

UFRRJ
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

**PROSPECÇÃO DE MACROALGAS MARINHAS PARA
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CONTRA *Leishmania infantum*
E DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ESTERÓIS DE
*Neobenedenia melleni***

RODRIGO CÉSAR FERNANDES BARBOSA

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**PROSPECÇÃO DE MACROALGAS MARINHAS PARA AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE CONTRA *Leishmania infantum* E DETERMINAÇÃO
DO PERFIL DE ESTERÓIS DE *Neobenedenia melleni***

RODRIGO CÉSAR FERNANDES BARBOSA

Sob Orientação da
Prof. Dra. Márcia Cristina Campos de Oliveira
E Co-orientação da
Prof. Dra. Áurea Echevarria Aznar Neves Lima

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre** em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química.

Seropédica - RJ
Fevereiro de 2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B238p BARBOSA, RODRIGO CÉSAR FERNANDES , 1987-
PROSPECÇÃO DE MACROALGAS MARINHAS PARA AVALIAÇÃO
DA ATIVIDADE CONTRA *Leishmania infantum* E
DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ESTERÓIS DE *Neobenedenia*
melleni / RODRIGO CÉSAR FERNANDES BARBOSA. -
Seropédica, 2020.
67 f.: il.

Orientadora: Márcia Cristina Campos de Oliveira.
Coorientadora: Áurea Echevarria Aznar Neves Lima.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em
Química, 2020.

1. *Leishmania infantum*. 2. *Neobenedenia melleni*.
3. Algas Marinhas. I. Oliveira, Márcia Cristina
Campos de, 1969-, orient. II. Lima, Áurea Echevarria
Aznar Neves , 1950-, coorient. III Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós
graduação em Química. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RODRIGO CÉSAR FERNANDES BARBOSA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 17/02/2019

Márcia Cristina Campos de Oliveira. (Dr.) IQ-UFRRJ

Aurea Echevarria Aznar Neves Lima. (Dr.) IQ-UFRRJ

Maria Raquel Garcia Vega. (Dr.) UENF

Valter Viana de Andrade Neto. (Dr.) IOC-FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio incondicional e por estar sempre presente. Ao Rafael e à Renata, meus irmãos, pela grande ajuda nas coletas de algas.

Às minhas orientadoras, professoras Dra. Márcia Cristina Campos de Oliveira e Dra. Aurea Echevarria Aznar Neves Lima, pela orientação, paciência, companheirismo e pela confiança durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Valter Viana de Andrade Neto, ao Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos, e a todo o grupo do Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos da Fiocruz, pela orientação e suporte nos experimentos de atividade biológica.

À professora Dra. Rosane Nora Castro, aos técnicos da Central Analítica, e a todos do IQ-UFRRJ que contribuíram de forma direta ou indireta com os trabalhos realizados.

Ao Laboratório de Nutrologia do HUCFF-UFRRJ, onde parte das análises foi realizada.

Aos pesquisadores Marcelo Duarte Pontes, Felipe Schwahofer Landuci, Beatriz Castelar Duque Estrada e Giselle Eler Amorim Dias, e ao Técnico de Laboratório Ricardo de Oliveira Soares, da FIPERJ, pelo suporte desde a concepção, à execução dos projetos.

Às fazendas marinhas Pérola do Atlântico e Maricultura Costa Verde, por abrirem as portas para a realização das coletas *neobenedenia melleni*.

Ao IFRJ, à UENF e à UFRRJ, minhas escolas de química desde o Ensino Técnico à Pós-Graduação.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, Renan Augusto Pereira D'Ávila, Jefferson Moura Monteiro e Victor Luis de França Machado, por sempre incentivarem, apoiarem e serem parceiros de toda hora.

Aos amigos Thiago Andrade Delfino da Silva e Sidnei Gomes dos Santos Júnior, por estarem sempre presentes nos momentos importantes.

A quem porventura não tenha sido citado, e que tenha participado de forma direta ou indireta da realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Meu sincero muito obrigado todos!

RESUMO

BARBOSA, Rodrigo César Fernandes. **Prospecção de macroalgas marinhas para avaliação da atividade contra *Leishmania infantum* e determinação do perfil de esteróis de *Neobenedenia melleni***. 2020. 66 p. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

Plantas marinhas produzem metabólitos secundários relacionados à defesa contra predadores, em concentração capaz de resistir ao efeito diluente da água do mar, de forma a serem efetivos em baixas concentrações. Assim, produtos naturais marinhos tendem a ter alta atividade biológica em baixas concentrações. A perspectiva de compostos com atividades biológicas de interesse à saúde humana justifica o estudo de produtos naturais marinhos, sobretudo lançando mão de ferramentas como modelagem molecular e modificação estrutural, como forma de equacionar a relação atividade/toxicidade, o que motivou a realização deste estudo acerca da atividade de extratos de algas marinhas contra *Leishmania infantum*. O gênero *Leishmania* compreende protozoários digenéticos, que vivem alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, sendo estes, responsáveis pela transmissão do parasito de um hospedeiro para outro. *L. infantum* é uma das espécies responsáveis pela ocorrência da leishmaniose visceral, forma clínica da doença que acomete além de humanos, demais animais vertebrados, principalmente cães. Foram testadas concentrações de 0 a 175 µg/mL de extratos e frações de *Ulva fasciata*, *Ulva flexuosa*, *Dictyota menstrualis*, *Sargassum vulgare* e *Hypnea musciformis* contra promastigotas de *L. infantum*, onde após o período de incubação de 72h, a 26°C, foi adicionado o reagente resazurina, indicador de atividade metabólica mitocondrial. Com exceção das frações básicas de *D. menstrualis* e *H. musciformis*, os demais extratos e frações não apresentaram atividade nas concentrações testadas. As frações básicas de *D. menstrualis* e *H. musciformis* apresentaram IC₅₀ de 80,1 (71,6 – 89,5) e 63,2 (60,7 – 65,8) µg/mL, respectivamente, o que evidencia o potencial dos produtos naturais marinhos como fonte de compostos bioativos. O fracionamento bioguiado das frações básicas de *D. menstrualis* e *H. musciformis* originaram as frações HBH e F2', respectivamente apresentando valores de IC₅₀ = 30,4 (57,7 – 66,8) e 62,2 (57,7 – 66,8) µg/mL, demonstrando a importância das etapas de fracionamento, para a otimização da atividade biológica. Foram realizados ensaios de citotoxicidade em macrófagos peritoneais com as frações que apresentaram os menores valores de IC₅₀, onde HBH apresentou a melhor relação atividade/citotoxicidade, com CC₅₀ = 132,8 µg/mL. Na segunda parte do trabalho foi avaliado o perfil de esteróis e a toxicidade aguda (LC₅₀) de *Neobenedenia melleni*, um ectoparasita de peixes marinhos, de ocorrência acentuada em sistemas de cultivo, responsável por grandes perdas para indústria da maricultura. O parasito fixa-se principalmente nos olhos do hospedeiro, causando cegueira, natação errática e dificuldade na alimentação, o que pode levar à morte se não tratado. O principal tratamento se dá através de banhos de água doce, os quais causam choque osmótico e consequente desprendimento do parasito. Devido à logística e altos custos envolvidos nesta forma de tratamento, torna-se de grande interesse o desenvolvimento de tratamentos alternativos para o controle deste parasito. Diante dos poucos estudos acerca de sua fisiologia e metabolismo, fazem-se necessários estudos prévios acerca dos potenciais alvos farmacológicos a serem explorados. Neste contexto, foram identificados os principais esteróis presentes no extrato lipídico preparado a partir dos tecidos do parasito pelo método de Bligh & Dyer (1959), e

avaliados através de Cromatografia em Camada Fina e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas. Constatou-se que o parasito apresenta os precursores esqualeno e desmosterol, além de colesterol e ésteres de colesterol, o que indica que o este possui o complexo enzimático necessário à biossíntese de colesterol e ao armazenamento deste sob a forma de ésteres. Desta forma, as enzimas envolvidas na biossíntese de colesterol representam potenciais alvos farmacológicos para o controle de *N. melleni*.

Palavras chave: *Leishmania infantum*, *Neobenedenia melleni*, Algas Marinhas.

ABSTRACT

BARBOSA, Rodrigo César Fernandes. **Marine macroalgae prospecting to activity evaluate against *Leishmania infantum* and sterol profile determination of *Neobenedenia melleni***. 2020. 66 p. Dissertation (Master Science in Chemistry). Chemistry Institute, Department of Organic Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Marine plants produce secondary metabolites related to defense against predators, in a concentration capable of resisting the diluting effect of sea water, in order to be effective in low concentrations. Thus, natural marine products tend to have high biological activity at low concentrations. The perspective of compounds with biological activities of interest to human health justifies the study of natural marine products, especially by using tools such as molecular modeling and structural modification, as a way to equate the activity/toxicity relationship, which motivated the realization of this study about activity of seaweed extracts against *Leishmania infantum*. The *Leishmania* genus comprises digenetic protozoa, which alternately live in vertebrate hosts and insect vectors, which are responsible for transmitting the parasite from one host to another. *L. infantum* is one of the species responsible for the occurrence of visceral leishmaniasis, a clinical form of the disease that affects, in addition to humans, other vertebrate animals, mainly dogs. Concentrations of 0 to 175 $\mu\text{g} / \text{mL}$ of extracts and fractions of *Ulva fasciata*, *Ulva flexuosa*, *Dictyota menstrualis*, *Sargassum vulgare* and *Hypnea musciformis* were tested against *L. infantum* promastigotes, where after the 72h incubation period, at 26°C, was added the reagent resazurin, indicator of mitochondrial metabolic activity. With the exception of the basic fractions of *D. menstrualis* and *H. musciformis*, the other extracts and fractions showed no activity at the tested concentrations. The basic fractions of *D. menstrualis* and *H. musciformis* showed an IC_{50} of 80.1 (71.6 - 89.5) and 63.2 (60.7 - 65.8) $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, which shows the potential of natural marine products as a source of bioactive compounds. The bioguided fractionation of the basic fractions of *D. menstrualis* and *H. musciformis* gave rise to the fractions HBH and F2', respectively showing values of $\text{IC}_{50} = 30.4$ (57.7 - 66.8) and 62.2 (57.7 - 66,8) $\mu\text{g}/\text{mL}$, demonstrating the importance of the fractionation steps for the optimization of biological activity. Cytotoxicity tests were performed on peritoneal macrophages with the fractions that had the lowest IC_{50} values, where HBH presented the best activity/cytotoxicity ratio, with $\text{CC}_{50} = 132.8 \mu\text{g}/\text{mL}$. In the second part of the work, the sterol profile and acute toxicity (LC_{50}) of *Neobenedenia melleni*, an ectoparasite of marine fish, with a marked occurrence in farming systems, responsible for large losses for the mariculture industry, were evaluated. The parasite attaches mainly to the host's eyes, causing blindness, erratic swimming and difficulty in feeding, which can lead to death if left untreated. The main treatment is through fresh water baths, which cause osmotic shock and consequent detachment of the parasite. Due to the logistics and high costs involved in this form of treatment, it is of great interest to develop alternative treatments to control this parasite. In view of the few studies on its physiology and metabolism, previous studies on the potential pharmacological targets to be explored are necessary. In this context, the main sterols present in the lipid extract prepared from the parasite tissues were identified by the method of Bligh & Dyer (1959), and evaluated using Thin Layer Chromatography and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry. It was found that the parasite has the precursors squalene and desmosterol, in addition to cholesterol and cholesterol esters, which indicates that the parasite

has the enzyme complex necessary for cholesterol biosynthesis and storage in the form of esters. Thus, the enzymes involved in cholesterol biosynthesis represent potential pharmacological targets for the control of *N. melleni*.

Key words: *Leishmania infantum*, *Neobenedenia melleni*, Seaweed.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
CAPÍTULO I. PROSPECÇÃO DE MACROALGAS MARINHAS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CONTRA <i>Leishmania infantum</i>	15
1.1 INTRODUÇÃO	16
1.1.1 Produtos naturais marinhos	16
1.1.2 Doenças tropicais negligenciadas	19
1.2 METODOLOGIA.....	25
1.2.1 Coleta das macroalgas.....	25
1.2.2 Preparo dos Extratos e Frações.....	26
1.2.3 Manutenção e cultivo dos parasitos	26
1.2.4 Avaliação da atividade leishmanicida contra promastigotas de <i>L. infantum</i>	27
1.2.5 Avaliação da citotoxicidade (CC ₅₀) em macrófagos peritoneais murinos	27
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
1.3.1 Fracionamento e ensaios biológicos de <i>D. menstrualis</i>	29
1.3.2 Fracionamento e ensaios biológicos de <i>H. musciformis</i>	34
1.3.3 Identificação de eudesmano halogenado presente na fração básica de <i>H. musciformis</i> (BH)	36
1.4 CONCLUSÕES.....	44
1.5 PERSPECTIVAS.....	45
1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
CAPÍTULO II. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ESTERÓIS DE <i>Neobenedenia melleni</i> COMO ESTRATÉGIA PARA DESCOBERTA DE POTENCIAIS ALVOS FARMACOLÓGICOS.....	51
2.1 INTRODUÇÃO	52
2.2 METODOLOGIA.....	52
2.2.1 Coleta de parasitos	52
2.2.2 Extração de lipídeos neutros.....	53
2.2.3 Avaliação do perfil de esteróis de <i>N. melleni</i> por cromatografia em camada fina (CCF).....	53

2.2.4 Derivatização e avaliação do perfil de esteróis de <i>N. melleni</i> por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM).....	54
2.2.5 Avaliação da toxicidade aguda (LC₅₀) e dose máxima de DMSO indicada para experimentos com <i>N. melleni</i>	54
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
2.4 CONCLUSÕES.....	64
2.5 PERSPECTIVAS.....	65
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
CONCLUSÕES GERAIS	67

INTRODUÇÃO GERAL

Após bilhões de anos de evolução, estima-se que no planeta Terra haja em torno de 8,7 milhões de espécies, entre as quais, 1 milhão de animais, mais de 400 mil de plantas terrestres, cerca de 3 milhões de insetos, 1,5 milhão de algas e 1,5 milhão de fungos entre outros (MORA *et al.*, 2011). Diante de tamanha disponibilidade, a natureza tem sido fonte de agentes medicinais por milhares de anos, com registros na antiga China, a cerca de 2700 a.C. e no papiro de Ebers, que enumera cerca de 100 doenças, e descreve um grande número de drogas de origem animal e vegetal, por volta de 1500 a.C. (SOUZA *et al.*, 2007).

Apesar da importância dos produtos naturais (PN) para o tratamento de enfermidades adquiridas pelo homem, seu estudo e desenvolvimento apresentaram pouco progresso até a década de 1940, fato decorrente das limitações existentes até então, visto que a principal ferramenta utilizada à época para a elucidação dos metabólitos eram os métodos químicos de análise, baseados em reações de degradação, derivatização e identificação de grupos funcionais, o que demandava grandes quantidades de material, visto que por vezes as quantidades de substâncias isoladas são da ordem de miligramas.

Mesmo com reconhecida importância dos métodos químicos de análise para o desenvolvimento da área de química de produtos naturais (QPN), foi a partir do advento dos métodos físicos de análise, como a espectroscopia na região do visível e ultravioleta (UV-Vis), infravermelho (IR) (1940), ressonância magnética nuclear (RMN) (1960), espectrometria de massas (EM), além das diversas técnicas cromatográficas, que tornou-se possível a redução drástica das quantidades de material vegetal necessário às análises, assim como possibilitou a determinação em curto espaço de tempo, de estruturas moleculares complexas (PINTO *et al.*, 2009).

No Brasil, devido à grande biodiversidade que compreende além do extenso litoral, a maior floresta equatorial e tropical úmida do mundo, a QPN foi uma das primeiras áreas a desenvolver investigações no país, sendo até hoje a área que congrega o maior número de pesquisas produzidas no âmbito das áreas da química. Estima-se que 20% do patrimônio genético mundial esteja concentrado em território nacional, onde o índice de endemismo é alto. Desta forma, grande parte dos estudos desenvolvidos na área de QPN no país é voltada para o isolamento e identificação de substâncias inéditas, com interesse biológico ou não, visto a necessidade de se conhecer a real diversidade química, dos recursos naturais disponíveis (PINTO *et al.*, 2009).

Neste contexto, além de espécies terrestres já amplamente estudadas, a extensão dos mares e oceanos, que ocupam mais de 2/3 da superfície terrestre e abrigam grande parte da vida do planeta, incluindo representantes de 34 dentre os 36 filos animais descritos, proporciona biodiversidade de igual interesse científico, capaz de fornecer novos metabólitos passíveis de estudos de atividade biológica em diversos modelos de interesse para a saúde humana (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009).

Entre os anos de 1965 e 2013, cerca de 20.000 substâncias de origem marinha haviam sido isoladas. No entanto, estima-se que apenas 5% das substâncias isoladas de origem marinha foram caracterizados (COUCEIRO, 2013). Pode-se ainda citar que 45% dos produtos naturais de microrganismos marinhos foram isolados a partir do ano 2000, o que demonstra o recente e crescente interesse nos metabólitos fornecidos pelos oceanos (BLUNT *et al.*, 2007).

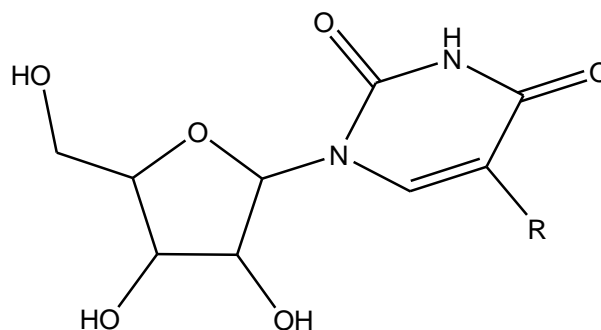
Possivelmente devido à dificuldade de acesso às grandes profundidades dos oceanos, os estudos e o desenvolvimento de produtos naturais marinhos passou a apresentar relevância apenas a partir da década de 1970, com o desenvolvimento de materiais e técnicas seguras de

mergulho, o que possibilitou a prospecção de algas e invertebrados marinhos, abrindo caminho para o isolamento e elucidação de novas substâncias (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009).

Outros aspectos que podem ser considerados como entraves ao desenvolvimento de produtos naturais marinhos é a disponibilidade de quantidades adequadas de material, que contemplem todas as fases de testes pré-clínicos e clínicos necessários ao desenvolvimento de novos fármacos, além da toxicidade associada ao uso, visto que a função ecológica das moléculas farmacologicamente ativas isoladas, via de regra, estão relacionadas à defesa contra predadores ou microrganismos.

Os primeiros compostos com atividade biológica isolados de fontes marinhas datam do ano de 1951, com a descoberta dos nucleosídeos espongouridina e espongotimidina (**Figura 1**), que apresentaram propriedades anticancerígenas e antivirais, e serviram de modelo para o desenvolvimento de antivirais como a Azidotimidina (AZT), utilizada no tratamento da AIDS.

Figura 1: Estrutura da Espongouridina (R = Me) e da Espongoutimidina (R = H).



Espongouridina R = Me

Espongoutimidina R = H

Atualmente, 23 fármacos desenvolvidos a partir de PN marinhos são comercializados, todos oriundos de invertebrados, dos quais 18 apresentam atividade antitumoral, e os demais apresentam atividade antiviral, analgésica, cicatrizante e ainda indicação para o tratamento de dislipidemias e doenças neurológicas (COUCEIRO, 2013).

Além do desenvolvimento de fármacos, derivados de PN marinhos são aplicados em outras áreas da ciência, como por exemplo, a aplicação da tecnologia do DNA recombinante em algas marinhas, a enzima DNA polimerase encontrada na bactéria termófila marinha *Pyrococcus furiosus* (Pfu), que é amplamente utilizada em reações de cadeia da polimerase (PCR), e a utilização proteína fluorescente verde (GFP) isolada da medusa *Aequoria victoria*, descoberta pela qual foi atribuído o Prêmio Nobel de Química em 2008 (COUCEIRO, 2013).

A vida marinha também sofre com a presença de parasitos. Segundo o Anuário 2019 da Associação Brasileira da Piscicultura (PEIXE BR), no ano de 2018 a produção nacional de peixes de cultivo foi de 722.560 toneladas, resultado 4,5% superior ao de 2017, demonstrando o crescimento da piscicultura no país. O controle da presença de parasitas nos sistemas de cultivo é de vital importância para garantir o aumento da produtividade, e conseqüentemente, da rentabilidade desta atividade. Na piscicultura de peixes marinhos, um dos maiores entraves enfrentados pelos produtores é a ocorrência do ectoparasita patógeno *Neobenedenia melleni*, espécie cosmopolita responsável por grandes infestações. O parasito se fixa principalmente nas mucosas e olhos, mimetizando com o hospedeiro e causando hemorragia, natação errática,

cegueira e conseqüente dificuldade de alimentação, podendo evoluir para morte, representando desta forma, grandes perdas para a produção. Seu tratamento convencional se dá através de banhos de água doce, que expõe o parasito a choque osmótico, causando-lhe rompimento celular seguido de morte.

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo realizar o fracionamento bioquímico e avaliar a atividade antiparasitária de extratos das algas verdes do gênero *Ulva*, de algas pardas do gênero *Dictyota* e *Sargassum* e da alga vermelha do gênero *Hypnea*, frente aos parasitos *Leishmania infantum*. Além da determinação do perfil de esteróis do ectoparasita de peixes marinhos *Neobenedenia melleni*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Hu, W. P.; Munro, M. H.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R.; *Nat. Prod. Rep.* 24, 31, 2007.

Costa-Lotufo, L.V., Wilke, D. V., Jimenez, P. C. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico& perspectivas. *Rev. Quim. Nova*, Vol. 32, No. 3, 703-716, 2009.

Couceiro, T. A. C. Estado da arte, em 2013, dos fármacos de origem marinha. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Almada, 2013.

Mora, C. Tittensor, D.P., Adl, S. Simpson, A.G.B., Worm, B. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLoS Biol.* 9(8), 2011.

Pinto, A. M. V.; Leite, J. P. G.; Ferreira, W. J.; Cavalcanti, D. N.; Villaça, R. C.; Giongo, V.; Teixeira, V. L.; Paixão, I. C. N. P. *Rev. Bras. Farmacogn.* 22, 813, 2012.

Souza, M. V. N.; Pinheiro, A. C.; Ferreira, M. L.; Gonçalves, R. S. B.; Lima, Camilo H. da C. Produtos Naturais em Fase Avançada de Testes Clínicos no Tratamento contra o Câncer. *Rev. Fitos.* 2007.

