeção visual para medição das áreas de inibição com régua milimetrada. Todo o procedimento foi realizado em condições assépticas.

4.7 Avaliação *in vitro* da atividade Antifúngica.

4.7.1 Microorganismos

Os cinco microrganismos utilizados para o teste antifúngico foram: *Candida krusei*(ATCC6258) *Cryptococcus neoformans* (ATCC48184), *Aspergillus fumigatus* (USP2), *Candida tropicalis* (ATCC750) e *Trichophyton interdigitale* (ATCC75896)

4.7.2 Ensaio de microdiluição, susceptibilidade antifúngica

Os ensaios de microdiluição em caldo foram realizados em conformidade com o descrito pelos documentos M27-A3 e M38-A2 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)), para o estabelecimento de controle de qualidade e da estirpe de referência.

O repique das culturas foi realizado em ágar batata, incubadas por 24-48 horas em temperatura constante de 35°C, posteriormente as culturas foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril a 0,85%. As suspensões foram agitadas em vortex, a densidade celular foi ajustada com espectrofotômetro, acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância equivalente de 90% para leveduras e 80% para *Aspergillus sp* e *Dermatófitos*, em comprimento de onda de 530 nm para obter uma solução padrão dos fungos com 1×10^6 a 5×10^6 células por mL. Realizou-se posteriormente uma diluição 1:100 seguida de uma diluição de 1:20 da suspensão-padrão com meio líquido RPMI 1640 tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS), para *Aspergillus* e *dermatófitos* somente foi feita uma diluição 1:50, resultando em concentração de 5.0×10^2 a 2.5×10^3 células por mL. As diluições seriadas dos extratos e frações foram realizadas em placas de 96 poços (formato de U). As amostras das frações algais foram diluídas previamente em DMSO na proporção 1:50, e cada poço foi preenchido com 50 µL do meio RPMI-1640. A fileira 12 da placa foi usada como controle de esterilidade, preenchida apenas com o meio. A fileira 11 foi usada para controle de crescimento preenchida com o meio e a solução 1:50 de fungo. Nas fileiras 1 e 2 foram colocados 50 uL dos extratos na concentração

de 1250 µg/mL e a partir da segunda foram feitas as diluições sucessivas até a fileira 10. O fármaco itraconazol foi utilizado como controle. Todos os testes foram realizados em triplicata. As placas posteriormente foram incubadas a 35°C por 48 horas para as leveduras, 120 horas para *Aspergillus* e 28°C por 72 horas para os dermatófitos. Passado os tempos necessários foi procedida a leitura das CIM (concentração inibitória mínima) para cada fungo.

4.8 Avaliação *in vitro* da atividade antileishmania

4.8.1 Microorganismos

Foram utilizadas cepas da espécie *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH-8) mantidas no Laboratório de Atividade Antileishmania do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí. As formas promastigotas foram cultivadas em meio Schneider's suplementado (10% de soro fetal bovino, 100 µg/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina) e incubadas em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.) a 26° (CARNEIRO et al, 2012).

4.8.2 Avaliação *in vitro* da atividade antileishmania sobre formas promastigotas

O ensaio foi realizado com formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase logarítmica de crescimento. Os parasitas foram semeados em placas de cultivo celular de 96 poços contendo meio Schneider's suplementado, na quantidade de 1×10^6 leishmania por 100 µL de meio. As frações das algas foram diluídas em DMSO. Em seguida, as soluções das frações foram adicionadas aos poços em triplicata e realizadas diluições seriadas, atingindo as oito faixas de concentrações finais desejadas (800 a 6,25 µg/mL).

As placas foram incubadas em estufa B.O.D. a temperatura de 26°C por 48h e, 6h antes do término deste período, foram adicionados 20µL de resazurina 1×10^{-3} mol/L, quando se incubou novamente a placa. A leitura da placa foi realizada num

leitor de placas de absorvância Biotek (modelo ELx800), no comprimento de onda de 550 nm e os resultados foram expressos em termos de inibição do crescimento (%).

O controle positivo foi realizado com 2 µg/mL de Anfotericina B diluído em meio Schneider's contendo 1×10^6 promastigotas por poço. Já o controle negativo equivaleu ao meio Schneider's contendo 1×10^6 promastigotas por poço e, neste caso, a viabilidade será de 100% para o parasita. A leitura do branco, para cada concentração e para os controles fez-se necessária para desprezar a absorvância resultante do próprio meio com interferência ou não dos compostos estudados (SOARES et al., 2007; VALADARES et al., 2011).

4.8.3 Análise estatística

Todos os ensaios antileishmania foram realizados em triplicata em três experimentos independentes. A concentração inibitória média (CI_{50}) com limite de confiança de 95% foi calculada utilizando regressão de probitos do programa SPSS 13.0. Foram realizadas análises de variância ANOVA seguida pelo Teste de Bonferroni, através do programa *GraphPad Prism* versão 5.0, tomando-se o valor de $p < 0,05$ como nível máximo de significância estatística.

4.9 Ensaio avaliação de potencial antioxidante pelo método DPPH

A determinação da atividade antioxidante foi realizada utilizando o método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), segundo metodologia proposta por Mensor et al., (2001) com modificações. Soluções estoque dos extratos e frações (1,0 mg/mL) foram diluídas até as concentrações finais de 250, 150, 100, 50, 25, e 15 µg/mL, em etanol. 400 µL de uma solução etanólica de DPPH (0,3 mM) foi adicionada à 1.0 mL das amostras das soluções de diferentes concentrações e esperado o tempo de 30 minutos para reação em temperatura ambiente e livre de luz. Após o tempo estabelecido foram medidos os valores de absorvância em 518 nm e convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (%AA) usando a seguinte fórmula:

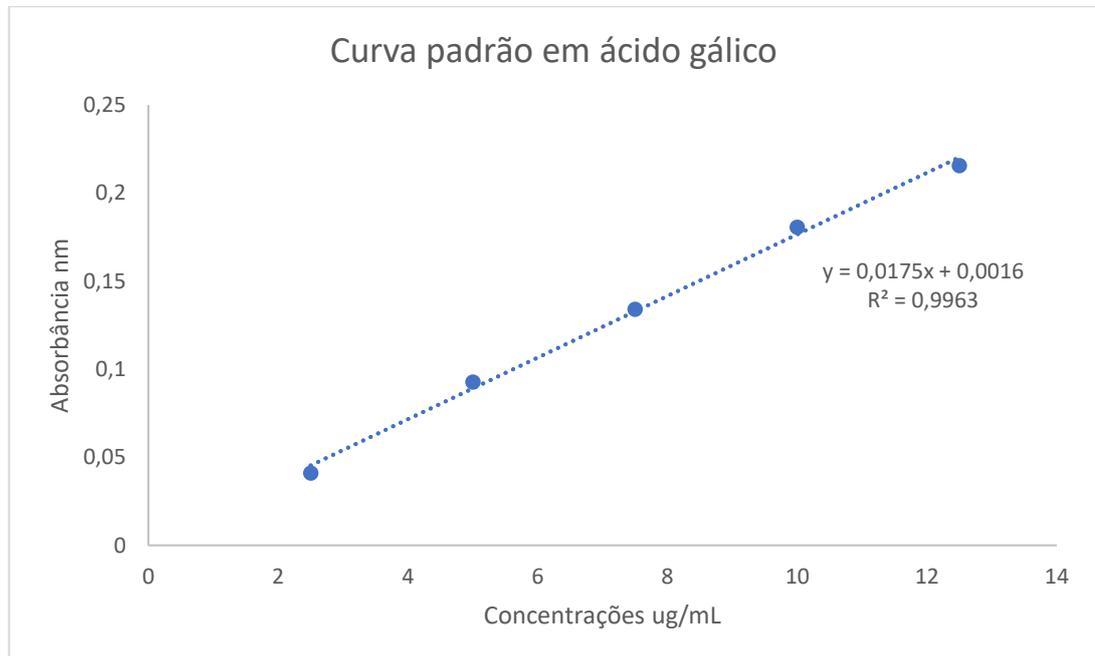
$$AA\% = 100 - \frac{\{[Abs amostra - Abs branco] \times 100\}}{Abs controle}$$

Etanol (400 µL) acrescido da solução dos extratos (1.0 mL) foi usado como branco. A solução de DPPH (400 µL; 0.3 mM) acrescida de etanol (1.0 mL) foi usado como controle negativo. Os controles positivos são aqueles que utilizam soluções padrão. Os valores de CE₅₀ (concentração de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%) foram calculados pela regressão linear dos pontos, onde a abscissa representa as concentrações testadas das frações e a ordenada o percentual médio de atividade antioxidante de três testes separados.

5.0 Quantificação de compostos fenólicos

A quantificação de compostos fenólicos das algas foi realizada baseada no método colorimétrico de Folin-Ciocalteu segundo metodologia proposta por Andrade et al., (2007) com modificações. O reagente de Folin-Ciocalteu, de coloração amarelo, forma um complexo de coloração azul na presença de agentes redutores, no caso os compostos fenólicos. Alíquotas das frações foram diluídas (1.0 mg/mL) com água destilada para o preparo de soluções com concentrações de 10 a 100 µg/mL. foram adicionados 0.5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água (1:10 v/v) a alíquotas de 0.5 mL de amostra acrescidas de 1.0 mL de água. Após um período de 5 minutos, foi acrescentado aos tubos de ensaio 0.5 mL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 10%. A absorbância foi mensurada em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 760 nm, após 1 hora de incubação das amostras em temperatura ambiente, água destilada foi utilizada como branco. Ácido gálico (2.5 a 12.5 µg/mL), dissolvido em água destilada, foi utilizado para elaboração da curva padrão (figura 9) onde os valores de fenólicos totais são expressos como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico/g de amostra).

Figura 9- Curva de calibração de ácido gálico utilizada para quantificação de fenóis totais



Fonte: próprio autor

5.1 Avaliação de Citotoxicidade *in vitro*

5.1.1 Material

Células: Foram utilizadas linhagens de células tumorais humanas, SF-295 (glioblastoma), PC-3 (próstata), HL-60 (leucemia) e HCT-116 (colon). As células foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Amostras: As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril, sendo testadas inicialmente na maior concentração de 50 µg/mL. As amostras que apresentaram percentual de inibição maior que 75% foram diluídas por meio de uma diluição seriada para determinação do valor de CI₅₀ (concentração capaz de inibir 50% da proliferação celular).

5.1.2 Método

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT é um dos métodos que tem a capacidade de analisar indiretamente a viabilidade celular por meio do estado metabólico da célula. O método do MTT é realizado por meio de uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983). O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996).

