



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

MARLA JAYSSA CORRÊA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LEISHMANICIDA *IN VITRO* CONTRA
LEISHMANIA BRAZILIENSIS DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DAS
ALGAS MARINHAS *HYPNEA MUSCIFORMIS* E *SPHAEROCOCCUS
CORONOPIFOLIUS***

FORTALEZA-CE

2023

MARLA JAYSSA CORRÊA DA SILVA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LEISHMANICIDA *IN VITRO* CONTRA *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DAS ALGAS MARINHAS *HYPNEA MUSCIFORMIS* E *SPHAEROCOCCUS CORONOPIFOLIUS*

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof^ª. Dra. Norma Maria Barros Benevides.

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Ticiane Monteiro Abreu.

FORTALEZA-CE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D11a da Silva, Marla Jayssa Corrêa.

Avaliação do potencial leishmanicida in vitro contra leishmania braziliensis dos polissacarídeos sulfatados das algas marinhas *Hypnea musciformis* e *Sphaerococcus coronopifolius*. / Marla Jayssa Corrêa da Silva. – 2023.

79 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides.

Coorientação: Profa. Dra. Ticiano Monteiro Abreu.

1. Efeito leishmanicida. 2. Carragenanas. 3. Protozoário. 4. Algas Vermelhas. I. Título.

CDD 572

MARLA JAYSSA CORRÊA DA SILVA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL LEISHMANICIDA *IN VITRO* CONTRA *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DAS ALGAS MARINHAS *HYPNEA MUSCIFORMIS* E *SPHAEROCOCCUS CORONOPIFOLIUS*

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Aprovado em 20/12/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Norma Maria Barros Benevides (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Ticianá Monteiro Abreu (Co-orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Marjory Lima Holanda Araújo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr^ª. Naya Lúcia de Castro Rodrigues
Externo

Aos meus pais

Por me fazerem sentir mais forte do que sou!

“Estou sempre fazendo aquilo que não sou capaz, numa tentativa de aprender como fazê-lo” (Vincent Van Gogh).

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, autor da vida, agradeço pela saúde, força e coragem depositadas em mim e pelo aprendizado ao longo de minha trajetória.

À Professora **Dra. Norma Maria Barros Benevides**, agradeço por me acolher em seu laboratório de maneira tão especial e pela confiança. Sempre que precisei, não mediu esforços para me ajudar na execução desse trabalho. Sou grata por todo cuidado e pelos ensinamentos obtidos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

A Universidade Federal do Ceará e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, por toda infraestrutura disponibilizada.

À Professora **Dra Ticiano Monteiro Abreu**, agradeço pela confiança e dedicação na execução desse trabalho. Sou grata por todo apoio, ensinamentos e disponibilidade na execução desse manuscrito.

À Professora **Dra Maria Jania Teixeira**, agradeço pelo compartilhamento de conhecimentos e orientações a mim concedidas por meio de sua vasta experiência com leishmaniose e pelo acolhimento no Laboratório Parasitologia do DPML-UFC.

Agradeço ao **Dr. Rui Felipe Pinto Pedrosa**, coordenador em Peniche-Leiria-Portugal do projeto “CROSS-ATLANTIC-Creating Opportunities from Seaweed Sulfated polysaccharides for Application in Therapeutics” em parceria com a Dr^o Norma Maria Barros Benevides coordenadora do referido projeto em Fortaleza-Ceará-Brasil, pelo envio de algumas espécies de algas marinhas da Costa litorânea de Portugal, onde a espécie *Sphaerococcus coronopifolius* foi utilizada nas atividades das pesquisas desse trabalho.

Aos meus pais, **Miran Corrêa** e **Jose Maria**, pelo apoio, compreensão e amor, vocês são minha maior motivação, sem vocês nada disso seria possível.

A toda minha **família** por todo incentivo e apoio.

Ao meu namorado, **Rodrigo Smith**, por sempre me incentivar, para que eu pudesse realizar o “meu melhor” em tudo que viesse fazer, por me ajudar a manter a calma e a paciência quando tudo estava pesado e cansativo, por escutar todas as minhas reclamações diárias, minhas explicações das apresentações orais (construiu conhecimento em bioquímica e patologia), e no final sempre sendo positivo e acreditando no meu potencial.

Aos **meus colegas** de laboratório de Carboidratos e Lectinas (CarboLec-UFC) por todos os momentos de ajuda e estudos no decorrer dessa caminhada.

Aos meus colegas de laboratório no DPML **Amanda Mesquita, Miguel Gomes, Sabrina Lourenço** pelos momentos de descontração e aprendizagem durante os experimentos.

Agradeço a **Raquel pinheiro** e a **Naya Lúcia**, por todo ensinamento e experiência compartilhada, vocês foram fundamentais para a execução desse trabalho, obrigada por se dedicarem e me ensinarem tanto.

As minhas amigas **Tawanny Borges** e **Ana Carolina Moreira**, vocês foram minha família longe de casa e dos meus, sou grata por serem minha rede de apoio mesmo que com punhos fragilizados, nós nos apoiamos. Obrigada pelas melhores risadas e histórias em Fortaleza.

Aos meus amigos que a bioquímica me presenteou **Gabrielle Oliveira** e **Sávio Justino**, pela amizade construída, por deixarem os dias no departamento mais leves. Caminhamos e estamos finalizando juntos essa jornada.

A **Isabelle Pereira** pelo acolhimento e suporte nos meus primeiros dias em fortaleza e por todo conhecimento compartilhado.

Agradeço todos que participaram dessa caminhada e apoiaram esse sonho, cada colega de pós-graduação e discente da Bioquímica ou Patologia.

Muito obrigada!

RESUMO

Os polissacarídeos sulfatados são moléculas complexas formadas por monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas e que possuem sulfato como substituintes. As algas marinhas são conhecidas como uma rica fonte de polissacarídeos sulfatados com efeitos benéficos à saúde. As espécies *Hypnea musciformis* e *Sphaerococcus coronopifolius* são macroalgas vermelhas fontes de diversos metabólitos de grande potencial para novas substâncias biologicamente ativas como os polissacarídeos sulfatados, ainda são pouco explorados. A leishmaniose é uma patologia causada pelo protozoário *Leishmania sp.* e acomete uma significativa parcela da população mundial, sendo uma doença de difícil tratamento e profilaxia. Por isso, faz-se necessária a busca de novas moléculas, que possam eliminar esses parasitos, levando ao controle dessa parasitose. Diante do exposto, no presente estudo avaliou-se potencial citotóxico e leishmanicida *in vitro* contra *Leishmania braziliensis* dos polissacarídeos sulfatados das algas marinhas *H. musciformis* e *S. coronopifolius*. Para tanto, foi realizado uma extração com a utilização da papaína. Os polissacarídeos sulfatados totais foram adicionados à suspensão de promastigotas por até 48h, e mensurado o efeito antipromastigota pela análise microscópica com Trypan Blue. Para avaliar o efeito contra as formas amastigotas, foram utilizados macrófagos J774 infectados com *L. braziliensis* e tratados ou não com PHM (5, 10 e 25 µg/mL) e PSC (5, 10, 25 e 50 µg/mL). Avaliou-se a citotoxicidade dos PST pelo ensaio de MTT, carga parasitária, dosagem de citocinas e NO após 24 e 48h de infecção. Dessa forma, as concentrações com menor citotoxicidade, foram selecionadas para dar continuidade dos experimentos. Os PST avaliados apresentaram efeito anti-promastigota, PHM e PSC, demonstraram melhor inibição dos parasitos (25 µg/mL; 74,03% ± 8,40%; 60,06% ± 7,66%; 48h). Contra as formas amastigotas, PHM e PSC (5µg/mL) reduzem a carga parasitária intracelular em 24 e 48h de incubação (redução máxima: 52,17%±1,49%; 45,29% ±0,74% respectivamente, acompanhado por um aumento na produção de NO (5µg/mL/48h: 5,34 µmol/mL; 5,64 µmol/mL). Observou-se significância dos níveis de IL-12, TNF α , IL-10 e IL-4 nos experimentos. Diante dos resultados obtidos, PHM e PSC apresentaram um efeito leishmanicida promissor *in vitro* contra com *L. braziliensis*, entretanto os mecanismos da função imunológica que indicam a ação dos polissacarídeos sulfatados é um processo complexo que pode ser regulado por uma ou mais vias.

Palavras-chaves: efeito leishmanicida; carragenanas; protozoário; algas vermelhas.

ABSTRACT

Sulfated polysaccharides are complex molecules formed by monosaccharides linked by glycosidic bonds and possessing sulfate as a substituent. Marine algae are known as a rich source of sulfated polysaccharides with beneficial health effects. The species *Hypnea musciformis* and *Sphaerococcus coronopifolius* are red macroalgae that are sources of various metabolites with great potential for new biologically active substances, such as sulfated polysaccharides, which are still poorly explored. Leishmaniasis is a pathology caused by the protozoan *Leishmania sp.* and affects a significant portion of the world's population, being a disease that is difficult to treat and prevent. Therefore, the search for new molecules that can eliminate these parasites, leading to the control of this parasitosis, is necessary. Given the above, this study evaluated the *in vitro* cytotoxic and leishmanicidal potential against *Leishmania braziliensis* of sulfated polysaccharides from the marine algae *H. musciformis* and *S. coronopifolius*. To this end, an extraction was performed using papain. The total sulfated polysaccharides were added to a promastigote suspension for up to 48 hours, and the antipromastigote effect was measured by microscopic analysis with Trypan Blue. To evaluate the effect against amastigote forms, J774 macrophages infected with *L. braziliensis* and treated or not with PHM (5, 10, and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and PSC (5, 10, 25, and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were used. The cytotoxicity of PSTs was evaluated by MTT assay, parasite load, cytokine and NO levels after 24 and 48 hours of infection. Thus, the concentrations with the lowest cytotoxicity were selected to continue the experiments. The PSTs evaluated showed anti-promastigote effect, PHM and PSC demonstrated better inhibition of the parasites (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 74.03% \pm 8.40%; 60.06% \pm 7.66%; 48h). Against amastigote forms, PHM and PSC (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) reduced the intracellular parasite load in 24 and 48 hours of incubation (maximum reduction: 52.17% \pm 1.49%; 45.29% \pm 0.74% respectively), accompanied by an increase in NO production (5 $\mu\text{g}/\text{mL}/48\text{h}$: 5.34 $\mu\text{mol}/\text{mL}$; 5.64 $\mu\text{mol}/\text{mL}$). Significant levels of IL-12, TNF α , IL-10, and IL-4 were observed in the experiments. Based on the results obtained, PHM and PSC showed a promising *in vitro* leishmanicidal effect against *L. braziliensis*; however, the mechanisms of immunological function that indicate the action of sulfated polysaccharides are a complex process that can be regulated by one or more pathways.

Keywords: leishmanicidal effect; carrageenans; protozoa; red algae.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Ciclo de vida da <i>Leishmania sp</i>	20
Figura 2	– Alga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen) Lamouroux.....	27
Figura 3	– Alga marinha vermelha <i>Sphaerococcus coronopifolius</i> Stackhouse.....	28
Figura 4	– Unidades repetidas presente nas carregenas de algas vermelhas. A unidade B consiste de α -D ou α -L galactopiranosose	29
Figura 5	– Estruturas químicas básicas repetitivas de carragenanas	30
Figura 6	– Estrutura química básica repetitiva de agaranas, com unidades D- e L alternantes	32
Figura 7	– Fluxograma de obtenção dos PST das algas marinhas vermelhas	38
Figura 8	– Avaliação da citotoxicidade de PHM em macrófagos <i>in vitro</i>	45
Figura 9	– Avaliação da citotoxicidade de PSC em macrófagos <i>in vitro</i>	46
Figura 10	– Avaliação da atividade leishmanicida de PHM contra as formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	47
Figura 11	– Avaliação da atividade leishmanicida de PSC contra as formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	48
Figura 12	– Carga parasitária em macrófagos infectados com <i>Leishmania braziliensis</i> e tratados com PHM.	50
Figura 13	– Carga parasitária em macrófagos infectados com <i>Leishmania braziliensis</i> e tratados com PSC.	51
Figura 14	– Concentração de óxido nítrico nos macrófagos infectados com <i>L. braziliensis</i> e tratados com PHM e PSC.	53
Figura 15	– Efeito de PHM na concentração de citocinas pró-inflamatórias em cultura de macrófagos infectados por <i>Leishmania braziliensis</i>	55
Figura 16	– Efeito de PHM na concentração de citocinas anti-inflamatórias em cultura de macrófagos infectados por <i>Leishmania braziliensis</i>	57
Figura 17	– Efeito de PSC na concentração de citocinas pró-inflamatórias em cultura de macrófagos infectados por <i>Leishmania braziliensis</i>	58
Figura 18	– Efeito de PSC na concentração de citocinas anti-inflamatórias em cultura de macrófagos infectados por <i>Leishmania braziliensis</i>	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies de <i>Leishmania</i> causadoras de leishmaniose tegumentar em humanos.....	21
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANF	Anfotericina B
BSA	Albumina sérica bovina
CARBOLEC	Laboratório de Carboidratos e Lectinas
CCP	Cloreto de cetilpiridínio
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GLU	Glucantime
ICNF	Conservação da Natureza e das Florestas
iNOS	Óxido Nítrico Sintetase induzida
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LC	Leishmaniose cutânea
LM	Leishmaniose mucosa
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LD	Leishmaniose disseminada
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
M Φ	Macrófago
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NEED	N-(1-naftil)-etilenodiaminadihidrocloro.
NK	Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
N.N.N.	Meio Neal, Novy & Nicolle
OMS	Organização Mundial de Saúde

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PST	Polissacarídeos sulfatados totais
PS	Polissacarídeos sulfatados
PHM	Polissacarídeos sulfatados totais de <i>H. musciformis</i>
PSC	Polissacarídeos sulfatados totais de <i>S. coronopifolius</i>
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
SBF	Soro bovino fetal
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	T regulatórias
Th	T Helper
TNF	Fator de necrose tumoral
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1	As Leishmanioses	17
2.1.1	<i>Ciclo biológico do Parasito</i>	18
2.1.2	<i>Leishmaniose Tegumentar (LT)</i>	20
2.1.3	<i>Imunopatologia da leishmaniose</i>	22
2.1.4	<i>Tratamentos das leishmanioses</i>	24
2.2	Algas marinhas.....	25
2.3	Polissacarídeos sulfatados: Aspectos gerais e estrutura química	28
2.3.1	<i>Atividades biológicas</i>	32
3.	OBJETIVOS.....	34
3.1	Geral.....	34
3.2	Específicos.....	34
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	MATERIAIS.....	35
4.1.1	<i>Algas Marinhas</i>	35
4.1.2	<i>Parasito</i>	35
4.1.3	<i>Reagentes e Meios de Cultura</i>	36
4.2	Métodos.....	36
4.2.1	<i>Extração de polissacarídeos sulfatados totais</i>	36
4.2.2	<i>Determinação de contaminantes proteicos</i>	37
4.2.3	<i>Determinação do teor de carboidratos totais</i>	37
4.2.4	<i>Quantificação de sulfato livre</i>	38
4.2.5	<i>Ensaio de citotoxicidade em macrófagos dos polissacarídeos sulfatados totais</i>	38
4.2.6	<i>Avaliação do Efeito Leishmanicida in Vitro em Promastigotas dos PST</i>	39
4.2.7	<i>Avaliação do Efeito Leishmanicida in Vitro em Amastigotas dos PST</i>	40
4.2.8	<i>Dosagem de Óxido Nítrico</i>	40
4.2.9	<i>Dosagem de Citocinas</i>	41
4.2.10	<i>Análises estatísticas</i>	42
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42

5.1	Rendimento dos polissacarídeos sulfatados totais.....	42
5.2	Quantificação do conteúdo de carboidratos e quantificação do conteúdo de contaminantes proteicos	43
5.3	Avaliação da citotoxicidade dos polissacarídeos sulfatados.....	44
5.4	Avaliação do efeito leishmanicida em promastigotas	47
5.5	Avaliação do efeito leishmanicida em macrófagos infectados.....	50
5.6	Avaliação da concentração de óxido nítrico (NO) em macrófagos infectados com <i>L. braziliensis</i> e tratados com os polissacarídeos sulfatados	52
5.7	Efeito dos PHM e PSC sobre a concentração de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em macrófagos infectados com <i>Leishmania braziliensis</i>	55
6	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é considerada uma doença antroponozoonótica negligenciada e representa um grave problema de saúde global, tornando-se um dos principais problemas de saúde pública (PINHEIRO et al., 2021; HONG et al., 2020; WHO, 2019). Ela é uma doença causada por parasitos do gênero *Leishmania*, os quais são transmitidos ao homem pela picada de um flebotomíneo fêmea infectado (PINHEIRO et al., 2021). Em média, são registrados no Brasil cerca de 21.000 casos/ano, com coeficiente de incidência de 8,6 casos/100.000 habitantes, nos últimos 5 anos. A região Norte apresenta o maior coeficiente (46,4 casos/100.000 habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (17,2 casos/10.000 habitantes) e Nordeste (8 casos/100.000 habitantes) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Atualmente, a terapêutica contra a leishmaniose baseia-se na utilização de cinco fármacos: os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B e a sua formulação lipossômica, a miltefosina, a paromomicina e a pentamidina (SANTIAGO et al., 2021). Esses tratamentos, entretanto, apresentam várias inconveniências, como toxicidade, administração prolongada e surgimento de resistência por parte do parasito (TIWARI et al., 2018; COSTA et al., 2014). Portanto, para o melhor controle da leishmaniose, faz-se necessária a busca por novos fármacos, destacando-se, os obtidos através da prospecção de compostos de origem natural.