**CAPÍTULO I. PROSPECÇÃO DE MACROALGAS MARINHAS PARA
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CONTRA *Leishmania
infantum***

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Produtos naturais marinhos

Algas marinhas se proliferam através da retenção de nutrientes presentes na água, principalmente, pela fixação de amônia, nitrito, nitrato e fosfato. Assim, sua ocorrência se dá de forma mais acentuada em águas com altas concentrações de matéria orgânica, ou seja, podem atuar como bioindicadores de poluição. Em contrapartida, áreas degradadas pela poluição, e que apresentam proliferação acentuada de algas, apresentam redução dos níveis de oxigênio dissolvido decorrente da atividade fotossintética, o que impacta a fauna do ecossistema em questão. Desta forma, diferentemente do que ocorre com invertebrados e microrganismos marinhos, cuja retirada intensiva do ambiente pode ocasionar impactos ambientais como o desequilíbrio ecológico, a retirada de algas de áreas acometidas por altos níveis de proliferação, pode servir ao propósito de prospecção de metabólitos e utilização de biomassa, sem que isto impacte o meio ambiente.

Em casos de proliferação, a remoção de macroalgas ocorre rotineiramente por iniciativa de órgãos governamentais de proteção e gestão ambiental, em ambientes como praias, lagoas e baías, como medida para evitar principalmente a mortandade de peixes. No entanto, esta biomassa é descartada, o que poderia ser revertido através da colaboração entre instituições, o que favoreceria a pesquisa e desenvolvimento de produtos naturais marinhos, sem com isto, impactar o meio ambiente.

A disponibilidade de biomassa suficiente para os estudos químicos e de *screening* farmacológico, sem que a extração dos organismos em questão cause impacto ambiental, representa um grande entrave para a pesquisa de desenvolvimento de PN marinhos. No entanto, no que tange o estudo de macroalgas, o desenvolvimento de técnicas de cultivo em sistemas de recirculação representa possibilidade de aquisição da biomassa necessária aos estudos, quando este não implica redução na produção dos metabólitos secundários de interesse (CASTELAR *et al.*, 2015).

Algas marinhas são multicelulares e crescem fixas a um substrato, podendo este ser composto por rochas calcárias, terrenos arenosos, lodosos entre outros, e eventualmente, podem se desprender do substrato e apresentarem-se livres pela coluna d'água.

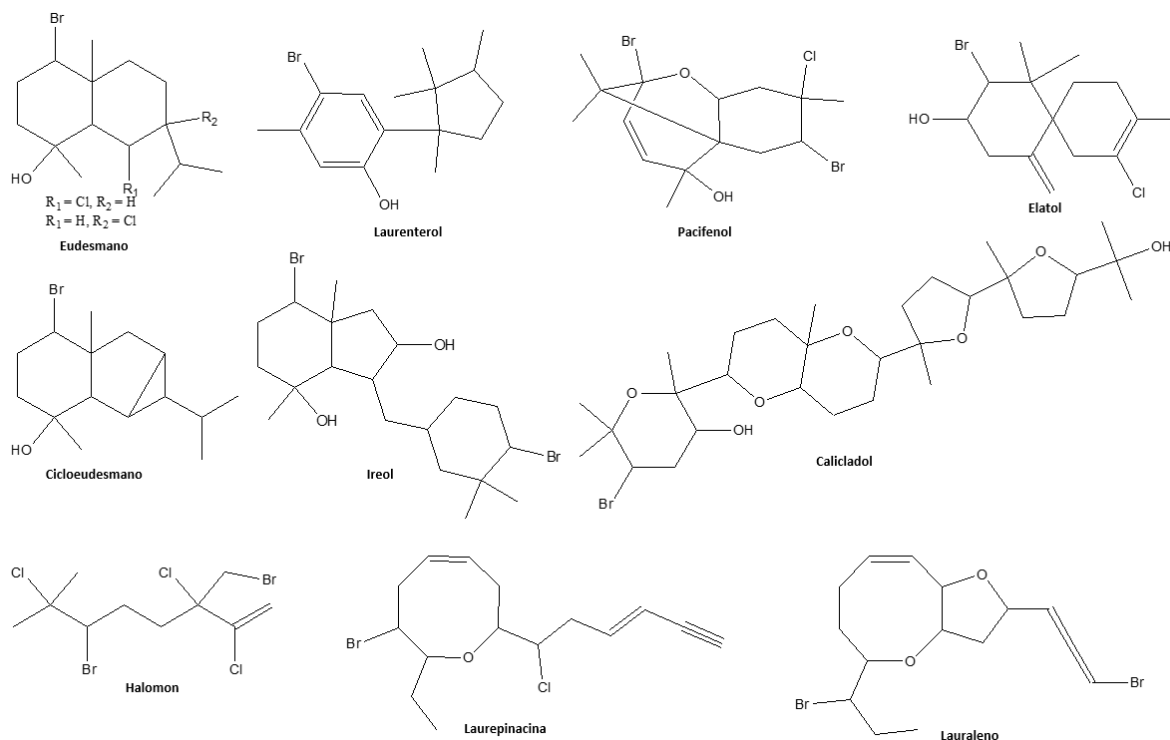
As macroalgas estão taxonomicamente organizadas em três divisões: Rhodophyta (algas vermelhas), Chlorophyta (algas verdes) e Ochrophyta (algas pardas) (GRAHAM & WILCOX, 2000). Podem ser distinguidas pela sua coloração, ou seja, pela abundância dos pigmentos produzidos. Algas verdes produzem majoritariamente as clorofilas *a* e *b*, o que confere para estas, a coloração verde. Algas pardas produzem as clorofilas *a* e *c*, porém, apresenta carotenoides como os pigmentos mais abundantes, o que confere para sua coloração variável entre diferentes tons de marrom. Algas vermelhas possuem clorofila *a*, mas como pigmentos predominantes produzem as ficoeritrinas, de coloração avermelhada, atribuindo-lhes sua coloração característica (SANTIAGO, 2018).

Produtos naturais de algas marinhas são majoritariamente estudados para a compreensão de seu papel ecológico, e como ferramenta no estabelecimento dos limites taxonômicos de espécies, gêneros e famílias (TEIXEIRA, 2013). No entanto, são pouco explorados em estudos fitoquímicos e farmacológicos, representando assim campo fértil para a descoberta de novos compostos com atividades biológicas de interesse para a saúde humana, e conseqüentemente, de interesse industrial.

Com cerca de 1.500 compostos isolados, as Rhodophytas são as mais estudadas quanto a metabólitos especiais, devido a sua maior abundância e diversidade, se comparada às demais

macroalgas. PN isolados de algas vermelhas apresentam a peculiaridade da presença frequente de halogênios em seus compostos, sendo estes majoritariamente terpenóides. Enquanto aproximadamente 90% dos relatos de compostos isolados de algas vermelhas apresentam bromo e/ou cloro, como os exemplos apresentados na **Figura 2**, algas verdes e pardas apresentam um percentual de aproximadamente 7 e 1%, respectivamente. As espécies dos gêneros *Plocamium* e *Laurência* estão entre as mais estudadas entre as algas vermelhas, caracterizando-se pela produção predominante de mono e sesquiterpenos halogenados.

Figura 2: Compostos halogenados isolados de algas vermelhas.



Fonte: Blunt *et al.* (2007)

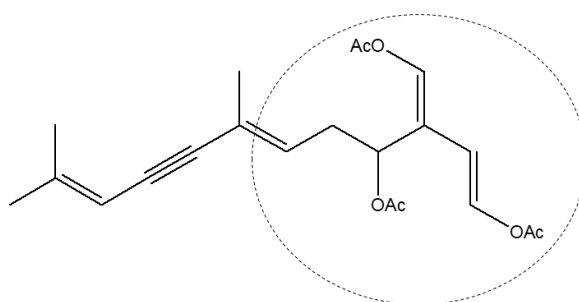
A dificuldade de equacionar de forma razoável a relação entre bioatividade/toxicidade, que corroborou com o desinteresse pelo desenvolvimento de produtos naturais marinhos, hoje é contornado pelo avanço das técnicas de síntese e modelagem molecular, que garantem a independência da indústria frente à escassez dos recursos biológicos, direcionando a utilização de moléculas de origem natural como protótipos no desenvolvimento fármacos sintéticos, onde através de modificações estruturais e avaliação da relação entre estrutura, atividade e toxicidade, possibilitam o desenvolvimento destes fármacos, como alternativa viável ao uso das substâncias de origem natural como princípio terapêutico (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009).

Dentre as algas vermelhas, os metabólitos isolados de espécies do gênero *Laurencia* são os mais estudados, tendo apresentando atividades biológicas como tripanocida (VEIGA-SANTOS *et al.*, 2010), leishmanicida (SANTOS *et al.*, 2010), antiviral contra o vírus HSV-1, antifúngica (STEIN *et al.*, 2011) e anti-helmíntica (DAVYT *et al.*, 2001).

Segundo Hutson (2012), extratos de *Asparagopsis taxiformis* inibiram em 96% o desenvolvimento embrionário de *Neobenedenia melleni*, ectoparasita de importância comercial que acomete cultivos de peixes marinhos elevando os custos de produção em todo o mundo.

Chlorophytas são as que possuem a menor complexidade de metabólitos especiais, apresentando apenas cerca de 300 compostos conhecidos, produzem majoritariamente diterpenos e sesquiterpenos funcionalizados, semelhantes aos produzidos pelas algas vermelhas, no entanto com menor ocorrência de halogenação. A principal característica das algas verdes é a presença do éster dienolato 1,4-diacetoxibutadieno (**Figura 3**), encontrado em muitos terpenos de algas verdes.

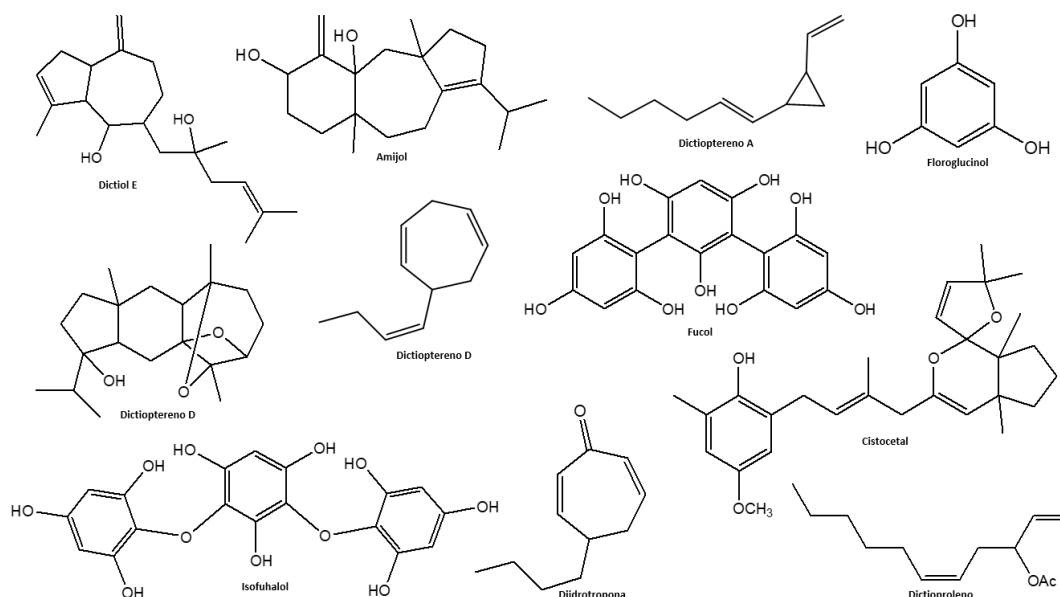
Figura 3: Estrutura do caulerpeno, terpeno presente em algas verdes, com o grupo 1,4-diacetoxibutadieno em destaque.



Das atividades biológicas de extratos de algas verdes relatadas, destacam-se a inibição da enzima α -amilase pelo extrato obtido em acetona (TEIXEIRA *et al.*, 2008) de *Caulerpa racemosa* e atividade antiviral de extratos hidroalcoólicos de *Ulva fasciata* sobre a replicação do vírus metapneumovírus humano (HPMV) (MENDES *et al.*, 2010).

Aproximadamente 1.100 compostos oriundos de Ochrophytas são relatados, dentre os quais a maior representação é de acetogeninas, diterpenos e dos florotaninos, chegando estes, em algumas espécies, a representar entre 10 e 20% da massa seca da alga (**Figura 4**) (RAGAN e GLOMBITZKA 1986; AMSLER e FAIRHEAD 2006).

Figura 4: Compostos isolados de algas pardas.



Algas pardas representam o grupo de algas marinhas mais estudado no Brasil, tanto no que tange a descoberta de novas moléculas com atividade biológica, quanto nos estudos acerca de ecologia, taxonomia, filogenia e biogeografia, baseados em dados químicos de seus metabólitos, devido à maior complexidade destes, embora a distribuição de algas vermelhas pelos 8.698 Km da costa brasileira seja mais abundante (TEIXEIRA, 2013). Aproximadamente um terço dos compostos conhecidos oriundos de algas pardas são diterpenos isolados de espécies do gênero *Dictyota*, e dentre as atividades biológicas relatadas, destacam-se a atividade antiviral contra os vírus da síndrome imunodeficiência adquirida (SIDA) (PINTO *et al.*, 2012) e da herpes simplex humano tipo 1 (HSV-1) (ABRANTES *et al.*, 2010), além da atividade contra o veneno da cobra *Lachesis muta*, neutralizando suas atividades hemolítica, proteolítica, hemorrágica e obstrutiva (DOMINGOS *et al.*, 2011), inibição da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ (GARCIA *et al.*, 2009) e atividade contra promastigotas de *Leishmania amazonensis* por extratos de *Dictyota cervicornis* (SANTOS *et al.*, 2011).

1.1.2 Doenças tropicais negligenciadas

Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN's), segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), são doenças infecciosas que podem ser causadas por helmintos, protozoários, bactérias, fungos, ectoparasitas ou vírus (LINDOSO e LINDOSO, 2009), que disseminam-se em locais de precária estrutura sanitária, de moradia, alimentação, e acesso limitado ao sistema de saúde (VASCONCELOS *et al.*, 2016), sendo estas, endêmicas de regiões subdesenvolvidas, de clima tropical ou subtropical, impactando majoritariamente populações de baixa renda. Devido ao fato de os acometidos por este tipo de doença não representarem potenciais compradores de medicamentos, os investimentos por parte das indústrias farmacêuticas para combatê-las são escassos, o que deu origem ao termo “doença negligenciada” (SOUZA, 2010).

Leishmanioses, malária, doença de Chagas, doença do sono (tripanossomíase humana africana, THA), filariose linfática, dengue e esquistossomose continuam sendo algumas das

principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, e fazem parte das doenças consideradas DTN's. Embora as DTN's e a tuberculose sejam responsáveis por 11,4% da carga global de doença, apenas 21 (1,3%) dos 1.556 novos medicamentos registrados entre 1975 e 2004, foram desenvolvidos especificamente para essas doenças (VALVERDE, 2018).

Um estudo recente sobre o financiamento mundial de inovação para doenças negligenciadas (G-Finder2, na sigla em inglês) revelou que menos de 5% deste financiamento foi investido no grupo das doenças extremamente negligenciadas, sendo estas, doença do sono, leishmaniose visceral e doença de Chagas, ainda que mais de 500 milhões de pessoas sejam ameaçadas por estas três doenças parasitárias (VALVERDE, 2018).

Estas doenças, consideradas extremamente negligenciadas, são causadas por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, da família Trypanosomatidae. No Brasil, entre as DTN'S, leishmanioses e doença de Chagas são as mais recorrentes, causando incapacidade e morte de milhares de indivíduos todos os anos (WHO, 2018a).

As leishmanioses são antroponoses de grande importância médica e veterinária. Essas patologias acometem o homem e algumas espécies de mamíferos sinantrópicos, silvestres e domésticos, os quais, alguns são considerados hospedeiros reservatórios (SANTIAGO, 2018 *apud* REY, 2001). Os agentes etiológicos são protozoários do gênero *Leishmania* que, de acordo com sua espécie e estado imunológico do hospedeiro, podem produzir diferentes manifestações clínicas, como as formas cutânea, mucocutânea ou visceral da doença (SANTIAGO, 2018 *apud* WHO, 2018b). As formas cutânea e mucocutânea pertencem à classe da leishmaniose tegumentar americana (LTA) que é de baixa gravidade quando comparada à leishmaniose visceral (LV) e sua cura é geralmente espontânea, ou após tratamento específico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A LV, também conhecida como calazar, é causada por espécies pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*. São reconhecidas atualmente como agentes etiológicos da doença a *L. donovani* e a *L. infantum* (syn. *L. chagasi*), sendo a *L. donovani* responsável pela infecção no Velho Mundo, enquanto *L. infantum* causa a LV no Novo Mundo (SOUZA et al., 2012).

O gênero *Leishmania* compreende protozoários digenéticos (heterogênicos), que vivem alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, sendo estes os responsáveis pela transmissão do parasito de um hospedeiro para outro (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

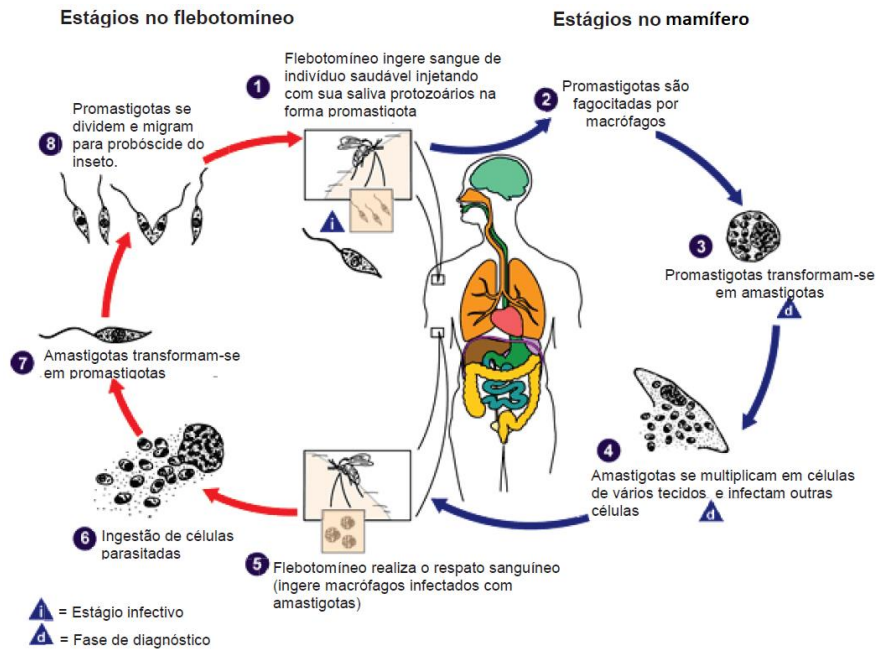
Diversas espécies de flebotômíneos hematófagos, dípteros da família Psychodidae, subfamília Phebotominae, são responsáveis pela transmissão das leishmanioses, dentre as quais, podemos citar as espécies *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. A espécie *L. longipalpis*, presente nos países da América Latina (exceto Chile), é considerado o principal vetor da *L. infantum* nestes locais (GONTIJO; MELO, 2004).

No ciclo biológico do parasito, destacam-se duas formas evolutivas: promastigotas e amastigotas. As formas promastigotas são encontradas inicialmente aderidas ao intestino médio do inseto vetor e, ao sofrer metaciclogênese, se diferenciam da forma procíclica para a metacíclica (MUSKUS; MARÍN-VILLA, 2002). As amastigotas têm o corpo ovoide e flagelo interno, são as formas intracelulares encontradas no sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (BURCHMORE; BARRET, 2001).

Flebotômíneos fêmeas são responsáveis pela transmissão, uma vez que apenas estas possuem aparelho bucal capaz de realizar o repasto sanguíneo. O ciclo biológico se inicia quando o flebotômíneo infectado inocula promastigotas metacíclicas, forma infecciosa do parasito, as quais são fagocitadas pelas células do sistema retículo endotelial, como macrófagos e neutrófilos. Dentro das células ocorre a formação do vacúolo parasitóforo, e promastigotas diferenciam-se em formas amastigotas, que através fissão binária se multiplicam, causam o

rompimento da célula e a infecção de outras células. Ao realizar o repasto sanguíneo novamente, os flebotomíneos ingerem macrófagos infectados com amastigotas, as quais no intestino do vetor se transformam em promastigotas, que se dividem também por fissão binária, migrando posteriormente para o probóscide do flebotomíneo, onde permanecem até o próximo repasto sanguíneo, sendo novamente inoculadas, dando sequência ao ciclo de vida do parasito (KAYE; SCOTT, 2011), conforme ilustrado na **Figura 5**.

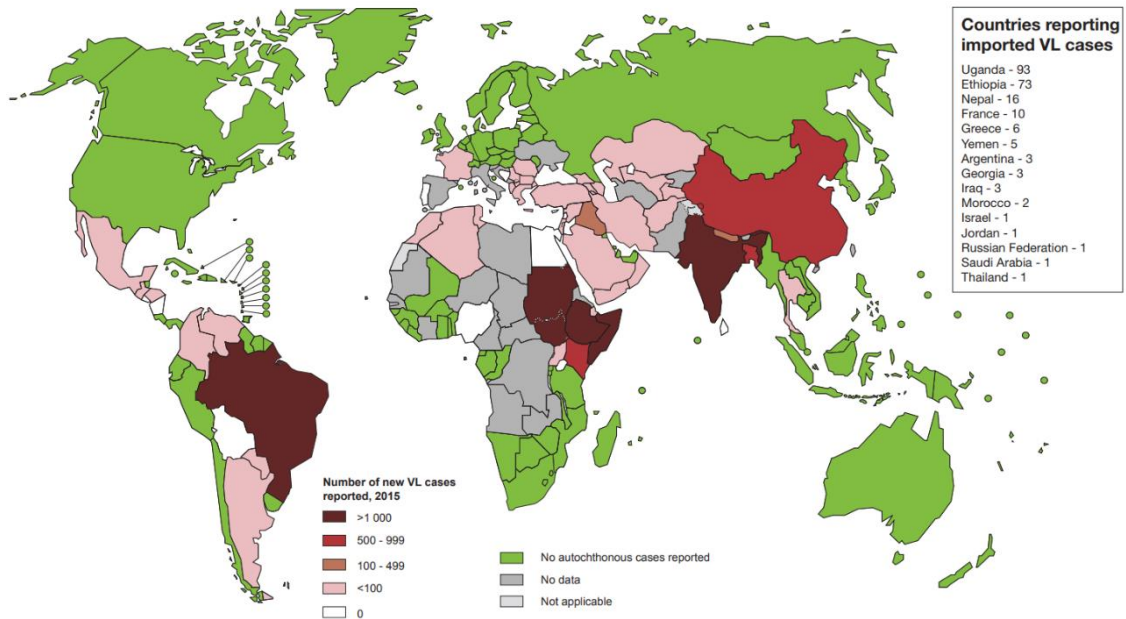
Figura 5: Ciclo biológico da *Leishmania* no interior do inseto vetor e do hospedeiro mamífero.