Inicialmente as células tumorais foram plaqueadas nas concentrações $0,1 \times 10^6$ cél/mL para as linhagens SF-295, PC-3, $0,7 \times 10^5$ cél/mL para a linhagem HCT-116 e $0,3 \times 10^6$ cél/mL para a linhagem HL-60. As células foram tratadas com os compostos-teste (frações das algas) e incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium) a 1%, e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

5.1.3 Análise Estatística

Os experimentos foram analisados segundo a média \pm desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular. O valor de CI₅₀ foi determinado por regressão não linear. Para as análises foi utilizado o programa *GraphPad Prism*.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Avaliação fitoquímica qualitativa

Os extratos e frações das 3 algas foram examinados para determinação da presença de saponinas, fenóis e taninos, polissacarídeos, alcaloides, flavonoides, purinas, açúcares redutores, antraquinonas e ácidos orgânicos (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultado da análise fitoquímica qualitativa para classes de metabólitos das frações hidro alcoolicas (FHa) e Hexânicas (FHe) das algas *Hypnea pseudomusciformis*, *Padina Gymnospora* e *Jania adhaerens*

Testes	<i>Hypnea pseudomusciformis</i>		<i>Padina gymnospora</i>		<i>Jania adhaerens</i>	
	FHa	FHe	FHa	FHe	FHa	FHe
Saponinas	+	-	+	-	-	-
Fenóis e taninos	-	+	+	-	-	-
Polissacarídeos	-	-	-	-	-	-
Alcaloides	-	-	-	-	+	-
Flavonoides	-	-	-	-	-	-
Purinas	+	+	+	+	+	+
Açúcares redutores	-	-	+	-	-	-
Antraquinonas	-	+	-	-	-	-
Ácidos orgânicos	-	-	-	-	-	-

+ Presença do composto

- Ausência do composto

Dos 54 testes realizados, 13 apresentaram resultado positivo. As frações hidro alcoolicas das algas *Hypnea pseudomusciformis* e *Padina gymnospora* apresentaram resultado positivo para saponinas, a presença de fenóis e taninos foi constatada na fração hidroalcoólica de *Padina gymnospora* e fração hexânica de *hypnea pseudomusciformis*. Na determinação de polissacarídeos os resultados obtidos foram

todos negativos. Somente para a fração hidroalcoólica de *Jania adhaerens* foi constatada a presença de alcaloides. Para flavonoides e ácidos orgânicos não foi constatado nenhum resultado positivo para nenhuma fração das algas analisadas. A presença de purinas foi constatada em todas as algas e de Antraquinonas somente na fração hexânica de *Hypnea pseudomusciformis*.

Os resultados obtidos pelo levantamento fitoquímico qualitativo conduzido por Abirami e Kowsalya (2011), para o extrato metanólico da alga *Padina gymnospora* corroboram alguns dos resultados do presente trabalho, como a presença de saponinas, fenóis e açúcares redutores. Porém na referida avaliação, foi constatada também a presença de flavonoides o que não ocorreu no teste fitoquímico do presente estudo.

Não foram encontrados na literatura dados sobre fitoquímica da espécie *hypnea pseudomusciformis*, porém Rafiquzzaman et al., (2016) em ensaio fitoquímico realizado para a alga de *Hypnea musciformis* puderam observar a presença de fenóis, terpenóides, saponinas e também taninos no extrato metanólico dessa alga.

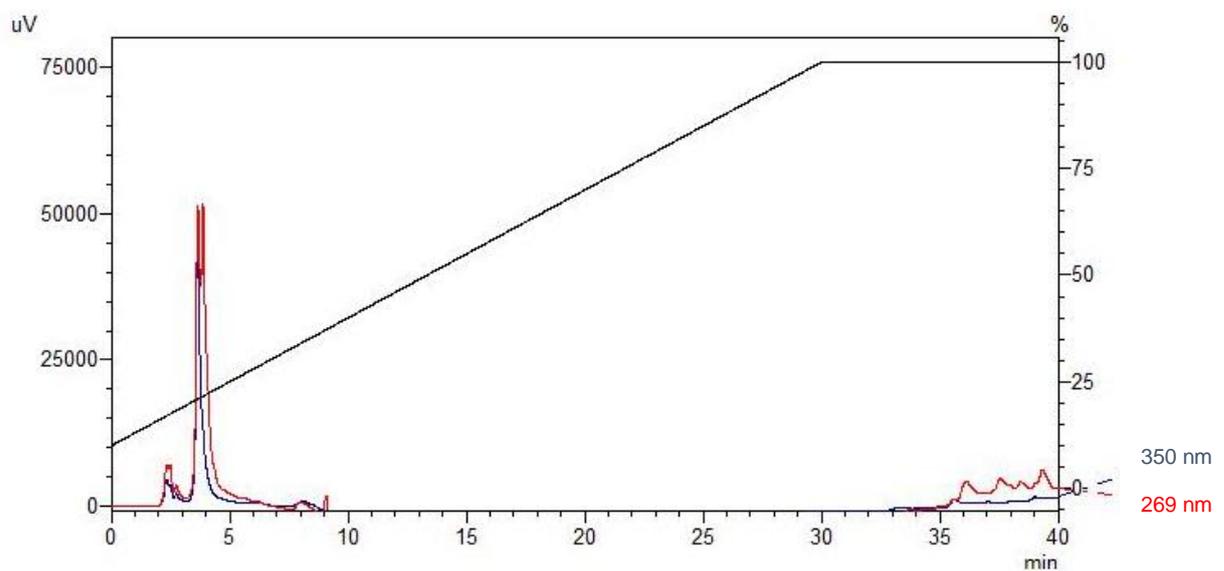
Mohy e El-Ahwany (2016) investigando a alga *Jania rubens*, verificaram a presença nos extratos metanólico e etanólico de alcaloides, triterpenóides, esteroides, taninos e coumarinas. É possível observar que a presença de alcaloides tanto em *Jania Rubens* quanto em *Jania adhaerens* de mesmo gênero, corrobora o avaliado na fitoquímica preliminar do presente estudo. Ainda tratando da alga *Jania Rubens*, o estudo conduzido por Kumbhar et al., (2014) corrobora os compostos citados anteriormente, porém aqui foi verificada também a presença de saponinas nos extratos metanólicos, etanólico e aquoso.

6.2 Análise fitoquímica por cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE)

Os compostos referentes a fração hidroalcoólica e hexânica da alga *Hypnea pseudomusciformis* analisada por CLAE estão representados na figura 10 e 11. De acordo com o cromatograma da figura 9, é possível observar logo no início da corrida dois picos, o primeiro surgindo no tempo de retenção de 2,3 minutos e apresentando uma área de 6,7% e o segundo pico mais proeminente que se mostrou no tempo de retenção de 3,64 minutos apresentando uma área de 93,2%. De acordo com a

fitoquímica anterior realizada para essa fração é possível que esse composto seja uma saponina ou mesmo algum composto fenólico que pode ter sido mascarado na fitoquímica qualitativa. No estudo fitoquímico conduzido por Dhinakaran et al. (2016) com a fração metanólica da alga *Hypnea musciformis*, foram observados 4 picos, os dois primeiros mais proeminentes, nos tempos de retenção de 2,05 e 2,23 e os dois últimos nos tempos de 2,6 e 3,2 minutos. A análise no referido estudo demonstrou que o composto fenólico mais abundante foi a epicatequina.

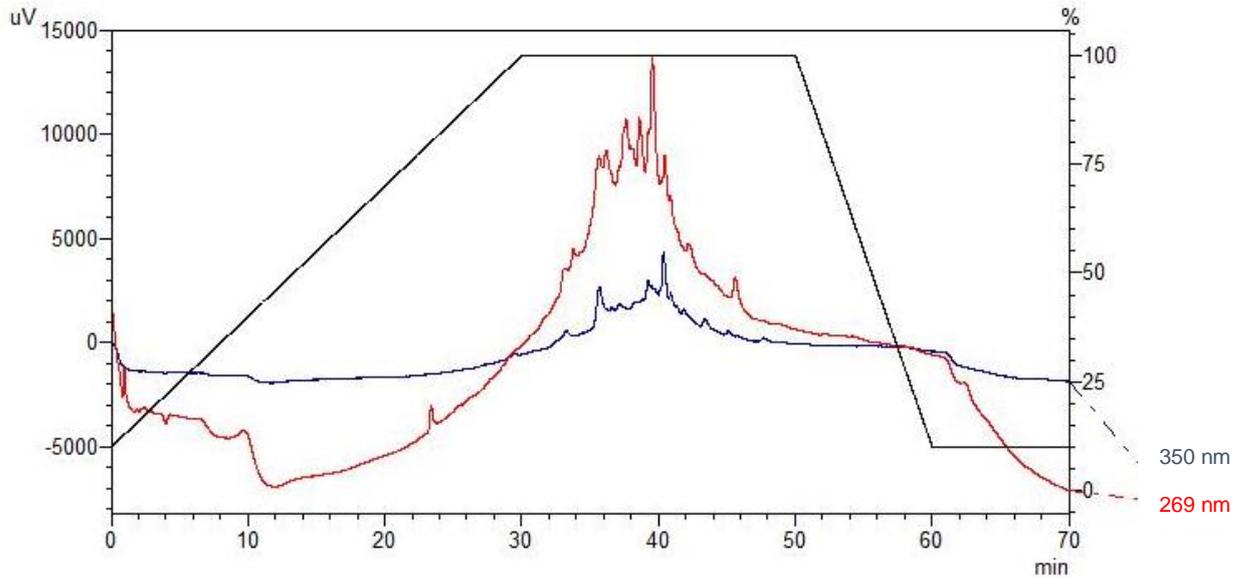
Figura 10. Cromatograma referente à fração hidro alcoólica da alga *Hypnea pseudomusciformis*



Fonte: próprio autor

Os testes fitoquímicos preliminares demonstram para a fração hexânica de *H. pseudomusciformis* (figura 11) a presença de compostos fenólicos e antraquinonas, porém não houve uma separação satisfatória dos picos no perfil cromatográfico referente a essa fração, possivelmente seja necessário ajustar o método para a detecção de antraquinonas ao invés do método utilizado para compostos fenólicos.