Nesse contexto, as algas constituem um grupo de organismos com ampla diversidade de formas, funções e fonte de metabólitos diversos, tais como os polissacarídeos sulfatados (LEANDRO et al., 2020; VASCONCELOS et al., 2018). Os polissacarídeos sulfatados têm recebido ampla atenção e são extensivamente estudados por pesquisadores bioquímicos e nutricionais, devido às suas diversas funções biológicas e seu potencial biotecnológico (SHASHIDHAR et al., 2015, SUN, 2011). Além disso, alguns polissacarídeos têm sido aceitos e usados como parte de remédios fitoterápicos (XIE et al., 2016).

Nesse contexto, uma vez que é de extrema importância à busca de novas fontes naturais que sejam eficazes contra os protozoários do gênero *Leishmania* e que apresentem mínimos efeitos adversos, o uso de polissacarídeos sulfatados algais surge como uma possível ferramenta para o controle dessa parasitose, uma vez que são polímeros facilmente disponíveis na natureza, não tóxicos, não onerosos, seguros, biodegradáveis e biocompatíveis (AHMADI et al., 2015).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 As Leishmanioses

A leishmaniose é uma doença infectoparasitária que resulta do parasitismo de hospedeiros vertebrados por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* (família Trypanosomatidae). Essa doença é uma zoonose transmitida aos seres humanos pela picada de insetos vetores fêmeas infectados pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, no Brasil, e pode evoluir para formas graves, apresentando elevada letalidade quando não tratada adequadamente (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2022; PINHEIRO et al., 2021; ALMEIDA et al., 2020; VASCONCELOS et al., 2018; STEVERDING, 2017).

A leishmaniose é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade e a existência de espécies do tipo *Leishmania* datam de tempos pré-históricos de 100 milhões de anos, documentada no trato alimentar de um inseto fossilizado (STEVERDING, 2017). Os parasitos do gênero *Leishmania* foram descritos pela primeira vez no Brasil em lesões de pele de pacientes, posteriormente descritas como “úlceras de Baurú” (São Paulo – Brasil), em 1909. Em 1911, o cientista brasileiro Gaspar de Oliveira Vianna (1885–1914), estudando espécies de *Leishmania* obtidos de uma lesão de pele, descreveu uma nova espécie que recebeu o nome de *Leishmania braziliensis* (STEVERDING, 2017; GOMES et al., 2014).

A leishmaniose é considerada uma doença antropozoonótica negligenciada e está incluída pela Organização Mundial de Saúde (OMS) entre as doenças endêmicas de maior relevância no mundo, representando um grave problema de saúde global, tornando-se um dos principais problemas de saúde pública (PINHEIRO et al., 2021; HONG et al., 2020; WHO, 2017). O negligenciamento de uma doença acarreta na segregação, periferia e esquecimento, seja pelos governos, pelos sistemas de saúde e pela indústria farmacêutica (ARAUJO et al., 2013).

Devido a grave problemática de saúde pública, rápida propagação e distribuição global, estima-se que anualmente são registrados no mundo cerca de 0,7 a 1,3 milhão de novos casos de leishmaniose. Entretanto, considerando haver notificação compulsória em apenas 32 países, o cenário real é certamente mais grave (WHO, 2023; SANTOS, et al., 2021; EVARISTO et al., 2021; GLANS et al., 2018). Na América do Sul, 97% dos casos notificados estão localizados no Brasil e, nos últimos 30 anos, o Nordeste Brasileiro tem sido considerado a principal região endêmica do país (EVARISTO et al., 2021; PAHO, 2019). A doença pode evoluir para formas graves e apresentar elevada letalidade quando não tratada adequadamente (ALMEIDA et al., 2020; VASCONCELOS et al., 2018; TAVARES et al., 2009).

O aumento do número de casos de leishmaniose observado nos últimos 25 anos em todo o mundo foi devido a vários fatores ligados à globalização, às mudanças climáticas e também fatores humanos como, por exemplo, desmatamento, urbanização, migração, os quais contribuem para a disseminação da leishmaniose, e negligenciamento das populações, uma vez que está intrinsicamente ligado à pobreza, realidade de um sexto da população mundial (STEVERDING, 2017; ARAUJO et al., 2013; TAYLOR et al., 2011).

2.1.1 Ciclo biológico do Parasito

O protozoário do gênero *Leishmania* possui um ciclo biológico heteroxênico, isto é, necessita da alternância entre hospedeiros vertebrados e invertebrados para completar o seu desenvolvimento, além disso, não ocorre a transmissão de pessoa para pessoa (LOPES et al., 2014; KAYE & SCOOT, 2011). Os hospedeiros invertebrados são flebotomíneos fêmeas hematófagos do gênero *Lutzomyia* (PINHEIRO et al., 2021).

Participam do ciclo duas formas biológicas principais: as formas promastigota e amastigota. As promastigotas são formas afiladas que apresentam um longo flagelo, são extracelulares, parasitam o trato digestivo dos hospedeiros invertebrados e é transmitida ao hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo (ALCOLEA et al., 2019; AWASTHI et al., 2004). As amastigotas são formas arredondadas ou ovoides, sem flagelo livre, são parasitos intracelulares obrigatórios no hospedeiro vertebrado, sendo encontradas em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM – macrófagos, neutrófilos e células dendríticas imaturas) (ALCOLEA et al., 2019; KAYE & SCOOT, 2011; AWASTHI et al., 2004).

O ciclo biológico desse parasito compreende duas fases principais (figura 1): a primeira fase ocorre quando flebotomíneos fêmeas durante o repasto sanguíneo adquire as formas amastigotas que, dentro da membrana peritrófica, transformam-se em formas promastigotas procíclica de crescimento exponencial, que se multiplicam dentro do intestino do vetor. Neste elas passam pela metaciclogênese, deixando de reproduzir-se e tornando-se promastigotas metacíclicas (formas infectantes para o hospedeiro vertebrado). Esse processo ocorre após as promastigotas terem sofrido modificações bioquímicas em sua superfície, perdendo, assim, sua capacidade de adesão ao epitélio do intestino médio do inseto. As promastigotas metacíclicas realizam a migração para a probóscide do inseto e, durante o repasto sanguíneo, são inoculadas no hospedeiro vertebrado (ROCHA et al., 2019; GLANS et al., 2018; CONCEIÇÃO & ALVES, 2014; BENNOUNA & DENKERS, 2005).

A segunda fase ocorre dentro do hospedeiro vertebrado, quando o vetor infectado se alimenta do sangue e injeta as formas infectantes promastigotas metacíclicas. Estas são, então, fagocitadas pelas células do SFM, principalmente macrófagos, onde mudam de forma para a amastigota, no interior de vacúolos parasitóforos, multiplicando-se rapidamente por fissão binária (ROCHA et al., 2019; LIESE et al., 2008).

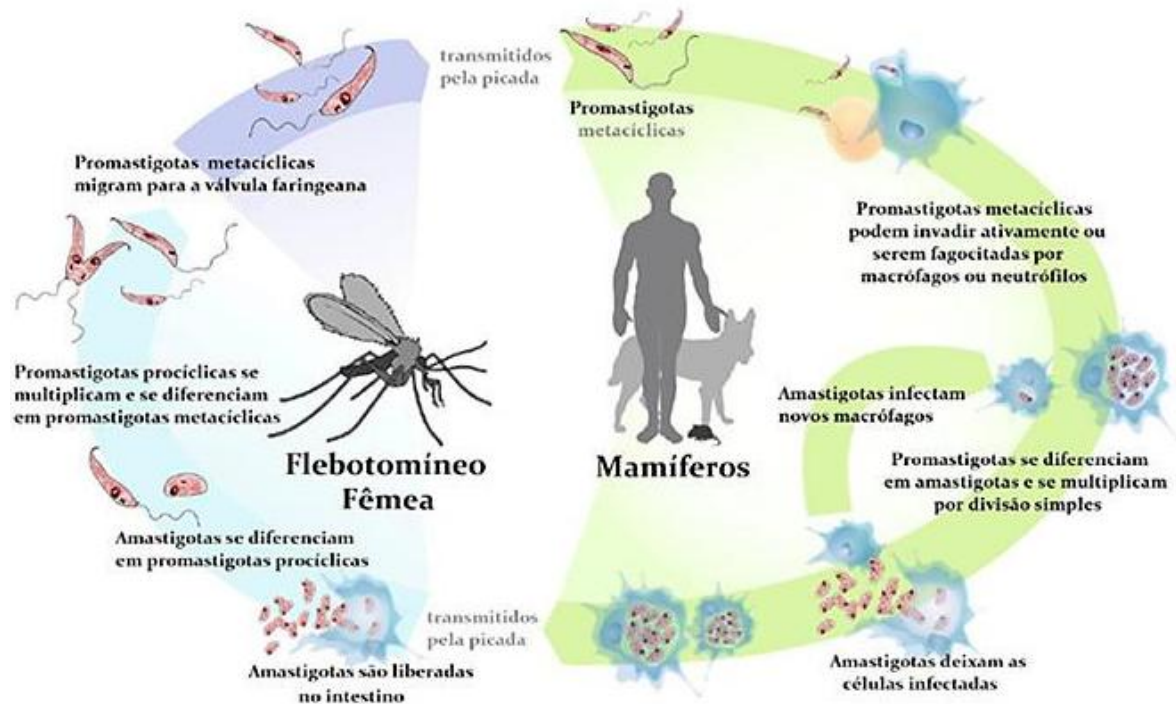
No interior dessas células, a multiplicação das amastigotas pode progredir até o rompimento da membrana da célula hospedeira, liberando os parasitos que, posteriormente, são fagocitados por outros macrófagos. As reinfecções podem persistir por todo o ciclo de vida do hospedeiro, caso não haja tratamento, ocasionando lesões cutâneas e/ou viscerais (CHEUKA et al., 2016; CONCEIÇÃO & ALVES, 2014; REY, 2008; BAÑULS et al., 2007).

Os componentes salivares do parasito possuem um papel importante na ativação da resposta imune do hospedeiro contra o mesmo. Apesar dos macrófagos serem células fagocitárias especializadas no combate a agentes infecciosos, esses parasitos desenvolvem mecanismos de defesa capazes de subverter sua capacidade microbicida e, dessa forma, conseguem sobreviver e multiplicar-se nesse ambiente potencialmente tóxico (BRASIL, 2017; KAYE; SCOTT, 2011).

O ciclo se completa quando a forma amastigota é transmitida para flebotomíneos fêmeas que se infectaram durante o repasto sanguíneo a partir de reservatórios infectados, no intuito de obter proteínas necessárias ao desenvolvimento de seus ovos (SACKS & KAMHAWI, 2001).

As apresentações clínicas da leishmaniose são classificadas em dois grandes grupos: a leishmaniose visceral (LV) ou calazar, a qual é considerada mais grave devido ao seu quadro clínico, que pode levar o paciente ao óbito, e a tegumentar (LT) (VASCONCELOS et al., 2018; CHEUKA et al., 2016; SCOTT & NOVAIS, 2016).

Figura 1: Ciclo de vida da *Leishmania sp.*



Fonte: Miguelferig (2013).

2.1.2 *Leishmaniose Tegumentar (LT)*

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença que acomete pele e mucosas e as manifestações clínicas dependem de alguns fatores, como a espécie de *Leishmania* envolvida e a relação do parasito com seu hospedeiro. Nas Américas, são reconhecidas 12 espécies causadoras de LT humana (tabela 1). No Brasil, as principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, dispõe maior abrangência, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (VASCONCELOS et al., 2018; BRASIL, 2017).

Tabela 1: Espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose tegumentar em humanos.

	<i>Viannia</i>	<i>Leishmania</i>
SUBGÊNERO	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. amazonenses</i>
	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. mexicana</i>
	<i>L. lainsoni</i>	<i>L. venezuelensis</i>
	<i>L. lindenberg</i>	<i>L. waltonia</i>
	<i>L. naiffi</i>	
	<i>L. pevuviana</i>	
	<i>L. panamensis</i>	
	<i>L. shawi</i>	

Fonte: STEVERDING, 2017 (adaptado).

As manifestações clínicas da LT podem apresentar formas diferentes (ROCHA et al., 2019; BARROSO et al., 2018; SANTOS, 2018; BRASIL, 2017; COSTA et al., 2009; MINODIER & PAROLA, 2007; GONTIJO & CARVALHO et al, 2003):

- A forma cutânea (LC) ou cutânea localizada (LCL) apresenta lesões somente na pele, ocorrendo a formação de úlceras rasas, com bordas elevadas em moldura, inicia-se no local de inoculação das promastigotas infectantes e, em geral, são indolores. Todas as espécies de *Leishmania* que estão relacionadas ao comprometimento tegumentar podem ocasionar a LCL.
- A mucocutânea (LM) é considerada a forma mais grave da LT, é caracterizada por uma resposta imunológica e exacerbada, é caracterizada por infiltração celular acometendo as mucosas, principalmente nasal, formando lesões úlcero infiltrante. Tem como principal agente causador a *L. braziliensis*, podendo também ser causada pela *L. amazonensis*.
- A forma cutânea disseminada (LD) é caracterizada por lesões não contíguas, formadas pela disseminação do parasito por via linfática, hematogênica e também lesões acneiformes distribuídas em diversas regiões do corpo, ocorrendo, principalmente, em indivíduos imunossuprimidos. É uma forma de expressão clínica relativamente rara que pode ser observada em até 2% dos casos de LT. As duas espécies reconhecidas como causadoras são a *L. braziliensis* e a *L. amazonensis*.

- A forma cutânea difusa (LCD) representa uma forma clínica mais rara, caracteriza-se por lesões nodulares com grande carga parasitária podendo ser distribuídas por todo o corpo do indivíduo e geralmente não cicatrizantes. Nas Américas, está associada à *L. amazonensis*, podendo ser causada também pela *L. mexicana*.

A *L. (Viannia) braziliensis* foi a primeira espécie de *Leishmania* descrita e incriminada como agente etiológico da LT no continente americano. É a mais importante, não só no Brasil, mas em toda a América Latina. Tem ampla distribuição, desde a América Central até o norte da Argentina e está distribuída em todo Brasil (BRASIL, 2017). No Ceará, as formas tegumentares humanas têm como agente etiológico principal a *L. braziliensis*, espécie capaz de desenvolver quadros de LC, com lesões únicas ou múltiplas, ulceradas, e também com acometimento mucocutâneo, no qual pode haver, principalmente, o comprometimento das mucosas da orofaringe, com elevada morbidade (LEITE et al., 2012).