Fonte: Adaptado de CDC, 2018.

A LV é amplamente distribuída pelo mundo (**Figura 6**), ocorrendo em todos os continentes, com exceção da Oceania. A LV atinge aproximadamente 68 países (WHO, 2018a), com incidência anual de aproximadamente 500.000 novos casos e 59.000 óbitos (MALEKI *et al*, 2016), dos quais no ano de 2018, 95% ocorreram em dez países: Brasil, China, Etiópia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão. A letalidade da doença pode chegar a 95%, caso não seja adotado o tratamento adequado (WHO, 2018a).

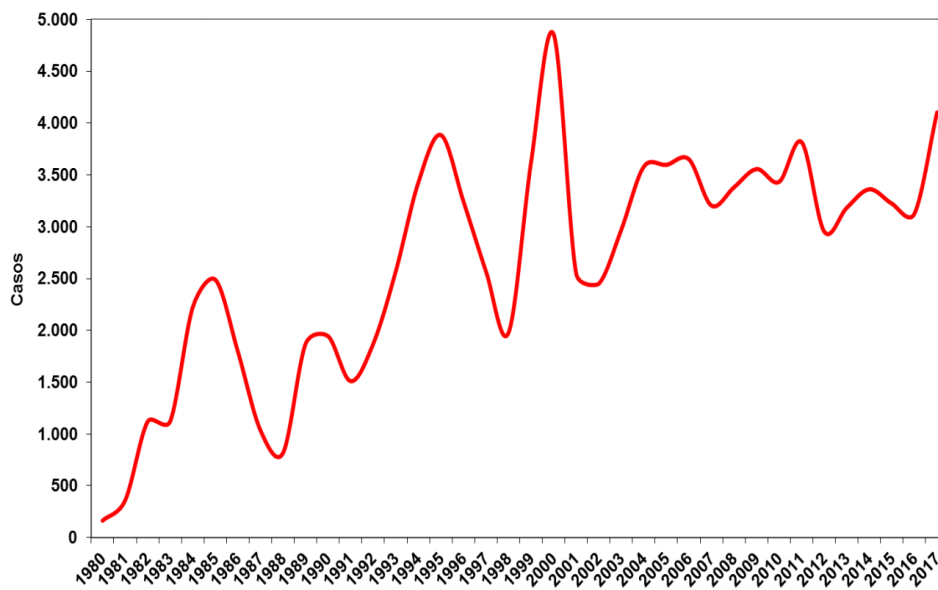
Figura 6: Distribuição dos casos de leishmaniose visceral no mundo, no ano de 2016.



Fonte: WHO, 2018b.

No Brasil, segundo o Guia de Vigilância em saúde, do Ministério da Saúde (SVS/MS, 2017), no ano de 2017 os casos de LV somaram 4.103 ocorrências, o que representa um coeficiente de incidência de 1,98 casos/100.000 habitantes, com ocorrências em 23 Estados das 5 regiões, e um índice de letalidade de 8,8%. A **Figura 7** demonstra a evolução dos casos de LV no período compreendido entre 1980-2017.

Figura 7: Distribuição dos casos de leishmaniose visceral no Brasil, no período entre 1980-2017.



Fonte: Ministério da Saúde, 2014.

Os fármacos utilizados no combate às leishmanioses podem ser divididos em duas categorias: fármacos de primeira e de segunda escolha. Os considerados de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes (**Tabela 1**), como o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio, desenvolvidos na década de 1940 e utilizados desde então. Os grandes inconvenientes da utilização destes fármacos são os sintomas causados pela elevada hepatotoxicidade e cardiotoxicidade, como náuseas, dores abdominais, diarreia, batimentos cardíacos irregulares e etc. Outros fatores limitantes à sua utilização são a resistência aos fármacos antimoniais, além da elevada taxa de mortalidade associada ao uso, especialmente em pacientes coinfectados com HIV e tuberculose (COELHO-JÚNIOR *et al.*, 2016).

Tabela 1: Estrutura química de antimoniais pentavalentes e seus respectivos nomes químicos e comerciais.

FÓRMULA ESTRUTURAL PROPOSTA	*NOME QUÍMICO NOME COMERCIAL
$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{NHCH}_3^+ \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HOCH} \\ \\ \text{HCOH} \cdot (\text{OH})_2\text{Sb}_2\text{O}^- \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} $	<p>*Antimoniato de N-metilglucamina</p> <p>Glucantime® Antimoniato de meglumina</p>
$ \left[\begin{array}{ccc} \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{HCO} \\ \\ \text{HCO} \\ \\ \text{HCO} \\ \\ \text{COO}^- \end{array} & \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{Sb} - \text{O} - \text{Sb} \\ \\ \text{O}^- \end{array} & \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CHOH} \\ \\ \text{OCH} \\ \\ \text{OCH} \\ \\ \text{OCH} \\ \\ \text{COO}^- \end{array} \\ \end{array} \right] \cdot \text{Na}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O} $	<p>*Gluconato de antimônio (V) sódico ou estibogluconato de sódio</p> <p>Pentostam® Solustibosan®</p>

Fonte: RATH *et al.*, 2003.

O principal fármaco considerado de segunda escolha é o antibiótico anfotericina B (**Figura 8**). Embora altamente eficaz mesmo em pacientes resistentes aos medicamentos antimoniais, tem restrições devido à sua toxicidade renal e à administração intravenosa lenta, o que é muito inconveniente ao paciente (BHANDARI *et al.*, 2012). Como alternativa à toxicidade da anfotericina B convencional, desenvolveu-se uma formulação do fármaco em pó e liofilizado, associado a uma membrana lipídica, denominada anfotericina B lipossomal, que apresenta menor toxicidade. Entretanto, seu uso permanece limitado devido ao elevado custo (DORLO *et al.*, 2012).

Apesar de todos os esforços no combate à doença e no desenvolvimento de novas formulações, em muitos países endêmicos, incluindo o Brasil, a quimioterapia ainda é baseada em antimoniais pentavalentes, pentamidina e anfotericina B convencional (TORRES *et al.*, 2014).

Tendo em vista os efeitos adversos associados ao uso dos medicamentos de primeira e segunda escolha, a complexidade das vias de administração destes, assim como os altos custos de medicamentos de menor toxicidade como a anfotericina B lipossomal, ou de fácil administração como a miltefosina, a busca por novos compostos com potencial atividade leishmanicida e baixa toxicidade vem ao encontro da necessidade de desenvolver tratamentos eficazes e acessíveis à população.

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo realizar o fracionamento bioguiado de extratos e frações das algas verdes *Ulva fasciata* e *Ulva flexuosa*, das algas pardas *Dictyota menstrualis* e *Sargassum vulgare*, e da alga vermelha *Hypnea musciformis*, em promastigotas de *L. infantum*, espécie causadora da LV.

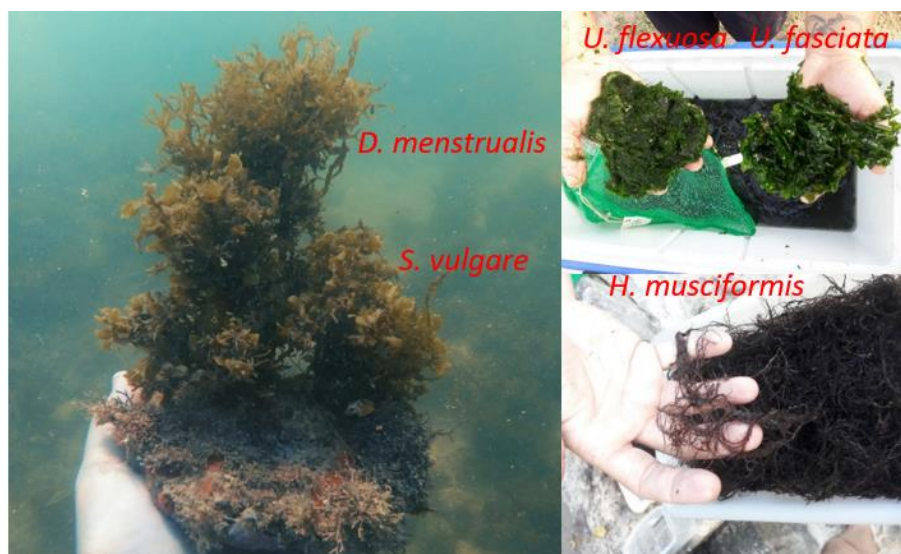
A seleção das espécies de algas foi feita após avaliação dos relatos de atividades biológicas de diversas algas marinhas, assim como a geodistribuição destas pelo litoral do Estado do Rio de Janeiro.

1.2 METODOLOGIA

1.2.1 Coleta das macroalgas

As macroalgas foram coletadas através de mergulho livre, nas regiões infralitoral e entremarés (**Figura 11**). *U. fasciata* e *U. flexuosa* foram coletadas na praia do Posto Quebramar, Barra da Tijuca, no município do Rio de Janeiro – RJ; *S. vulgare* e *D. menstrualis* foram coletadas nas praias Azeda e Azedinha, no município de Armação dos Búzios – RJ; *H. musciformis* foi coletada na Praia Grande, Ilha de Itacuruçá, no município de Mangaratiba – RJ.

Figura 11: Coleta de *D. menstrualis*, *S. vulgare*, *U. fasciata*, *U. flexuosa* e *H. musciformis*.



O material coletado foi triado para a retirada de sedimentos e organismos associados. Parte do material foi acondicionado em solução de formol a 4% em água do mar, para posterior identificação taxonômica. O restante do material foi pesado para cálculo de rendimento dos extratos.

1.2.2 Preparo dos Extratos e Frações

Os extratos foram preparados no Laboratório de Pesquisa em Fitoquímica do Departamento de Química, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ. Realizou-se a secura de 50 gramas de cada alga a 55°C em estufa de circulação de ar da marca Tecnal por 48 horas, sendo estas posteriormente trituradas em moinho de facas. Ambas as algas apresentaram aproximadamente 20% de matéria seca.

Realizou-se a extração por decocção utilizando 100 mL de uma solução etanol em água (8:2), durante duas horas, a 80°C, para isto sendo utilizadas 10 gramas de cada alga seca. Após a extração, os extratos obtidos foram concentrados através de destilação à pressão reduzida, em rotaevaporador Bucchi, equipado com banho ultratermostático Masterfrio e bomba de vácuo Trivac.

É importante ressaltar que o teor de minerais em algas marinhas é consideravelmente alto, composto em sua maior parte por sais de sódio, potássio e cálcio, normalmente variando em torno de 30%, e em determinadas espécies, podendo chegar a 70% em relação ao peso seco da planta (PATARRA, 2008). Na literatura não são relatadas metodologias que tenham levado em consideração o alto teor de minerais, nem que tenham removido estes dos extratos antes da realização dos experimentos de atividades biológicas, de forma a garantir a presença apenas de compostos orgânicos, buscando a otimização das atividades avaliadas.

Desta forma, após destilação até secura, os extratos brutos foram ressuspensos em etanol absoluto, e submetidos à filtração à vácuo para a remoção dos minerais presentes. Após filtração, os extratos foram novamente concentrados por destilação à pressão reduzida, e os rendimentos calculados. As massas dos extratos brutos obtidos foram de 2,3 g de *U. fasciata*, 2,1 g de *U. flexuosa*, 1,8 g de *S. vulgare*, 2,4 g de *D. menstrualis* e 2,2 g *H. musciformis*.

Metade dos extratos brutos obtidos foi tratada conforme preconizado por Matos (1997), para a obtenção de compostos básicos, como alcaloides, através de extração ácido base. De acordo com esta metodologia, o extrato hidroalcoólico obtido foi colocado em meio de HCl 1% e filtrado para a exclusão de compostos insolúveis na fase aquosa. Posteriormente, ajustou-se o pH para 10 com NH₄OH concentrado, seguido de partição líquido-líquido com clorofórmio. Posteriormente a fase orgânica foi separada em funil de separação, filtrada em Na₂SO₄ anidro e concentrada em rotaevaporador, originando a fração de compostos básicos, identificada como fração básica.

Extratos brutos e frações básicas foram testados frente às formas promastigotas de *L. infantum*. As frações que apresentaram atividade leishmanicida foram submetidas à partição líquido-líquido tendo como fase aquosa metanol/água (9:1) e como fase orgânica hexano, seguida de cromatografia em coluna clássica com gel de sílica 60 (70-230 mesh) da Silicycle, conforme fluxogramas apresentados nas Figuras 15 (Página 21) e 22 (Página 27).

1.2.3 Manutenção e cultivo dos parasitos

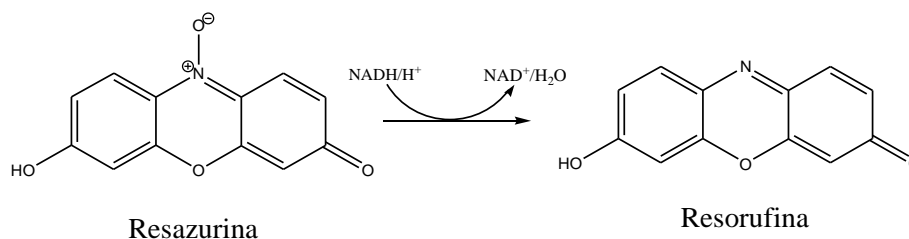
As formas promastigotas de *L. infantum* (cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263) foram mantidas a 26°C, em meio de cultura Schneider® (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), 100 µg/mL de estreptomicina, e 100 U/mL

de penicilina. Para manutenção dos parasitos foram feitos repiques duas vezes por semana até a quinta passagem. Os parasitos foram obtidos de infecção intraperitoneal de camundongos BALB/c.

1.2.4 Avaliação da atividade leishmanicida contra promastigotas de *L. infantum*

A avaliação da atividade leishmanicida foi realizada no Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Os experimentos foram realizados em placa de 96 poços, com inóculo inicial de $2,0 \times 10^6$ promastigotas/mL e com extratos brutos e frações básicas de *U. fasciata*, *U. flexuosa*, *S. vulgare*, *D. menstrualis* e *H. musciformis*, com concentrações variando entre 0 e 128 $\mu\text{g/mL}$. Os parasitos foram incubados a 26°C por 72 horas. Após esse período o crescimento parasitário foi avaliado pela adição do reagente fluorimétrico resazurina (AlamarBlue®), um corante de coloração azul e não fluorescente, que em presença de NADPH redutase, ou NADH redutase, na mitocôndria, é reduzido a resorufina (**Figura 12**), produto rosa e altamente fluorescente. Desta forma, a resazurina é um indicador de oxirredução utilizado para estudos de atividade metabólica mitocondrial (WINARTASAPUTRA *et al.*, 1980). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 12: Representação da reação de redução da resazurina à resorufina.



1.2.5 Avaliação da citotoxicidade (CC_{50}) em macrófagos peritoneais murinos

Para avaliar a atividade dos compostos na célula hospedeira foram realizados testes de toxicidade em macrófagos peritoneais murinos não infectados na ausência ou presença das frações BD, MBD, F2', MBH, HBH e HYP-1, nas concentrações 3,75 - 960 $\mu\text{g/mL}$ e de anfotericina B (0,289 - 18,5 $\mu\text{g/mL}$) por um período de incubação de 24 e 72 horas a $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Após o tempo de incubação, a viabilidade celular foi avaliada por fluorimetria, adicionando 50 μM de resazurina por poço. A leitura foi realizada em equipamento Spectra Max GEMINI XPS (Molecular Devices, Silicon Valley, EUA), com excitação a 560 nm e emissão a 590 nm.

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com exceção das frações básicas de *D. menstrualis* e *H. musciformis*, que apresentaram atividade leishmanicida, os demais extratos e frações testados não apresentaram atividade frente ao *L. infantum*, nas concentrações testadas (0 - 128 $\mu\text{g/mL}$) (**Tabela 2**).

Tabela 2: Valores de IC₅₀ dos extratos e frações testados em promastigotas de *L. infantum* em ensaios de 72 horas.

Extrato	IC ₅₀ (µg/mL)
Extrato Bruto - <i>U. fasciata</i>	> 128
Fração Básica - <i>U. fasciata</i>	> 128
Extrato Bruto - <i>U. flexuosa</i>	> 128
Fração Básica - <i>U. flexuosa</i>	> 128
Extrato Bruto - <i>D. menstrualis</i>	> 128
Fração Básica - <i>D. menstrualis</i>	80,1 (71,6 – 89,5)*
Extrato Bruto - <i>S. vulgare</i>	> 128
Fração Básica - <i>S. vulgare</i>	> 128
Extrato Bruto - <i>H. musciformis</i>	> 128
Fração Básica - <i>H. musciformis</i>	63,2 (60,7 – 65,8)*

*Intervalo de 95% de confiança para os valores de IC₅₀.

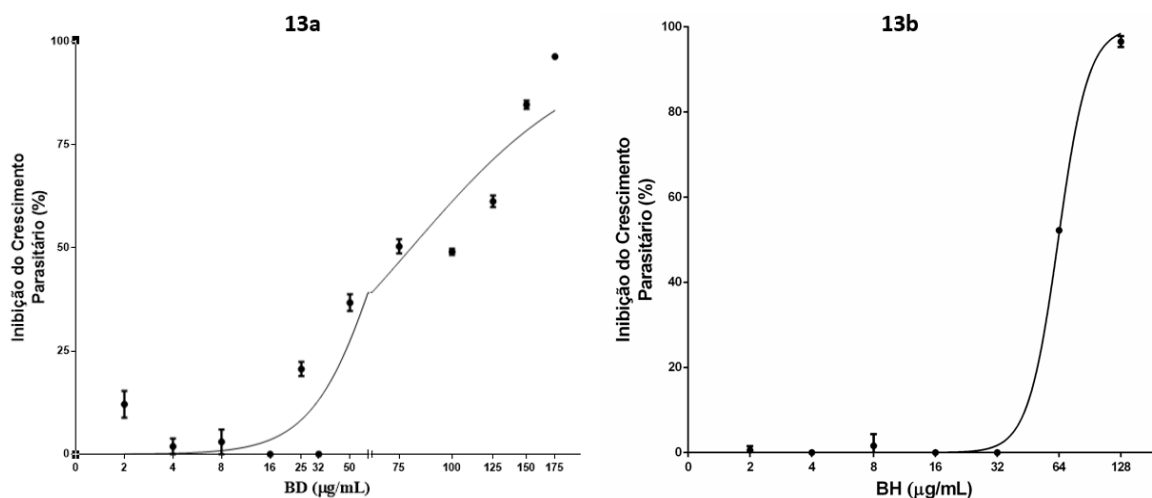
Estes resultados corroboram com dados da literatura que descrevem atividades antiparasitárias de extratos de algas do gênero *Dictyota*, como inibição do crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* por extratos de *Dictyota cervicornis* (SANTOS *et al.*, 2011), *Dictyota ciliota* e *Dictyota menstrualis* (LIRA *et al.*, 2016), e de *Dictyota mertensii* (ALIANÇA *et al.*, 2014), de formas amastigotas de *L. amazonensis* por extratos de *Dictyota pfaffi* (SOARES *et al.*, 2012), de formas amastigotas de *Leishmania donovani* por extratos de *Dictyota dichotoma* (ORHAN *et al.*, 2006, SPAVIERI *et al.*, 2010 e VONTHRON-SENECHEAU *et al.*, 2011), de formas promastigotas de *Leishmania brasiliensis* por extratos de *Dictyota sp.* (BIANCO *et al.*, 2013), de formas amastigotas de *Leishmania mexicana* (FREILE-PELEGRIN *et al.*, 2008) e tripomastigotas de *Tripanossoma cruzi* por extratos de *Dictyota caribaea* (LEÓN-DENIZ *et al.*, 2009), o que demonstra o potencial das algas do gênero *Dictyota*, como possível fonte de compostos bioativos contra protozoários do gênero *Leishmania*.

Corroboram, ainda, com os relatos da atividade de extratos de algas do gênero *Hypnea*, como a inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. infantum* por extratos de *Hypnea cornuta* (MINICANTE *et al.*, 2016), de formas tripomastigotas de *T. cruzi* por extratos de *Hypnea spinella* (SANTIAGO, 2018), entre outros.

No entanto, não são descritos fracionamento de extratos, isolamento e elucidação estrutural de compostos com atividade leishmanicida provenientes de algas marinhas, etapa necessária à descoberta de compostos que possam servir de modelo ao desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da LV.

Na **Figura 13** são apresentadas as curvas de inibição de crescimento parasitário de promastigotas de *L. infantum* frente às frações básicas de *D. menstrualis* (BD) e *H. musciformis* (BH), respectivamente, a partir das quais foi possível determinar os valores de IC₅₀ (µg/mL).

Figura 13: Curva de inibição do crescimento de promastigotas *L. infantum* frente à fração básica de *D. menstrualis* (13a) e *H. musciformis* (13b).

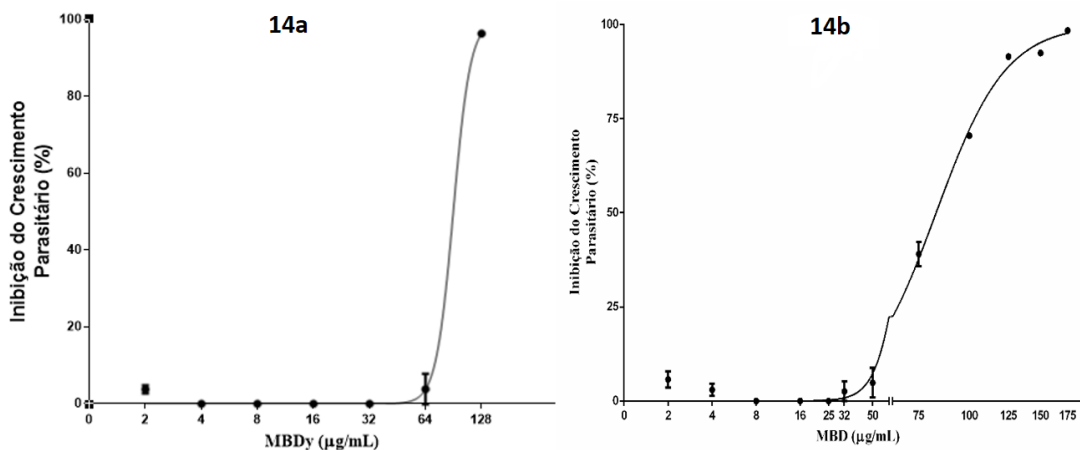


Diante destes resultados, realizou-se o fracionamento bioquímico dos extratos que apresentaram atividade leishmanicida.