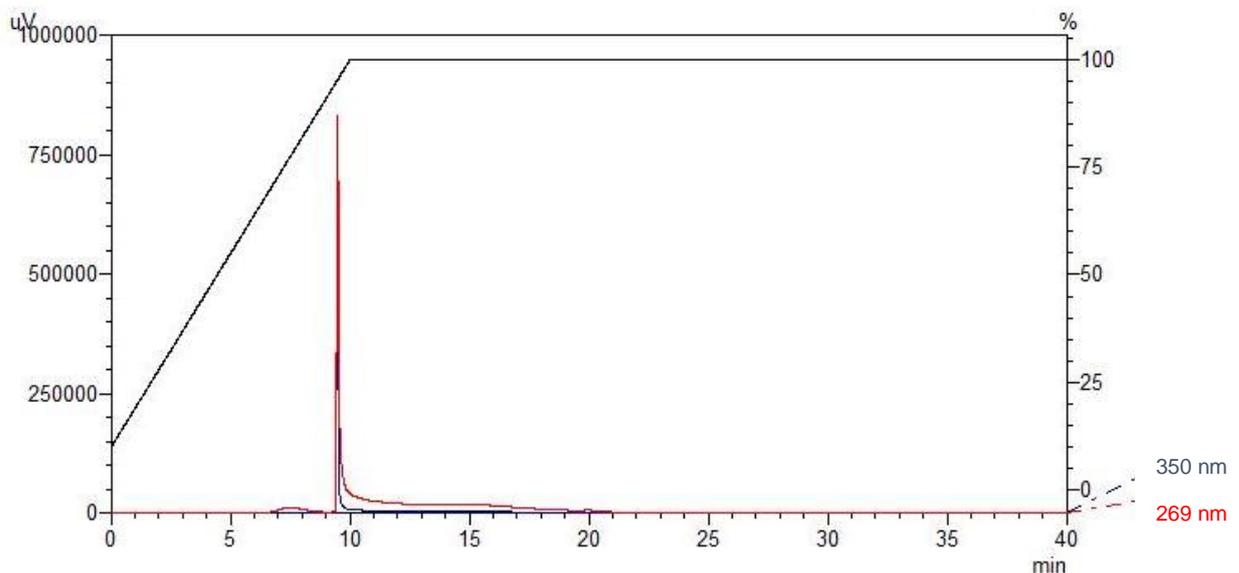
Figura 11- Cromatograma referente à fração Hexânica da alga *Hypnea pseudomusciformis*



Fonte: próprio autor

Em relação a fração hidroalcoólica de *Padina gymnospora* (figura 12) foi detectado um único pico no tempo de retenção de 9,4 minutos com uma área de 100%. De acordo com a fitoquímica qualitativa realizada para essa fração é possível que o pico em questão seja um composto fenólico ou um tanino. É possível observar na fração hexânica (figura 13) da mesma alga, um único pico no tempo de retenção de 8,1 minutos com área igualmente de 100%, que de acordo com o método utilizado pode ser um composto fenólico.

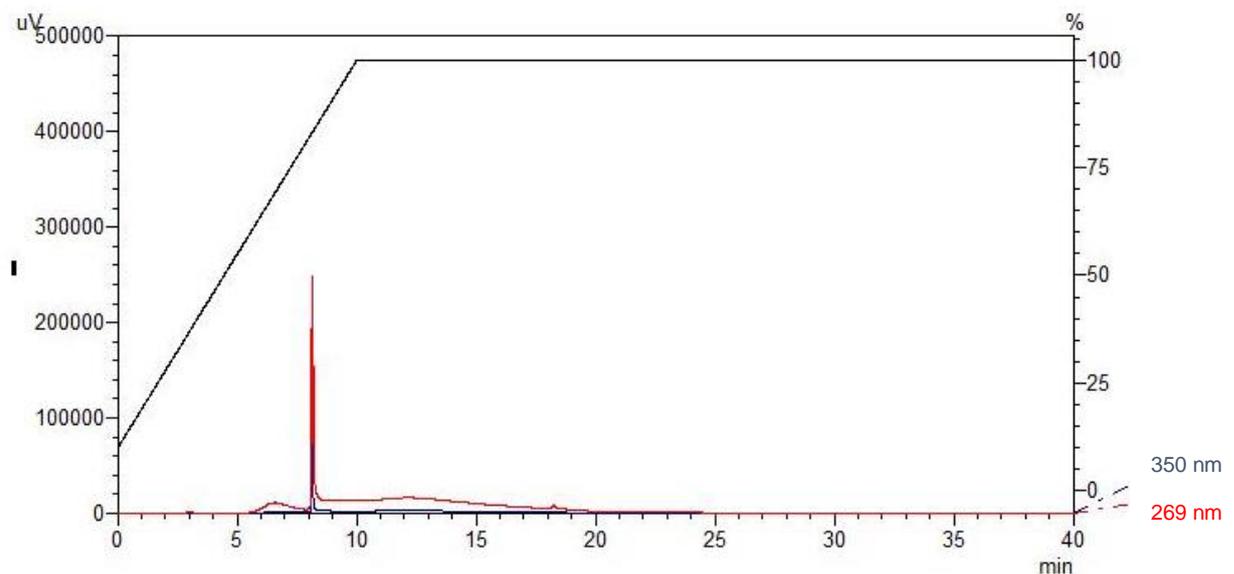
Figura 12- Cromatograma referente a fração hidro-alcoólica da alga *Padina gymnospora*



Fonte: próprio autor

Diferente do perfil cromatográfico apresentando no presente estudo, a análise fitoquímica conduzida por Johnson e Janakiraman, (2014) demonstraram que o perfil cromatográfico do extrato benzenico de *Padina gymnospora* apresentou 4 picos proeminentes nos tempos de retenção de 1,143, 1,803, 2,933 e 3,723 minutos respectivamente. Ainda no mesmo estudo o extrato isopropanolico demonstrou um pico proeminente no tempo de retenção 2,657 minutos e o extrato benzênico de *Padina tetrastomatica* demonstrou um pico proeminente em 2,657 minutos, e outro pico moderando aos 4,063 minutos. Segundo os autores os componentes levantados na cromatografia podem ser possivelmente fenóis, alcaloides, taninos, esteroides, glicosídeos, saponinas e flavonoides, levantados em fitoquímica preliminar, porém assim como no presente estudo, é necessário efetuar uma investigação mais aprofundada para definir com certeza absoluta os constituintes demonstrados.

Figura 13- Cromatograma referente a fração hidro-alcoólica da alga *Padina gymnospora*

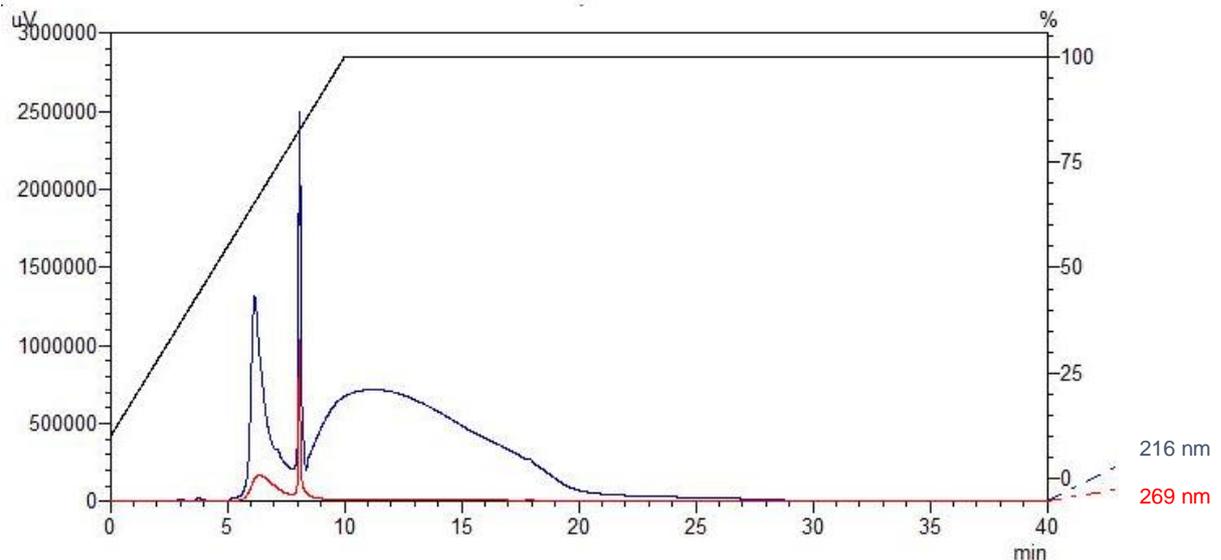


Fonte: próprio autor

É possível verificar no cromatograma da fração hidro-alcoólica da alga *Jania adhaerens* (figura 14) a presença de dois picos, o primeiro no tempo de retenção de 6,1 minutos com área de 69,6% enquanto o segundo pico se mostrou no tempo de retenção de 8,0 minutos com área de 30,34%. De acordo com a fitoquímica preliminar

e a metodologia de separação realizada para essa alga, possivelmente os picos apresentados são compostos da classe dos alcaloides.

Figura 14- Cromatograma referente a fração hidroalcoólica da alga *Jania adhaerens*



Fonte: próprio autor

6.3 Ensaio antibacteriano, difusão em ágar.

Cerca de 24 horas após a realização do teste foi verificado resultado para a formação do halo de inibição, para todas as algas e suas determinadas frações. Não foi observado, porém nenhuma formação de halo inibitório induzido pelos extratos e frações das algas para nenhuma das bactérias testadas. Em estudo similar, Salem et al., (2016) obtiveram em sua investigação para a fração acetato de etila de *Padina gymnospora*, valores de zona de inibição de 17,8 mm para *S. aureus* e 11,3 mm para *E. coli*, ainda no mesmo estudo a fração metanólica de *Padina gymnospora* também apresentou zonas de inibição de 11,5 e 13,3 mm para *S. aureus* e *E. coli* respectivamente. Na investigação conduzida por Pramitha e Lipton (2015) utilizando o extrato metanólico de *Hypnea musciformis* foi obtida zona de inibição de 78,5 mm para *S. aureus*.

Alves et al., (2015) assim como no presente estudo, não obteve resultados de inibição contra *E. coli* para as frações hexânicas, clorofórmicas, metanólica e acetato de etila das algas *Padina gymnospora* e *Jania adhaerens*. Porém no referido estudo essas frações apresentaram zonas de inibição contra *Bacillus subtilis* e *Micrococcus*

luteus, onde pode se destacar a zona de inibição da fração clorofórmica de *Jania adhaerens* e fração acetato de etila de *Padina gymnospora* contra *Bacillus subtilis* (15,33 e 17,0 mm respectivamente). As zonas de inibição apresentadas contra *Micrococcus luteus* para as frações acetato de etila de *Jania adhaerens* e hexânica de *Padina gymnospora* foram de 14,33 e 16,33 mm, respectivamente.

6.4 Avaliação da susceptibilidade antifúngica

Os dados coletados das concentrações inibitórias mínimas referentes ao ensaio de micro diluição estão compilados na tabela 4.

Tabela 4 - Concentração inibitória mínima (CIM) expressa em µg/mL das frações hidroalcoólicas (FHa) e hexânica (FHe) das algas *Jania adhaerens*, *Hypnea pseudomusciformis* e *Padina gymnospora* contra os fungos *Candida Krusei*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida tropicalis* e *Trichophyton interdigitale*.

Extratos (alga/solvente)	<i>Candida krusei</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Trichophyton interdigitale</i>
<i>Jania adhaerens</i> -FHa	39,06 µg/mL.	N.D	N.D	N.D
<i>Jania adhaerens</i> -FHe	1250 µg/ mL.	N.D	N.D	N.D
<i>Hypnea pseudomusciformis</i> - FHa	9,76 µg/ mL.	N.D	N.D	N.D
<i>Hypnea pseudomusciformis</i> - FHe	N.D	N.D	N.D	N.D
<i>Padina gymnospora</i> -FHa	1250 µg/ mL.	N.D	N.D	N.D
<i>Padina gymnospora</i> -FHe	N.D	N.D	N.D	N.D

N.D= CIM não detectado

Fonte: próprio autor

A concentração inibitória mínima (CIM) observada para a fração hidro alcoólica da alga *Jania adhaerens* foi de 39,06 µg/mL contra *Candida krusei*, enquanto a fração hexânica da mesma alga apresentou um desempenho inferior, apresentando um CIM de 1250 µg/mL para a mesma levedura, ambas as frações não apresentaram qualquer atividade contra *Aspergillus fumigatus*, *Candida tropicalis* e *Trichophyton interdigitale*.