2.1.3 Imunopatologia da leishmaniose

A principal defesa do hospedeiro vertebrado contra *Leishmania* é a sua capacidade de ajustar a resposta imunológica mediada por célula, demonstrada pela proliferação de linfócitos e produção de altos níveis das citocinas inflamatórias interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), juntamente com o controle de respostas inflamatórias exacerbadas, tornando-a capaz de controlar ou até mesmo eliminar o parasito (SCHNORR et al., 2012; SILVA et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2006).

A resposta imune mediada por células T tem um papel fundamental no controle ou desenvolvimento da infecção e depende das citocinas secretadas pelas células da imunidade inata no início da infecção. Dependendo do estímulo recebido, as células T CD4⁺ naïve podem se diferenciar em células T auxiliares do tipo 1 (Th1) ou tipo 2 (Th2), caracterizadas pelo perfil de citocinas que produzem (OZAKY, 2018). As citocinas inflamatórias do perfil Th1, tais como IFN- γ e TNF- α , podem induzir sinergicamente a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio, principalmente, óxido nítrico (NO), pelos macrófagos, inibindo a replicação de *Leishmania* no fagolisossomo (KAPIL et al., 2018)

Assim, o IFN- γ liberado ativa os macrófagos, que são as principais células da linhagem monocítico-fagocitária parasitados por *Leishmania*, e seus mecanismos efetores parecem ser o principal responsável pelo controle desses parasitos (KAPIL; SINGH;

SILAKARI, 2018). O estímulo para a diferenciação das células T em Th1 na infecção por *Leishmania* é a interleucina (IL) 12, produzida pelos macrófagos e células dendríticas, que aumenta a expressão de outras citocinas, como IL-1 α , IL-18, IL-23 e IL-27 (OZAKY, 2018).

Citocinas derivadas de células T CD4⁺ do tipo Th2, tais como a IL-10 e o fator de crescimento transformante- β (TGF- β), que antagonizam os efeitos de IFN- γ e TNF- α , resultam em proliferação dos parasitos. Ademais, as células T regulatórias (Treg) também podem suprimir os efeitos do IFN- γ (GIUDICE et al., 2012). As células Th2 produzem as citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que induzem a produção de imunoglobulinas e a inibição da inflamação, promovendo o desenvolvimento da infecção (OZAKY, 2018).

Os macrófagos são importantes para a infecção por *Leishmania* eles podem ser invadidos pelos parasitos de duas maneiras: as promastigotas são fagocitadas diretamente ou através da captação de neutrófilos apoptóticos infectados (cavalos de tróia). Além disso, os macrófagos podem hospedar o parasito por um longo período de tempo, agir como células apresentadoras de antígeno e secretar moléculas que induzem a resposta inflamatória e podem eliminar esse parasito. (JAFARZADEH et al., 2019; SCORZA et al., 2017; GIUDICE et al., 2012). Para isso, o macrófago precisa ser ativado por linfócitos T que, irão secretar IFN- γ , aumentando a regulação da produção de NO pelos macrófagos (KALANTARI et al., 2014; RIBEIRO et al., 2014).

A ativação por citocinas inflamatórias, principalmente, IL-1 e TNF- α , podem estimular os macrófagos a gerar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, através da montagem da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase e ativação da óxido nítrico sintase induzida (iNOS), respectivamente. Essa ativação requer sinais, e o TNF- α age sinergicamente com o IFN- γ para induzir a produção de NO e a eliminação de amastigotas pelos macrófagos (JAFARZADEH et al., 2019; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

Embora IFN- γ e TNF- α sejam as citocinas chave no controle de parasitos ativando macrófagos infectados, para produzir efetores microbicidas que podem eliminar parasitos intracelulares, essas citocinas também medeiam o dano tecidual, havendo evidências de que o aumento da produção de IFN- γ e TNF- α está associado com o aumento da reação inflamatória e o desenvolvimento das úlceras cutâneas e lesões das mucosas, apesar do baixo número de parasitos detectáveis (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017; LEITE et al., 2012).

Portanto, o resultado das infecções tegumentares com *Leishmania* é consequência de um balanço entre fatores pró e anti-inflamatórios. Em pacientes infectados, a patogenia tecidual está associada a uma resposta imune vigorosa do tipo Th1 aos antígenos do parasito,

e o tamanho da lesão correlaciona-se diretamente com a magnitude da produção de TNF- α e com a frequência de linfócitos CD4 + do tipo Th1, produtores de TNF- α e IFN- γ (OLIVEIRA et al., 2011).

Uma propriedade interessante das infecções por espécies de *Leishmania* é a persistência do parasito, nos linfonodos, muito tempo após a cura clínica da infecção sintomática, uma propriedade que pode resultar em manifestações cutâneas posteriores, mas que também pode ser crítica para o desenvolvimento de proteção imunológica contra a reinfecção (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

Apesar de, no geral, a LT não causar risco de morte, as lesões desfigurantes causadas podem ter como consequência a estigmatização das pessoas afetadas, podendo resultar na exclusão, educação precária e perdas econômicas, tudo isso, em populações com recursos limitados. Pode, também, tornar-se disseminada e debilitante em pessoas imunodeprimidas (como pacientes afetados pelo vírus da imunodeficiência humana - HIV). Ademais, dentre os novos casos relatados anualmente, poucos recebem tratamento (CAETANO et al., 2019).

2.1.4 Tratamentos das leishmanioses

O tratamento atual da leishmaniose depende exclusivamente da quimioterapia, pois até o momento não existem vacinas preventivas nem terapêuticas (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). No Brasil, o antimoniato de meglumina (Glucantime®) é a droga de primeira escolha utilizada no tratamento da leishmaniose (GLANS et al., 2018). Administrada por via parenteral, apresenta toxicidade elevada e falha terapêutica significativa em casos mais graves (TEIXEIRA et al., 2023). Ademais, o tratamento com esse fármaco é caro e apresenta sérios efeitos adversos como febre, náusea, vômito, dor de cabeça, dores musculares ou articulares que requer um acompanhamento atento do paciente, exigem hospitalização para administração intravenosa, além de alta toxicidade cardíaca e hepática, e, às vezes, é ineficaz ou apresenta baixas taxas de cura para algumas espécies, além do aparecimento de cepas resistentes a essas drogas, o que tem sido um problema crescente nas áreas endêmicas para essa doença (MOLAIE et al., 2019; ARMAHA et al., 2018; COSTA et al., 2014).

Drogas de segunda linha, que são usadas em áreas onde a resistência ao antimônio é comum, tais como a anfotericina B e a sua formulação lipossômica, têm-se mostrado efetivas no tratamento da leishmaniose, porém são fármacos considerados de custo mais elevado e o seu uso requer hospitalização (VALADARES et al., 2011). A pentamidina pode ser usada no tratamento da leishmaniose tegumentar em áreas endêmicas dos continentes americano,

asiático e africano. Entretanto, comumente, o tratamento com pentamidina causa dor no local da injeção, náusea, dor de cabeça, sensação de ardor e hipotensão, além de erupções cutâneas, alterações no fígado, disfunções renais e, raramente, diabetes mellitus (IQBAL et al., 2016; DUTRA et al., 2016).

Além disso, a eficácia do tratamento também depende das espécies de *Leishmania* envolvidas na infecção, uma vez que algumas espécies são mais resistentes a alguns fármacos e talvez também por que essas medicações convencionais que afetam o crescimento do parasito não corrigem as variações imunológicas como os mecanismos de anergia presentes na forma LCD (BERBERT et al., 2018; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

Assim, devido às dificuldades inerentes ao tratamento da doença, aos efeitos adversos provocados pelos fármacos utilizados e ao aumento do número de casos de resistência do parasito, faz-se necessária a pesquisa por novas moléculas, principalmente, as de origem natural. Os produtos vegetais oferecem enormes possibilidades de descoberta de compostos novos e seletivos com pouca ou nenhuma toxicidade, que podem ter efeitos significativos no tratamento da doença, causando o mínimo de efeitos adversos no paciente (DIBYENDU et al., 2014). Dentre esses compostos de origem natural, estão os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas.

2.2 Algas marinhas

As algas marinhas são organismos fotossintéticos que possuem papel singular na sustentação do ecossistema e estão espalhados por toda faixa litorânea do mundo. Constituem um dos maiores produtores de biomassa do ambiente marinho, integram uma ampla diversidade de compostos e representam a base da cadeia alimentar nos oceanos, uma vez que outros organismos marinhos necessitam das algas para a obtenção de energia (SALEHI et al., 2019; SAMARAKOON & JEON, 2012).

O habitat das algas marinhas é predominantemente marinho, podendo ainda ser encontradas em ambientes úmidos como águas de estuários, dulcícolas, rios, lagos, mangues e até em fontes de águas termais, entretanto a sua distribuição depende da temperatura, salinidade da água e intensidade de luz solar (MAKKAR et al., 2016; PAL et al., 2014)

As algas macroscópicas são classificadas de acordo com a estrutura física, função e ciclo reprodutivo, a saber, são divididas em três grandes grupos (SALEHI et al., 2019; MAKKAR et al., 2016; NEGREIROS et al., 2015).

- Chlorophyta: possui coloração verde, principalmente, pela predominância das clorofilas a e b, apesar de também possuir beta-caroteno e xantofila. Os principais gêneros desse filo incluem *Ulva*, *Codium*, *Enteromorpha*, *Chaetomorpha* e *Cladophora*.

- Phaeophyta, com coloração marrom, principalmente pela presença dos pigmentos xantofila e fucoxantina. Seus principais gêneros incluem *Ascophyllum*, *Laminaria*, *Saccharina*, *Macrocystis*, *Nereocystis* e *Sargassum*.

- Rhodophyta, que possui coloração vermelha devido à predominância dos pigmentos ficoeritrina. Os principais gêneros de algas vermelhas incluem *Pyropia*, *Porphyra*, *Chondrus*, *Palmaria*, *Gracilaria* e *Hypnea*.

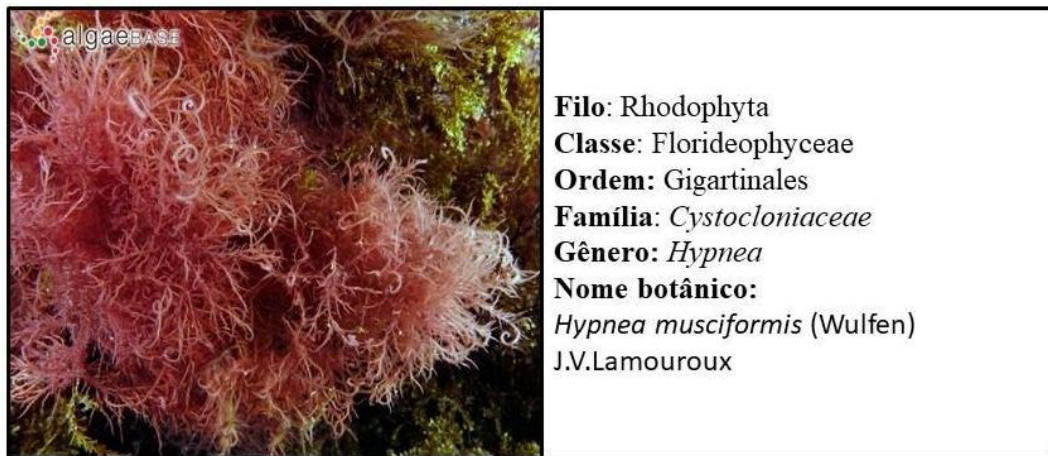
As algas vermelhas representam o grupo com grande diversidade de espécies, distribuindo-se desde regiões tropicais até ambientes mais frios. (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

As algas apresentam uma produção rica de diversos metabólitos como fitopigmentos (xantofilas e carotenóides), ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), destacando-se uma particularidade a presença de polissacarídeos sulfatados em sua composição, que constituem um extenso grupo de macromoléculas com uma vasta quantidade de valiosas propriedades biológicas (GANESAN et al., 2019; CHENG et al., 2016). A investigação de muitos de seus metabólitos tem despertado o interesse crescente em estudos nos últimos anos a fim de elucidar novas descobertas para aplicação em diversas áreas (RODRIGUES *et al.*, 2009). Desse modo para esse estudo foram selecionadas as espécies de macroalgas vermelhas *Hypnea musciformis* e *Sphaerococcus coronopifolius*.

A alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen) JV Lamouroux é a espécie mais conhecida do gênero *Hypnea* pertence à família Hypneaceae em geral (figura 2), entre 4 a 30 cm e 0,5 a 1,0 cm de diâmetro, apresentando morfologia dotada de ramos cilíndricos, com presença de ápices em forma de gavinha ou ganchos de seus ramos, cuja finalidade é de aderência ao substrato ou epifitando outras algas. (JESUS et al., 2013).

No Brasil, a distribuição geográfica da referida espécie ocorre em costas, estuários, em marés calmas e rasas, além de recifes e rochas, percorrendo desde o litoral do Rio Grande do Sul até o litoral do Estado do Maranhão. *H. musciformis* é valorizada na costa nordeste do Brasil e em todo o mundo devido a sua importância econômica como fonte de κ-carragenana e ι-carragenana, galactanas sulfatadas presentes na matriz extracelular (FAVERI et al., 2015; JESUS et al., 2013).

Figura 2: Alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux.

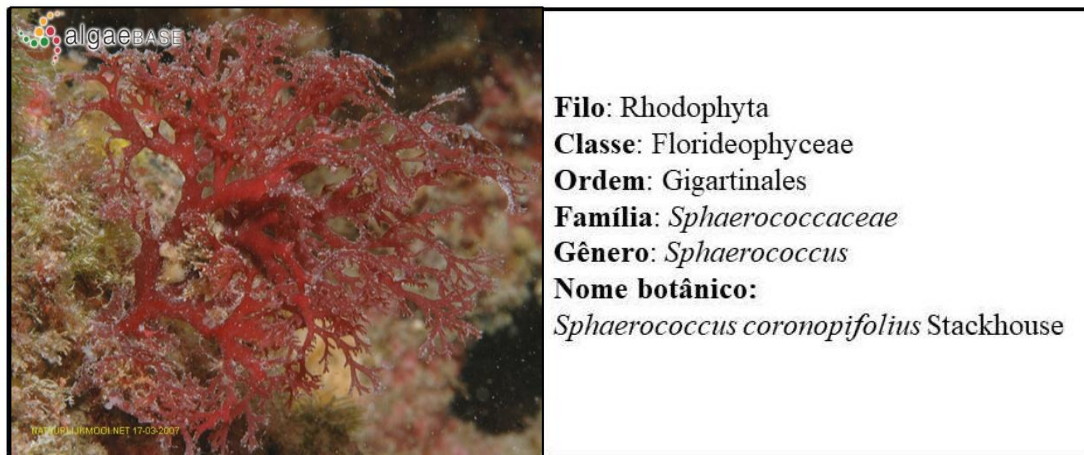


Fonte: Algabase

Sphaerococcus coronopifolius Stackhouse é uma alga vermelha pertencente ao filo Rhodophyta, família Sphaerococcaceae, apresenta morfologia estreita, comprimida, cartilaginosa, com frondes escarlates e eixos principais que são vermelho-acastanhado escuro (figura 3) (ALVES et al., 2018; SMYRNIOTOPOULOS et al., 2010). O habitat desta espécie raramente é em rochas no baixo litoral, mas é comum no sublitoral raso a uma profundidade de 15 m, e estão distribuídos no Atlântico Leste (Irlanda e Grã-Bretanha às Ilhas Canárias) e Mediterrâneo e Mar Negro, estão presentes também na costa de Portugal, nomeadamente no Algarve (ALVES et al., 2018; GUIRY et al., 2014). Não há registro na literatura sobre *S. coronopifolius* na distribuição geográfica brasileira.

De acordo com a literatura a alga *S. coronopifolius*, apresenta atividades biológicas com metabólitos bioativos, alguns deles já demonstraram atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (ETAHIRI et al., 2011), outros foram testados quanto à sua citotoxicidade contra linhagens celulares de câncer de pulmão humano (SMYRNIOTOPOULOS et al., 2010), atividade antibacteriana contra multirresistentes e cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (SMYRNIOTOPOULOS et al., 2010), potencial antitumoral e antimicrobiano (RODRIGUES et al., 2015) e efeitos citotóxicos dos bromoditerpenos (ALVES et al., 2022).