1.3.1 Fracionamento e ensaios biológicos de *D. menstrualis*

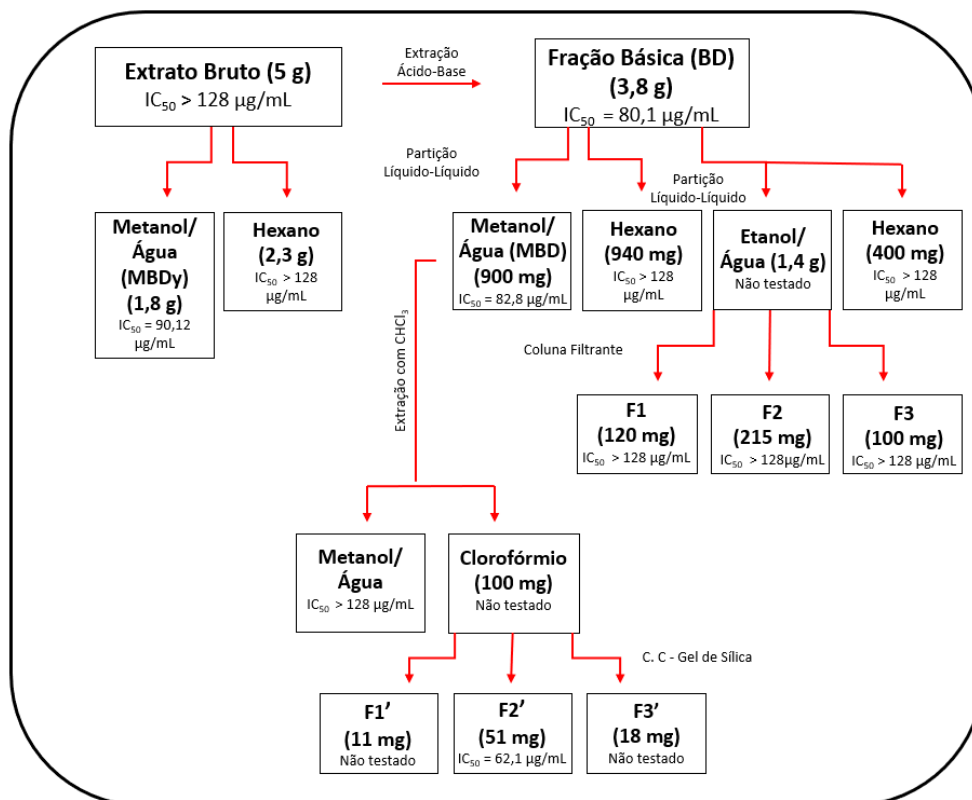
A espécie *D. menstrualis* demonstrou atividade majoritariamente nas frações polares. Após partição líquido-líquido do extrato bruto com metanol/água (9:1) e hexano, e da fração básica (BD) com metanol/água (9:1), etanol/água (9:1) e hexano, verificou-se que apenas as frações metanólicas do extrato bruto (MBDy) e da fração básica (MBD) se mostraram bioativas, apresentando valores de IC₅₀ iguais a 90,1 (85,6 – 94,9) e 82,8 (78,1 – 87,7) µg/mL, respectivamente (**Figura 14**). Por ter demonstrado menor valor de IC₅₀, optou-se pelo fracionamento de MBD.

Figura 14: Curva de inibição do crescimento de promastigotas *L. infantum* frente à fração MBDy (14a) e MBD (14b).



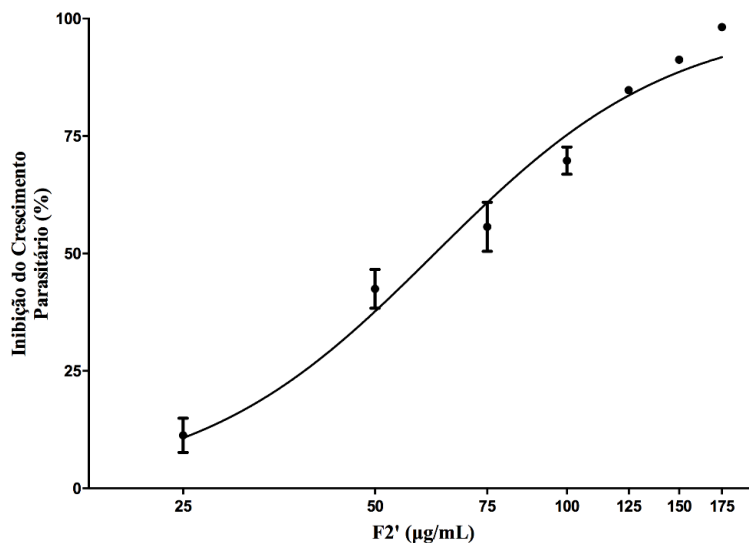
Desta forma, MBD foi ressuspendida em metanol/água (9:1) e extraída com clorofórmio, conforme fluxograma apresentado na **Figura 15**. A fração clorofórmica obtida foi submetida ao fracionamento por cromatografia em coluna clássica a pressão atmosférica (CLC) com gel de sílica e gradiente de solventes com hexano/acetato de etila, originando 14 subfrações onde após avaliação do perfil cromatográfico por cromatografia em camada fina (CCF), foram reunidas as com perfis semelhantes, obtendo-se desta forma as frações F1', F2' e F3'.

Figura 15: Fluxograma de fracionamento de *D. menstrualis*.



Ainda de acordo com os perfis cromatográficos por CCF, optou-se pela realização do teste de atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *L. infantum* apenas para a fração F2', devido à menor complexidade em relação à mistura de substâncias, tendo esta apresentado IC₅₀ = 62,1 (57,7 – 66,8) µg/mL (**Figura 16**).

Figura 16: Curva de inibição do crescimento de promastigotas *L. infantum* frente à fração F2'.



Após análise dos cromatogramas e espectros obtidos pela técnica de cromatografia gasosa (**Figura 17**) acoplada à espectrometria de massas, realizada na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em equipamento GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Scientific Instruments, Tóquio, Japão), com coluna VF-5m (5% fenil-metilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,25 mm), pôde-se obter a indicação de presença dos sesquiterpenos, derivado de colesterol e derivado de estigmasterol halogenado com base nas propostas sugeridas pela biblioteca NIST 11 através de comparação da similaridade dos padrões de fragmentação apresentados nas Figuras **18**, **19** e **20**.

Figura 17: cromatograma obtido da técnica CG-EM da fração F2'.

CENTRAL ANALÍTICA MULTIUSUÁRIO_IQ_UFRRJ
CGMS
Analyzed by : Cristiane Cardoso
Analyzed : 9/12/2019 10:32:49
Solicitante: : Márcia
Sample Name : F2
Sample ID : F2
Injection Volume : 1,0 uL Solvente: Diclorometano
Data File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\Marcia\2019\06.12.19\F2.qgd
Method File : C:\GCMSsolution\Data\Project1\Marcia\2019\120C-2'-10CMIN-280C- 5MINVARRED 40 A400.qgm
EQUIPAMENTO: Modelo:GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu)
Coluna: VF-5m (30X0.25X0.25)

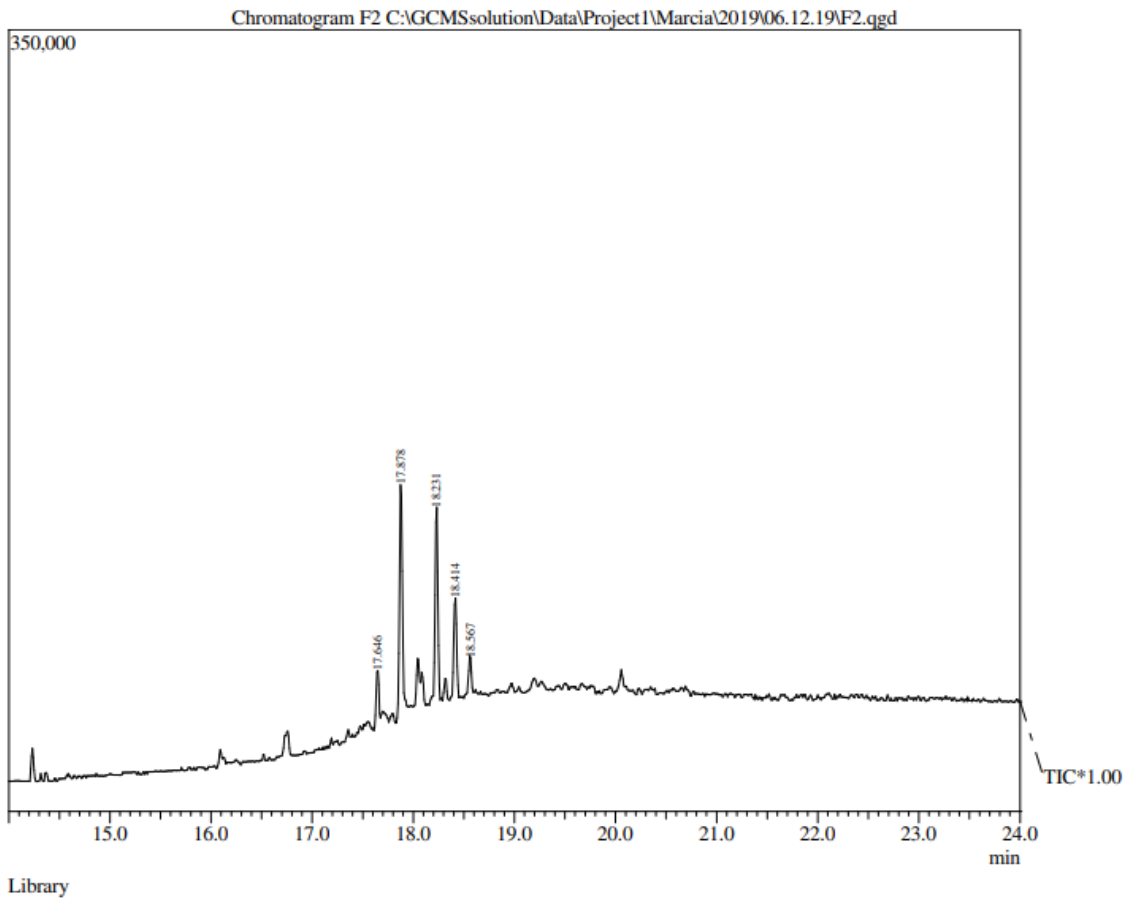


Figura 18: Compostos sugeridos pela biblioteca NIST 11 através de comparação da similaridade dos padrões de fragmentação dos compostos com tempos de retenção iguais a 17,646 e 17,878 minutos, respectivamente.

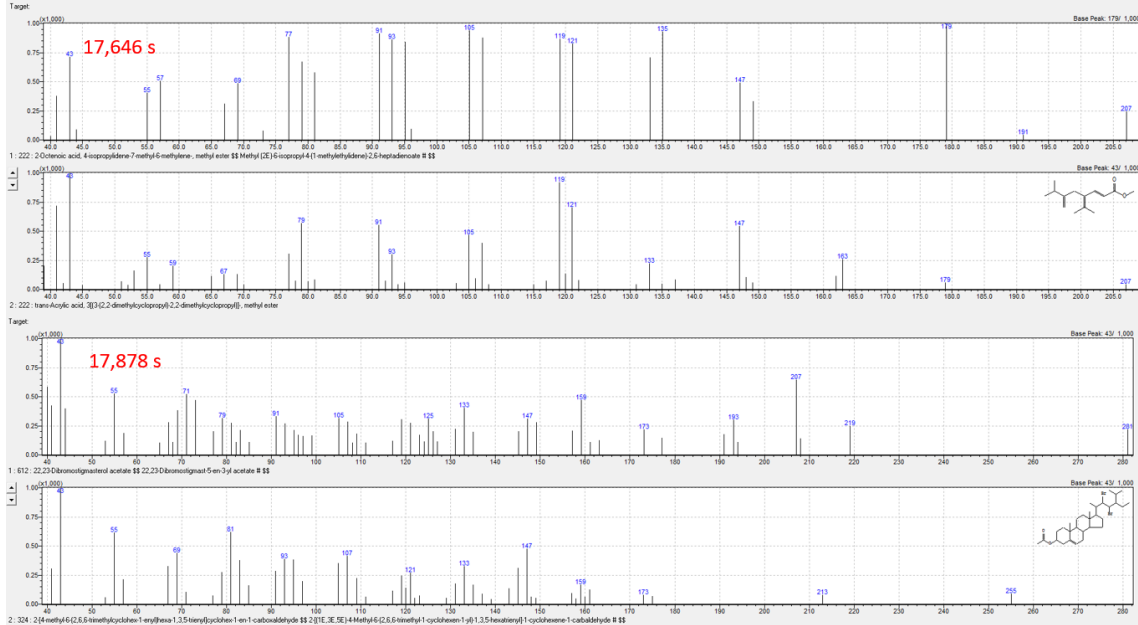


Figura 19: Compostos sugeridos pela biblioteca NIST 11 através de comparação dos perfis de similaridade dos padrões de fragmentação dos compostos com tempos de retenção iguais a 18,045 e 18,231 minutos, respectivamente.

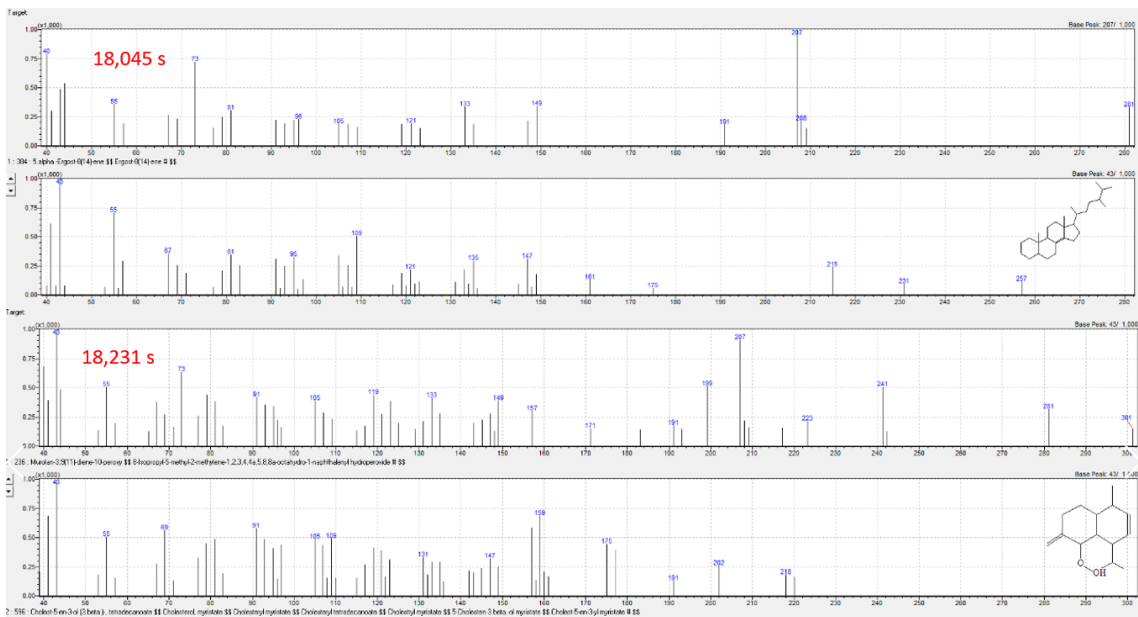
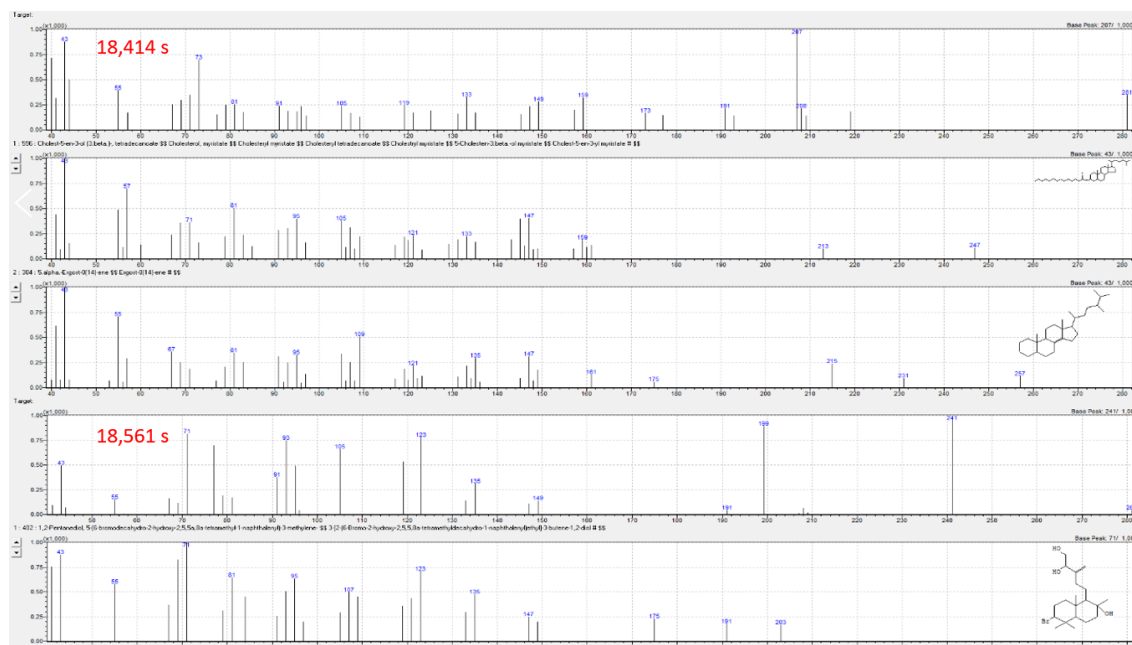


Figura 20: Compostos sugeridos pela biblioteca NIST 11 através de comparação dos perfis de similaridade dos padrões de fragmentação dos compostos com tempos de retenção iguais a 18,414 e 18,561 minutos, respectivamente.



A presença de terpenos corrobora com relatos da literatura acerca desta classe de compostos, como sendo os principais responsáveis por diversas atividades biológicas de algas da divisão das Ochrophytas (BLUNT *et al.*, 2007).

Em estudo publicado em 2012, Pan *et al.* descrevem a atividade leishmanicida de esteróis isolados de *Pentalinom andrieuxii* contra formas promastigotas e amastigotas de *L. mexicana*. Desta forma, os resultados obtidos para a fração F2', podem ainda estar relacionados à presença dos derivados de colesterol e de estigmasterol halogenado, identificados por espectrometria de massas.

1.3.2 Fracionamento e ensaios biológicos de *H. musciformis*

Após partição líquido-líquido do extrato bruto e da fração básica com metanol/água (9:1) e hexano, verificou-se que a fração metanólica do extrato bruto (MBH), apresentou IC₅₀ = 41,4 (37,6 – 45,7) µg/mL (**Figura 21**), e a fração hexânica básica (HBH) apresentou IC₅₀ = 30,4 (26,8 – 37,4) µg/mL (**Figura 22**).

Figura 21: Curva de inibição do crescimento das formas promastigotas *L. infantum* frente à fração MBH.

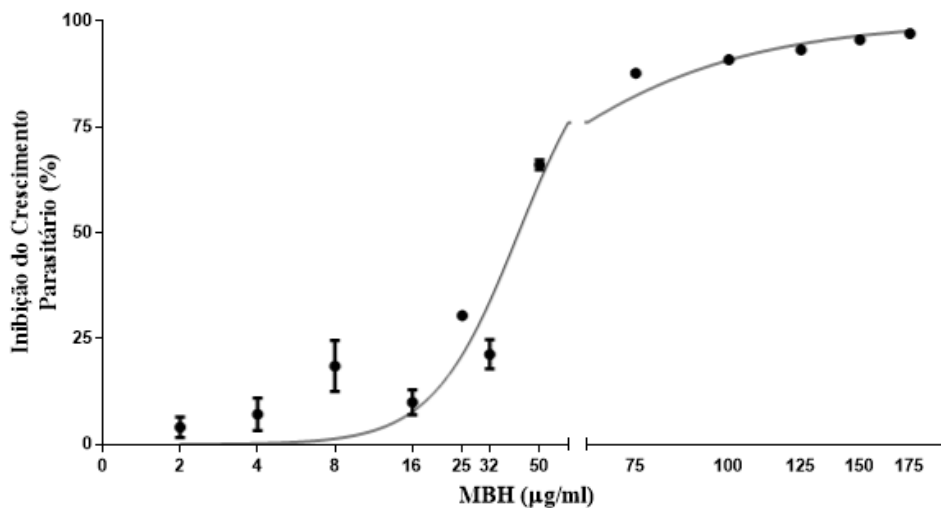
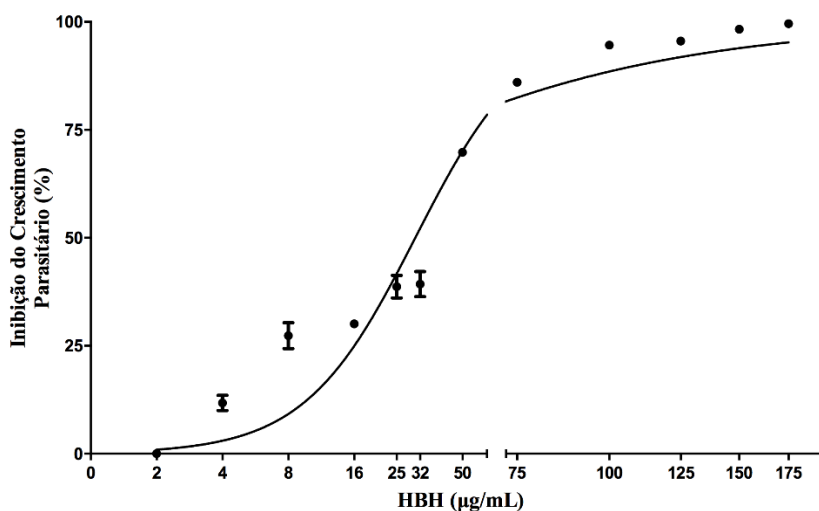


Figura 22: Curva de inibição do crescimento das formas promastigotas *L. infantum* frente à fração HBH.



Os perfis cromatográficos do extrato bruto, BH, MBH e HBH foram avaliados por CCF (**Figura 23**). Devido à semelhança dos perfis cromatográficos da HBH, do extrato bruto e da BH, optou-se por realizar o fracionamento da fração básica por cromatografia em coluna com gel de sílica, conforme fluxograma de fracionamento apresentado na **Figura 24**, com gradiente de solventes utilizando hexano/clorofórmio/metanol, de onde foram obtidas 7 frações, as quais foram analisadas por CG-EM.

Figura 23: CCF do extrato bruto, BH, MBH e HBH de *H. musciformis*.