Para fração hidro alcoólica de *Hypnea pseudomusciformis* foi observado boa atividade antifúngica com uma CIM de 9,76 µg/mL para a levedura *Candida krusei*, novamente para *Aspergillus fumigatus*, *Candida tropicalis* e *Trichophyton interdigitale* não foi demonstrada qualquer atividade. Não foi observado porém inibição para nenhum dos fungos testados com a fração hexânica de *Hypnea pseudomusciformis*.

Para a fração hexânica da alga *Padina gymnospora* não foi registrado nenhuma atividade para os fungos utilizados, já a sua fração hidro alcoólica obteve um CIM de 1250 µg/mL para *Candida krusei* e nenhuma atividade para *Aspergillus fumigatus* e os demais fungos. Em investigação antifúngica similar, Guedes et al., (2012) obteve uma CIM de 8,0 µg/mL para a fração diclorometano da alga *Hypnea musciformis* contra *Candida albicans* e CIM de 16,0 µg/mL para a mesma fração contra *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*. Para a fração metanólica obtiveram ótima atividade contra as espécies dermatófitas *Trichophyton tonsurans* (CIM 0,03 µg/mL), *T. rubrum* (CIM 0,125 µg/mL), *T. mentagrophytes* (CIM 4,0 µg/mL), *Microsporum canis* (CIM 0,03 µg/mL) e *Epidermophyton floccosum* (CIM 8,0 µg/mL)

O mesmo estudo também avaliou *Padina gymnospora* em que algumas frações foram testadas contra espécies de *Candida* e algumas espécies dermatófitas. Para as espécies de *Candida* foi verificada atividade para *Candida albicans* (CIM 10,0 µg/mL) tanto para a fração metanólica como para a etanólica e uma CIM de 15,0 µg/mL para a fração diclorometano. Contra as espécies dermatófitas a fração diclorometano apresentou atividade para *Trichophyton tonsurans* (CIM 12 µg/mL), *T. rubrum* (CIM 25 µg/mL) *Microsporum canis* (CIM 12 µg/mL), *M. gypseum* (CIM 10 µg/mL) e *Epidermophyton floccosum* (CIM 15 µg/mL). A ampla atividade antifúngica observada para *Padina gymnospora* pode ser explicada provavelmente por conta dos florotaninos, componentes encontrados exclusivamente em algas marrons, esses compostos são encontrados na membrana celular dessa classe de algas (SHIBATA et al., 2004)

Stein et al., (2011) obteve uma CIM <31.25 µg/mL contra *Candida albicans* para as frações metanólicas e cloroformicas da alga vermelha *Laurencia dendroidea*, com a fração etanólica foi observado uma CIM de 176,6 µg/mL para *Candida parapsilosis* e *Candida neoformans*, de acordo com os autores essas atividades provavelmente se devem a diversidade dos compostos halogenados presentes nesse gênero de alga que incluem sesquiterpenos, diterpenos e acetilenos.

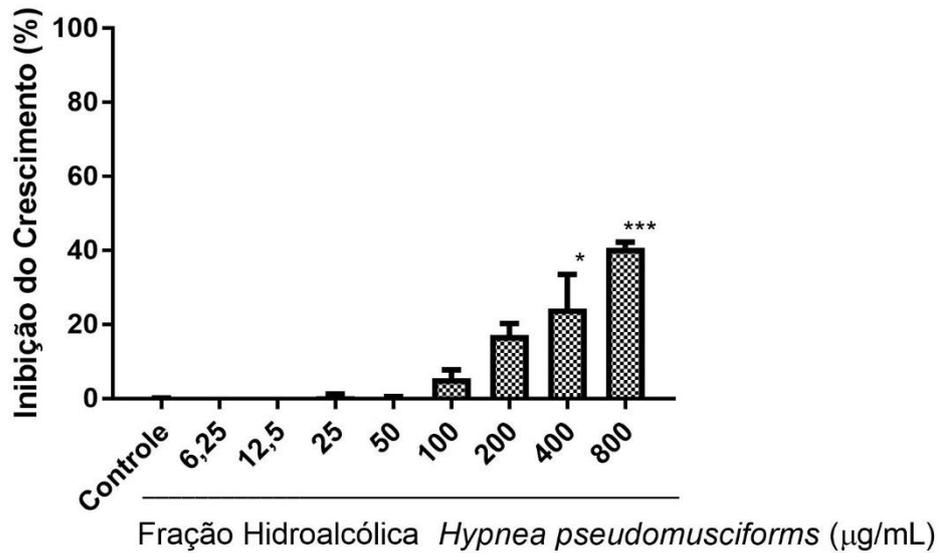
No trabalho conduzido por Val et al., (2001) realizando um levantamento antimicrobiano de várias espécies de algas contra fungos e bactérias foi verificado que os extratos metanolicos das algas *Jania adhaerens* e *Jania rubens* pertencentes ao mesmo gênero, não apresentaram atividade contra *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, corroborando em parte o resultado do presente trabalho em relação ao fungo *Aspergillus fumigatus*.

6.5 Avaliação da atividade antileishmania

Os resultados para a fração hidro alcoólica da alga *H. pseudomusciformis* (figura 15) foram inferiores em desempenho quando comparadas a sua fração hexânica, apresentando 42,25% de inibição das formas promastigotas para concentração testada de 800 µg/mL e 20,2% de inibição para a concentração de 200 µg/mL. Não foi possível determinar o CI_{50} para essa fração por conta da faixa em que esse se apresentaria (mais alta do que a maior concentração testada).

Os resultados do ensaio antileishmania para a fração hexânica da alga vermelha *H. pseudo musciformis* estão apresentados na figura 16, é possível observar que a fração em análise obteve uma alta porcentagem de inibição das formas promastigotas de *L. amazonenses* somente a partir de concentrações elevadas, 39,5 % para a concentração de 400 µg/mL e 88,8% para a concentração de 800 µg/mL respectivamente). Tendo apresentado CI_{50} na concentração de 396,8 µg/mL. Aliança, (2012) investigando extratos de várias algas, obteve um CI_{50} de 159,61 µg/mL para o extrato diclorometano/metanol de *H. musciformis* contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*.

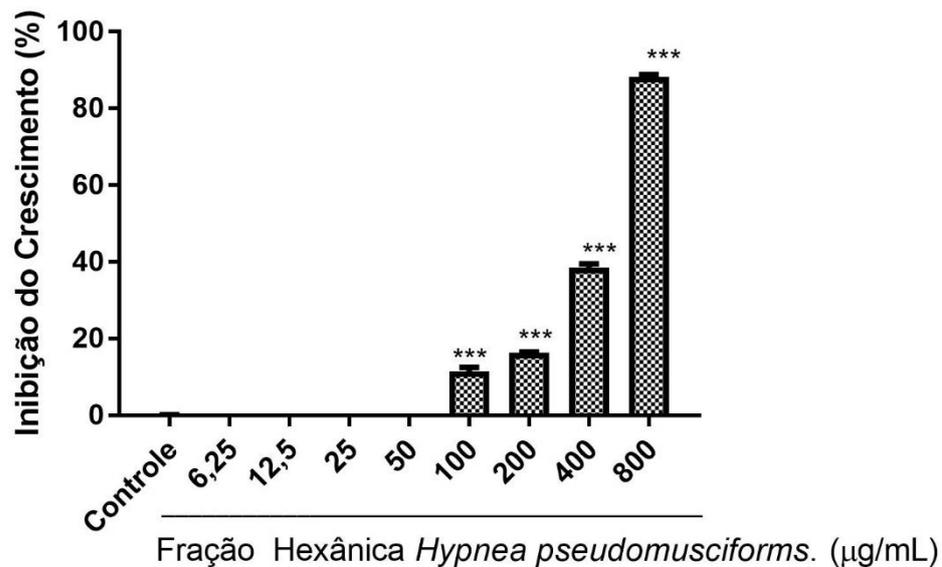
Figura 15 - Atividade antileishmania da fração hidroalcolica da alga *Hypnea pseudomusciformis*, contra as formas promastigotas de *L. amazonenses*, expressa em porcentagem de inibição de crescimento.



*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

Fonte: próprio autor

Figura 16 – Atividade antileishmania da fração hexânica da alga *Hypnea pseudomusciformis*, contra as formas promastigotas de *L. amazonenses*, expressa em porcentagem de inibição de crescimento

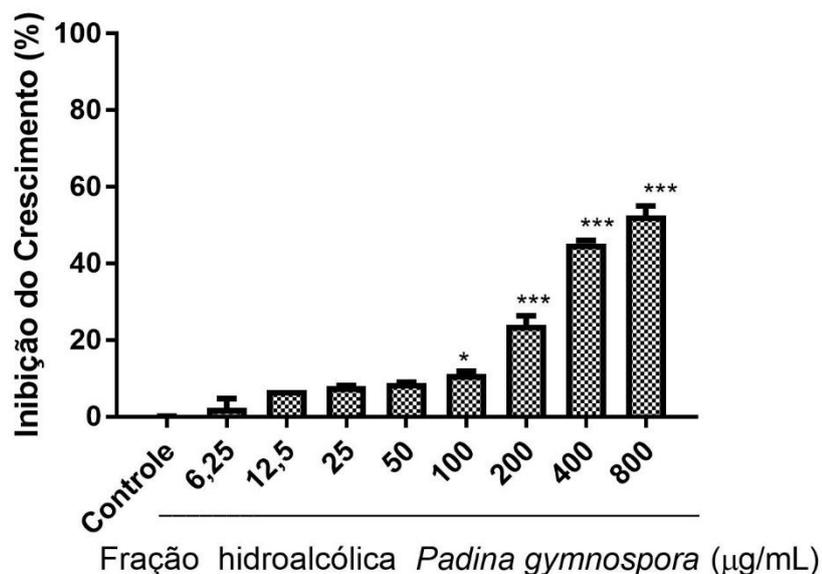


*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

Fonte: próprio autor

Para a fração hidro alcoólica de *P. gymnospora* (figura 17) foram obtidos valores de inibição de 55 % para a concentração testada de 800 µg/mL e sempre valores abaixo dos 20% no intervalo de concentrações que vão de 6,25 até 100 µg/mL, O CI₅₀ não pode ser determinado. Em estudo conduzido por Bianco et al., (2013) testando fração acetônica de *Padina spp* obtiveram nos testes valor de inibição de 80,9% contra *L. braziliensis*. Já Aliança et al., (2012) obteve um CI₅₀ de 127,30 µg/mL testando o extrato diclorometano/metanol de *P. gymnospora* contra *Leishmania amazonenses*

Figura 17- Atividade antileishmania da fração hidroalcoólica da alga *Padina Gymnospora*, contra as formas promastigotas de *L. amazonenses*, expressa em porcentagem de inibição de crescimento.