Figura 3: Alga marinha vermelha *Sphaerococcus coronopifolius* Stackhouse



Fonte: Algabase

2.3 Polissacarídeos sulfatados: Aspectos gerais e estrutura química

Polissacarídeos sulfatados (PS) são moléculas complexas formadas por polianiônicas, constituídas por unidades de glicídios unidas por ligações glicosídicas e apresentam grupos sulfatos, que conferem uma carga negativa (WIJESEKARA et al., 2011).

Os PS diferenciam-se dos outros polissacarídeos por apresentarem em sua composição grupos SO_3 substituindo o hidrogênio de umas das hidroxilas dos monossacarídeos, o que fez com que atualmente se passasse a dizer que os PS apresentam grupos sulfato (SO_4) ligados covalentemente a suas estruturas. (RICCIO & LAURITAN, 2019). Dependendo da unidade de repetição desses polímeros, eles podem ser classificados como homopolissacarídeos, quando são formados pela mesma unidade monossacarídica, ou heteropolissacarídeos. Além disso, eles podem apresentar diferenças na constituição de suas cadeias, podendo ser lineares ou ramificadas (HENTATI et al., 2020).

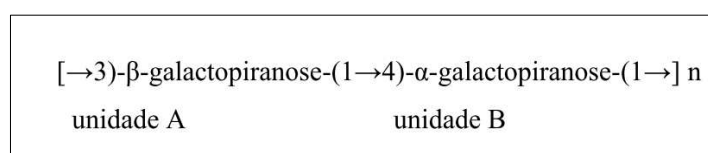
Os PS são sintetizados por diferentes organismos: algumas plantas, fungos, bactérias microrganismos, inclusive algumas microalgas, macroalgas e animais (LIBERMAN et al., 2020). Em algas, os polissacarídeos sulfatados são encontrados na matriz extracelular e possuem a função de proteção por meio da capacidade de retenção da umidade que promove um aumento na resistência contra a dessecação, essas macromoléculas podem desempenhar ações na interação e adesão celular formando uma barreira protetora contra patógenos (VAVILALA & SOUZA, 2015). Os polissacarídeos obtidos de organismos de origem marinha apresentam uma enorme variedade de estruturas e, por este motivo, são considerados

como uma extraordinária fonte natural de compostos para a prospecção de novos fármacos (SENNI et al., 2011).

Bem como as algas marinhas possuem as suas classificações, os PS são classificados devido as suas diferentes estruturas e conformações. Através das algas marrons, é possível obter substâncias denominadas fucanas (homofucanas) e as fucoïdanas (heterofucanas); as algas verdes apresentam polissacarídeos sulfatados mais heterogêneos que são ricos em galactose, manose, xilose, arabinose, glicose e ou ácidos urônicos. (JIAO et al., 2011; SALEHI et al., 2019). O número, a estrutura química e as características físico-químicas dos polissacarídeos de algas marinhas variam de acordo com a espécie algal, o estágio de vida da alga, a estação do ano, o local de coleta e os procedimentos de extração da referida molécula (CUNHA & GRENHA, 2016),

As algas vermelhas são excelentes fontes de agaranas e carragenanas, ambas são galactanas sulfatadas, e possuem variação enantiomérica, D- ou L-, na 4-ligada α -galactose (JIAO *et al.*, 2011; POMIN & MOURÃO, 2008). As carragenanas são formadas por cadeias lineares compostas por unidades dissacarídicas repetitivas de resíduos de D-galactose ligados. Na unidade A: (1 \rightarrow 3) - β -D- galactopiranoose; e, na unidade B: (1 \rightarrow 4) - α -D-galactopiranoose (LI *et al.*, 2014). Mostrando assim, um arranjo dissacarídeo alternante repetitivo entre as unidades A e B (AB), como representado na figura 4.

Figura 4: Unidades repetidas presente nas carragenas de algas vermelhas. A unidade B consiste de α -D ou α -L galactopiranoose.



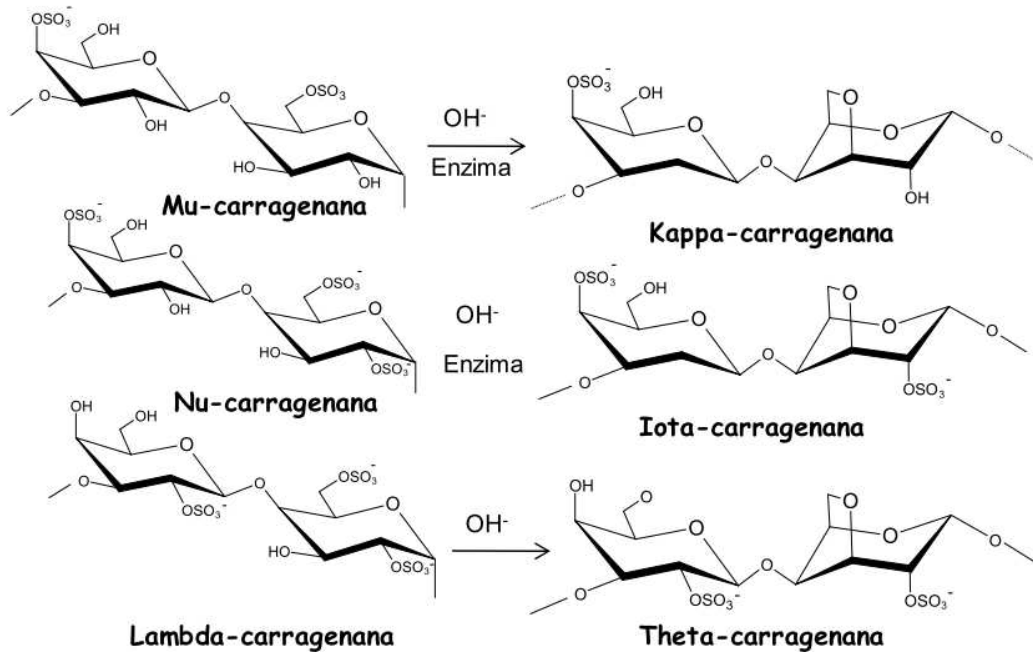
Fonte: COURA, 2012.

A unidade A sempre se apresenta na configuração enantiomérica D-, enquanto que a unidade B pode se apresentar tanto na configuração enantiomérica D- como na L-. Portanto, de acordo com a estereoquímica da unidade B, estas galactanas podem ser classificadas como carragenana, quando esta unidade pertencer à série D-, ou agarana, quando pertencer à série L- (STORTZ & CERZO, 1997).

As carragenanas apresentam padrões de classificação que se baseia na quantidade e posição dos grupos sulfatos e a presença da ligação 3,6 anidro na unidade B da D-Galactose.

Portanto, as carragenanas estão distribuídas em 4 tipos principais que são identificadas por prefixos gregos: kappa (κ), lambda (λ), Ômega (ω) e Beta (β) representadas na figura 5 (VASCONCELOS et al., 2015).

Figura 5: Estruturas químicas básicas repetitivas de carragenanas



Fonte: CAMPO et al., 2009.

A principal diferença entre as várias formas de carragenana está relacionada às características estruturais, incluindo o número e a posição dos grupos sulfato e a ocorrência de 3,6-anidro-D-galactose na unidade B da cadeia (GUANGLING et al., 2011).

As carragenanas do tipo Kappa (κ) apresenta sulfatação no C-4 da unidade A (1 \rightarrow 3- β -D-galp-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)- α -D-galp(1 \rightarrow), e a unidade B pode apresentar variações na posição dos grupos sulfatos recebendo classificações diferentes como as carragenanas iota (ι) apresentando a 3,6 anidrogactose-2-sulfato (NECAS et al., 2013).

As do tipo Lambda (λ) possui a sulfatação no C-2 de ambas (A e B) os resíduos de galactose e na unidade B ainda possui sulfatação no C-6. As lambdas carragenanas podem ainda receber classificação de Xi (ξ) apenas quando os dois resíduos A e B estão sulfatados no C-2 e as carragenanas Pi (π) e Theta (θ) que apresentam na unidade 4,6-O-(1-carboxi-etilideno-2-sulfato) e 3,6-anidrogactose-2-sulfato respectivamente. Importante ressaltar que a carragenana theta não é biossintetizada de forma natural nas algas, tornando-se necessário a utilização de tratamento alcalino da λ -carragenana (NECAS et al., 2013).

A família Beta (β) são carragenanas que não possuem sulfatação no resíduo de galactose da unidade A, apenas apresentam o resíduo de 3,6-anidrogactose na unidade B. A unidade B classifica os tipos de carragenanas beta, as α -carragenanas possuem o 3,6-anidrogactose-2-sulfato, já a carragenana gamma (γ) possuem um grupo sulfato no C-6, ainda faz parte dessa classificação a delta (δ) com sulfatação em 2 e 6-dissulfato. As carragenanas Omega (ω) possuem na unidade A grupos sulfatos no C-6 e 3,6-anidrogactose na unidade B. Os principais tipos de carragenanas comerciais são as kappa (κ), iota (ι) e lambda (λ) (VASCONCELOS et al., 2015; GUANGLING et al., 2011).

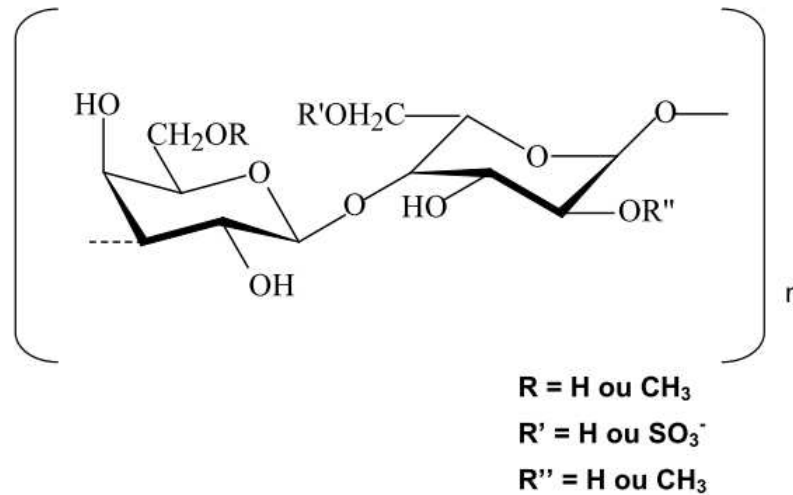
As carragenanas são utilizadas na indústria de alimentos devido as suas excelentes propriedades como espessante, gelificante e estabilizante. Além disso, esse composto é largamente utilizado, também, pela indústria farmacêutica na fabricação de cosméticos e como excipientes de medicamentos por sua ótima compatibilidade e viscoelasticidade (CAMPO et al., 2009).

As agaranas também conhecidas como ágar apresenta uma estrutura linear possuindo na unidade B o resíduo de α -L-galactopirranose que pode sofrer reação de ciclização no carbono 3 e 6 do anel pirranose formando a unidade B do dissacarídeo na forma de 3,6-anidro- α -L-galactose. Frequentemente os grupamentos de hidroxilas podem apresentar substituições por outros compostos como ésteres de sulfatos, ácido pirúvico e grupo metil (CIANCIA, QUINTANA, CEREZO, 2010).

As estruturas químicas das agaranas apresentam dois tipos de polímeros diferentes, a agarose que constitui um polissacarídeo neutro formado pela repetição do dissacarídeo (1-3)- β -D-galactose e (1-4)-3,6-anidro- α -L-galactose (figura 6). Esse composto é largamente utilizado em diferentes setores industriais: na indústria de alimentos, como na fabricação de gelatinas, queijos, enlatados e doces; na indústria farmacêutica, como laxantes, e agentes emulsificantes e estabilizadores de medicamentos; em pesquisas de laboratório como um meio de cultura e aplicações biotecnológicas, possuindo aplicações como géis de separação em análises de cromatografia de permeação em gel e técnicas de eletroforese (VASCONCELOS et al., 2015; MCHUGH, 2003).

O segundo polissacarídeo que constitui a estrutura das agaranas é a agarpectina ainda que é constituída por grupos aniônicos como sulfato, glucuronato e grupo metil. No geral, as agaranas possuem quantidades de grupo sulfato menor do que as carragenanas, porém apresentam diferentes aplicações industriais devido suas propriedades gelificantes (VASCONCELOS et al., 2015). As agaranas por apresentarem alta capacidade de gelificação, por isso são chamadas de hidrocolóides (USOV, 2011).

Figura 6: Estrutura química básica repetitiva de agaranas, com unidades D- e L alternantes.



Fonte: Holanda, 2007

Além desses dois grupos de galactanas, existe um outro grupo, denominados de galactanas híbridas que são polissacarídeos complexos que possuem a unidade B do dissacarídeo tanto na configuração D como na configuração L. Alguns estudos relatam que desconhecem se esses resíduos de dissacarídeos repetitivos presentes tanto nas carragenanas como nas agaranas pertencem a uma mesma molécula de polissacarídeo sulfatado ou a moléculas separadas formando agregados difíceis de romper (TAKANO et al., 2003).

Nas últimas décadas, os polissacarídeos sulfatados de origem algais têm atraído muita atenção como aditivos funcionais no campo farmacêutico, mas também nas indústrias alimentícias e cosméticas. Nesse contexto, a literatura tem mostrado o uso dessas moléculas como algo vantajoso, uma vez que são polímeros facilmente disponíveis na natureza, não tóxicos, não onerosos, seguros, biodegradáveis e biocompatíveis (AHMADI et al., 2015).

2.3.1 Atividades biológicas

Várias pesquisas recentes sobre as atividades biológicas dos polissacarídeos sulfatados de algas marinhas já foram descritas, tais como: imunoestimulante, antitrombótica e pró-trombótica, antitumoral, antiviral, pró-inflamatória, antinociceptiva, anti-inflamatória, antioxidante, anticoagulante, efeito antiedematogênico, efeito ansiolítico, cosmética, nutracêutica e dentre outros estudos. (FONSECA et al., 2008; SYNYTSYA et al., 2010; LINS et al., 2009; BANDYOPADHYAY et al., 2011; SILVA et al., 2010; ARAÚJO et al., 2017; CARNEIRO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2014; COURA et al., 2012; ARAÚJO et al., 2012;

VANDERLEI et al., 2011; NA et al., 2010; BARAHONA et al., 2011; LI et al., 2011; QUINDERÉ et al., 2013; MONTEIRO et al., 2015; SOUZA et al., 2018; RUOCCO et al., 2016).

Há relatos na literatura, que demonstram a capacidade que esses polissacarídeos têm de atuarem em sistemas de entrega de drogas. A aplicação específica de polissacarídeos em formulações farmacêuticas inclui o seu uso em implantes, filmes, micropartículas, nanopartículas e formulações de hidrogel (BENEKE; VILJOENM; HAMMAN, 2009).

Há dois elementos principais que contribuem para a importância e relevância dos biomateriais à base de polissacarídeos sulfatados com aplicação na biotecnologia farmacêutica: as ligações glicosídicas, que podem ser facilmente clivadas pelas enzimas hidrolases e, assim, contribuem para a biodegradabilidade; e a presença de grupos sulfato negativamente carregados, que permitem a funcionalização para aplicações específicas, além de uma interação privilegiada com epitélios carregados positivamente (RAVEENDRANS et al., 2013).

Os macrófagos expressam uma variedade de receptores de superfície celular, incluindo os específicos para os resíduos de manose, fucose, galactose e N-acetilglucosamina. Assim, os carboidratos podem ser usados como sinais de reconhecimento específicos para atingir macrófagos e desencadear respostas imunes. De fato, alguns estudos têm investigado os receptores de manose dos macrófagos como alvos, usando agentes baseados em carboidratos (RODRIGUES & GRENHA, 2015). Nesse contexto, os polissacarídeos sulfatados extraídos de algas marinhas podem ser de potencial uso para estimular o sistema imune ou controlar a atividade de macrófagos. Além disso, estudos têm mostrado que as carragenanas podem aumentar as atividades de ligação e morte por macrófagos (CUNHA & GRENHA, 2016).