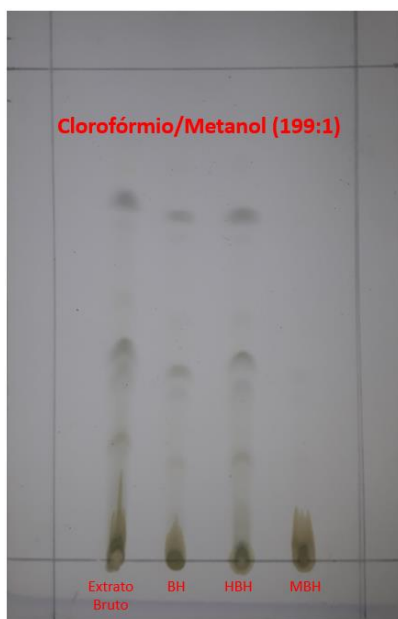
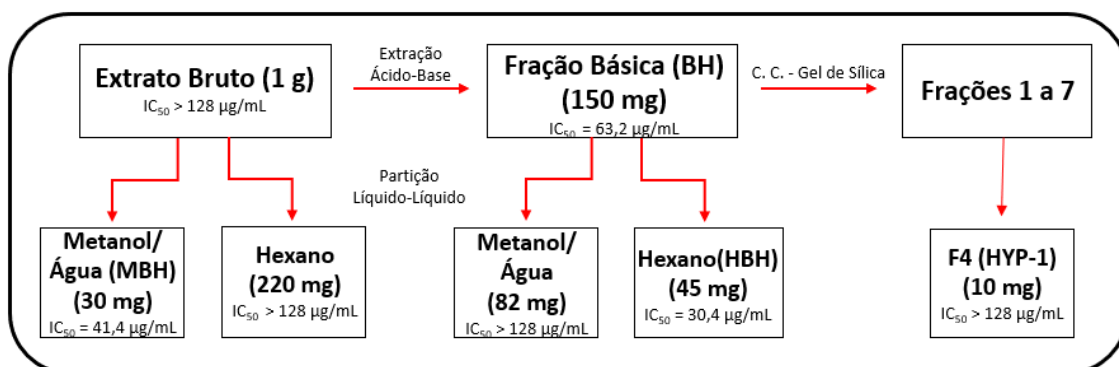


Figura 24: Fluxograma de fracionamento de *H. musciformis*.



Os critérios utilizados para a escolha das frações a serem testadas quanto à atividade leishmanicida foram as maiores massas obtidas e menor complexidade de mistura de compostos observada nos cromatogramas obtidos. A fração obtida por gradiente de solventes hexano/clorofórmio (1:1), denominada HYP-1 (10 mg), apresentou pico único no cromatograma obtido por cromatografia gasosa (CG). As demais frações apresentaram elevada complexidade de mistura de compostos, o que motivou a realização de análises de elucidação estrutural, e da avaliação da atividade leishmanicida apenas para HYP-1, não tendo este apresentado atividade no intervalo de concentrações testadas (0 – 175 µg/mL).

1.3.3 Identificação de eudesmano halogenado presente na fração básica de *H. musciformis* (BH)

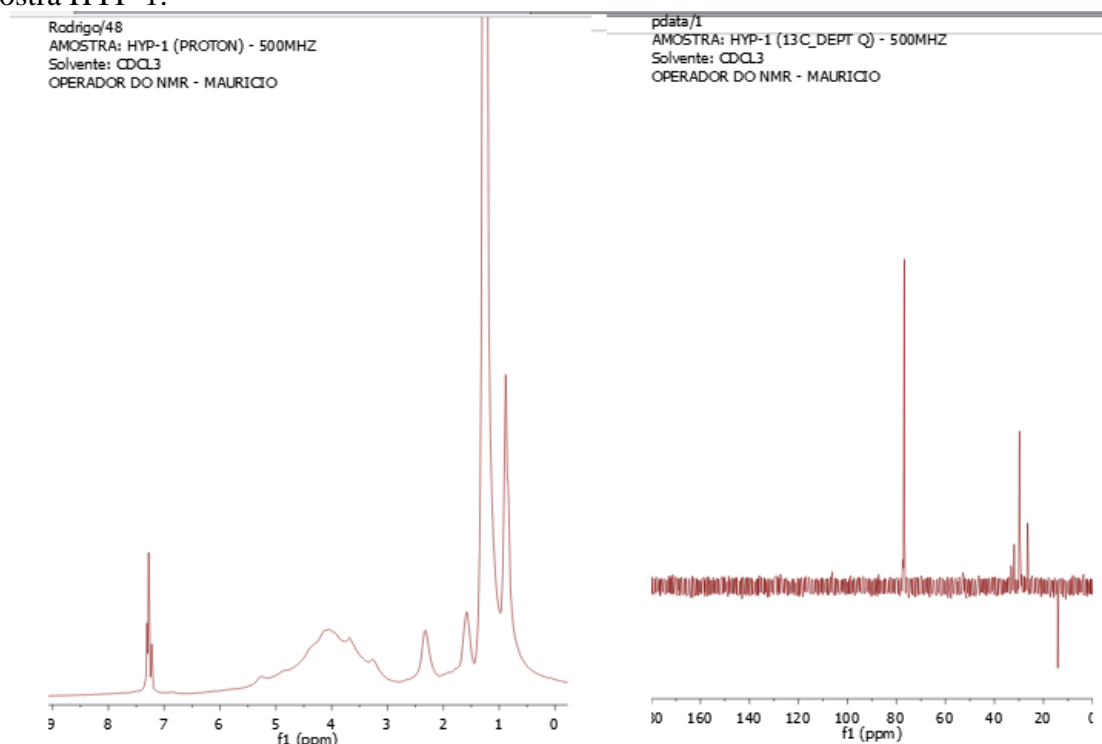
O primeiro relato da presença de sesquiterpenos bromados no gênero *Hypnea* foi em 1991, sendo isolados três sesquiterpenos bromados da espécie *Hypnea pannosa* (AFAQ-

HUSAIN *et al.*, 1991). Após este período, a descrição dessa classe de metabólitos ainda é limitada na literatura.

Em *H. musciformis* foi possível elucidar um sesquiterpeno bromado, o qual se apresentou na forma de óleo de coloração amarela, denominado HYP-1. Nos espectros de ressonância magnética nuclear de sesquiterpenos oriundos de algas, uma região de extrema importância é a dos carbonos e hidrogênios halometínicos, os quais se encontram na região entre δ C 50 e 80 ppm (GONZÁLEZ *et al.*, 1979). Estes sinais estão presentes no experimento de HSQC obtidos para a amostra HYP-1 isolada da fração básica de *H. musciformis*.

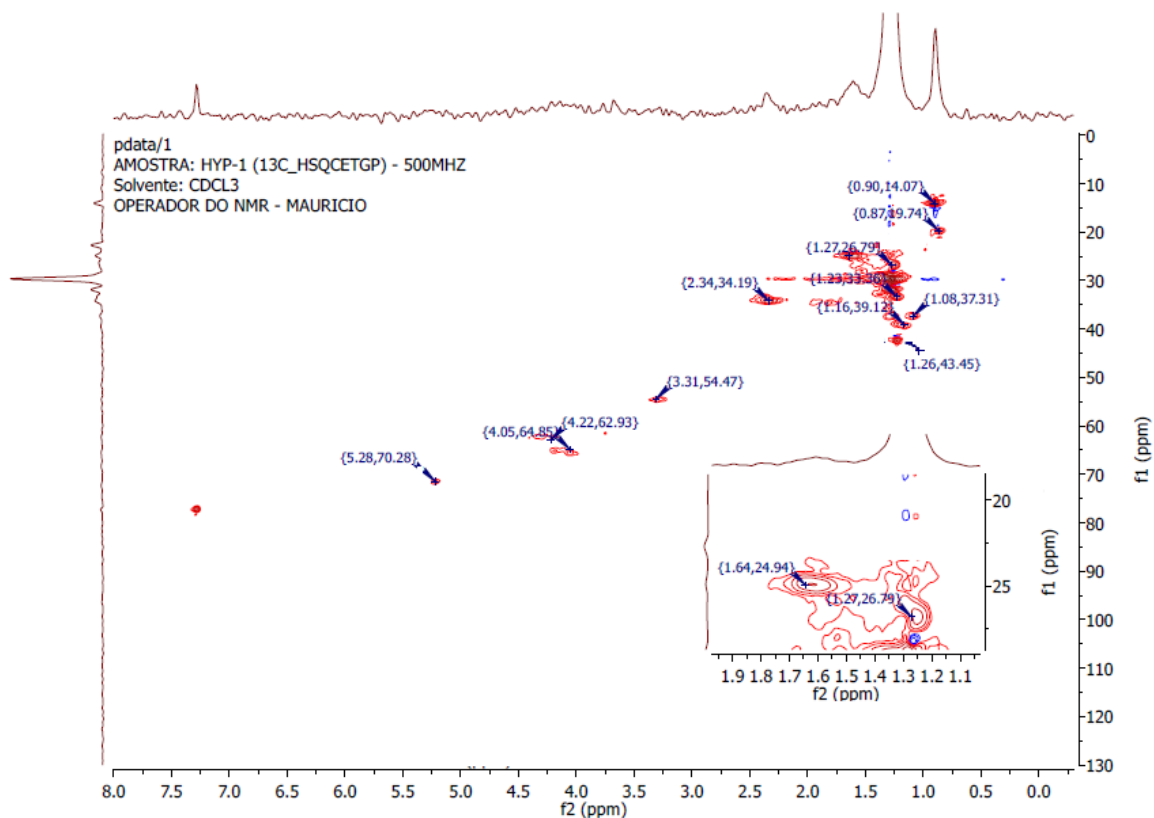
Os espectros de RMN ^1H e DEPTQ (Figura 25) adquiridos para HYP-1 não apresentaram boa resolução, mas as técnicas de HSQC e NOESY forneceram informações suficientes para a proposta estrutural.

Figura 25: Espectro de RMN ^1H (500 MHz em CDCl_3) e DEPTQ (125 MHz em CDCl_3) da amostra HYP-1.



No espectro HSQC da HYP-1 isolada de *H. musciformis*, observa-se dois grupos halometínicos em δ 3,31/54,47 (H-1/C-1) e δ 4,05/64,85 (H-3/C-3), um grupo hidroximetínico δ 5,28/70,28 (H-2/C2), um grupo hidroximetilênico δ 4,22/62,93 (H-12/C-12) e dois grupos metílicos em δ 0,90/14,05 (H-13/C-13) e δ 0,86/19,77 (H-14/C-14) (Figura 26).

Figura 26: Mapa de contorno HSQC (500/125 MHz em CDCl₃) da substância HYP-1.



A análise do espectro obtido através do experimento NOESY (**Figura 27**) revela o acoplamento espacial entre os hidrogênios H-7/H-8; H-7/H-9; H-8/H-12; H-7/H-12 e H-10/H-14, permitindo propor a estrutura do eudesmano halogenado com a conformação representada na **Figura 28**.

Figura 27: Espectro NOESY (500 MHz; CDCl₃) da HYP-1.

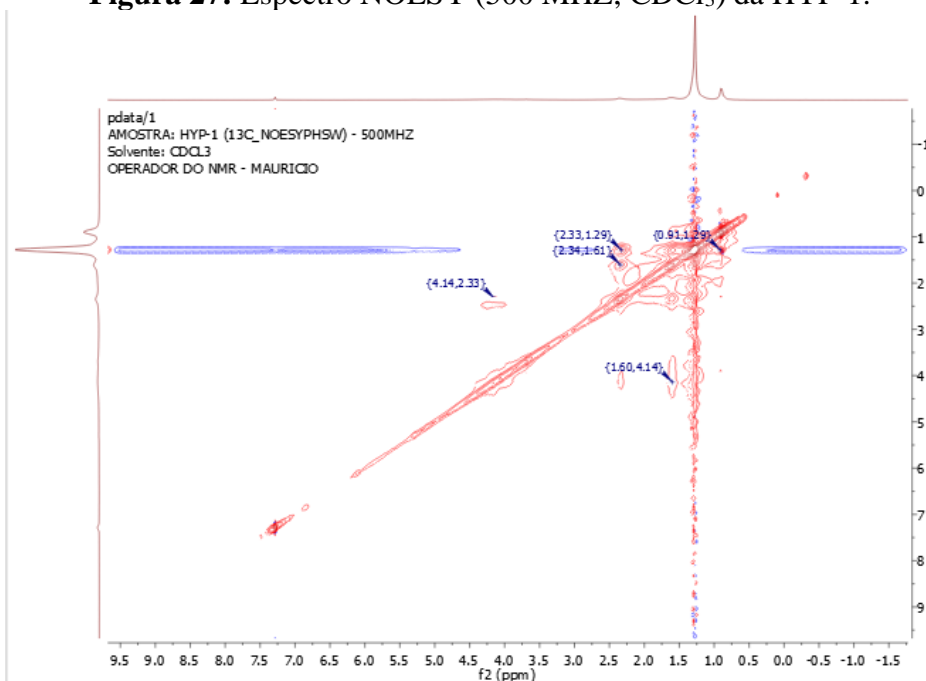
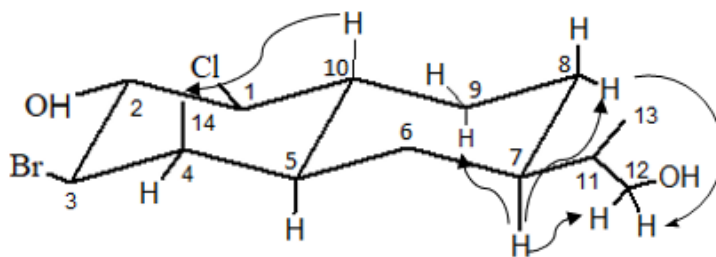


Figura 28: Acoplamentos observados no experimento de NOESY.



Foram usados dois programas computacionais (Mestre Nova e Predict) para simular os espectros de RMN de ¹H e ¹³C (**Tabela 3**) para a proposta estrutural apresentada (**Figura 29**).

Figura 29: Estrutura proposta para HYP-1.

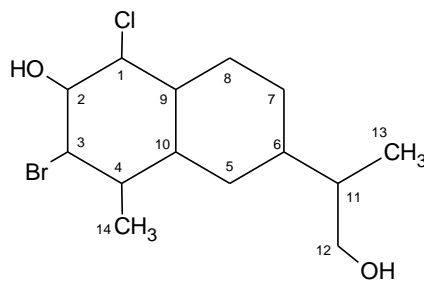


Tabela 3: Deslocamentos de RMN ^1H e ^{13}C da substância Hyp-1 em comparação com dados dos simuladores Mestre Nova e Predict.

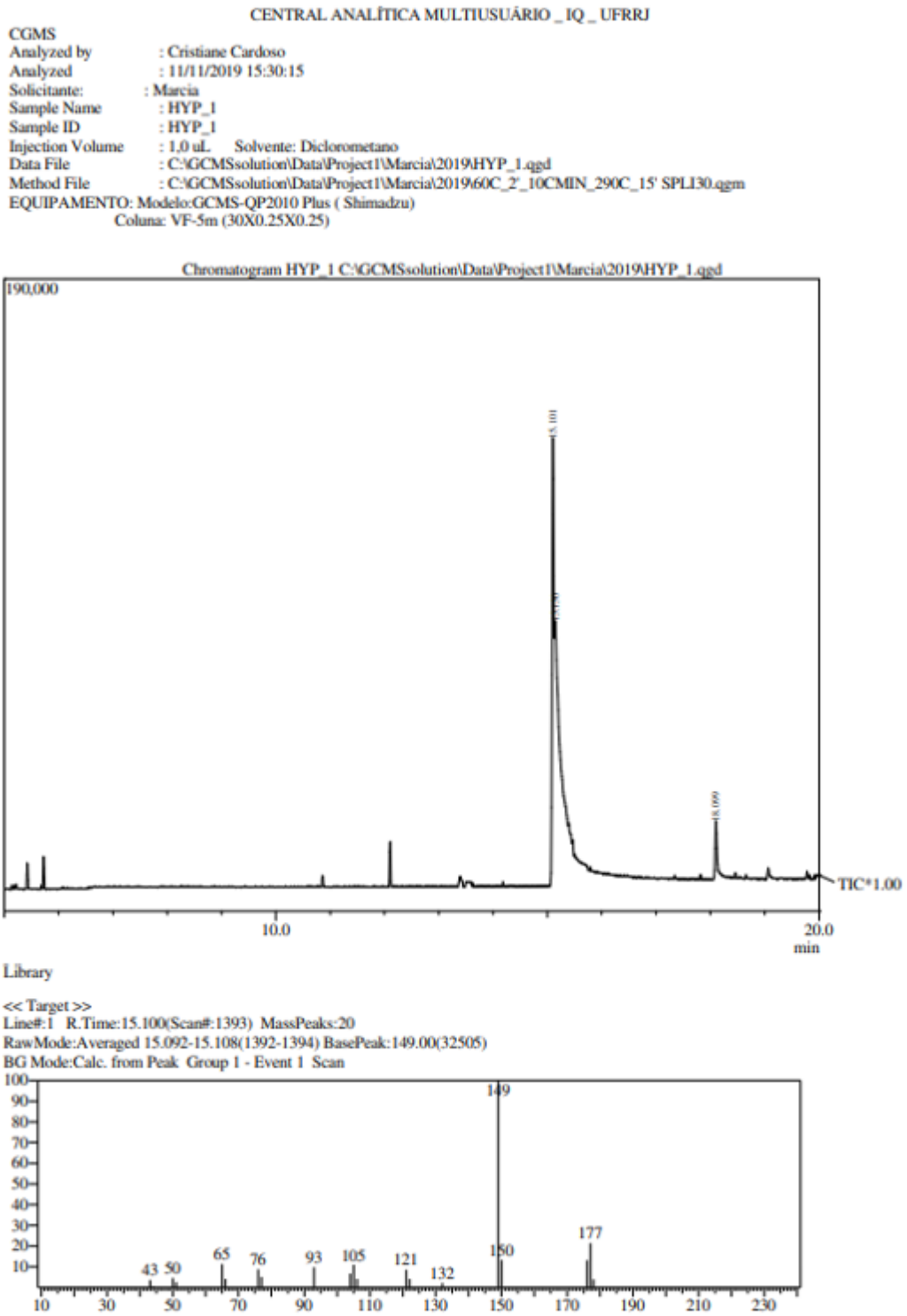
Carbono	δC	Simulação Mestre Nova (δC)	Simulação Predict* (δC)	δH	Simulação Mestre Nova (δH)	Simulação Predict* (δH)
1	54,47	70,26	59,5	3,31	4,30	3,78
2	70,28	74,28	74,6	5,28	4,57	4,30
3	64,85	59,11	65,0	4,05	4,15	3,95
4	39,12	40,29	41,0	1,16	1,87	1,62
5	37,31	40,85	37,8	1,08	1,31	1,26
6	33,36	33,85	32,2	1,23	1,30	1,71
7	34,19	35,36	38,8	2,34	1,65	1,14
8	24,94	27,38	28,8	1,64	1,30	1,80
9	26,79	27,46	28,3	1,27	1,36	1,97
10	43,45	44,46	41,0	1,26	1,62	1,48
11	39,12	39,32	40,1	1,16	1,67	1,42
12	62,93	66,01	62,2	4,22	3,30	4,22
13	14,05	13,44	13,2	0,90	0,91	0,89
14	19,77	16,62	19,2	0,86	1,04	0,93

*http://www.nmrdb.org/new_predictor/

■ Simulação Mestre Nova ■ Simulação Predict

A amostra HYP-1 (óleo de coloração amarela) foi analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), apresentando pico único com tempo de retenção em 15 minutos (**Figura 30**). O espectro de massas obtido apresentou pico base com m/z de 149 u.m.a, sendo este característico de fragmentos não halogenados de sesquiterpenos (Rabe, 2016). Como a técnica por impacto de elétrons leva a uma rápida fragmentação da molécula, não foi possível visualizar o íon molecular e nem os fragmentos contendo halogênio, já que fragmentos que apresentam halogênio geralmente apresentam baixa abundância por esta técnica (Ji *et al.*, 2009).

Figura 30: Cromatograma e espectro de massas obtidos da técnica CG/EM da amostra HYP-1 obtida do extrato metanólico de *H. musciformis*.



De acordo com o espectro de massas obtido, pôde-se propor o mecanismo de fragmentação para os picos de maior intensidade (**Figuras 31 e 32**).

Figura 31: Proposta de fragmentação para o pico base m/z 149 observado no espectro de massas da HYP-1.