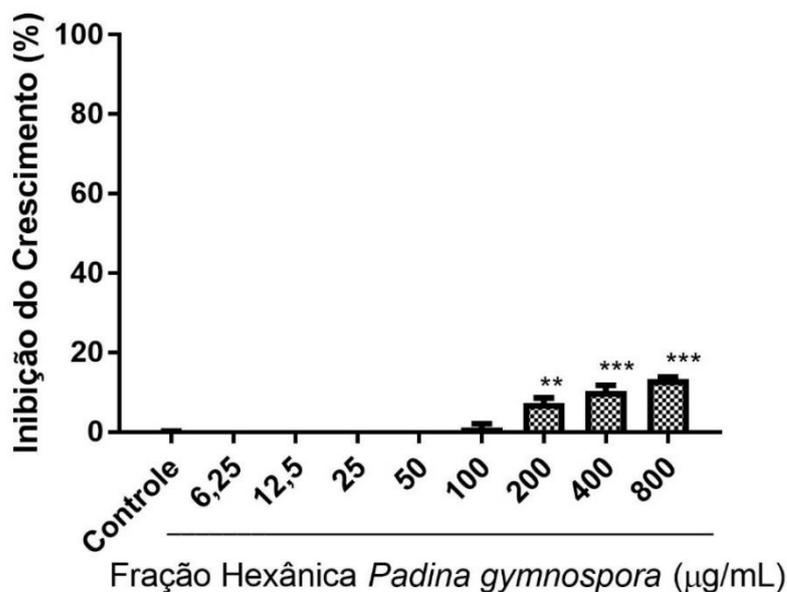


*: P <0.05; **: P <0.01; ***: P <0.001

Fonte: próprio autor

Os resultados para a fração hexânica da alga *P. gymnospora* (figura 18) não foram significativos em termos de porcentagem de inibição apresentando valores inferiores a 20% nas concentrações mais altas testadas (400 e 800 µg/mL) não sendo possível também obter o valor do CI₅₀.

Figura 18 - Atividade antileishmaniana da fração hexânica da alga *Padina gymnospora*, contra as formas promastigotas de *L. amazonenses*, expressa em porcentagem de inibição de crescimento.



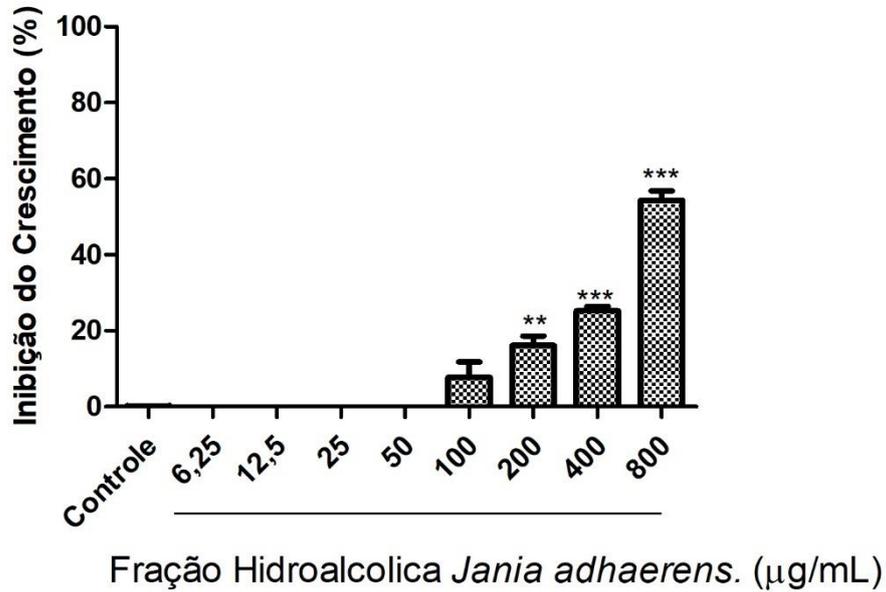
*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

Fonte: próprio autor

A fração hidro alcoólica de *J. adhaerens* (figura 19), apresentou resultado de inibição em torno de 56,2 % na concentração mais alta (800 µg/mL) e 24 % para 400 µg/mL, sendo o CI_{50} observado para essa fração na concentração de 738,94 µg/mL. Não foram encontrados na literatura ensaios antileishmaniana utilizando a alga *Jania adhaerens*, porém Selçuk et al., (2010) investigando potencial inibitório contra as formas axenicadas amastigotas de *Leishmania donovani*, obtiveram um CI_{50} de 28 µg/mL para o extrato metanólico da alga *Jania rubens*. Almendiger et al., (2010) investigando também a alga *Jania rubens* obtiveram CI_{50} de 60,7 µg/mL contra as formas axenicadas amastigotas de *L. donovani*. para uma fração confeccionada com álcool isopropílico, clorofórmio e metanol.

Para a fração hexânica da alga *J. adhaerens* (figura 20) foram obtidos valores bem parecidos a sua fração hidroalcoólica, porém levemente superiores. A porcentagem de inibição foi de 59% para a concentração mais elevada. Para essa fração foi obtido CI_{50} na concentração de 670,17 µg/mL.

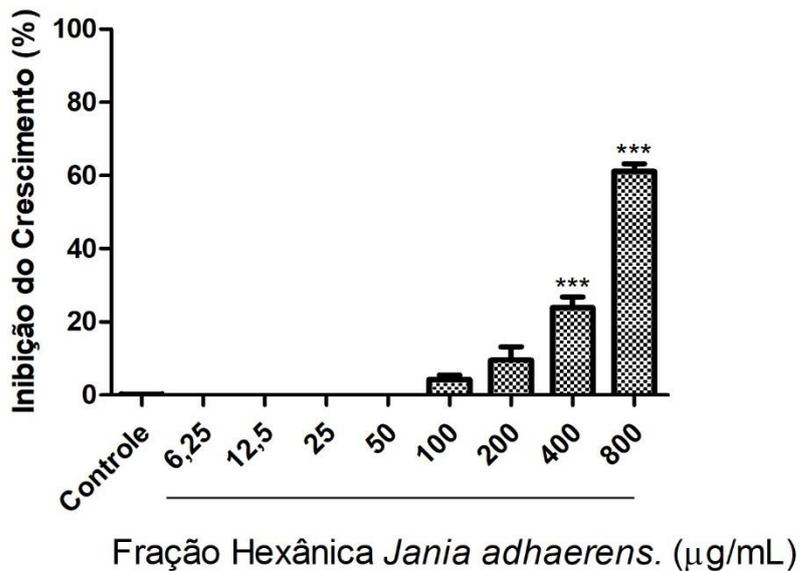
Figura 19- Atividade antileishmania da fração hidro alcoólica da alga *Jania adhaerens*, contra as formas promastigotas de *L. amazonenses*, expressa em porcentagem de inibição de crescimento.



*: P <0.05; **: P <0.01; ***: P <0.001

Fonte: próprio autor

Figura 20- Atividade antileishmania da fração hexânica da alga *Jania adhaerens*, contra as formas promastigotas de *L. amazonenses*, expressa em porcentagem de inibição de crescimento.



*: P <0.05; **: P <0.01; ***: P <0.001

Fonte: próprio autor

Santos et al., (2010) constataram, que o composto elatol isolado da fração hexânica da alga vermelha *Laurencia dendroidea* é um agente antiproliferativo potente contra as formas promastigotas, amastigotas e intracelular de *L. amazonensis*, concentrações de $4.0 \pm 0,3 \mu\text{M}$ e $7.5 \pm 0,5 \mu\text{M}$ de elatol induziram cerca de 50% e 90% de inibição de crescimento respectivamente em *L. amazonensis*, após 72 horas do tratamento. Em investigação sobre o potencial tripanomicida, fungicida e leishmanicida da alga vermelha *Bostrychia tenella* conduzido por De Felício et al. (2010) foram obtidos resultados de inibição melhores que os do fármaco padrão (amphotericina B: CI_{50} 13 $\mu\text{g/mL}$) para quatro subfrações (H02, H03, D01 and D02) no total, sendo duas obtidas da fração hexânica e duas da fração diclorometano da alga, contra *L. amazonenses* (CI_{50} 1,5 2,7, 4,4, e 4,3 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente)

Allmendinger et al., (2010) avaliaram o potencial antileishmania de várias espécies de algas de algas vermelhas contra *L. donovani* obtendo resultados de inibição para todas as algas testadas com destaque para *Halopitys incurvus* (CI_{50} 16.5 $\mu\text{g/mL}$) e *Plocamium cartilagineum* (CI_{50} 21,2 $\mu\text{g/mL}$)

Em ensaio antileishmania com extrato de algas marrons contra espécie *L. donovani*, Spavieri et al., (2010) constataram que todas as algas testadas em seu ensaio apresentaram inibição para *L. donovani*, com destaque para as algas *Bifurcaria bifurcata* (CI_{50} 6,4 $\mu\text{g/mL}$) e *Halidrys siliquosa* (CI_{50} 8,6 $\mu\text{g/mL}$), em contrapartida essas mesmas algas apresentaram citotoxicidade na faixa de 32,7 e 42,5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente para células de mamíferos.

Vonthron-Sénécheau et al., (2011) avaliando a fração acetato de etila da alga marrom, *Bifurcaria bifurcata*, obtiveram bom resultado de inibição contra *L. donovani* com CI_{50} de 3,8 $\mu\text{g/mL}$. Lira et al., (2016) obtiveram resultados bastante significativos para as frações hexânica e acetato de etila das algas marrons *Dictyota ciliolata* (CI_{50} 1,15 e 4,22 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente) e *Dictyota menstrualis* (CI_{50} 0,61 e 0,7 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente) avaliadas contra as formas promastigota de *L. amazonenses*.

A alga marrom *Styopodium zonale* em estudo conduzido por Soares et al., (2016) apresentou alta atividade anti-Leishmania contra *L. amazonensis* e baixa toxicidade para as células do hospedeiro com 100% de inibição para as formas promastigotas do microorganismo na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, no teste com a fração diclorometano e 0,75 $\mu\text{g/mL}$ para a fração acetato de etila-hexano, segundo os

investigadores a ação se deve ao ácido atomarico (meroditerpeno) presente nas frações.

6.6 Avaliação do potencial antioxidante

Os resultados do ensaio da atividade antioxidante estão compilados na tabela 5. A alga vermelha *H. pseudomusciformis* em sua fração hidro alcoolica apresentou os melhores resultados dentre as algas testadas com porcentagens de atividade antioxidante entre 15 e 42% no intervalo de concentrações testadas (CE_{50} : 256,31 $\mu\text{g/mL}$). Em se tratando da fração hexânica da mesma alga, foram obtidos valores variando de 15,60 a 39,04 % de porcentagem de atividade antioxidante nos intervalos testados, alcançando um CI_{50} na faixa de 367,64 $\mu\text{g/mL}$.