Estudos que exploram o potencial desses polissacarídeos no controle da leishmaniose são escassos. Não há relatos na literatura sobre um possível efeito de polissacarídeos sulfatados totais de algas *H. musciformis* e *S. coronopifolius* contra *L. braziliensis*. Dessa forma, os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas podem surgir como uma nova fonte com grande potencial em aditivos naturais a ser investigada como um possível efeito leishmanicida.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar o potencial leishmanicida *in vitro* contra *Leishmania braziliensis* dos polissacarídeos sulfatados totais das algas marinhas *Hypnea musciformis* e *Sphaerococcus coronopifolius*.

3.2 Específicos

- Isolar polissacarídeos sulfatados de *H. musciformis* e *S. coronopifolius*;
- Caracterizar parcialmente a estrutura química dos polissacarídeos sulfatados totais das algas *H. musciformis* e *S. coronopifolius*;
- Avaliar a citotoxicidade em macrófagos dos polissacarídeos sulfatados de *H. musciformis* e *S. coronopifolius*;
- Analisar o potencial leishmanicida *in vitro* dos polissacarídeos sulfatados das algas *H. musciformis* e *S. coronopifolius* contra as formas promastigotas e amastigota de *L. braziliensis*;
- Avaliar o efeito do tratamento com polissacarídeos sulfatados das algas *H. musciformis* e *S. coronopifolius* *in vitro* na produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos infectados com *L. braziliensis*;
- Verificar o efeito do tratamento com polissacarídeos sulfatados das algas *H. musciformis* e *S. coronopifolius* na produção das citocinas IL-12, TNF- α , IL-4 e IL-10 por macrófagos infectados com *L. braziliensis*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 *Algas marinha*

A alga marinha *Hypnea musciformis* foi coletada na Praia das Flecheiras (3°13'06''S; 39°16'47''W), localizada no município de Trairí, a 130 km de Fortaleza, no litoral Oeste do Estado do Ceará, Brasil. Após as coletas, as algas foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas em recipientes isotérmicos para o Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CarboLec) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC. No laboratório, as algas foram limpas para a retirada de epífitas e/ou outros organismos incrustantes, lavadas com água destilada e armazenadas (-20°C) até o uso. Espécie está depositada na forma de exsicata (n° 56149) no Herbário Prisco Bezerra (UFC).

Amostras da alga marinha vermelha *Sphaerococcus coronopifolius* foram coletadas em Berlenga Nature Reserve, Peniche, Portugal com autorização prévia do Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF), e conduzidas ao Instituto Politécnico de Leiria em Peniche-Portugal. No laboratório, as algas foram lavadas com água destilada para retirada de areia, epífitas e/ou organismos incrustantes, e posteriormente liofilizadas e trituradas. Logo após, as algas foram enviadas ao Laboratório de Carboidratos e Lectinas (CarboLec), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.1.2 *Parasito*

A cepa de *L. braziliensis* (MHOM/BR/94/H3227) foi obtida de paciente com leishmaniose tegumentar americana (LTA) e sua caracterização foi feita por reação em cadeia da polimerase - PCR (CASTILHO et al., 2003). Os parasitos foram cultivados *in vitro* a 25 °C em tubos de ensaio com meio N.N.N. e meio Schneider suplementado (Sigma-Aldrich). Para os experimentos, foram utilizadas promastigotas até a 5ª passagem de cultivo, mantidas em meio Schneider (Aldrich-Sigma) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) inativado, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 20 mM de HEPES (Gibco). A viabilidade dos parasitos foi analisada pela motilidade dos mesmos ao microscópio óptico.

4.1.3 Reagentes e meios de cultura

Para a extração dos polissacarídeos sulfatados: álcool etílico 96%, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), acetato de sódio, cisteína, papaína, cloreto de cetilpiridínio (CCP), que foram obtidos da Cequímica LTDA. (Ceará, Brasil).

Para a avaliação do efeito leishmanicida: meio Schneider, os antibióticos penicilina e estreptomicina, 2-mercaptoetanol, trypan blue e L-glutamina que foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St Louis, U.S.A.); soro fetal bovino (SBF) CRIPION (São Paulo, Brasil) RPMI 1640, que foi obtido da Gibco (Grand Island, NY); meio ágar base sangue, que foi obtido da KASVI (Paraná, Brasil); kits para dosagem das citocinas IL-4, -10 e -12 e TNF- α , foram obtidos da BD Biosciences (U.S.A.).

Todos os demais reagentes utilizados no decorrer do trabalho foram de grau analítico. Para os respectivos experimentos, os meios de cultura foram utilizados puros ou suplementados, como descrito a seguir:

- Meio Schneider suplementado com 20% de SBF, urina humana estéril a 2% e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina). Foi mencionado como Schneider suplementado o meio contendo os componentes conforme descrito acima, e como Schneider aquele utilizado sem suplementos.

- Meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF, 50 μ M de 2-mercaptoetanol, 2mM L-glutamina, e antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina). Foi mencionado como RPMI suplementado o meio contendo todos os componentes acima e como RPMI aquele utilizado sem suplementos.

- Meio Neal, Novy & Nicolle (N.N.N.): Meio ágar sangue a 10%, foi suplementado com meio Schneider e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina).

4.2 Métodos

4.2.1 Extração de polissacarídeos sulfatados totais

A extração dos polissacarídeos sulfatados totais (PST) foi realizada seguindo protocolo descrito por Farias e colaboradores (2000). Inicialmente, a alga desidratada em temperatura ambiente e macerada com N₂ líquido, (5g) foi hidratada em 250 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 6,0 (proporção de 1:50, m/v), contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e cisteína (ambos 5 mM) acrescido de 510 mg de papaína (30 mg mL⁻¹).

A solução contendo a alga hidratada foi submetida a uma digestão proteolítica a 60 °C em banho-maria (MARCONI, modelo MA 159) durante 6 h e após esse período, em seguida, o homogenato foi filtrado em placa porosa e, os polissacarídeos sulfatados presentes no filtrado foram precipitados através da adição de 25 mL de cloreto de cetilpiridínio (CCP) a 10%, por 24 h. Após a precipitação, o extrato foi centrifugado (1000 x g, 20 min, 4 °C), o precipitado obtido foi lavado com 200 mL de CCP 0,05% e centrifugado nas mesmas condições acima descritas, e o precipitado obtido foi dissolvido em 160 mL de NaCl 2 M: etanol (100:15; v:v) e novamente precipitado através da adição de 300 mL de etanol absoluto gelado por 18h.

Após centrifugação nas mesmas condições acima descritas, o precipitado obtido foi lavado duas vezes com 300 mL de etanol a 80 % e uma vez com 300 mL de etanol absoluto, sempre seguidas de centrifugação. O precipitado final obtido após diálise contra água destilada, foi liofilizado e denominado de PST (figura 7). Posteriormente foi calculado o rendimento, segundo a equação 1, e o material resultante será armazenado devidamente.

Equação 1

$\text{Rendimento do PST\%} = \frac{\text{Massa (g) do PST obtido após a liofilização}}{\text{Massa (g) da alga seca utilizada na extração}} \times 100$
--

4.2.2 Determinação de contaminantes proteicos

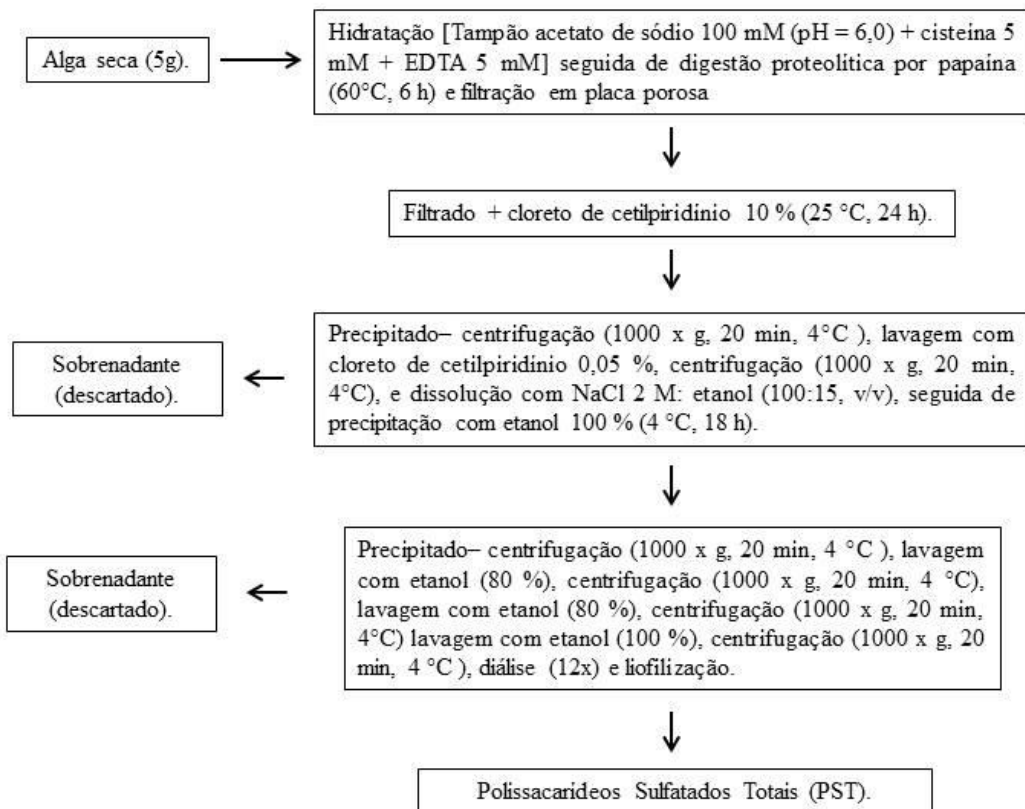
A determinação de contaminantes proteicos foi realizada seguindo o método de Bradford (1976). Foi preparada uma solução estoque de 1mg/mL de PST, e 1mL dessa solução foi adicionada a 2,5 mL do reagente de Bradford, após 10 minutos foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 595 nm. A concentração de proteínas foi estimada em relação à curva padrão obtida com albumina sérica bovina (BSA).

4.2.3 Determinação do teor de carboidratos totais

Para a análise do percentual de carboidratos totais dos PST, foi utilizado o método do ácido sulfúrico/UV (ALBALASMEH; BERHE; GHEZZEHEI, 2013). Foi preparada uma solução estoque de 1 mg/mL de polissacarídeos sulfatados a qual foi diluída em três proporções diferentes 1:10, 1:20 e 1:30. Após isso, foi adicionado 1 mL das diferentes diluições preparadas à 3 mL de ácido sulfúrico e agitadas por 30 segundos. Em seguida, a

solução foi colocada em banho de gelo por 2 min até estabelecer a temperatura ambiente de 25°C. Por fim, foi realizada leitura da absorbância a 315nm em espectrofotômetro (AMERSHAM BIOSCIENCES, modelo BIOTRAK II). Todas as análises foram realizadas em triplicata. A quantificação dos polissacarídeos foi realizada a partir de uma curva de calibração de concentrações crescentes de D-galactose (10 a 100 µg de galactose/mL).

Figura 7- Fluxograma de obtenção dos PST das algas marinhas vermelhas



Fonte: Elaborado pela autora seguindo o protocolo descrito por Farias e colaboradores (2000).

4.2.4 *Quantificação de sulfato livre*

O teor de sulfato livre foi determinado após hidrólise ácida (4 mg/mL de HCl 1 M, 5 horas, 105 °C) pelo método da gelatina-bário (DODGSON; PRICE, 1962) e monitorado em espectrofotômetro à 360 nm. O sulfato de sódio foi empregado como padrão.

4.2.5 *Ensaio de citotoxicidade em macrófagos dos polissacarídeos sulfatados totais*

Para avaliação da citotoxicidade, foram utilizados macrófagos da linhagem J774, obtidos da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) da Bahia (Brasil). Para os experimentos, foram utilizados 200 μL /poço de uma suspensão de 5×10^5 macrófagos/mL em meio RPMI suplementado, em placas estéreis de 96 poços. Inicialmente, as placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 , por 12 h. Posteriormente, serão removidos 20 μL de meio dos poços, com exceção dos controles de viabilidade, foram adicionados 20 μL dos polissacarídeos sulfatados de *H. musciformis* (PHM) e polissacarídeos sulfatados de *S. coronopifolius* (PSC) para as concentrações finais de 5, 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO_2 , por 24 e 48 horas.

Decorrido este tempo, cada poço foi lavado duas vezes com 200 μL de PBS estéril, adicionados 200 μL de meio RPMI suplementado e as placas incubadas mais uma vez em estufa de CO_2 por 90 minutos. Posteriormente, 100 μL do meio de cultura foram removidos em todos os poços e adicionados 100 μL da solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo) (1 mg/mL), sendo a placa reincubada em estufa de CO_2 por 4 horas. Encerrado o tempo de incubação, a solução de MTT foi removida das placas e adicionados 150 μL de DMSO puro, em seguida, a placa foi submetida à agitação pelo período de 10 min. A absorbância foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 570nm

Como controle, foram utilizados RPMI suplementado, DMSO puro e salina (NaCl 0,9%) estéril, diluente no qual os PST foram dissolvidas. Os experimentos foram realizados em triplicata. A viabilidade celular das amostras será calculada pela equação: % inibição = $[(\text{OD}_{\text{controle}} - \text{OD}_{\text{substância}}) / \text{OD}_{\text{controle}}] \times 100$, no qual OD representa a absorbância das amostras.

4.2.6 Avaliação do efeito leishmanicida in vitro em promastigotas dos PST

Para a avaliação desse efeito, as culturas contendo as formas promastigotas de *L. braziliensis* serão centrifugadas (3000 rpm; 15 min; 4°C), ressuspensas em meio Schneider, contadas em câmara de Neubauer e diluídas em meio Schneider suplementado, para obter a concentração de 10^7 promastigotas/mL.

Para os ensaios com promastigotas, os parasitos foram distribuídos (10^7 promastigotas/mL; 160 μL /poço) em placas de culturas de 48 poços e foram adicionados 40 μL dos PHM concentrações finais de 5, 10 e 25 $\mu\text{g/mL}$, e PSC para as concentrações finais de 5, 10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$.

As placas foram incubadas a 25°C em estufa BOD (Mod. 347F) por 24 e 48 horas. Após cada intervalo de tempo, a viabilidade das promastigotas foi avaliada pela contagem de formas viáveis utilizando o corante Trypan blue (0,2%) com leitura em câmara de Neubauer. Soluções controle empregadas: Anfotericina B (16 µg/ml); Meio Schneider suplementado (Parasitas não tratados).

4.2.7 Avaliação do efeito leishmanicida *in vitro* em amastigotas dos PST

Para a realização dos ensaios *in vitro*, os macrófagos da linhagem J774 foram descongeladas à temperatura ambiente e expandidas em garrafas de cultura celular estéreis contendo meio de cultura RPMI suplementado, em estufa de CO₂ (5% de CO₂ e 95% de umidade) à 37° C. Após atingirem a confluência, as células aderidas à superfície da garrafa de cultivo foram destacadas por meio de raspagem com “cell scraper” (TPP). A suspensão contendo as células foi coletada e centrifugada a 1500 rpm por 15 min a 5°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi ressuscitado em RPMI suplementado, contados em câmara de Neubauer e diluídos em meio RPMI suplementado, para a concentração de 1x10⁶ células/mL. A suspensão de macrófagos foi distribuída em placas de 24 poços, cada poço contendo uma lamínula de vidro redonda de 23 milímetros e incubados em estufa de CO₂, por 12 h.