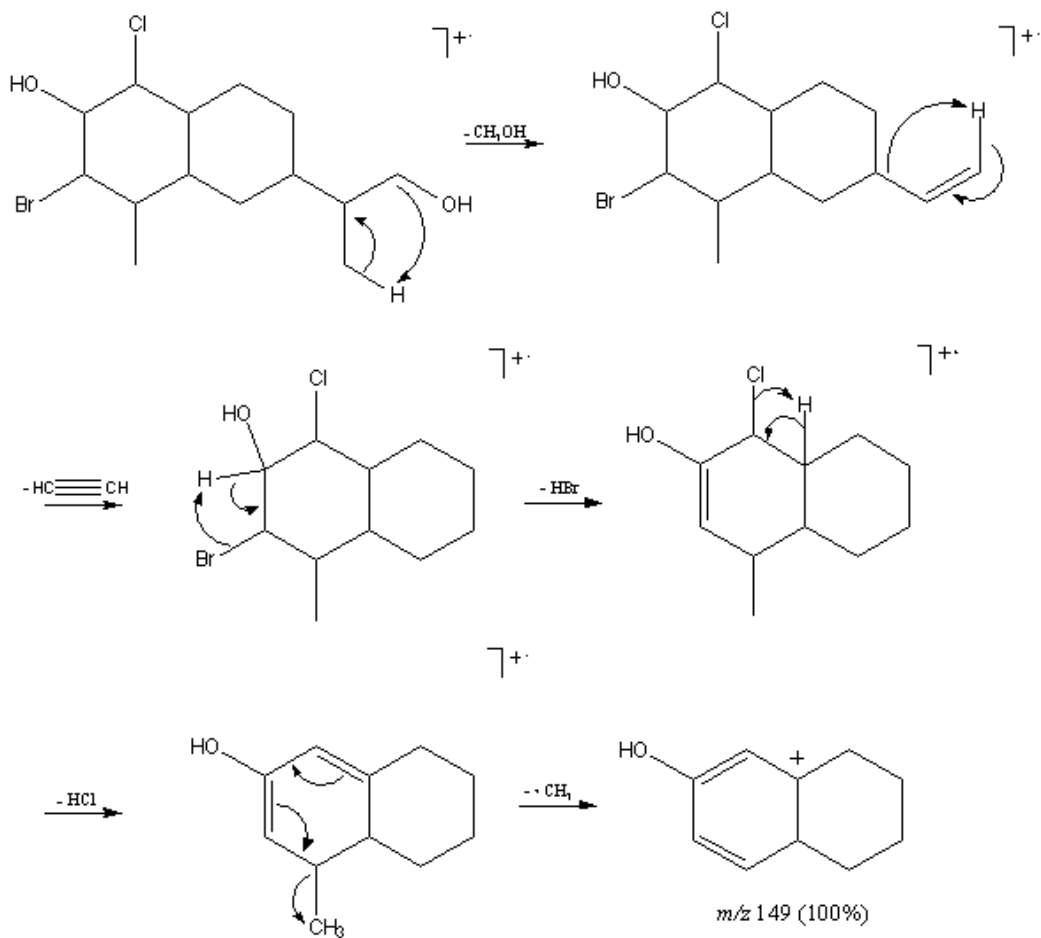
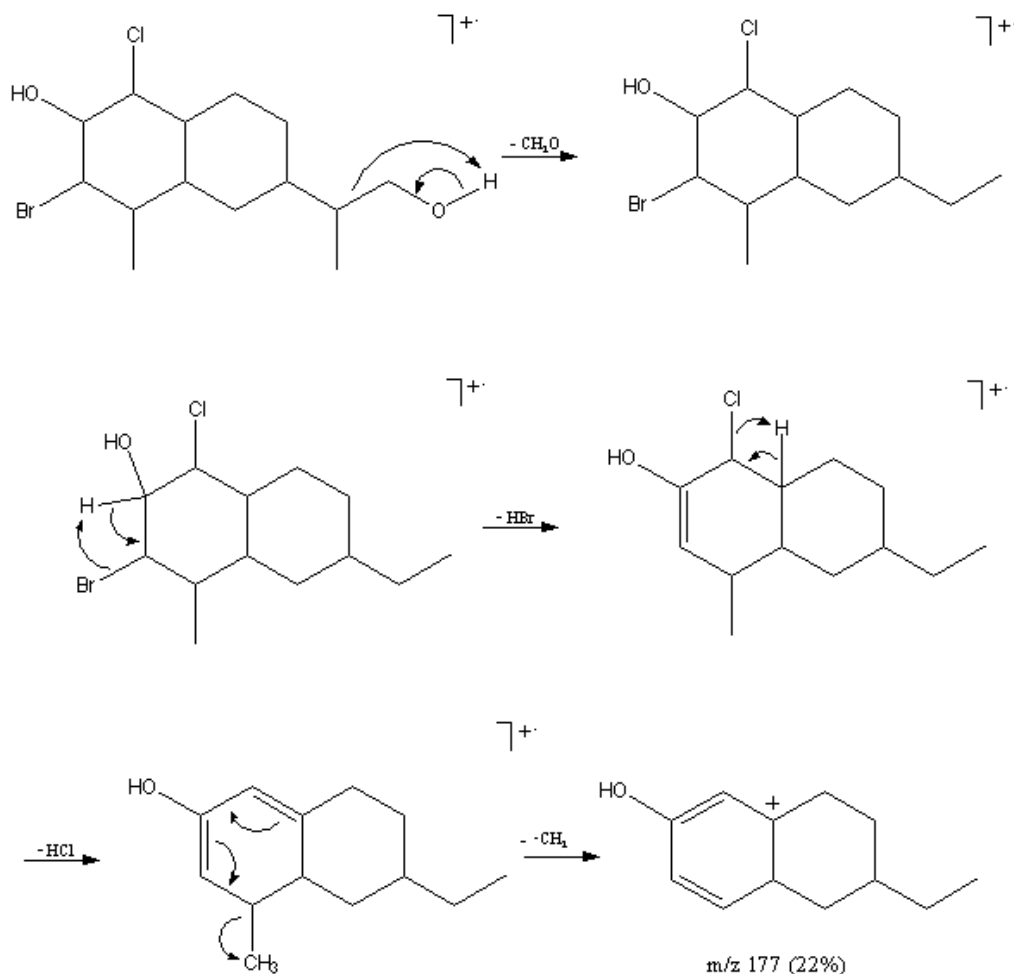


Figura 32: Proposta de fragmentação para o pico m/z 177 observado no espectro de massas da HYP-1.



Após análise espectroscópica para o sesquiterpeno obtido de *H. musciformis* designado HYP-1, foi proposta a nomenclatura 3-bromo-1-cloro-1,12-dihidroxi-14-*nor*-eudesmano.

De acordo com os resultados de atividade contra promastigotas obtidos, foram selecionados para avaliação de citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos, as frações BD, MBD e F2' de *D. menstrualis*, e de *H. musciformis*, MBH, HBH e HYP-1.

Os valores de CC_{50} obtidos (**Tabela 4**), indicam que a fração menos citotóxica, HBH, é também a que demonstrou a maior atividade contra promastigotas de *L. infantum*, o que a torna uma das frações de maior interesse para a avaliação de atividade frente a amastigotas intracelulares, levando em conta, além de seus valores de IC_{50} e CC_{50} , sua composição indicada por CG-EM.

Tabela 4: Valores de CC₅₀ obtidos em avaliação de citotoxicidade das frações BD, MBD, F2', MBH, HBH e HYP-1 frente a macrófagos peritoneais murinos.

FRAÇÃO	CC ₅₀ (µg/mL)
BD	31,0
MBD	66,6
F2'	32,3
MBH	48,2
HBH	132,8
HYP-1	67,3

A relação entre citotoxicidade e atividade leishmanicida contra amastigotas intracelulares, denominada índice de seletividade (IS), diz respeito à especificidade de um fármaco em relação ao parasito e ao hospedeiro. Desta forma, a avaliação da citotoxicidade fornece informações necessárias ao planejamento dos experimentos com amastigotas intracelulares, em relação às concentrações a serem adotadas, uma vez que compostos com valores de IS ≥ 10 são considerados promissores (LOPES, 2014), ou seja, CC₅₀ deve ser no mínimo 10 vezes maior que o IC₅₀, o que significa que o fármaco é 10x mais seletivo para a célula do parasito, que a do hospedeiro.

1.4 CONCLUSÕES

Dentre as algas marinhas testadas, duas apresentaram atividade leishmanicida contra promastigotas de *L. infantum*, o que reforça a potencialidade dos produtos naturais marinhos para pesquisa de compostos que possam servir de modelo para o desenvolvimento de fármacos de interesse para a saúde humana.

O fracionamento ácido-base para a obtenção possibilitou a obtenção de frações com atividade leishmanicida. O fato dos extratos brutos de *D. menstrualis* e *H. musciformis* não terem apresentado atividade leishmanicida, mas suas frações básicas sim, chama a atenção para a abordagem dos protocolos a serem adotados durante a prospecção, acerca das classes de compostos que se deseja obter, principalmente quando os mecanismos de ação e os alvos farmacológicos do modelo a ser testado são conhecidos, visto que via de regra os ensaios de atividades biológicas são interrompidos quando extratos brutos não apresentam os resultados desejados, o que reforça a importância das etapas de fracionamento e isolamento.

Diferentemente de PN terrestres, algas marinhas apresentam em sua composição, altos teores de minerais. Desta forma, durante o preparo de extratos hidroalcoólicos, parte considerável dos extratos obtidos são compostos inorgânicos, o que tende a mascarar o rendimento real dos extratos obtidos. Desta forma, a alternativa adotada para a remoção de compostos minerais, que consistiu na ressuspensão dos extratos brutos obtidos em etanol absoluto, seguida de filtração e concentração, mostrou-se como importante ferramenta para o preparo de extratos com concentrações reduzidas de compostos inorgânicos.

A amostra F2', por ser uma mistura de terpenos e esteróis, e havendo na literatura diversos relatos de atividades biológicas de terpenos, assim como relatos de esteróis com atividade leishmanicida, e a fração HBH, por ter apresentado a maior atividade leishmanicida e menor citotoxicidade, representam as frações obtidas no presente trabalho, de maior interesse para o preparo em maior quantidade e isolamento de seus compostos, para testes individuais de atividade leishmanicida, citotoxicidade e análises de determinação estrutural.

1.5 PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos, a sequência do trabalho se dará através da avaliação da atividade leishmanicida na forma amastigota intracelular de *L. infantum* das frações de *D. menstrualis* e *H. musciformis* que apresentaram atividade antipromastigota no intervalo de concentrações testado, além do isolamento e determinação estrutural dos compostos presentes nestas frações.

1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrantes, J. L.; Barbosa, J.; Cavalcanti, D. N.; Pereira, R. C.; Fontes, C. L. F.; Teixeira, V. L.; Souza, T. L. M.; Paixão, I. C. N. P. *Planta Med.* 76, 339, 2010.

Aliança, A. S. S., Anjos, K. F. L., Reis, T. N. V., Higino, T. M. M., Brelaz-De-Castro, M. C. A., Bianco, E. M., Figueiredo, R. C. B. Q. The *in Vitro* Biological Activity of the Brazilian Brown Seaweed *Dictyota mertensii* against *Leishmania amazonensis*. *Molecules*. v. 19, p. 14052-65, 2014.

Almeida, M.A.O.*et al.* Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Parasitology*, v. 127, p. 227–232, 2005.

Bhandari, V.; kulshrestha, A.; deep, D.K., stark, O., praiapati, V.; K.; ramesh, V.; sundar, S.; schonian, G.; dujardin, J. C.; salotra, P. Drug susceptibility in *leishmania* isolates following miltefosine treatment in cases of visceral leishmaniasis and post kalazar dermal leishmaniasis. *Plos Neglect. Trop.* v. 6, p. 1-6, 2012.

Bianco, E.M., De Oliveira, S.Q., Rigotto, C., Tonini, M.L., Guimaraes, T.R., Bittencourt, F., Gouvea, L.P., Aresi, C., Rojo De Almeida, M.T., Goularte Moritz, M.I., Leal Martins, C.D., Scherner, F., Carraro, J.L., Horta, P.A., Reginatto, F.H., Steindel, M., Oliveira Simoes, C.M., Schenkel, E.P. Anti-infective potential of marine invertebrates and seaweeds from the brazilian coast. *Molecules*. v. 18, p. 5761-5778, 2013.

Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Hu, W. P.; Munro, M. H.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R.; *Nat. Prod. Rep.* 24, 31, 2007.

Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Hu, W. P.; Munro, M. H.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R.; *Nat. Prod. Rep.* 25, 35, 2008.

Castelar, B.; Pontes, M.D.; Costa, W.M. de; Moura, L.C.F.; Dias, G.E.A.; Landuci, F.S.; Reis, R.P. Biofiltering efficiency and productive performance of macroalgae with potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, v. 41 (esp.), p. 763 – 770, 2015.

Coelho-Júnior *et al*, Coinfecção por Leishmaniose Visceral e Vírus da Imunodeficiência Humana: Uma Evolução Clínica Desfavorável. *Ver. Patol. Trop.* Vol. 45, 233-240. abr-jun. 2016.

Croft, S. L. & olliario, P. Leishmaniasis chemotherapy challenges and opportunities. *Clin. Microbiol. Infec.* v. 17, p. 1478-83, 2011.

Croft, S. L.; Sundar, S.; fairlamb, A. H. Drug Reistance in Leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 19, p. 111-126, 2006.

Davyt, D.; Fernandez, R.; Suescun, L.; Momburu, A.; Saldanã, J.; Dominguez, L.; Coll, J.; Fujii, M. T.; Manta, E. J. *Nat. Prod.* 64, 1552-1555, 2001.

Desjeux, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clinical Dermatology*, v. 14, n. 5, p.417-23, 1996.

Domingos, T. F. S.; Vallim, M. A.; Carvalho, C.; Sanchez, E. F.; Teixeira, V. L.; Fuly, A. L. *Rev. Bras. Farmacogn.* 21, 234, 2011.

Dorlo, T. P. C; Balasegaram, M.; Beijnen, J. H; De Vries, P. J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemoth.* v. 67, p. 2576-97, 2012.

Freile-Pelegrin, Y., Robledo, D., Chan-Bacab, M.J., Ortegamorales, B.O. Antileishmanial properties of tropical marine algae extracts. *Fitoterapia*. v. 79, p. 374-377, 2008.

Garcia, D. G.; Bianco, E. M.; dos Santos, M. C. B.; Pereira, R. C.; Faria, M. V. C.; Teixeira, V. L.; Burth, P. *Phytother. Res.* 23, 943, 2009.

Gontijo, B., Carvalho, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36, 71-80, jan-fev, 2003.

Gontijo, C. M. F.; Melo, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, São Paulo, 7, 338-349, 2004.

González, A. G., Martín, J. D., Martín, V. S., & Norte, M. (1979). Carbon-13 NMR application to Laurencia polyhalogenated sesquiterpenes. *Tetrahedron Letters*, 20, 2719-2722, 1979.

Graham, L. E., Wilcox, L. W. *Algae*. Prentice Hall, Michigan, EUA, 2000.

Ji, N. Y., Li, X. M., Li, K., Wang, B. G. Halogenated Sesquiterpenes from the Marine Red Alga *Laurencia saitoi* (Rhodomelaceae). *Helvetica Chimica Acta* – 92, 2009.

Kaye, P.; Scott, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 9, 604-615, 2011.

León-Deniz, L. V., Dumonteil, E., Moo-Puc, R., Freile-Pelegrin, Y. Antitrypanosomal *in vitro* activity of tropical marine algae extracts. *Pharmaceutical Biology*. 47, 9, 864-71, 2009.

Lindoso, J. A. L. & Lindoso, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 51, 5, 247-253, 2009.

Lira, M. L. F., Lopes, R., Gomes, A. P., Barcellos, G., Verícimo, M., Osako, K., Ortiz-Ramirez, F. A., Ramos, C. J. B., Cavalcanti, D. N., Teixeira, V. L., Amaral, V. Anti-leishmanial activity of Brazilian green, brown, and red algae. *J. Appl. Phycol.* 18, 591-98, 2016.

Lopes, E.O.; Oliveira, C.G.; Deflon, V.M.; Leite, C.Q.; Pavan, F.R. Determinação da atividade antitumoral *in vitro* dos complexos de coordenação contendo os metais Zn(II) e Co(III). **Rev Ciên Farm Básica Apl.**, v.35 Supl.1, 2014.

Maleki, F. et al. In vitro and in vivo susceptibility of *Leishmania major* to some medicinal plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 7, 1, 37-42, 2016.

Matos, F. J. A. Introdução a fitoquímica experimental. 2 ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

Mendes, G. S.; Soares, A. R.; Martins, F. O.; de Albuquerque, M. C. M., Costa, S. S., Yoneshigue-Valentin, Y., Gestinari, L. M. S., Santos, N., Romanos, M. T. V. **Rev. Inst. Med. trop.** S. Paulo, 52, 3, 2010.

Minicante, S. A.; Michelet, S.; Bruno, F.; Castelli, G.; Vitale, F.; Sfriso, A.; Morabito, M.; Genovese, G. Bioactivity of Phycocolloids against the Mediterranean Protozoan *Leishmania infantum*: An Inceptive Study. **Sustainability**. 8, 1131, 1-9, 2016.

MINISTERIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília, DF: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância da Saúde. 1ª Edição, 2014.

Mora, C., Tittensor, D. P., Adl, S., Simpson A. G. B., Worm, B. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? **PLoS Biology**, 9, 2011.

Newman, D. J., Cragg, G. M. Marine Natural Products and Related Compounds in Clinical and Advanced Preclinical Trials. **J. Nat. Prod.** 67, 1216-1238, 2004.

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.

Pan, Li. *et al.* Sterols with antileishmanial activity isolated from the roots of *Pentalinon andrieuxii*. **Phytochemistry**, 82, 128–135, 2012.

Patarra, R. F. Pesquisa de Ácidos gordos em macroalgas marinhas do litoral de Açores. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Porto, 2008.

Rabe, P., Dickschat, J. S. The EIMS fragmentation mechanisms of the sesquiterpenes corvol ethers A and B, epi-cubebol and isodauc-8-en-11-ol. **Beilstein J. Org. Chem.**, 12, 1380–1394, 2016.

Rath, S., Trivelin, L. A., Imbrunito, T. R., Tomazela, D. M., Jesús, M. N., Marzal, P. C., Andrade-Junior, H. F., Tempone, A.G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quim. Nova**, 26, 4, 550-555, 2003.

Rey L. Bases da Parasitologia Médica. 3ª ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2011.

Rey, L. O complexo *Leishmania brasiliensis* e a leishmaniose tegumentar americana. Parasitologia. 3 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. p. 182-192, 2001.

Santiago, L. P. T. Investigação das Atividades Tripanocida e Leishmanicida de Macroalgas Marinhas. Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e à Universidade Federal Fluminense, IEAPM/UFF. Arraial do Cabo, 2018.

Santos, A. O.; Britta, E. A.; Bianco, E. B.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B. P.; Pereira, R. C.; Nakamura, C. V. *Mar. Drugs*. 9, 2369, 2011.

Santos, A. O.; Veiga-Santos, P.; Ueda-Nakamura, T.; Dias-Filho, B. P.; Sudatti, D. B.; Bianco, E. M.; Pereira, R. C.; Nakamura, C. V. *Mar. Drugs*. 2010, 8, 2733.

Stein, E. M.; Andregueti, D. X.; Rocha, C. S.; Fujii, M. T.; Baptista, M. S.; Colepicolo, P.; Indig, G. L. *Rev. Bras. Farmacogn.* 21, 239, 2011.

Shaw, J.J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89, 3, 471-478, 1994.

Soares, D.C., Calegari-Silva, T.C., Lopes, U.G., Teixeira, V.L., De Palmer Paixao, I.C.N., Cirne-Santos, C., Bou-Habib, D.C., Saraiva, E.M. Dolabelladienetriol, a compound from *Dictyota pfaflii* algae, inhibits the infection by *Leishmania amazonensis*. *Plos Neglect. Trop.* 6, 1787, 2012.

Souza, W. Doenças negligenciadas. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 2010.

Souza, M. A., Nunes, R. F. F., Viana, T. C., Marinho, M. J. M., Queiroz, Moreira P. V. S., Pereira, W. O. Leishmaniose Visceral Humana: do Diagnóstico ao Tratamento. *Rev. Cien. Saúde Nov. Esp* 10, 61-69, 2012.

SVS/MS. Sistema de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde 2017. Disponível em <https://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/outubro/06/Volume-Unico-2017.pdf> Acessado em 15/03/2020.

Spavieri, J., Kaiser, M., Casey, R., Hingley-Wilson, S., Lalvani, A., Blunden, G., Tasdemir, D. Antiprotozoal, antimycobacterial and cytotoxic potential of some british green algae. *Phytother. Res.* 24, 1095-1098, 2010.

Teixeira, V. L. Produtos Naturais de Algas Marinhas Bentônicas. *Rev. Virtual Quim.* 5, 343-362, 2013.

Teixeira, V. L.; Rocha, F. D.; Houghton, P. J.; Kaplan, M. A. C.; Pereira, R. C. *Fitoterapia*, 78, 35 2008.

Torres, F. A. E.; Passalacqua, T. G.; Velásquez, A. M. A.; Souza, R. A.; Pio Colepicolo; Graminha, M. A. S. New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: a review. *Rev. Bras. Farmacogn.* 24, 265-76, 2014.

Valverde, Ricardo. Doenças negligenciadas. Agência Fiocruz de Notícia, 2018. Disponível em <https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>. Acesso em 12 jun 2019.

Vasconcelos, R. S.; Kovalski, DF, Tesser Junior, ZC. Doenças Negligenciadas: Revisão da Literatura sobre as Intervenções Propostas, *Sal. & Transf. Soc.*, 6, 2, 114-131, 2016.

Veiga-Santos, P.; Pelizzaro-Rocha, K. J.; Santos, A. O.; Ueda-Nakamura, T.; Dias-Filho, B. P.; Silva, S. O.; Sudatti, D. B.; Bianco, E. M.; Pereira, R. C.; Nakamura, C. V. *Parasitology*. 137, 1661, 2010.

Vonthron-Senecheau, C., Kaiser, M., Devambe, I., Vastel, A., Mussio, I., Rusig, A.M. Antiprotozoal activities of organic extracts from French marine seaweeds. *Mar. Drugs*. 9, 922-933, 2011.

Werneck GL. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. *Cad. Saúde Pública*. 26, 644, 2010.

WHO. World Health Organization. "Neglected tropical diseases." Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/. Visitado em junho de 2019a.

WHO. World Health Organization. "Leishmaniasis". Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Visitado em junho de 2019b.

Winartasaputra, H; Mallet, VN; Kuan, SS; Guilbault, GG. Fluorometric and colorimetric enzymic determination of triglycerides (triacylglycerols) in serum. *Clinical Chemistry*. 26, 613, 1980.

**CAPÍTULO II. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ESTERÓIS DE
Neobenedenia melleni COMO ESTRATÉGIA PARA
DESCOBERTA DE POTENCIAIS ALVOS
FARMACOLÓGICOS**

2.1 INTRODUÇÃO

Neobenedenia melleni (Monogenea: Capsalidae) é um ectoparasita hematófago de peixes marinhos tropicais, de ocorrência acentuada em sistemas de cultivo, onde o confinamento é fator agravante para sua proliferação. Possui ciclo reprodutivo curto e ciclo de vida compreendendo apenas um hospedeiro, com larvas podendo alternar entre o estilo de vida livre ou parasitária, causando surtos em curtos espaços de tempo, sobretudo em condições de confinamento, aumento da salinidade, temperatura e poluição da água, e diminuição do oxigênio dissolvido, condições que afetam a imunidade do hospedeiro, criando assim as condições necessárias à infecção (SANCHES, 2008).

Este parasita se fixa principalmente nas mucosas e olhos, mimetizando com o hospedeiro e causando hemorragia, natação errática, cegueira e conseqüente dificuldade de alimentação, podendo evoluir para morte, representando desta forma grandes perdas para a produção. Seu tratamento convencional se dá através de banhos de água doce que expõe o parasito a choque osmótico, causando-lhe rompimento celular seguido de morte. No entanto, tratamentos desta natureza demandam gastos com mão de obra, visto a dificuldade e frequência do manejo, elevando os custos de produção, e conseqüentemente a elevação do valor do produto final ao consumidor (OHNO *et al.*, 2007).

São relatados demais tratamentos como banhos de formalina, e agentes oxidantes como o permanganato de potássio, o que não isenta dos contratempos do manejo, assim como torna questionável a destinação do pescado para consumo humano, e em situações extremas, a inclusão de antibióticos na dieta, o que eleva ainda mais os custos de produção, e impacta a qualidade nutricional do pescado (TRASVIÑA-MORENO *et al.*, 2017).

Desta forma, a busca por tratamentos que reduzam os custos de produção, sem impactar a qualidade do produto, representa fator de grande interesse, tanto em relação à melhoria da logística das condições de cultivo e conseqüente redução do valor agregado do produto final, quanto pelo bem-estar animal.