Para a alga marrom *Padina gymnospora* em análise de sua fração hidro alcoolica, foram obtidos resultados variando de 25,4 a 38,6% de atividade antioxidante entre a menor e maior concentração testada, alcançando a CI_{50} na concentração de 387,87 $\mu\text{g/mL}$. Em relação a sua fração hexânica, a CI_{50} obtida foi somente em uma concentração bastante elevada (947,12 $\mu\text{g/mL}$). Já para a alga vermelha *Jania adhaerens* em sua fração hidro alcoolica foram obtidos resultados bem inferiores em termos de porcentagem de atividade antioxidante em comparação com as algas anteriores, alcançando CI_{50} somente em elevada concentração (CE_{50} : 1227 $\mu\text{g/mL}$), já para a fração hexânica da referida alga, foram obtidos valores de porcentagem de atividade antioxidante variando de 21,64 a 37,91% na menor e maior concentração testadas, respectivamente, alcançando CI_{50} na concentração de 416,9 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 5 - Resultados da avaliação quantitativa de atividade antioxidante para as frações hidro alcóolica (FHa) e hexânica (FHe) das algas *Padina gymnospora*, *Hypnea pseudomusciformis* e *Jania adhaerens* expressos em média e desvio padrão da porcentagem de atividade antioxidante (%AA) e CE₅₀ (quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%) expresso em µg/mL.

Alga/fração	Absorbância em 518 n.m						CE ₅₀ µg/mL
	15 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	250 µg/mL	
<i>Padina</i> FHa	25,4±0,7	26,7±6,2	27,3±1,9	31,0±2,8	36,4±2,0	38,6±2,6	387,8
<i>Padina</i> FHe	25,2±1,0	25,7±2,3	26,5±0,1	27,3±0,1	29,0±0,6	*	947,1
<i>Hypnea</i> FHa	31,3±0,9	34,3±1,4	35,5±1,1	37,0±1,3	42,9±0,6	*	256,3
<i>Hypnea</i> FHe	15,6±0,8	18,0±0,6	25,8±0,0	*	29,8±4,6	39,0±2,3	367,6
<i>Jania</i> FHa	*	*	13,7±0,5	15,1±1,2	16,9±1,8	19,8±2,4	1227,3
<i>Jania</i> FHe	21,6±2,8	25,2±0,5	27,9±2,9	31,7±1,6	34,1±2,6	37,9±1,8	416,9

*Valores excluídos da curva por conta de discrepâncias.

Fonte: próprio autor

Testes realizados por Kim et al., (2005) visando a avaliar a atividade antioxidante para o extrato hidro-alcoolico bruto de *J. adhaerens* apresentaram resultados abaixo dos 20% de atividade antioxidante, corroborando o avaliado no presente trabalho.

Em relação a alga *H. pseudomusciformis* a disponibilidade de dados é muito escassa, porem comparando com os dados de atividade antioxidante do trabalho de Rafiquzzaman et al., (2015) com a alga *H. musciformis* pertencente ao mesmo gênero, é possível se ter uma idéia. No referido trabalho a alga obteve cerca 79,34 % de

percentual antioxidante na concentração (1 mg/mL) para o extrato produzido com metanol. Ainda se tratando da alga *Hypnea musciformis*, no estudo conduzido por Martins et al., (2012) foi observada boa atividade antioxidante (76,8%) na concentração de 10 µg/mL para o extrato diclorometano/metanol (1:1, v/v).

Na investigação conduzida por Shanmuganathan e Devi (2015), acerca de diferentes frações feitas com *Padina gymnospora*, revelou que a fração acetato de etila obteve bons valores de percentual inibitório (>60%) na concentração de 1 mg/mL (CE₅₀ 184,0 µg/mL). Martins et al., (2012) avaliando a fração acetato de etila de *Padina gymnospora* obteve 46,3 % de percentual antioxidante na concentração de 100 µg/mL.

Al-Amoudi et al., (2009) investigando o potencial antioxidante pelo método DPPH de algumas espécies de algas, obtiveram para a alga marrom *Sargassum crassifolia* em forma de extrato aquoso e metanólico, atividade antioxidante de 69 e 49,7% respectivamente e de 24,9 % para a fração em hexano.

Investigando os extratos metanólicos e aquosos de várias espécies de algas da costa Dinamarquesa também pelo método DPPH, Farvin e Jacobsen, (2012) obtiveram valores significantes CE₅₀ (7,5 9,2 e 9,9 µg/mL), para as frações etanólicas e CE₅₀ (111,4 8,3 e 8,3 µg/mL) para as frações aquosas das algas *Polysiphonia fucoides*, *Fucus serratus* e *Fucus vesiculosus* respectivamente.

Chakraborty et al., (2013) avaliando as algas vermelhas, *Turbinaria ornata* e *Turbinaria conoides* registrou 64,14% de atividade antioxidante para a fração Acetato de etila da alga *Turbinaria ornata* e 34,23% para a fração Diclorometano de *Turbinaria conoides*. Cho et al., 2011 obtiveram ótimos resultados testando quanto a atividade antioxidante (método DPPH) o extrato etanólico e frações da alga *Enteromorpha prolifera*. O melhor resultado apresentado foi o da fração clorofórmica, que obteve resultados variando de 94,8 a 97,2% de inibição na faixa de concentrações de 0,25 a 1,0 mg/mL, seguida do extrato bruto 44,0 a 96,3% na mesma faixa de concentração anteriormente citada. Segundo os autores a forte atividade antioxidante apresentada por *Enteromorpha prolifera* se deve a presença do composto Feorfobida A.

6.7 Quantificação de compostos fenólicos

Os resultados referentes a quantificação de compostos fenólicos estão compilados na tabela 6. A quantificação de compostos fenólicos foi realizada somente na fração hidroalcoólica de *Padina gymnospora* e hexânica de *Hypnea pseudomusciformis* tendo em vista que somente essas apresentaram resultado positivo para compostos fenólicos no teste fitoquímico qualitativo.

Tabela 6 - Quantificação de compostos fenólicos totais da fração hidro alcoólica(FHa) da alga *Padina gymnospora* e fração hexânica (FHe) da alga *Hypnea pseudomusciformis*, expressos em média e desvio padrão de mg equivalente de ácido gálico/g de amostra.

Alga/fração	mg de Ac. Gálico/g de amostra
<i>Padina gymnospora</i> FHa	18,48±0,11
<i>Hypnea pseudomusciformis</i> FHe	12,13±0,01

Fonte: próprio autor

De acordo com a quantificação foi identificado para *Padina gymnospora* um conteúdo fenólico da ordem de 18,48 mg de Ac. Gálico/g de amostra, a equação utilizada para fazer os cálculos de quantificação está demonstrada na figura 20. Martins et al., (2012) quantificando fenóis em várias algas encontrou para *Padina gymnospora* um valor significativamente maior (243,20 mg de Ac. Gálico/g de amostra) do que no presente trabalho, porém os solventes utilizados (dicloro metano/metanol 1:1) podem ter influenciado diretamente nos valores obtidos. Ainda no referido trabalho foi obtido para *Hypnea musciformis*, 50.93 mg de Ac. Gálico/g de amostra, valor superior ao do presente trabalho.

Khaled, Hiba e Asma (2012) investigando algas da costa libanesa, quantificaram cerca de 8,90 mg de Ac. Gálico/g de amostra, para a fração etil acetato de *Padina pavonica* e 7,5 mg de Ac. Gálico/g de amostra para a fração butanol de *Sargassum vulgare*.

Xu et al., (2015) investigando a alga *Hypnea musciformis*, também obteve valores superiores ao obtidos no presente trabalho, sendo 102,2 e 157,0 mg de Ac. Gálico/g de amostra para a fração acetato de etila e butanol, respectivamente.

Chakraborty, Joseph e Praveen (2015) testando o extrato metanólico e frações de *Hypnea musciformis*, obtiveram os seguintes valores para conteúdo de compostos fenólicos: extrato metanólico (9,84), fração hexânica (56,81), fração diclorometano (87,82) e acetato de etila (205,48) mg de Ac. Gálico/g de amostra, respectivamente.

Testes realizados por Kim et al., (2005) visando a quantificação de fenóis, não identificaram compostos fenólicos para a alga *Jania adhaerens*, corroborando os resultados obtidos no presente trabalho.

6.8 Avaliação de Citotoxicidade *In vitro*

Os resultados dos testes realizados com os extratos para a verificação do potencial citotóxico frente a quatro linhagens de células tumorais estão compilados na tabela 7. Inicialmente, estes compostos foram testados na concentração única de 50 µg/mL.

Apesar da observação de resultados de inibição aparentemente altos, como para a fração hexânica de *Jania adhaerens* (63,04%) e para as frações hidroalcoólicas de *P. gymnospora* (57,43%) e *H. pseudomusciformis* (45,54%) para células HL-60, a metodologia adotada no presente estudo preconiza que os compostos que apresentaram percentual de inibição do crescimento tumoral menor que 75% nas linhagens tumorais testadas, não são considerados citotóxicos, sendo considerado assim o valor de CI_{50} maior que 50 µg/mL. Sendo assim, nenhuma das frações das algas testadas foi considerada citotóxica frente as linhagens de células SF-295 (glioblastoma), PC-3 (próstata), HL-60 (leucemia) e HCT-116 (colon) abordadas nesse estudo.

Tabela 7 – Percentual de inibição do crescimento tumoral *in vitro* na concentração única de 50 µg/mL das frações hidro alcoólicas (Fha) e hexânica (FHe) das algas *Hypnea pseudomusciformis*, *Padina gymnospora* e *Jania adhaerens* frente a quatro linhagens de células tumorais após 72 h de tratamento determinado pelo método do MTT. IC – Inibição do Crescimento; DP – Desvio Padrão.

Amostras	HCT-116		SF-295		PC-3		HL-60	
	IC(%)	DP(%)	IC(%)	DP(%)	IC(%)	DP(%)	IC(%)	DP(%)
<i>Hypnea</i> FHe	19,69	13,69	19,02	17,53	31,26	2,06	0,00	0,00
<i>Hypnea</i> FHa	0,00	0,00	0,00	0,00	4,11	0,67	45,54	1,46
<i>Padina</i> FHe	4,96	5,06	NT	NT	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Padina</i> FHa	7,55	4,59	2,78	6,80	6,69	0,73	57,43	1,00
<i>Jania</i> FHe	36,12	19,49	26,39	4,83	20,06	0,60	63,04	3,70
<i>Jania</i> FHa	15,01	3,05	NT	NT	0,00	0,00	0,00	0,00

NT=Não testado.