As células não aderidas foram removidas por lavagem com RPMI e cultivadas com meio RPMI suplementado na ausência ou presença de *L. braziliensis* (10⁷ promastigotas/mL), numa proporção de 10 parasitos para 1 célula (10:1) por 12h, tempo suficiente para que ocorresse a infecção. Os parasitos extracelulares foram removidos por lavagem com RPMI (KARMAKAR *et al.*, 2011). Após esse período as células foram tratadas com fármaco de referência Glucantime® (4 mg/mL), PHM (5, 10 e 25 µg/mL) e PSC (5, 10, 25 e 50 µg/mL), sendo incubadas durante 24 e 48h (37° C, 5% CO₂ e 95% de umidade). Posteriormente, os sobrenadantes das culturas foram coletados para a dosagem de óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias (IL-12, TNF-α) e anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4).

Para quantificar o nível de infecção dos macrófagos, as lamínulas contendo as células foram lavadas com salina, e em seguida, fixadas e coradas com corante Giemsa (Sigma Aldrich). As lamínulas coradas foram montadas em lâminas de vidro e examinadas em microscópio óptico (ZEISS, Brasil), com magnificação de 100x em óleo de imersão. Cinquenta células foram examinadas e o número de amastigotas/50 células foi determinado. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.8 *Dosagem de óxido nítrico*

A produção de óxido nítrico (NO) foi medida pela dosagem de seus produtos de degradação, nitrito e nitrato, mais estáveis, utilizando o método colorimétrico com Reagente de Griess (GREEN *et al.*, 1982). Através da reação de Griess, o nitrito presente na amostra reage em meio ácido com uma amina aromática (sulfanilamida), produzindo um sal diazônico. Este reagirá com NEEDED (N-(1-naftil)-etilenodiaminadihidroclorato), formando um complexo estável de coloração púrpura, podendo assim ser quantificado.

Sobrenadantes da cultura de macrófagos foram incubados com o reagente de Griess (1:1 v/v), recém-preparado, por 10 min à temperatura ambiente. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm e a concentração de NO₂ determinada usando uma curva padrão de nitrito de sódio e expressa como µmol/mL. Para evitar interferência por NO₂, possivelmente presente no meio, foi adicionado um branco para cada experimento, utilizando RPMI suplementado, meio utilizado na cultura das células.

4.2.9 *Dosagem de citocinas*

Os níveis das citocinas IL-4, IL-10, IL-12 e TNF- α nos sobrenadantes obtidos da cultura de macrófagos foram determinados utilizando-se o método imunoenzimático (ELISA), como recomendado pelo fabricante dos kits (BD Biosciences, San José, CA, USA).

Resumidamente, a placa de 96 poços, fundo chato (Nunc), foram sensibilizados por 12 às 18h com o anticorpo de captura anti-citocina purificado na concentração determinada, a 4°C. A placa foi lavada, utilizando-se solução de lavagem (PBS com Tween 20 a 0,05%), em seguida, foi realizado bloqueio com PBS e soro fetal bovino (SBF 10%), posteriormente a foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente. Após esse período passou novamente por lavagem com PBS + Tween 20, foram adicionados o padrão e as amostras, e em seguida, incubada novamente por 2h à temperatura ambiente. Após esse período e nova lavagem com PBS + Tween 20, foi feita a incubação por mais 1h com o anticorpo de detecção conjugado à enzima peroxidase.

Após isso, a placa passou por nova lavagem e o substrato foi adicionado. Sendo incubada por 30 minutos, à temperatura ambiente e protegida da luz. A reação foi finalizada com ácido fosfórico (1:20) e a leitura realizada em leitor de ELISA (Molecular DevicesCorp.;

Sunnyvale, CA, USA), usando filtro de 450nm. Os resultados foram analisados utilizando-se o programa Softmax PRO (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

4.2.10 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism 6.0 Version for Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, USA). Em todos os testes *in vitro* os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e a comparação entre as médias foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Tukey, com exceção da dosagem de NO em que se empregou o post-teste Bonferroni. Em todos os testes utilizados, a significância mínima foi aceita quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento dos polissacarídeos sulfatados totais

O método de extração dos polissacarídeos sulfatados (PST) baseou-se na abordagem enzimática utilizando a papaína como a enzima proteolítica. A papaína é responsável pela quebra das proteínas presentes na parede celular da alga, viabilizando o isolamento dos polissacarídeos sulfatados totais.

O rendimento dos polissacarídeos sulfatados totais da alga marinha vermelha *H. musciformis*, o qual foi obtido a partir da extração enzimática foi de 43%. Este rendimento é considerado semelhante aos obtidos por Rodrigues et al., (2011) para a mesma espécie de alga marinha que apresentaram rendimento de 49%. No entanto, este rendimento foi superior quando comparado aos valores obtidos por Souza et al., (2018) e Brito et al., (2016) que apresentaram rendimento de 28% e 31,8%, respectivamente, no qual foi utilizado o protocolo de digestão enzimática com pH 5.0.

Seguindo o mesmo protocolo de extração a alga marinha vermelha *S. coronopifolius* teve um rendimento de 25%. Este rendimento foi semelhante aos polissacarídeos obtidos por Bouhlal et al. (2011), o qual apresentou um rendimento de 25,5%. No entanto o rendimento foi inferior se comparado com outra espécie *Gracilariopsis hommersandii* (37%) (Sánchez et al., 2019), no qual foi utilizado o protocolo de extração com água destilada (90 °C) sob agitação mecânica.

Os rendimentos obtidos das algas *H. musciformis* e *S. coronopifolius* em comparação com outras algas marinhas vermelhas, demonstrou-se superior, *Gracilaria birdiae* (4,66%) (VANDERLEI et al., 2011), *Gelidiella acerosa* (7,1%) (CHAGAS et al., 2020), *Pyropia yezoensis* (10%) (HE et al., 2020), *Gracilaria córnea* (15,70%) (RODRIGUES et al., 2017) e *Solieria filiformis* (19,14 %) (ARAÚJO et al., 2011).

Essa variação nos rendimentos destaca a influência da espécie de alga utilizada e a importância de ajustar os métodos de extração conforme a especificidade do estudo (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2003). Além disso, a variação no rendimento dos PST pode ser influenciada por diversos fatores, como o período de coleta, o estágio de vida da alga, variações sazonais e o tipo de método de extração utilizado. A literatura oferece diferentes métodos de extração cada um com o objetivo de extrair macromoléculas específicas (WASSIE et al., 2021).

Várias metodologias podem ser empregadas para a extração de polissacarídeos de algas marinhas, tais como aquosa a frio (MACIEL et al., 2008) e a quente (SOUZA et al., 2012), enzimática (FARIAS et al., 2000), por tratamento alcalino (STEPHANIE et al., 2010), dentre outras. Porém, a extração por digestão enzimática possui a propriedade de eliminar contaminantes proteicos (FARIAS et al., 2000). Ressalta-se que o método enzimático utilizado para a extração dos polissacarídeos produz carboidratos desprovidos de capacidade gelificante, possibilitando sua utilização em ensaios celulares. Em contraste, métodos de extração mais simples e economicamente acessíveis resultam em polissacarídeos com elevada capacidade de gelificação, o que compromete substancialmente a execução dos ensaios e a análise de sua atividade biológica.

5.2 Quantificação do conteúdo de carboidratos e quantificação do conteúdo de contaminantes proteicos.

O teor de carboidratos dos PST alga *H. musciformis* (43%) mostrou-se semelhante ao descrito por Rodrigues et al., (2011) (55%) e inferior ao encontrado por Brito et al., (2016) e Souza et al., (2016) (97% e 98%) respectivamente, para a mesma alga marinha. Enquanto que o teor de sulfato da alga em estudo (29%) foi superior ao apresentado por Souza *et al.*, (2018) (17,3%) e inferior ao descrito por Rodrigues et al., (2011) (31%). A alga *S. coronopifolius* apresentou teor de carboidratos (37%), o teor de sulfato obtido (25%) foi similar ao encontrado por Bouhlal et al. (2011) (24%).

Com relação ao conteúdo de carboidratos das algas *H. musciformis* e *S. coronopifolius* mostraram-se inferior ao encontrado por Coura et al. (2012) para a alga marinha vermelha *Gracilaria cornea* (68,8%), Vanderlei et al. (2011) (68,2%) para a *Gracilaria birdiae*, *Solieria chordalis* (51,58%) (STEPHANIE et al., 2010) e na *Pterocladia capillacea* (59,91%) (ISMAIL; AMER, 2021). Esses dados refletem a diversidade nos teores de carboidratos solúveis presentes em diferentes espécies de algas, destacando a importância de avaliar as características estruturais e bioquímicas de cada alga em pesquisas sobre polissacarídeos.

O teor de sulfato de ambas as algas foi similar aos descritos por Araújo et al. (2011) (27,75%) *Solieria filiformis*, e superior ao exposto por Coura et al., 2012 (15,66%) *Gracilaria cornea*, Vanderlei et al., (2011) (8,38%) e Silva (2019) (3%), ambos com a alga marinha vermelha *Gracilaria birdiae*. Outros trabalhos com algas vermelhas obtiveram resultados superior, Andrade (2016), que estudou a espécie de alga vermelha *Solieria filiformis*, obtendo um resultado equivalente de 35,89%, no estudo de Gong et al., (2021).

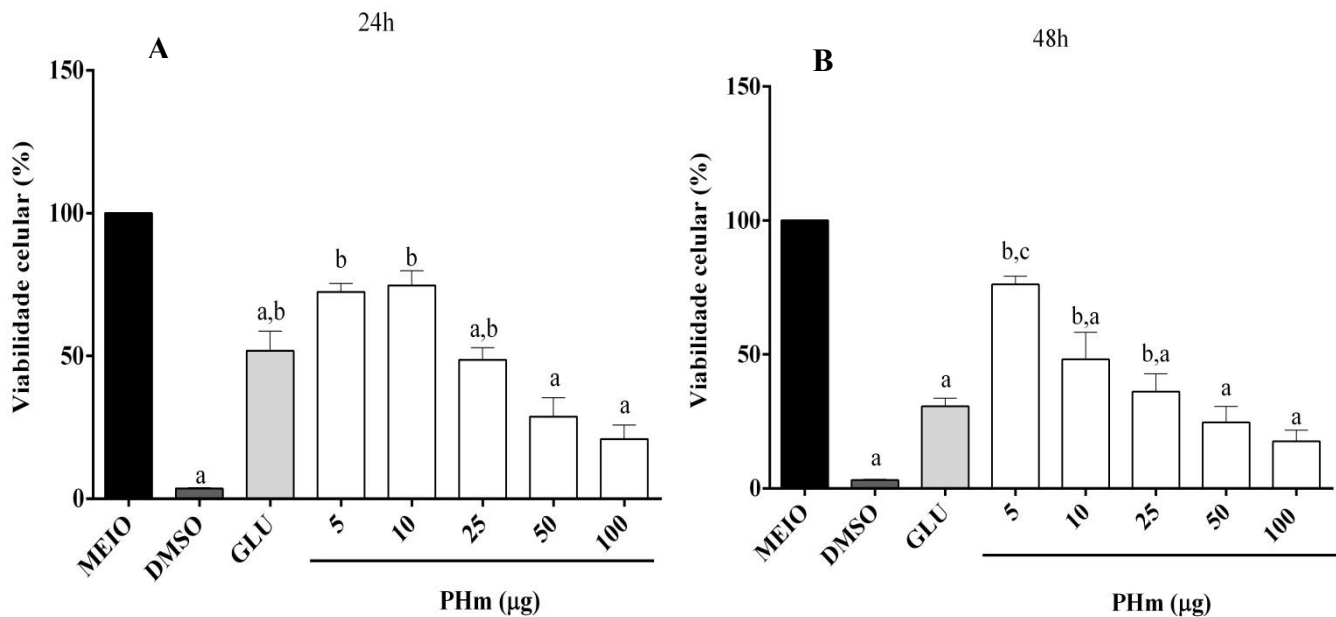
A análise pelo método Bradford (1976) a quantificação espectrofotométrica de proteínas nos PST de *H. musciformis* e *S. coronopifolius* indicou ausência de proteínas nas amostras. A ausência de proteínas no extrato evidencia a eficiência da técnica empregada no processo de extração. O que está em concordância com outros estudos de obtenção de polissacarídeos sulfatados de outras espécies de algas que utilizaram a mesma metodologia de extração enzimática empregada neste trabalho, como os estudos de Chagas (2018) e Ribeiro (2016). Esses resultados indicam a eficácia do método de extração utilizado.

5.3 Avaliação da citotoxicidade dos polissacarídeos sulfatados

Foi observado que nas concentrações de PHM (5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) no tempo de 24h apresentaram diferentes reduções na viabilidade celular (72,39%±0,10%; 74,69%±0,24%; 48,56%±0,07%; 28,72%±0,11%; 20,91%±0,08% respectivamente). Após 48h as concentrações apresentaram as seguintes reduções (76,24%±0,24%; 68,17%±0,19%; 65,17%±0,10%; 45,76%±0,05%; 30,19%±0,09% respectivamente).

As concentrações analisadas não apresentaram significância estatística em relação ao Glucantime. As concentrações 50 e 100 µg/mL, apresentaram redução a viabilidade celular dos macrófagos em mais de 50% nos dois períodos analisados. (figura 8 A e 6 B).

Figura 8: Avaliação da citotoxicidade de PHM em macrófagos *in vitro*.

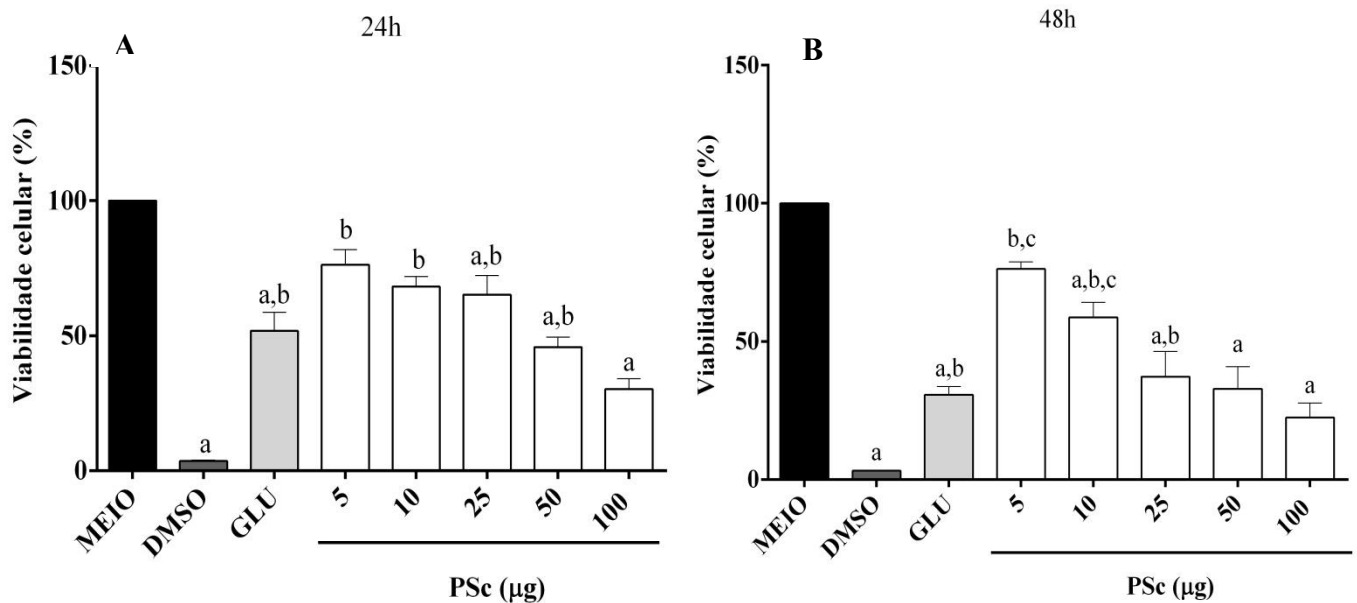


Fonte: Elaborada pela autora. Macrófagos da linhagem J774 foram incubados com DMSO 100%, glucantime (2mg), PHM (5, 10, 25, 50, 100 µg/mL) e, após 24 e 48 h de incubação, foi avaliada a viabilidade celular através do teste do MTT. MEIO: Células não tratadas (RPMI suplementado); DMSO 100%: padrão citotóxico. Realizado em triplicata e os resultados expressos como média ± E.P.M. * $p < 0,05$ vs MEIO ($p < 0,05$). a-MEIO; b-DMSO; c-GLU (ANOVA, Teste de Tukey).