O estudo da fisiologia do parasito como estratégia para a avaliação de potenciais alvos farmacológicos vem ao encontro da ideia de racionalizar e direcionar a pesquisa de controle parasitário, por meio da elucidação dos mecanismos de ação de quimioterápicos, o que facilita também a compreensão dos efeitos adversos causados ao hospedeiro, o que é de vital importância, visto sua destinação para consumo humano.

O conhecimento do perfil lipídico e suas vias metabólicas em parasitos pode contribuir para o desenvolvimento de moléculas que possam apresentar atividade antiparasitária. Esteróis desempenham funções estruturais e energéticas, e são precursores de diversos compostos (PEREIRA; MIGUEL, 2017). Como exemplo, pode-se citar o colesterol e o ergosterol, presentes em membranas celulares de diversos parasitas, diminuindo a fluidez da membrana devido à estrutura rígida do esqueleto cicloperidrofenantreno e aumentando a faixa de temperatura de transição inibindo a cristalização de ácidos graxos (XU, e col. 2001).

Neste contexto, foi avaliado o perfil de esteróis e a toxicidade aguda (LC₅₀) de *N. melleni* em diferentes concentrações de DMSO, como estratégia para a descoberta de potenciais alvos farmacológicos, o que auxilia na busca por substâncias que tenham como alvo a via de biossíntese de esteróis, possibilitando o controle de *N. melleni*.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Coleta de parasitos

Amostras de *N. melleni* foram coletadas na fazenda marinha Maricultura Costa Verde, através de banhos de água doce com duração de cinco minutos, em exemplares adultos de *Rachycentron canadum* (Bijupirá) mantidos sob condição de cultivo. Após a coleta, os parasitos foram lavados e conservados em tampão fosfato salino (PBS), e mantidos a -20°C até o momento das análises. Parte do material coletado foi acondicionado em solução de formol à 4% em água do mar, para posterior identificação.

2.2.2 Extração de lipídeos neutros

A extração de lipídeos neutros foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Fitoquímica do Instituto de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), conforme descrito por Bligh & Dyer (1959). Para o preparo do extrato lipídico, foram utilizados 10 espécimes de *N. melleni*, aos quais foram adicionados 1 mL de metanol, 0,5 mL de clorofórmio e 0,4 mL de água destilada. Após agitação da mistura em vortex, de 5 em 5 minutos durante 1 hora, a solução foi centrifugada por 20 min a 3.000 rpm e o sobrenadante, contendo os lipídeos, foi separado do precipitado e reservado.

O precipitado foi submetido a uma segunda extração conforme o protocolo descrito anteriormente. Os sobrenadantes foram unificados, apresentando volume final de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 0,5 mL de água destilada e 0,5 mL de clorofórmio. Após agitação, o material foi novamente centrifugado (3.000 rpm/30 min). A fase inferior (orgânica), contendo os lipídeos, foi então separada com o auxílio de seringa de vidro, filtrada com o agente secante sulfato de sódio anidro, e transferida para tubos de 1,5 ml, resistentes a solventes orgânicos (Axygen Scientific Inc., Union city, CA, USA). O solvente foi evaporado por arraste de nitrogênio gasoso (N₂), e parte do extrato lipídico bruto obtido foi derivatizado. O extrato lipídico obtido não foi passível de ser quantificado através de balança analítica.

O extrato lipídico bruto foi analisado por cromatografia em camada fina (CCF) e por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-EM), técnica pela qual também foram analisados os derivados obtidos e os padrões comerciais dos esteróis de interesse, conforme descrito a seguir.

2.2.3 Avaliação do perfil de esteróis de *N. melleni* por cromatografia em camada fina (CCF)

A avaliação de perfil de esteróis por CCF foi realizada no Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Os lipídeos extraídos foram analisados em placa de sílica (Silica Gel, 60F₂₅₄, Merck KGaA, Frankfurt, DS, Alemanha) após ressuspensão em 50 µl de clorofórmio. A placa cromatográfica foi previamente impregnada com nitrato de prata (1%) em metanol, com o objetivo de diferenciar os Fatores de Retenção (Rf's) do colesterol e do ergosterol, que possuem estruturas extremamente semelhantes, uma vez que o nitrato de prata separa com grande eficiência compostos cujas estruturas diferem apenas pelo número de insaturações. Foram utilizadas duas eluições com diferentes sistemas de solventes. A primeira, realizada até metade da placa, utilizando o sistema de solventes: hexano/éter etílico/ácido acético (60:40:1 v/v) e a segunda eluição foi feita com hexano/clorofórmio/ácido acético (80:20:1 v/v). As placas foram, então, borrifadas com reagente de *Charring* (10% CuSO₄ + 8% H₃PO₄) e aquecidas a 200 °C para revelação (ANDRADE-NETO *et al.*, 2011).

Os esteróis foram identificados através de comparação com padrões comerciais de colesterol, éster de colesterol, ergosterol, ergostano, desmosterol, estigmasterol e esqualeno (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, USA).

2.2.4 Derivatização e avaliação do perfil de esteróis de *N. melleni* por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM)

As reações de derivatização do extrato lipídico foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Fitoquímica do Instituto de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Parte do extrato lipídico bruto obtido foi ressuspendido em 50 µL do agente silanizante *N,O*-(trimetilsilil) trifluoroacetamida com 1% de trimetilclorosilano (BSTFA/TMCS (99:1)) e 50 µL de piridina, e incubado por 65 °C durante 1 hora.

As análises de avaliação do perfil de esteróis por CG-EM foram realizadas no Laboratório de Nutrologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), em equipamento GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Scientific Instruments, Tóquio, Japão), com coluna HP Ultra 2 Agilent (5% fenilmetilpolisiloxano, 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm) e na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em equipamento GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Scientific Instruments, Tóquio, Japão), com coluna VF-5m (5% fenilmetilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,25 mm).

Nas análises realizadas no HUCFF, o extrato lipídico bruto, os derivados obtidos e os padrões de colesterol, éster de colesterol, ergosterol, lanosterol, esqualeno e desmosterol foram injetados no equipamento. Após a injeção, a temperatura da coluna foi mantida a 50 °C por 1 minuto e então aumentada a 270 °C na razão de 10 °C/min e finalmente a 300 °C na razão de 1 °C/min. O fluxo do gás (He) foi mantido constante a 1.1 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 °C e 280 °C, respectivamente (Torres-Santos et al, 2009).

Na Central Analítica da UFRRJ foi realizada a variação das condições de análise, para a amostra derivatizada. Após a injeção, a temperatura da coluna foi mantida a 50 °C por 1 minuto e então aumentada a 270 °C na razão de 15 °C/min e finalmente a 290 °C na razão de 0,9 °C/min. O fluxo do gás (He) foi mantido constante a 1.02 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 280 °C. Os compostos foram identificados através dos tempos de retenção dos padrões e similaridade dos padrões de fragmentação através da utilização da biblioteca NIST 11.

2.2.5 Avaliação da toxicidade aguda (LC₅₀) e dose máxima de DMSO indicada para experimentos com *N. melleni*

Para a realização de experimentos *in vitro* com fármacos atuantes na via de biossíntese de colesterol, ou com extratos de plantas, foi necessário determinar a concentração máxima de DMSO suportada por *N. melleni*, solvente este comumente utilizado para promover a solubilização de compostos orgânicos em meio aquoso, para que se possa planejar os experimentos com segurança, com o mínimo de interferência do meio sobre os parasitos. Desta forma, visto a ausência destes dados na literatura, realizou-se a avaliação da toxicidade aguda (LC₅₀) e dose máxima de DMSO indicada para experimentos com *N. melleni*.

Amostras de *N. melleni* foram coletadas na fazenda marinha Pérola do Atlântico, através de banhos de água salgada com 1,2 mL/L de fenoxietanol (VAUGHAN *et al.*, 2008) com duração de cinco minutos, em exemplares adultos de *Rachycentron canadum* (Bijupirá)

mantidos sob condição de cultivo. Após a coleta, os parasitos foram transportados para o Laboratório de Pesquisa em Fitoquímica do Instituto de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), onde o experimento foi conduzido. O valor de LC₅₀ foi determinado através de regressão não linear pela utilização do programa GraphpadPrism 6.

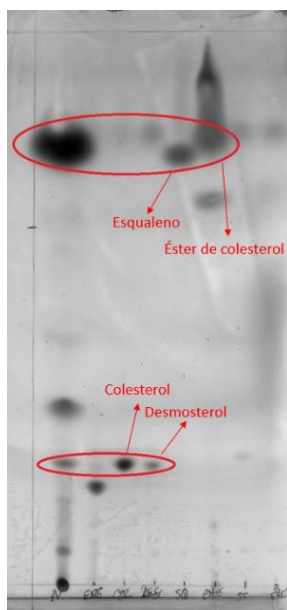
Cabe ressaltar que devido à logística envolvida na coleta na fazenda marinha situada Baía da Ilha Grande, no Município de Angra dos Reis, a qual envolveu deslocamento de barco da ilha ao continente, e o deslocamento de carro até a UFRRJ para início do experimento, transcorreu-se o tempo aproximado de 8 horas.

O experimento foi realizado em placa de 16 poços, com 5 animais por poço, nas concentrações de 0, 0,15, 0,3, 0,6, 1,25, 2,5 e 5,0% de DMSO em água com salinidade de 30‰, todos em triplicata. A cada hora, até a oitava hora de experimento, os animais foram avaliados em microscópio óptico, e o critério utilizado para definição de morte foi a ausência de movimento após estímulo físico, e desprendimento das ventosas, da superfície da placa (Transviña-Moreno *et al.*, 2017).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

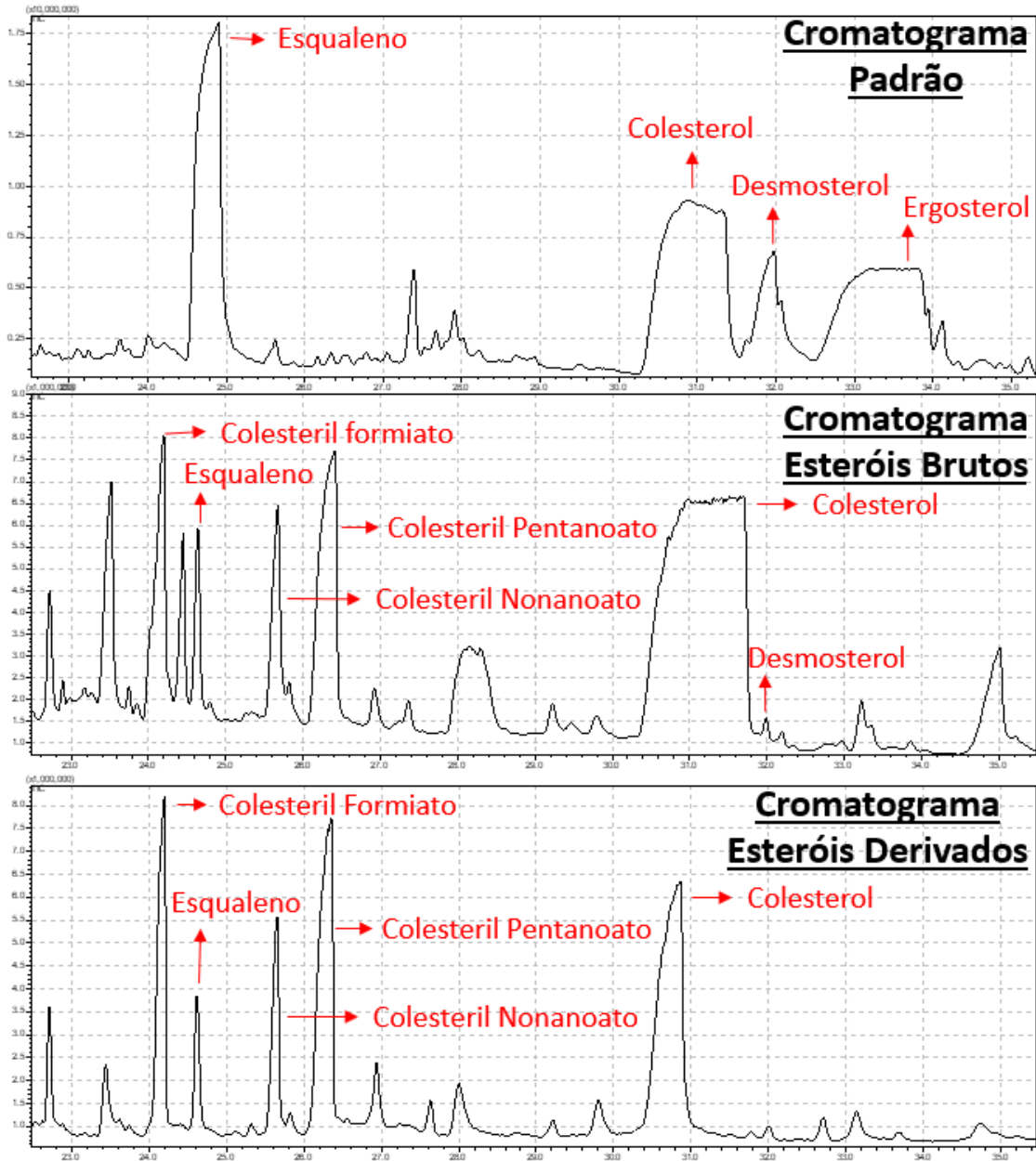
O extrato lipídico obtido não apresentou massa suficiente para ser quantificada em balança analítica, sendo assim não foi possível calcular seu rendimento. Já o perfil cromatográfico do extrato lipídico de *N. melleni* obtido por CCF (**Figura 33**), sugere que o mesmo pode apresentar esqualeno e desmosterol, importantes precursores do colesterol em sua via de biossíntese, além de colesterol e ésteres de colesterol.

Figura 33: CCF do extrato lipídico de *N. melleni*.



Nas análises realizadas por CG-EM (**Figura 34**), confirmou-se a presença de colesterol, esqualeno e desmosterol, conforme indicado na CCF, além de diferentes ésteres de colesterol.

Figura 34: Comparação entre o cromatograma dos padrões comerciais dos esteróis utilizados, do extrato lipídico bruto e do extrato lipídico silanizado de *N. melleni*.



As Figuras 35, 36 e 37 demonstram a similaridade entre os padrões de fragmentação do esqualeno, colesterol e desmosterol comerciais, utilizados como padrões, e os componentes da amostra, assim identificados.

Figura 35: Comparação entre o padrão de fragmentação do esqualeno comercial utilizado como padrão, e do componente da amostra, identificado como esqualeno.

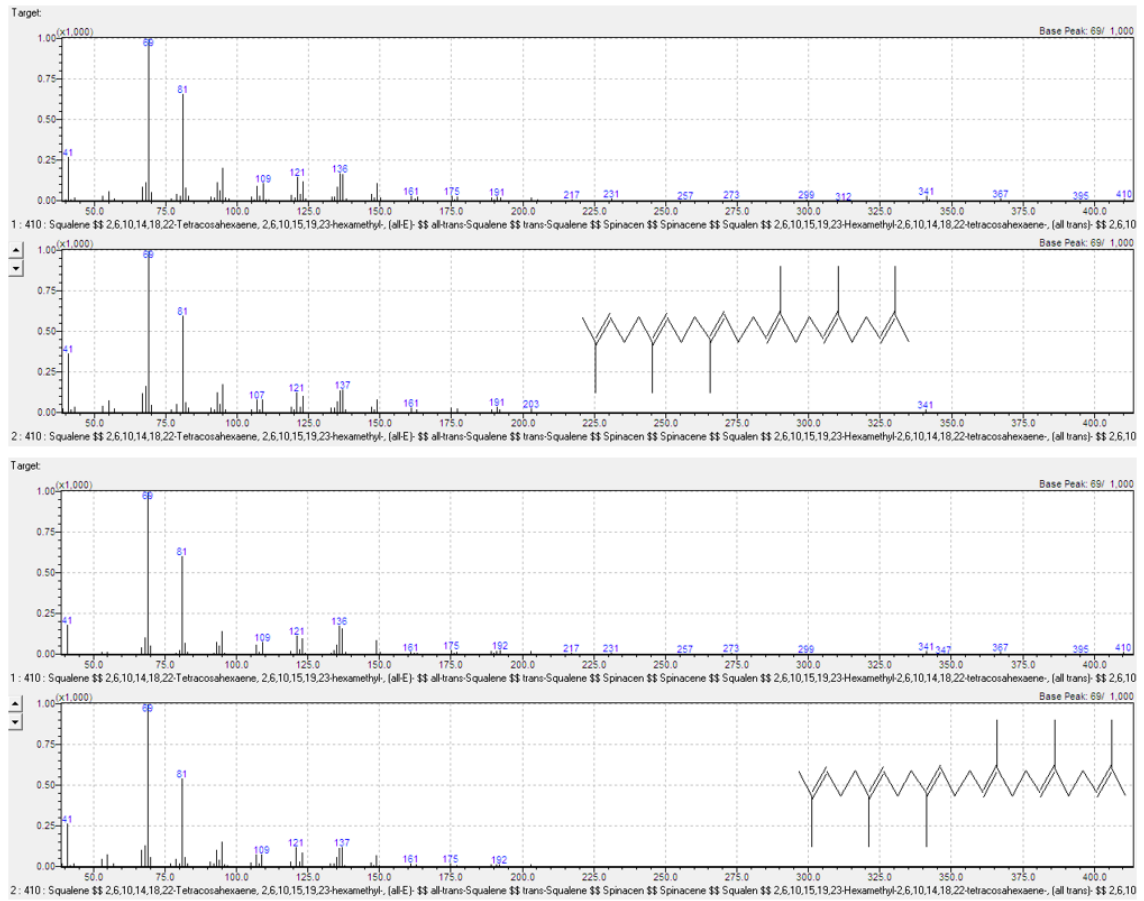


Figura 36: Comparação entre o padrão de fragmentação do colesterol comercial utilizado como padrão, e do componente da amostra, identificado como colesterol.

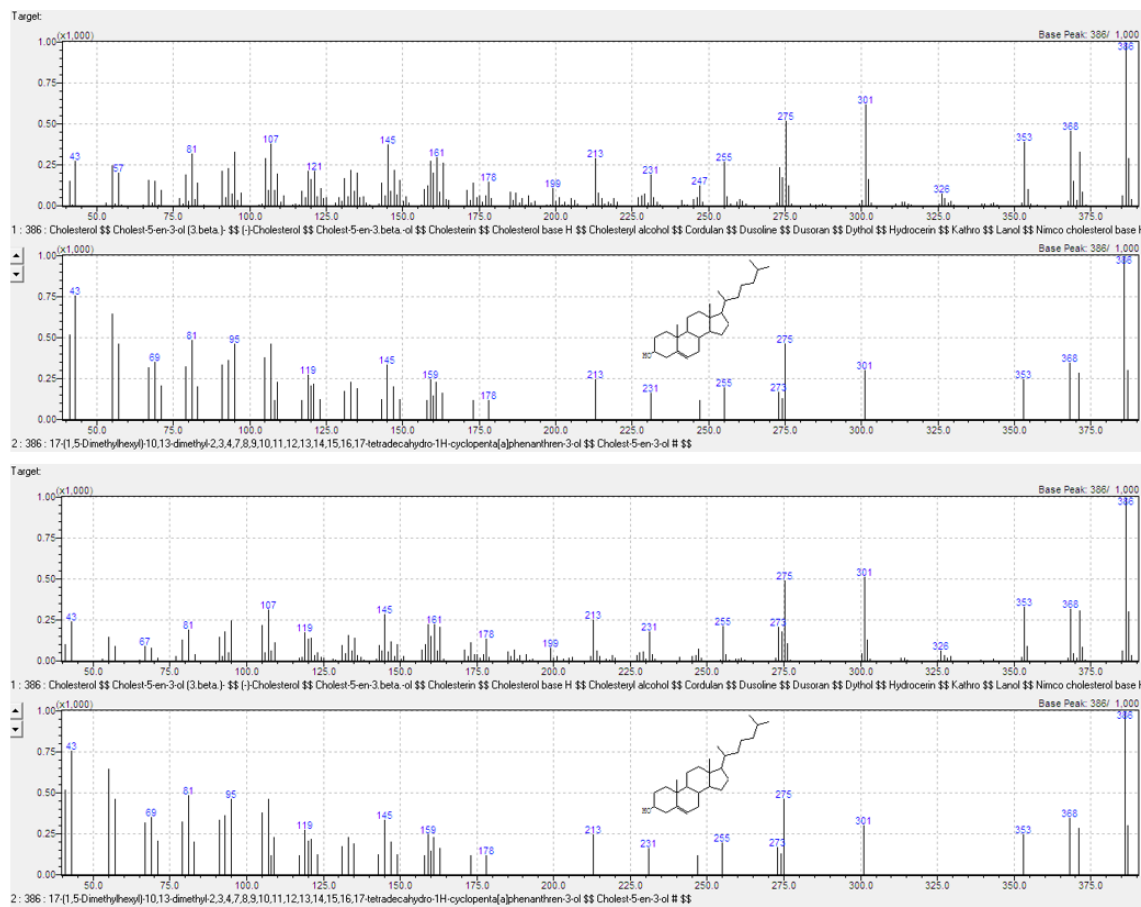
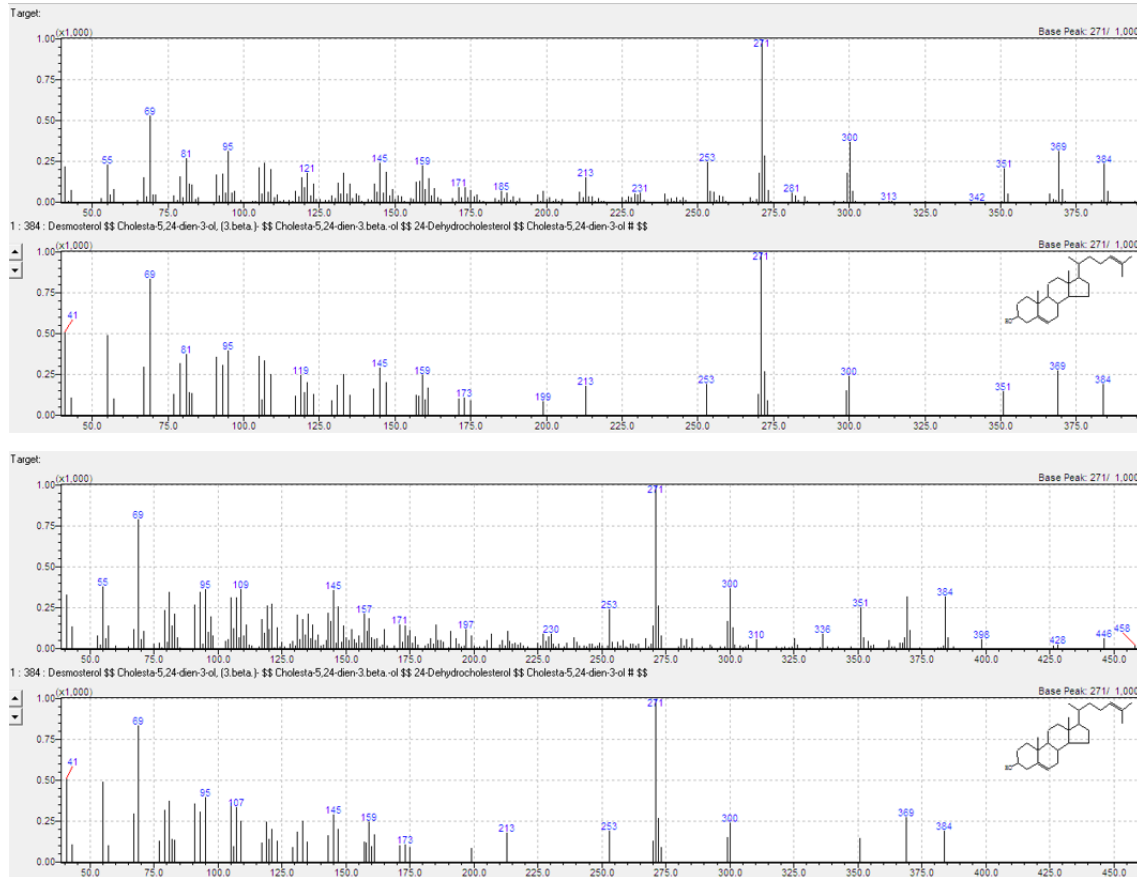


Figura 37: Comparação entre o padrão de fragmentação do desmosterol comercial utilizado como padrão, e do componente da amostra, identificado como desmosterol.