Fonte: próprio autor

Baliano et al., (2016) investigando potencial citotóxico de *Padina gymnospora*, nesse estudo concluíram que o extrato metanólico da alga na concentração mais alta testada (100 µg/mL) não apresentou citotoxicidade contra as linhagens celulares de fibroblastos de ratos (L929) e de carcinoma de ovário humano (OVCAR-3)

Guedes et al., (2013) avaliando a citotoxicidade contra as linhagens de células cancerosas K562 (leucemia mielocítica crônica), HEp-2 (carcinoma epidermóide laríngeo) e NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide pulmonar humano) puderam observar que o extrato diclorometano e a fração clorofórmica de *H. musciformis* demonstraram citotoxicidade contra a linhagem K562 (CI₅₀ 3,8 µg/mL e 6,4 µg/mL, respectivamente). A fração clorofórmica e o extrato etanólico de *P. gymnospora* apresentaram citotoxicidade contra a linhagem HEp-2 (CI₅₀ 8,2 e 15,9 µg/mL respectivamente). Ainda no referido estudo a fração clorofórmica de *Hypnea musciformis* demonstrou citotoxicidade contra a linhagem H292 (CI₅₀: 15,0 µg/mL).

Mosaddegh et al., (2014) não observaram citotoxicidade induzida por diferentes extratos das algas *Hypnea boergeseni*, *Hypnea charoides* e *Hypnea valentiae* (CI₅₀>100 µg/mL) para as linhagens de células cancerosas testadas que incluem, MCF-7(câncer de mama), HepG-2 (câncer de fígado), A-549 (adenocarcinoma

alveolar humano), HT-29 (adenocarcinoma coloretal humano) e MDBK (células de rim bovino)

Ao contrario do observado no presente estudo em que a alga *J. adhaerens* não apresentou citotoxicidade para as linhagens testadas, Mosaddegh et al., (2014) verificaram citotóxicidade induzida pelo extrato metanólico e clorofórmico da alga *J. adhaerens*. O extrato metanólico apresentou citotoxicidade nas linhagens MCF-7 e HT-29 (CI_{50} 58,31 e 72,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente), enquanto o clorofórmico demonstrou atividade citotóxica ($CI_{50} < 100 \mu\text{g}/\text{mL}$) para todas as linhagens testadas (MCF-7, HepG-2, A-549, HT-29 e MDBK)

Unissa et al., (2017) em investigação de citotóxicidade do extrato metanólico da alga *Jania Rubens* contra as linhagens de células cancerosas humanas Jurkat (leucemia de linfócitos T do adulto) e Molt4 (Leucemia linfoblástica aguda de células T humanas). Nesse estudo foi observado CI_{50} de 60,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a linhagem Molt4 e CI_{50} de 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para a linhagem Jurkat. Segundo os autores a atividade citotóxica se deve provavelmente pela presença de esteróis, alcaloides, triterpenoides, flavonoides e taninos presentes no extrato metanólico.

7. CONCLUSÃO

A fitoquímica qualitativa demonstrou a presença de fenóis, saponinas, purinas e antraquinonas na alga *H. pseudomusciformis*. Para a alga *P. gymnospora* foram detectados saponinas, fenóis, purinas e açúcares redutores. Somente alcaloides e purinas foram detectados para *J. adhaerens*. A CLAE revelou dois picos para a fração hidroalcolica de *H. pseudomusciformis*, sendo o segundo mais proeminente no qual possivelmente pode ser a saponina identificada anteriormente. A alga *P. gymnospora* apresentou um pico tanto na fração hidroalcolica como na hexânica, possivelmente um composto fenólico na primeira e na segunda um composto não determinado na fitoquímica qualitativa. No cromatograma referente a *J. adhaerens* foram observados dois picos que possivelmente sejam os alcaloides determinados na fitoquímica qualitativa.

Com o teste de atividade antibacteriana foi possível verificar que as frações testadas não se mostraram eficazes em inibir o crescimento das bactérias *E. coli* e *S. epidermis* nas concentrações testadas. Em contrapartida as frações hidroalcolicas de *H. pseudomusciformis* e *J. adhaerens* apresentaram ótimos resultados no ensaio de inibição contra a levedura *C. krusei*, os compostos responsáveis por essa atividade possivelmente são os demonstrados nos cromatogramas referentes a cada alga e sua respectiva fração. No ensaio antileishmania, todas as frações apresentaram moderada atividade, sendo a fração hexânica de *H. pseudomusciformis* a que apresentou maior eficacia. Em se tratando de atividade antioxidante, novamente a fração hidroalcolica de *H. pseudomusciformis* foi que a que apresentou melhores resultados dentre as algas testadas. A quantificação de fenóis demonstrou valores moderados para a fração hexânica de *H. pseudomusciformis* e para a hidroalcolica de *P. gymnospora*. No ensaio de citotóxicidade foi demonstrado que nenhuma das frações foi considerada citotóxica, o que é um forte indicio de que os compostos presentes nas algas testadas são seguros para uso em humanos. Portanto, os resultados obtidos nesse estudo sugerem que as algas *H. pseudomusciformis* e *J. adhaerens* possam vir a servir de base para estudos futuros visando a descoberta e isolamento de compostos presentes nessas espécies que auxiliem em casos de infecções causadas pela levedura *C. krusei* e pelo parasita *L. amazonensis*.

8. PERSPECTIVAS

Isolar e identificar os picos demonstrados na fração hidro-alcoolica das algas *Hypnea pseudomusciformis* e *Jania adhaerens* através de CLAE e espectômetro de massas.

Testar os compostos isolados quanto a sua capacidade antifúngica visando a verificação de possível melhoria de atividade.

Realizar particionamento com outros solventes (diclorometano, acetato de etila, butanol, metanol e clorofórmio) para novos testes fitoquímicos e antimicrobianos.

Analisar os componentes voláteis dos extratos por cromatografia gasosa acoplada a espectômetro de massas (GM-MS)

Realizar ensaio antioxidante pelo método FRAP (ferric reducing antioxidant power) para verificar o potencial redutor de ferro das frações.

REFERÊNCIAS

- ABIRAMI, R. G.; KOWSALYA, S. Phytochemical screening, microbial load and antimicrobial activity of underexploited seaweeds. **International Research Journal of Microbiology**, v. 3, n. October 2012, p. 328–332, 2011.
- AL-AMOUDI, O. A. et al. Chemical composition and antioxidant activities of Jeddah cornice algae, Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 1, p. 23–29, 2009.
- JOB, A. E. et al. Nanoparticle Technology: An alternative approach for Leishmaniasis Treatment, Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment. 2017
- ALIANÇA, A. S. S. Estudo da atividade biológica de produtos naturais de macroalgas do litoral nordestino sobre *Leishmania amazonensis*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação de em Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz. 2012.
- ALLMENDINGER, A. et al. Antiprotozoal, antimycobacterial and cytotoxic potential of twenty-three British and Irish red algae. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 7, p. 1099–1103, 2010.
- ANDRADE, C. A.; SILVA, V. C.; PEITZ, C.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; KERBER, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* - **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 17(2): 231-235, Abr./Jun. 2007.
- BALIANO, A. P. et al. Brown seaweed *Padina gymnospora* is a prominent natural wound-care product. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 6, p. 714–719, 2016.
- BARBOSA, W.L.R. 2004. Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais, Belém - Pa: **Revista Científica da UFPA**, vol. 4, 2001
- BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, 4: 14-19, 1996.
- BIANCO, É. M. et al. Anti-infective potential of marine invertebrates and seaweeds from the Brazilian coast. **Molecules**, v. 18, n. 5, p. 5761–5778, 2013.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 2, p. 170, 2009. CANTRELL, A. et al. Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 412, n. 1, p. 47–54, 2003.

BRAVO, F.; SANCHEZ, M. R. New and re-emerging cutaneous infectious diseases in Latin America and other geographic areas. **Dermatologic Clinics**, v. 21, n. 4, p. 655–668, 2003.

CABRITA, M. T.; VALE, C.; RAUTER, A. P. Halogenated compounds from marine algae. **Marine Drugs**, v. 8, n. 8, p. 2301–2317, 2010.

CARDOSO, K. H. M. et al. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 146, n. 1–2 SPEC. ISS., p. 60–78, 2007.

CARLA, R. et al. Antimicrobial activity of seaweeds of Pernambuco, northeastern coast of Brazil. **African Journal of microbiology research**, v. 10, n. 10, p. 312–318, 2016.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, n. 1, p. 15–25, 2013.

CARNEIRO, S. M. P. et al. The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.). **Biological Research**, v. 45, p. 111-116, 2012.

CASTELO BRANCO, P. V. et al. The antileishmanial drug miltefosine (Impavido®) causes oxidation of DNA bases, apoptosis, and necrosis in mammalian cells. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 806, p. 34–39, 2016.

CHAKRABORTY, K. et al. Evaluation of phenolic contents and antioxidant activities of brown seaweeds belonging to *Turbinaria* spp. (Phaeophyta, Sargassaceae) collected from Gulf of Mannar. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 1, p. 8–16, 2013.

CHAKRABORTY, K.; JOSEPH, D.; PRAVEEN, N. K. Antioxidant activities and phenolic contents of three red seaweeds (Division: Rhodophyta) harvested from the

Gulf of Mannar of Peninsular India. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 4, p. 1924–1935, 2015.

CHEN, J.Y., C.Y. HUANG, Y.S. LIN, T.L. HWANG, W.L. WANG, S.F. CHIOU AND J.H. SHEU, 2016. Halogenated sesquiterpenoids from the red Alga *Laurencia tristicha* collected in Taiwan. **J. Nat. Prod.**, 79: 2315-2323.

CHO, M. et al. Antioxidant properties of extract and fractions from *Enteromorpha prolifera*, a type of green seaweed. *Food Chemistry*, v. 127, n. 3, p. 999–1006, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-third edition M27-A3. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M38-A2. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

COSKUN, O. Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. **Northern Clinics of Istanbul**, v. 3, n. 2, p. 156–160, 2016.

DE FELÍCIO, R. et al. Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, n. 5, p. 763–769, 2010.

DE JESUS RAPOSO FM, Bernado de Morais AM, Santos Costa de Morais RM. Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. **Mar Drugs**. 13:2967–3028, 2015.

DENNING, D. W. et al. Efficacy and safety of voriconazole in the treatment of acute invasive aspergillosis. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 34, n. 5, p. 563–571, 2002.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

DINIZ, J. L. C. P.; COSTA, M. O. D. R.; GONÇALVES, D. U. Mucocutaneous Leishmaniasis: clinical markers in presumptive diagnosis. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 77, n. 3, p. 380–4, 2011.

DHINAKARAN D.I., KARTHICKRAJA P., KUMAR K.K., VIGNESHWARAN G., AND MARIMUTHU T. Identification of Novel metabolites along with the Assessment of Metal Toxicity and Its Implication in Marine Red alga *Hypnea musciformis*, **International Journal of Marine Science**, 6(20): 1-6 , 2016

DIXON, T. C., STEINBACH, W. J., BENJAMIN, D. K., JR, WILLIAMS, L. W. & MYERS, L. A. Disseminated *Candida tropicalis* in a patient with chronic mucocutaneous candidiasis. **South Med J** 97, 788– 790. (2004).