Para PSC foi observado que nas concentrações analisadas (5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) 24h demonstrou as seguintes reduções de viabilidade celular (76,24%±0,24%; 68,17%±0,19%; 65,17%±0,10%; 45,76%±0,05%; 30,19%±0,09% respectivamente). Transcorrido o período de 48 horas, ocorreram as seguintes reduções nas concentrações (76,21%±0,14%; 58,67%±0,05%; 37,24%±0,17%; 32,75%±0,15%; 22,42%±0,10% respectivamente). As concentrações avaliadas não demonstraram significância estatística quando comparadas ao Glucantime nos períodos analisados. A concentrações de 100 µg/mL promoveu redução superior a 50% na viabilidade dos macrófagos (figura 9A e 7B).

O Glucantime® (GLU) apresentou toxicidade em todos os tempos analisados, esse medicamento apresenta sérios efeitos adversos *in vivo*, sendo demonstrado por apresentar elevada toxicidade *in vitro* (DUARTE et al.,2016). É importante destacar que, no presente estudo, empregou-se uma concentração de 2 mg/mL de Glu, enquanto as concentrações avaliadas dos PST foram vinte vezes inferiores à do fármaco padrão.

Figura 9: Avaliação da citotoxicidade de PSc em macrófagos *in vitro*.



Fonte: Elaborada pela autora. Macrófagos da linhagem J774 foram incubados com DMSO 100%, glucantime (2 mg/mL), PSc (5, 10, 25, 50, 100 µg/mL) e, após 24 e 48 h de incubação, foi avaliada a viabilidade celular através do teste do MTT. MEIO: Células não tratadas (RPMI suplementado); DMSO 100%: padrão citotóxico. Realizado em triplicata e os resultados expressos como média ± E.P.M. * $p < 0,05$ vs MEIO ($p < 0,05$). a-MEIO; b-DMSO; c-GLU (ANOVA, Teste de Tukey).

O ensaio do MTT é um método colorimétrico baseado na reação de redução do sal brometo de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), de coloração amarela, a um sal chamado de Formazan, de coloração roxa. A reação de redução é catalisada pelo sistema enzimático succinato-tetrazolredutase, que faz parte da cadeia respiratória mitocondrial. A atividade deste sistema enzimático reflete a funcionalidade metabólica das mitocôndrias, sendo a ausência da redução do MTT indicativo de diminuição de atividade metabólica e viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

A utilização de testes *in vitro*, por meio de ensaios de viabilidade celular, constitui o primeiro passo para a avaliação da compatibilidade biológica de uma substância e oferece informações importantes sobre a análise da biocompatibilidade entre diferentes materiais (ROGERO et al., 2003).

A avaliação de citotoxicidade em macrófagos é primordial, pois é parte do ciclo de vida do parasito no hospedeiro vertebrado, uma vez que a conversão em amastigota e posterior multiplicação ocorre no interior destas células (LIU & UZONNA, 2012; KOUTSONI et al., 2014).

Na literatura Alves et al., (2016) descreve que frações ricas em galactana sulfatada (extraídas através de digestão proteolítica, com proteases alcalinas) de *H. musciformis*

apresentou potencial citotóxico em células RAW tratadas 24h e 48h, as concentrações utilizadas no estudo Alves et al., (2016) foram 1,0 e 2,0 mg mL⁻¹. Os PS da alga *Dictyota caribaea* não terem apresentado citotoxicidade e foram capazes de ativar macrófagos RAW 264.7 (NAKAMURA et al., 2006).

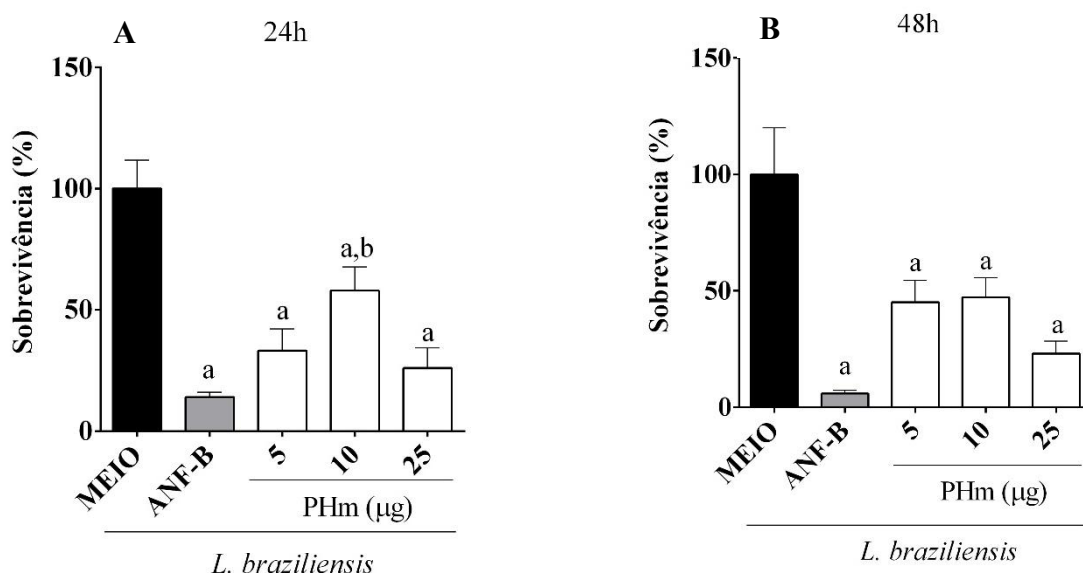
Diante dos resultados obtidos na avaliação da toxicidade de PHM e PSC em macrófagos, foi possível verificar que algumas concentrações dos PSTs demonstraram significativo efeito citotóxico sobre culturas de células. Os estudos prosseguiram investigando o efeito deste sobre macrófagos infectados por *L. braziliensis* e nas formas promastigota, utilizando as concentrações (5, 10 e 25 µg/mL) para PHM e (5, 10, 25 e 50 µg/mL) para PSC. As concentrações analisadas exibiram melhor viabilidade celular quando comparadas ao tratamento com Glucantime.

5.4 Avaliação do efeito leishmanicida em promastigotas

Foram avaliados *in vitro* o efeito leishmanicida de PHM e PSC nas concentrações (5, 10 e 25 µg/mL) e (5, 10, 25 e 50 µg/mL) respectivamente.

PHM quando testada nas primeiras 24 h, demonstrou efeito leishmanicida contra promastigotas em todas as concentrações testadas (66,87% ± 8,93; 42,09% ± 9,82%; 74,03 ± 8,40 % respectivamente), em relação ao controle Meio, apenas a concentração (10 µg/mL) apresentou significância estatística em relação à anfotericina B (57,91% ± 9,82%). Quando avaliada após 48 h, esse efeito continuou (54,90% ± 9,46%; 52,79% ± 8,44%; 76,92% ± 5,45% respectivamente), vale ressaltar que, neste tempo, a PHM não apresentou diferença estatística, quando comparada ao controle anfotericina B (figura 10 A e 8B).

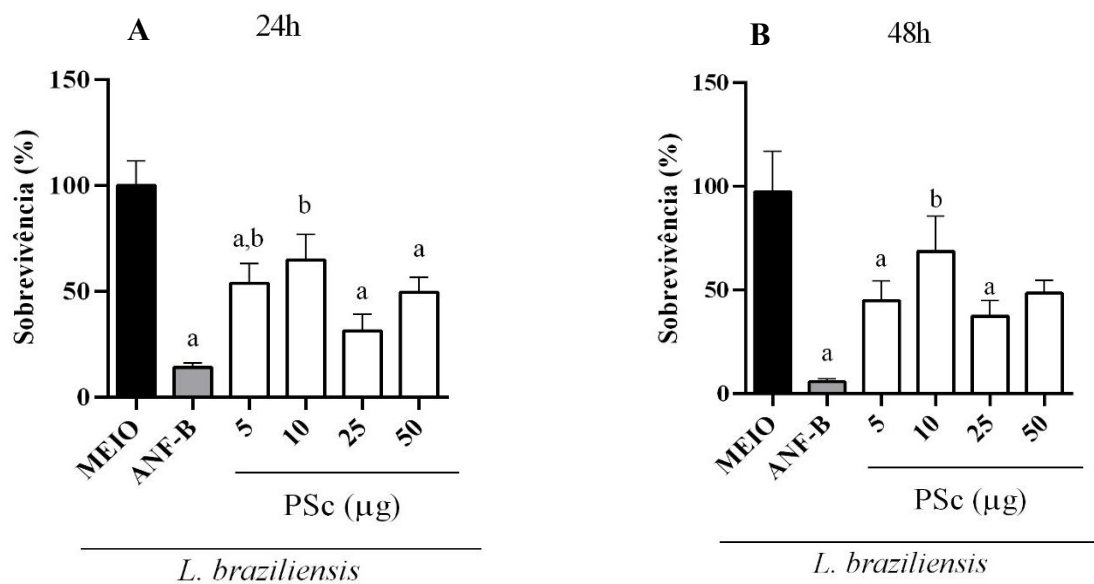
Figura 10: Avaliação da atividade leishmanicida de PHM contra as formas promastigotas de *L. braziliensis*.



Fonte: Elaborada pela autora. Promastigotas (10^7 parasitos/mL) foram incubadas com anfotericina B (16 $\mu\text{g/mL}$ - controle positivo), PHM (5, 10 e 25 $\mu\text{g/mL}$). MEIO: células não tratadas (Schneider suplementado) por 24 e 48 h. Realizado em triplicata e os resultados expressos como média \pm E.P.M. $p < 0,05$ vs a-MEIO e b-ANF B (ANOVA, Teste de Tukey).

PSC induziu redução significativa na sobrevivência dos parasitos em relação ao controle nas concentrações de 5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ (46,30% \pm 9,44%, 68,70% \pm 7,85%, 50,48% \pm 7,15%, respectivamente) as concentrações (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) apresentou significância estatística em relação à anfotericina B (53,70% \pm 9,44%; 64,81% \pm 12,18% respectivamente). Entretanto, com 48h, houve redução significativa, apenas nas concentrações de 5 e 25 $\mu\text{g/mL}$ (52,57% \pm 9,59%, 60,06% \pm 7,66%), apenas a concentração (10 $\mu\text{g/mL}$) apresentou significância estatística em relação à anfotericina B (68,85% \pm 17,12%). Ainda que as demais concentrações não tenham apresentado diferença significativa em comparação ao GLU, elas promoveram redução na sobrevivência das formas promastigotas (figura 11A e 9B).

Figura 11: Avaliação da atividade leishmanicida de PSC contra as formas promastigotas de *L. braziliensis*.



Fonte: Elaborada pela autora. Promastigotas (10^7 parasitos/mL) foram incubadas com anfotericina B (16 $\mu\text{g/mL}$ - controle positivo), PSC (5, 10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$). MEIO: células não tratadas (Schneider suplementado) por 24 e 48 h. Realizado em triplicata e os resultados expressos como média \pm E.P.M. $p < 0,05$ vs a-MEIO e b-ANF B (ANOVA, Teste de Tukey).

O resultado obtido quanto a atividade contra promastigota é corroborado ao estudo descrito por Kangussu-Marcolino *et al* (2015), em que foi relatada a atividade leishmanicida *in vitro* de polissacarídeos das algas vermelhas *Gymnogongrus griffithsiae* e *Euclima denticulatum* contra *L. amazonensis*. O polissacarídeo da alga *G. griffithsiae* inibiu o

crescimento em quase 50% a 10 µg/mL. O composto da alga *E. denticulatum* mostrou o efeito mais intenso, inibindo o crescimento de *L. amazonensis* em até 98% a 10 µg/mL. Apesar da atividade leishmanicida descrita no estudo, detalhes do mecanismo de ação dos polissacarídeos não estão claros.

O estudo descrito por Pires et al. (2013), no qual demonstraram que os polissacarídeos, com ênfase para o galactano sulfatado da alga vermelha *Solieria filiformis* e *Botryocladia occidentalis*, apresenta ações antiparasitárias, é eficaz para combater a infecção por *Leishmania amazonenses*. Em contrapartida nesse mesmo estudo os polissacarídeos da alga *Gracilaria caudata* não apresentaram efeito leishmanisida.

Existem relatos na literatura com atividades antiparasitárias de extratos de algas do gênero *Dictyota*, como inibição do crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* por extratos de *Dictyota cervicornis* (SANTOS et al., 2011). Lira et al., (2016) relata que extratos de *Dictyota ciliota* e *Dictyota menstrualis*, extraídos por decocção, apresentaram efeito leishmanicida contra *L. brasiliensis*.

Segundo Aliança et al., (2014) extrato de *Dictyota mertensii* apresentou atividade leishmanicida, contra as formas promastigotas de *L. brasiliensis*. Outros estudos apresentaram relatos da atividade leishmanicida 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) e *H. musciformis* (BARBOSA. 2020). No estudo de Barbosa (2020), foi utilizado fração básica de *H. musciformis*, extraída por decocção, no entanto, não descreveram o possível mecanismo de ação atividade leishmanicida desse composto.

Embora as formas de promastigotas sejam mais fáceis de manusear, no entanto possui a limitação e algumas diferenças metabólicas com a forma amastigota, que podem alterar sua resposta aos medicamentos (COSTA et al.,2014). Os compostos que apresentam atividade contra promastigotas poderiam ser incapazes de alcançar as formas amastigotas de *Leishmania*, pois poderiam apresentar inabilidade de atravessar a membrana das células, ou de se manterem estáveis com o baixo pH no interior dos macrófagos. No entanto, outros produtos podem ser também fagocitados pelos macrófagos e ativar diretamente o estágio intracelular do parasito (DUARTE et al.,2016).

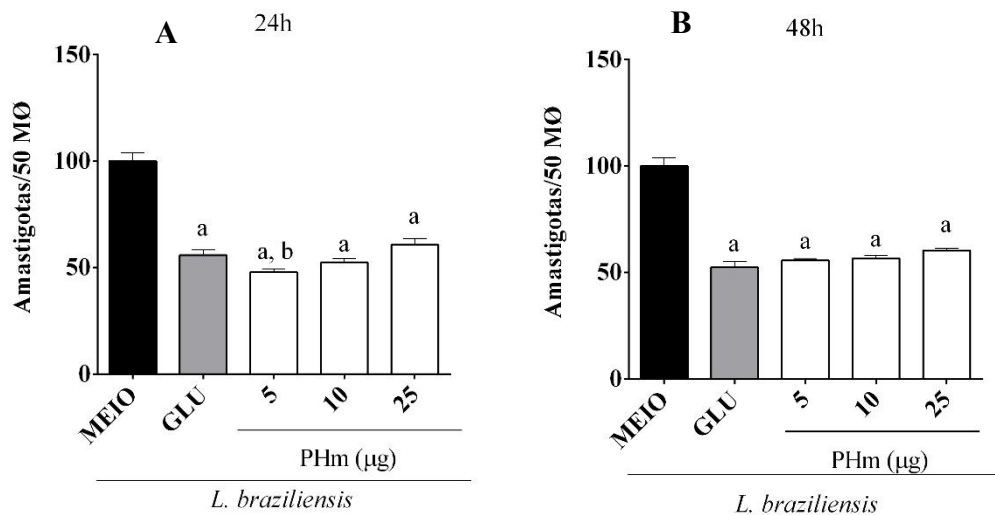
Embora a pesquisa sobre formas promastigotas não represente a infecção do hospedeiro mamífero, torna-se importante para a identificação de novas terapias potenciais (GUAN & MÄSER, 2017). Vale ressaltar que as promastigotas diferem significativamente das amastigotas em relação à morfologia, à composição do glicocálice de superfície e ao metabolismo. É concebível que a biologia específica do estágio tenha consequências

importantes sobre como os parasitos respondem a medicamentos e produtos químicos (KAR et al.,2017).