Desta forma, através do perfil cromatográfico obtido por CCF, da comparação dos tempos de retenção e da similaridade dos padrões de fragmentação frente ao cromatograma padrão obtidos por CG-EM, pode-se afirmar que *N. melleni* apresenta em seu perfil de esteróis, colesterol, os precursores esqualeno e desmosterol, além de diferentes ésteres de colesterol (**Tabela 5**). Estas informações sugerem que o parasito possua o complexo enzimático necessário para a produção endógena de colesterol, para sua esterificação e hidrólise de seus ésteres, forma pela qual diversas espécies armazenam o colesterol produzido e/ou captado do hospedeiro, para posterior utilização em caso de demanda energética (HUANG *et al.*, 1979).

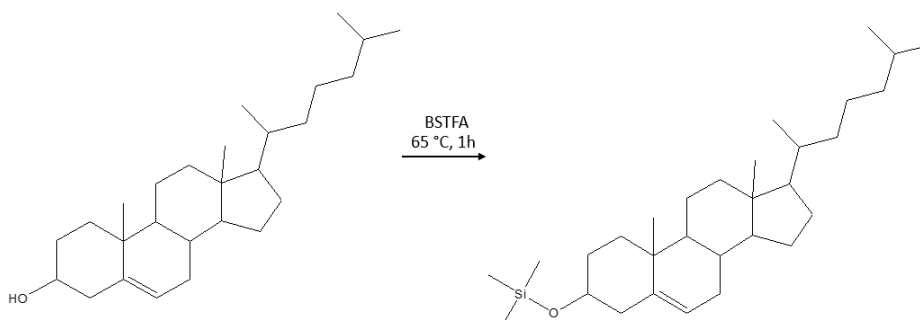
Tabela 5: Principais esteróis identificados no extrato lipídico de *N. melleni*.

COMPOSTO	MM	CONCENTRAÇÃO RELATIVA (%)	
		Esteróis brutos	Esteróis derivados
Colesteril formiato	414	10,01	17,91
Esqualeno	410	3,01	4,62
Colesteril nonanoato	526	5,45	9,58
Colesteril pentanoato	470	16,11	29,07
Colesterol	386	65,16	38,82
Desmosterol	384	0,26	-

MM = Massa molecular

A derivatização dos esteróis teve por objetivo reduzir as interações intermoleculares substituindo o hidrogênio das hidroxilas presentes nas estruturas dos esteróis, pelo grupo trimetilsilano (TMS) (**Figura 38**), o que ocasiona a redução do ponto de ebulição da amostra e o conseqüente afinamento dos picos do cromatograma obtido por CG.

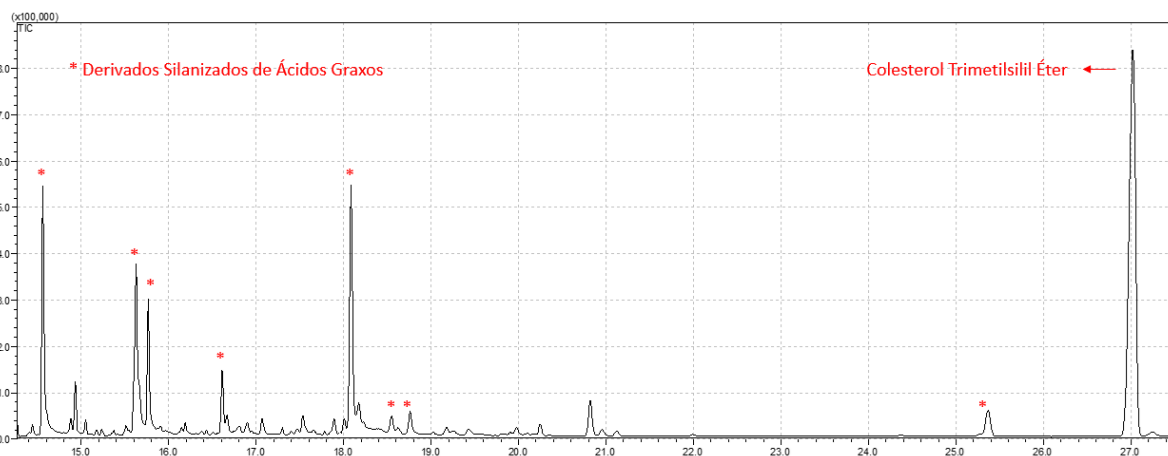
Figura 38: Reação de silanização do colesterol.



Embora se tenha observado o afinamento dos picos do cromatograma dos derivados, em relação ao do extrato lipídico bruto, através das condições utilizadas para a avaliação do perfil de esteróis não foi possível observar os derivados formados após a silanização. Observou-se ainda a redução da concentração relativa de colesterol, e o aumento das concentrações dos demais esteróis.

Diante destes resultados, optou-se por modificar as condições de análise, com o objetivo de identificar os derivados formados. Após a injeção, a temperatura da coluna foi mantida a 50 °C por 1 minuto e então aumentada a 270 °C na razão de 15 °C/min e finalmente a 290 °C na razão de 0,9 °C/min. O fluxo do gás (He) foi mantido constante a 1,02 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram de 280 °C. Através destas condições de análise, observou-se a presença do derivado silanizado do colesterol, e de diversos ácidos graxos (**Figura 39**).

Figura 39: Cromatograma dos derivados obtidos após silanização do extrato lipídico bruto de *N. melleni*.

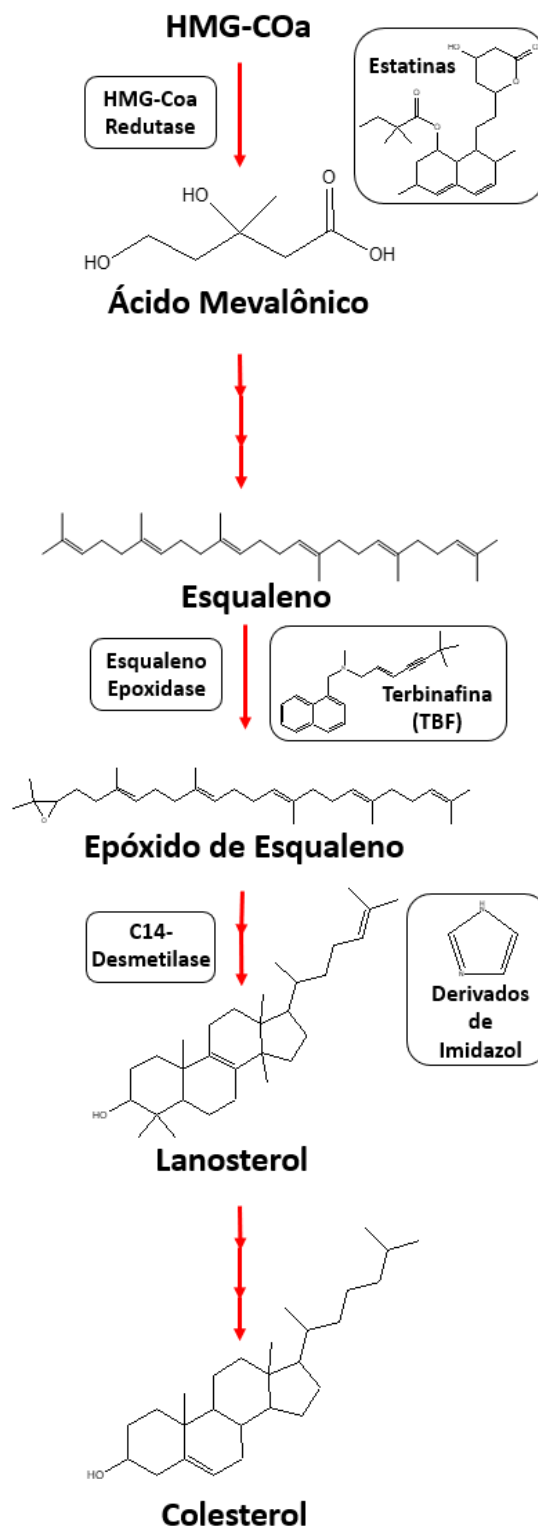


Por esta metodologia de análise foi possível detectar derivados de colesterol e de diversos ácidos graxos, mas não foi possível verificar a presença de esqualeno, ésteres de colesterol, e do derivado de desmosterol.

Estes resultados indicam que a derivatização não tenha sido completa, justificando a diminuição da concentração relativa do colesterol e o aumento dos demais compostos identificados no cromatograma dos derivados com a utilização da primeira metodologia adotada sendo esta, favorável à identificação de esteróis, conforme descrito por Torres-Santos *et al.* (2009), enquanto a segunda metodologia se mostrou aplicável às análises de perfil de ácidos graxos através de derivatização por agentes silanizantes.

Sendo o colesterol crucial à sobrevivência de diversos organismos, desempenhando funções estruturais e energéticas, as enzimas envolvidas em sua biossíntese (**Figura 40**), esterificação e hidrólise de seus ésteres, podem representar potenciais alvos farmacológicos para o controle de *N. melleni*.

Figura 40: Etapas da via de biossíntese de colesterol que envolvem enzimas utilizadas como alvo farmacológico, e os respectivos fármacos que as inibem.

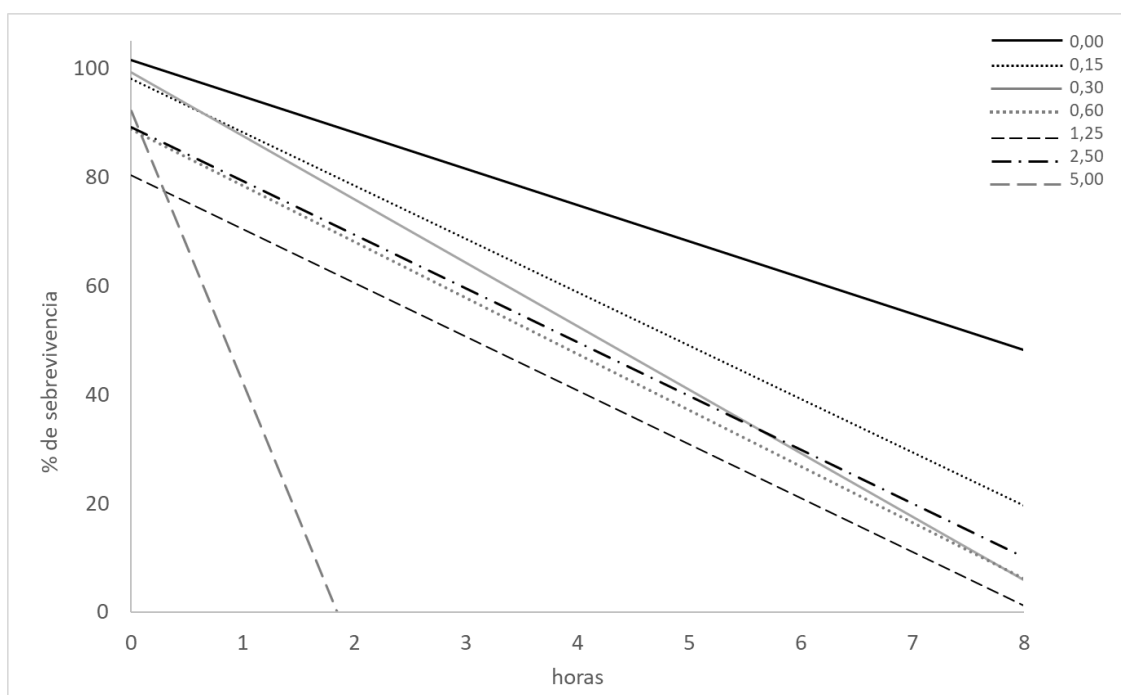


Fonte: Moliner *et al.*, 2009.

Testes biológicos são importantes para a descoberta de substâncias químicas que tenham ação no controle de parasitas. Esses testes devem oferecer condições de medição do índice de mortalidade dos parasitas mediante ao uso de solventes orgânicos durante o decorrer do experimento. Sendo assim, antes de se adotar um protocolo de teste biológico é de extrema importância observar a sensibilidade do parasita perante ao solvente mais adequado para promover uma solução no meio teste.

No experimento de avaliação da toxicidade aguda (LC_{50}) e dose máxima de DMSO indicada para experimentos com *N. melleni*, todos os modelos apresentaram valor de R^2 superior a 0,92 (**Figura 41**). O modelo apresentado para o controle se diferenciou dos demais (menor inclinação), sugerindo o efeito negativo de DMSO nos organismos.

Figura 41: Percentual de sobrevivência de *N. melleni* em meios com diferentes concentrações de DMSO, ao longo do tempo.

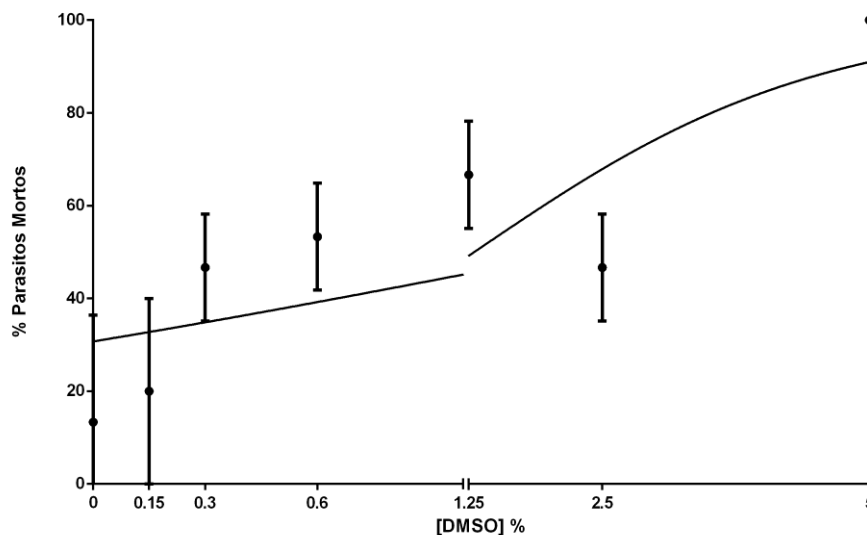


Com exceção de 0,30 e 5,0 %, a inclinação das retas relativas a todas as concentrações testadas foi a mesma, o que indica condição homogênea entre as populações testadas. A concentração de 5,0% promoveu morte de 100% da população na segunda hora após o início do experimento.

O tratamento de dados através de regressão linear foi realizado com o objetivo de observar o comportamento da inclinação das retas para cada concentração, dado que indica as condições de homogeneidade das populações testadas. No entanto, a determinação do LC_{50} foi realizada por regressão não-linear, através do programa GraphpadPrism 6.

A partir da terceira hora de experimento os parasitos entraram em letalidade (11 horas após a coleta), mesmo no tratamento controle, portanto o LC_{50} foi calculado para este tempo, sendo este igual a 2,3% (**Figura 42**).

Figura 42: Regressão não-linear do percentual de sobrevivência de *Neobenedenia* submetida a seis diferentes concentrações de DMSO (0,15; 0,30; 0,60; 1,25; 2,50 e 5,00%), além do controle (0,00 %), para a leitura realizada ao fim da terceira hora de experimento.



2.4 CONCLUSÕES

Através destes resultados, conclui-se que *N. melleni* apresenta em seu perfil lipídico, como principal componente esteroidal o colesterol, além dos precursores esqualeno e desmosterol, e de ésteres de colesterol, o que sugere que o parasito possua em seu complexo enzimático, enzimas responsáveis pela produção endógena de colesterol, esterificação para armazenamento como reserva energética, assim como enzimas responsáveis pela hidrólise destes ésteres. Desta forma, as enzimas envolvidas na via de biossíntese de colesterol podem representar potenciais alvos farmacológicos para o controle de *N. melleni*.

A presença destas enzimas e a consequente capacidade de biossíntese de colesterol pode ser confirmada através da análise genômica do parasito. No entanto, até o momento não constam nos bancos de dados de genomas, o sequenciamento genético completo desta espécie.

Embora tenha sido possível determinar o LC_{50} para a terceira hora de experimento devido à inviabilidade do controle, levando consideração o elevado desvio padrão entre as triplicatas realizadas, o planejamento inicial de 8 horas de experimento conforme relatos da literatura (Transviña-Moreno *et al.*, 2017), e o tempo transcorrido entre coleta e início do experimento, conclui-se que a logística envolvida na coleta e transporte, comprometeu a viabilidade dos parasitos, invalidando os resultados deste experimento. Desta forma, não foi possível dar sequência ao planejamento de avaliação da atividade de extratos e frações de algas marinhas, *in vitro*, contra adultos de *N. melleni*.

Estes resultados auxiliarão no planejamento para sua repetição, com a alteração de variáveis como a redução do tempo entre coleta e início do experimento, redução da concentração máxima de DMSO testada, com inclusão de concentrações intermediárias e o aumento do número de parasitos por poço.

Após a determinação da concentração máxima de DMSO à qual o parasito tenha resistência, poderá ser traçado um protocolo experimental para avaliar a ação de extratos de algas marinhas sobre *N. melleni*.

2.5 PERSPECTIVAS

Como sequência deste trabalho, planeja-se realizar o sequenciamento genético de *N. Melleni*, com o objetivo de confirmar a presença das enzimas envolvidas na biossíntese e de esterificação de colesterol, a repetição da avaliação do LC₅₀ em DMSO, assim como testes *in vitro* de resistência de adultos de *N. melleni* frente a fármacos já comercializados como inibidores de enzimas envolvidas na biossíntese e metabolismo de colesterol, e a extratos de macroalgas marinhas, como potencial fonte de compostos antineobenedenia.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade-Neto, V.V.; Cicco, N. N. T.; Cunha-Junior, E. F.; Canto-Cavalheiro, M. M.; Atella, G. C.; Torres-Santos, E. C. The pharmacological inhibition of sterol biosynthesis in *Leishmania* is counteracted by enhancement of LDL endocytosis. *Acta Tropica* 119, 194 – 198, 2011.

Bligh, E.G., Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 911–917, 1959.

Huang, W. Y., Meinschein, W. G. Sterols as ecological indicators. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 43, 739 – 745, 1979.

Moliner, C.; Raoult, D.; Fournier, P. E. Evidence that the intra-amoebal *Legionella drancourtii* acquired a sterol reductase gene from eukaryotes. *BMC Research Notes*, 2009.

Ohno Y, Kawano F and Hirazawa N (2009) The effect of oral antibiotic treatment and freshwater bath treatment on susceptibility to *Neobenedenia girellae* (Monogenea) infection of amberjack (*Seriola dumerili*) and yellowtail (*S. quinqueradiata*) hosts. *Aquaculture* 292, 248–251, 2009.

Pereira, E. L.; Miguel, A. L. R. Produção Industrial de Hormônios Esteroides. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, Três Corações, 15, 2, 411-435, 2017.

Sanches, E. G. Controle de *Neobenedenia melleni* (Maccallum, 1927) (Monogenea: Capsalidae) em Garoupa-Verdadeira, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), Cultivada em Tanques-Rede. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17, 3, 145-149, 2008.

Torres-Santos, E. C.; Sampaio-Santos, M. I. ; Buckner, F. S. ; Yokoyama, K. ; GELB, M. ; Urbina, J. A. ; Rossi-Bergmann, B. . Altered sterol profile induced in *Leishmania amazonensis* by a natural dihydroxymethoxylated chalcone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (Print), 63, 469-472, 2009.

Trasviña-Moreno AG, Ascencio F, Angulo C, Hutson KS Avilés-Quevedo A, Inohuye-Rivera RB, Pérez- Urbiola JC. Plant extracts as a natural treatment against the fish ectoparasite *Neobenedenia* sp. (Monogenea: Capsalidae). *Journal of Helminthology*, 2017.

Vaughan, D.B., Penning, M.R., Christison, K.W. 2-Phenoxyethanol as anaesthetic in removing and relocating 102 species of fishes representing 30 families from Sea World to uShaka Marine World, South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 75, 189–198, 2008.

CONCLUSÕES GERAIS

Através dos resultados obtidos, conclui-se que a crescente busca por compostos bioativos oriundos de produtos naturais marinhos é justificada tanto pela riqueza da biodiversidade marinha brasileira, quanto por ser uma área de pesquisa relativamente recente, com grande potencial para novas descobertas.

Observou-se a importância do conhecimento prévio, através de revisões de literatura, dos tipos de compostos que apresentam atividade biológica frente ao parasito em questão (*L. infantum*), o que pode guiar o fracionamento dos extratos de forma adequada, permitindo assim maximização das possibilidades de obtenção da atividade biológica esperada.

Concluiu-se ainda, que *N. melleni* é capaz de produzir colesterol, molécula que desempenha funções vitais estruturais e energéticas em organismos eucariontes. Desta forma, as enzimas envolvidas na biossíntese de colesterol representam potenciais alvos farmacológicos para o controle deste parasito.

De acordo com a literatura, a produção de colesterol por diversos organismos, pode ser regulada pela utilização de fármacos com princípios ativos derivados de imidazol, sendo este um alcaloide. Assim sendo, justifica-se a utilização das frações básicas de algas bentônicas para testes *in vitro* frente a *N. melleni*, como estratégia para a obtenção de compostos bioativos contra o mesmo.