DOS SANTOS, A. O. et al. Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*. **Marine Drugs**, v. 8, n. 11, p. 2733–2743, 2010.

DOWLATI, Y. Cutaneous leishmaniasis: Clinical aspect. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 425–431, 1996.

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

ELOFF JN. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial componentes from plants. **Journal of Ethnopharmacology** 1998; 60: 1–8.

ENGLAND, T. N. Journal Medicine ©. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 347, n. 22, p. 949–955, 1997.

FIDEL, P. L.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 1, p. 80–96, 1999.

FOULADVAND, M., BARAZESH, A., FAROKHZAD, F., MALEKIZADEH, H., SARTAVI, K. Evaluation of *in vitro* anti-leishmanial activity of some brown, green and red algae from the Persian Gulf. **Eur. Rev. Med. Pharmacol.** 15. 597-600, 2011

GOOGLE MAPS. **[Representação geográfica do local de coleta]**. [2018]. Disponível em: <<https://www.google.com.br/maps/@-2.8999291,-41.5710521,5618m/data=!3m1!1e3>>. Acesso em: 09/02/2018

GUEDES, E. A. C. et al. Antifungal Activities of Different Extracts of Marine Macroalgae Against Dermatophytes and Candida Species. **Mycopathologia**, v. 174, n. 3, p. 223–232, 2012.

GUEDES, É. A. C. et al. Cytotoxic activity of marine algae against cancerous cells. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 4, p. 668–673, 2013.

HANDA SS, KHANUJA SPS, LONGO G, RAKESH DD. Extraction Technologies for medicinal and Aromatic Plants. **International center for science and high technology, Trieste**, 2008, 21-25

HAYAKAWA, Y. et al. Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides isolated from green algae. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, n. 1, p. 86–94, 2000.

JOHNSON, M.; R, N. S.; JANAKIRAMAN, N. Uv-Vis And Hplc Studies On *Padina Gymnospora* (Kutzing) Sonder And *Padina Tetrastromatica* (Hauck). **Acta Biomedica Scientia** v. 1, n. 3, p. 122–128, 2014.

KIM, S. et al. Title: Total Phenolic Contents and Biological Activities of Korean Seaweed Extracts. **Food Science and Biotechnology** v. 14, n. 6, p. 1–5, 2005.

KOTHAVADE RJ, KURA MM, VALAND AG, PANTHAKI MH. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *Journal of Medical Microbiology*. 59(8)873- 80, 2010.

KUMBHAR, R. D.; RODE, S. P.; SABALE, A. B. Phycochemical screening of seaweeds from Sindhudurg district of Maharashtra. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 29, n. 1, p. 77–81, 2014.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012.

LAYER, F.; CUNY, C.; WERNER, G.; and WITE, W. Current data and trends on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz**. 2012

LIRA, M. L. F. et al. Anti-leishmanial activity of Brazilian green, brown, and red algae. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 1, p. 591–598, 2016.

MARTINS, C. D. L. et al. Antioxidant properties and total phenolic contents of some tropical seaweeds of the Brazilian coast. **Journal of applied Phycology**, v. 2, 2012.

MARSTON, A. Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22–24, p. 2786–2798, 2007.

MENSOR, LUCIANA, L. et al., Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res* v. 130, n. August, p. 127–130, 2001.

MOHY EL-DIN, S. M.; EL-AHWANY, A. M. D. Bioactivity and phytochemical constituents of marine red seaweeds (*jania rubens*, *Corallina mediterranea* and *Pterocladia capillacea*). **Journal of Taibah University for Science**, v. 10, n. 4, p. 471–484, 2016.

MOLYNEUX, P SONGKLANAKARIN. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating the activity antioxidante activity. **J, Sci. Tech.**, 26(2): 211-219, 2004.

MOSADDEGH, M. et al. A survey of cytotoxic effects of some marine algae in the Chabahar coast of Oman Sea. **Res J Pharmacog**, v. 1, p. 27–31, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, 65: 55-63, 1983.

N. KHALED, M. HIBA, C. ASMA: Antioxidant and antifungal activities of *Padina pavonica* and *Sargassum vulgare* from the Lebanese Mediterranean Coast, **Adv. Environ. Biol.** 6(1), 42–48, 2012.

NCUBE, N. S. et al. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, p. 1797–1806, 2008.

NIJVELDT, R.J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 74, pp. 418 – 425, 2011.

NUCCI, M.; MARR, K. A. Emerging Fungal Diseases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 4, p. 521–526, 2005.

OLIVEIRA WF, SILVA PMS, SILVA RCS, SILVA GMM, MACHADO G, COELHO LCBB, Correia MTS, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* infections on implants, **Journal of Hospital Infection**, 2017

ORHAN, I., SENER, B., ATICI, T., BRUN, R., PEROZZO, R., TASDEMIR, D., Turkish freshwater and marine macrophyte extracts show *in vitro* antiprotozoal activity and

inhibit FabI, a key enzyme of *Plasmodium falciparum* fatty acid biosynthesis. **Phytomedicine** 13, 388-393, 2006.

PASDARAN, A.; HAMED, A.; MAMEDOV, N. Antibacterial and insecticidal activity of volatile compounds of three algae species of Oman Sea. **Int. J. Sec. Metabolite**, v. 3, n. 2, p. 66–73, 2016.

PFALLER, M. A. et al. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: Geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 515–521, 2008.

PRAMITHA, V. S.; LIPTON, A. P. Antibiotic potentials of red macroalgae *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux and *Hypnea valentiae* (Turner) Montagne. **Seaweed Res. Utiln.**, v. 35, p. 95–107, 2013.

PRASHANT TIWARI, B.; KUMAR, M. K.; GURPREET KAUR, H. K. Phytochemical screening and extraction - A review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v. 1, n. 1, p. 98–106, 2011.

PUGLISI, M.P., TAN, L.T., JENSEN, P.R., FENICAL, W. Capisterones A and B from the tropical green alga *Penicillus capitatus*: unexpected anti-fungal defenses targeting the marine pathogen *Lindera thalassiae*. **Tetrahedron** 60, 7035–7039. 2004

RAFIQUZZAMAN, S. M. et al. Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of Edible Red Alga *Hypnea musciformis* from Bangladesh. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 40, n. 5, p. 1074–1083, 2016.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 76–83, 2009.

RAO, A.V.; RAO, L.G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, Japão, v. 55, p. 207-216, 2007.

RATH, S. et al. Antimonias Empregados No Tratamento Da Leishmaniose: Estado Da Arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, 2003.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 203–11, 2007.

SABEENA FARVIN, K. H.; JACOBSEN, C. Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 1670–1681, 2013.

SALEM, W. M. Screening for antibacterial activities in some marine algae from the red sea (Hurghada, Egypt). **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 15, p. 2160–2167, 2011.

SUZGEC-SELCUK, S, MERICLI, AH, GUVEN, KC, KAISER, M, CASEY, R, HINGLEY-WILSON, S, LALVANI, A AND TASDEMIR, D. Evaluation of Turkish seaweeds for antiprotozoal, antimycobacterial and cytotoxic activities. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 5, p. 778–783, 2011.

SHANMUGANATHAN, B.; PANDIMA DEVI, K. Evaluation of the nutritional profile and antioxidant and anti-cholinesterase activities of *Padina gymnospora* (Phaeophyceae). **European Journal of Phycology**, v. 51, n. 4, p. 482–490, 2016.

SHIBATA, T. et al. Local and chemical distribution of phlorotannins in brown algae. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, n. 4, p. 291–296, 2004.

SINDHI, V. et al. Potential applications of antioxidants – A review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 9, p. 828–835, 2013.

SINGH, R.; SMITHA, M. S.; SINGH, S. P. The Role of Nanotechnology in Combating Multi-Drug Resistant Bacteria. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 7, p. 4745–4756, 2014.

SOARES, D. C. et al. The brown alga *stypopodium zonale* (dictyotaceae): A potential source of anti-leishmania drugs. **Marine Drugs**, v. 14, n. 9, p. 1–11, 2016.

SOARES, D. C. et al. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. **Parasitology International**, v. 56, n. 2. p. 135-139, jun. 2007.

SOUSA, M. B. DE et al. Alfa, Betacaroteno E Alfatocoferol Em Algas Marinhas in Natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 953–958, 2008.

SPAVIERI, J. et al. Antimycobacterial, antiprotozoal and cytotoxic potential of twenty-one brown algae (phaeophyceae) from British and Irish waters. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 11, p. 1724–1729, 2010.

SRIVASTAVA, J. et al. Antimicrobial resistance (AMR) and plant-derived antimicrobials (PDAMs) as an alternative drug line to control infections. **3 Biotech**, v. 4, n. 5, p. 451–460, 2014.

STEIN, E. M. et al. Screening for antifungal activities of extracts of the Brazilian seaweed genus *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 2, p. 290–295, 2011.

STENGEL, D. B.; SOLÈNE, C. Natural products from marine algae : methods and protocols. **methods in molecular biology**. v. 1, p 1-439. 2015

SUGANTHI, M. Pathogenesis and clinical significance of dermatophytes : A comprehensive review. **Innovations in pharmaceuticals and pharmacotherapy**. v. 4(1), p. 62-70, 2017

SUNDAR, SHYAM Et al., Oral Miltefosine For Indian Visceral Leishmaniasis. **N Engl J Med**. 2002

TAKAICHI, S. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. p. 1101–1118, 2011. RUI, I. et al. **marine drugs**. v. 6, p. 2722–2740, 2013.

TORRES, Fábio A.E. et al . New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: a review. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba, v. 24, n. 3, p. 265-276, 2014

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 750, 2017.

UNISSA, R. et al. Evaluation of the *In vitro* Cytotoxic Activity of *Jania rubens* Against Jurkat and Molt- 4 Human Cancer Cell Lines. **Tropical Journal of Natural Product Research**, v. 1, n. 5, p. 199–202, 2017.

VALADARES, D. G. et al. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. **Parasitology International**, v. 60, n. 4. p. 357-363, dez. 2011.

VONTHRON-SÉNÉCHEAU, C. et al. Antiprotozoal activities of organic extracts from french marine seaweeds. **Marine Drugs**, v. 9, n. 6, p. 922–933, 2011.

WANG, L., WANG, X., WU, H., LIU, R., Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years. **Marine Drugs** 12 (9), 4984–5020, 2014.

WU, H. et al. Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 72, n. 151, p. 267–291, 2013.

XU, T. et al. Rapid Screening of Chemical Compositions of *Gracilaria dura* and *Hypnea musciformis* (Rhodophyta) From Corsican Lagoon. **International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients** p. 6–10, 2015.

YAMTHE, L. R. T. et al. Marine algae as source of novel antileishmanial drugs: A review. **Marine Drugs**, v. 15, n. 11, p. 1–28, 2017.

ZAMAN, S. BIN et al. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. **Cureus**, v. 9, n. 6, 2017.