5.5 Avaliação do efeito leishmanicida em macrófagos infectados

Após 24h, PHM, nas concentrações de 5, 10 e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ resultaram em uma redução significativa da carga parasitária que variou entre $52,17\% \pm 1,49\%$; $47,62\% \pm 1,71\%$; $39,26\% \pm 2,70\%$ respectivamente, quando comparado com o controle meio. Vale ressaltar que, neste tempo, houve diferença estatística entre as diferentes concentrações (5 e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) $60,74\% \pm 3,63\%$ (figura 12 A). Após o tratamento de 48h com PHM, houve redução significativa da carga parasitária nas concentrações 5, 10 e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em $44,40\% \pm 0,88\%$, $43,40\% \pm 1,43\%$, $39,60\% \pm 1,09\%$ quando comparados com o controle não tratado (figura 12 B). O tratamento com GLU apresentou redução significativa na carga parasitária quando comparado com o controle em 24h ($44,23\% \pm 2,64\%$) e 48h ($47,63\% \pm 2,82\%$).

Figura 12: Carga parasitária em macrófagos infectados com *Leishmania braziliensis* e tratados com PHM.

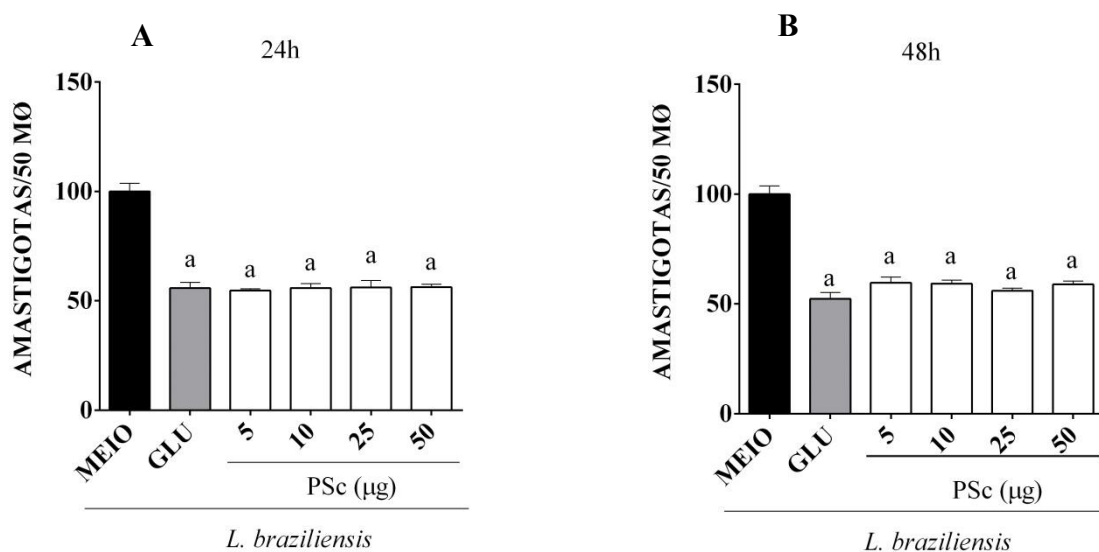


Fonte: Elaborada pela autora. Macrófagos da linhagem J774 foram incubados com glucantime (2mg/mL) PHM (5, 10 e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), após 24 e 48 horas, foi avaliada a carga parasitária. MEIO: macrófagos infectados e não tratados em meio RPMI suplementado; Controle do veículo: GLU (2mg/mL). Realizado em triplicata e os resultados expressos como média \pm E.P.M. $p < 0,05$ vs a: MEIO; b-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ANOVA, Teste de Tukey).

O tratamento com PSC, após as 24 h iniciais, as concentrações de 5, 10, 25 e 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ resultaram em uma redução significativa da carga parasitária, se comparado ao

controle, de $45,29\% \pm 0,74\%$, $44,13\% \pm 1,97\%$, $43,92\% \pm 3,26\%$ e $56,30\% \pm 1,23\%$ respectivamente (figura 13A). No tempo de 48 h, seguindo as mesmas concentrações, a redução foi significativa em relação com controle meio, alcançando $40,38\% \pm 2,62\%$; $40,72\% \pm 1,65\%$; $43,95\% \pm 1,14\%$; $41,05\% \pm 1,45\%$, respectivamente (figura 13B). Em relação ao tratamento com GLU a redução do número de parasitos versus o controle nas 24h ($55,77\% \pm 2,64\%$) e 48h ($47,63\% \pm 2,82\%$).

Figura 13: Carga parasitária em macrófagos infectados com *Leishmania braziliensis* e tratados com PSc.



Fonte: Elaborada pela autora. Macrófagos da linhagem J774 foram incubados com glucantime (2mg/mL) PSc (5, 10, 25 e 50 µg/mL), após 24 e 48 horas, foi avaliada a carga parasitária. MEIO: macrófagos infectados e não tratados em meio RPMI suplementado; Controle do veículo: GLU (2mg/mL). Realizado em triplicata e os resultados expressos como média \pm E.P.M. $p < 0,05$ vs a- MEIO (ANOVA, Teste de Tukey).

Modelos experimentais baseados na atividade contra formas amastigota de *Leishmania spp.* são importantes porque é o estágio de vida do parasito responsável pelas diferentes manifestações clínicas, sendo esse modelo o melhor caminho para relatar a atividade de drogas-teste leishmanicidas in vivo e in vitro (CARVALHO et al., 2017). Considera-se que os antimonialis têm ação parasiticida direta e comprometimento no DNA do parasito.

A avaliação da carga parasitaria após o tratamento com os polissacarídeos sulfatados de *H. musciformis* e *S. coronopifolius* comprovou o efeito leishmanicida dessas moléculas com uma diminuição significativa das formas amastigotas intracelulares. Vale ressaltar que não

foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os PST e o Glucantime, fármaco padrão; entretanto, a redução da carga parasitária foi semelhante entre os tratamentos.

Estes resultados corroboram com dados da literatura que descrevem atividades antiparasitárias de Galactana sulfatada obtida por extração aquosa da alga vermelha *Eucheuma denticulatum*, nesse estudo os polissacarídeos foram avaliados em condições experimentais sobre amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) amazonenses*, com tratamento com 2,5 e 10 µg/mL dos polissacarídeos, apresentando assim, atividade leishmanicida (MARCOLINO, 2010).

Estudo realizado com polissacarídeos sulfatados (heterofucanas) de *Sargassum filipendula*, que demonstraram com capacidade de induzir a atividade leishmanicida na forma de amastigota de *Leishmania infantum*. As heterofucanas são conhecidas pela capacidade de modular uma série de funções biológicas (TELLES et al., 2015).

Kar et al. (2011) demonstraram o efeito *in vitro* e *in vivo* de uma fucoidana (polissacarídeo sulfatado polianiónico de algas marrons) contra cepas de *L. donovani*, que inibiu a multiplicação de amastigotas de nos macrófagos. Segundo Soares et al., 2012, extratos da alga *Dictyota pfaffi*, a extração foi realizada com DCM/MeOH, esse composto apresentou inibição na infecção formas amastigotas de *L. amazonenses*.

Estudos anteriores também relataram atividades antiparasitárias contra *L. infantum* a partir de extratos das algas *Hypnea cornuta* (MINICANTE et al., 2016) e *H. musciformis* (BARBOSA et al., 2020). Nesses trabalhos, os extratos foram obtidos por decocção, utilizando 100 mL de uma solução hidroetanólica, durante duas horas a 80 °C.

É importante ressaltar que os macrófagos possuem em sua superfície vários tipos de receptores que podem ser alvo de ligação de diferentes polissacarídeos (MARTINEZ-POMARES et al., 2006; SCHEPETKIN; QUINN, 2006).

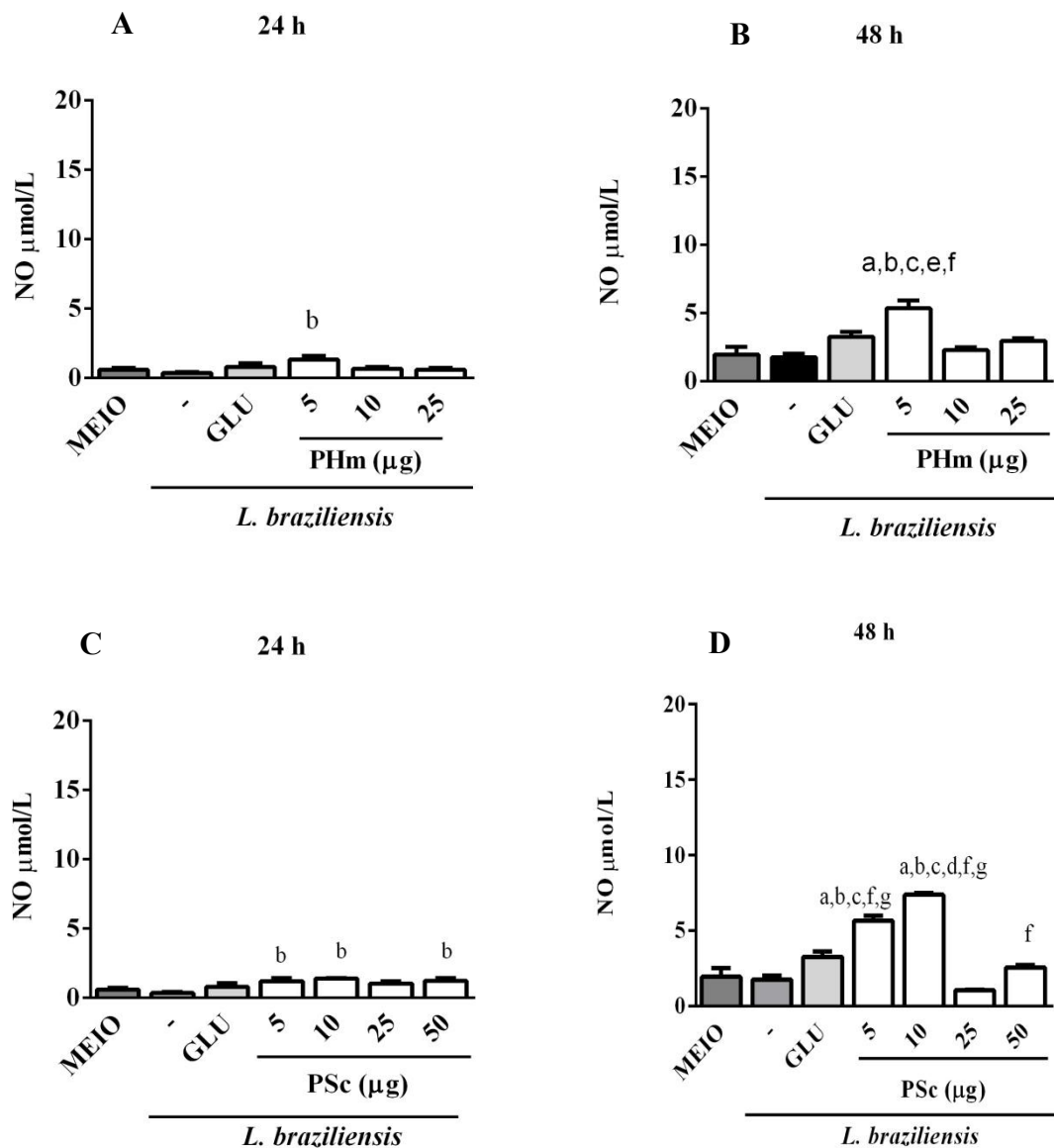
5.6 Avaliação da concentração de óxido nítrico (NO) em macrófagos infectados com *L. braziliensis* e tratados com os polissacarídeos sulfatados

Com objetivo de verificarmos se os PHM e PSC podem induzir um aumento na produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos foi utilizado o reagente de Griess. Os PHM, nos dois tempos analisado, A produção de NO apresentou aumento significativo em relação ao controle de macrófagos infectados apenas na concentração de 5 µg/mL, com valores de $1,30 \pm 0,27$ µmol/mL em 24 h e $5,34 \pm 0,57$ µmol/mL em 48 h (Figuras 14A e 14B).

Para PSC, no primeiro tempo analisado, aumentou os níveis de NO de forma significativa em relação ao controle macrófagos infectados (5, 10 e 50 µg/mL), apenas nas

concentrações de 5 $\mu\text{g/mL}$ ($1,18 \pm 0,23 \mu\text{mol/mL}$), 10 $\mu\text{g/mL}$ ($1,38 \pm 0,09 \mu\text{mol/mL}$) e 50 $\mu\text{g/mL}$ ($1,22 \pm 0,19 \mu\text{mol/mL}$). Seguidamente as 48h, foi observado que o tratamento com as concentrações de 5 $\mu\text{g/mL}$ ($5,64 \pm 0,34 \mu\text{mol/mL}$) e 10 $\mu\text{g/mL}$ ($7,37 \pm 0,09 \mu\text{mol/mL}$) aumentaram os níveis de NO de forma significativa em relação ao controle macrófagos infectados, assim como o GLU ($3,25 \pm 0,37 \mu\text{mol/mL}$) (figura 14C e 14D).

Figura 14 Concentração de óxido nítrico nos macrófagos infectados com *L. braziliensis* e tratados com PHM e PSc.



Fonte: Elaborado pelos autores. Macrófagos J774 foram incubados com foram incubados com glucantime (2mg/ mL) PHM (5, 10 e 25 $\mu\text{g/mL}$) ou PSc (5, 10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$), após 24 e 48 horas, foi avaliada a produção de Óxido Nítrico. MEIO: macrófagos não infectados em meio RPMI suplementado; -: macrófago infectado e não tratado; Controle do veículo: GLU (2mg/mL). Realizado em triplicata e os resultados expressos como média \pm E.P.M. $p < 0,05$ vs a- MEIO b: -, c: GLU, d: [5

$\mu\text{g/mL}$]; e: [10 $\mu\text{g/mL}$]; f: [25 $\mu\text{g/mL}$]; g: [50 $\mu\text{g/mL}$]. GLU = Glucantime. - = *L. braziliensis*. (ANOVA, Bonferroni).

Estudos demonstram que macrófagos ativado podem produzir óxido nítrico, e utilizam esta via para eliminar microrganismos fagocitados e, em especial parasitos, como, por exemplo, *Leishmania*. (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017; KALANTARI et al., 2014; KORHONEN et al., 2005). No presente estudo, objetivou-se avaliar a produção de óxido nítrico. Esta atividade leva mais tempo para se iniciar, devido à necessidade de expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (KORHONEN et al., 2005).

Os PHM e PSC induziram melhor produção de NO após 48 h de tratamento, o que está consistente com a cinética da indução de iNOS, que atua entre 48-72 horas após a infecção (GIUDICE et al., 2007). Alguns polissacarídeos algais, vêm se destacando como ativadores da produção de NO. Os polissacarídeos sulfatados de *Sargassum filipendula*, apresentaram à capacidade de ação imunoestimulante em macrófagos e, são eficazes na ativação da produção de NO (TELLES et al., 2015). Teruya e colaboradores também reportaram que fucoidanas obtidas da alga *laminaria angustata* induzem a produção de NO por RAW 264.7 nas concentrações de 50 a 400 $\mu\text{g/mL}$ (NAKAMURA et al., 2006; TERUYA et al., 2010).

Outros estudos também demonstram os efeitos dos polissacarídeos sulfatados na produção de NO por macrófagos com 48 horas de incubação. Segundo Kangussu-Marcolino et al (2015), polissacarídeos extraídos da alga vermelha *Eucheuma denticulatum* promoveu uma produção de NO até 81% (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) e alga *Gymnogongrus griffithsiae* exibiu um efeito estimulador de NO em 71% a 10 $\mu\text{g/mL}$, quando comparado ao meio. Nesse estudo foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos e, foi possível analisar que os polissacarídeos foram capazes de eliminar o ânion superóxido produzido por macrófagos, o qual estimulou essas células a liberar óxido nítrico e também apresentou efeito leishmanicida.

Leiro et al., (2007) descreveu que polissacarídeos sulfatados extraídos de *Ulva rigida*, alga verde, ativaram a produção de óxido nítrico, em macrófagos murinos *in vitro*, Segundo o autor, os grupos sulfato são importantes para que os polissacarídeos sulfatados sejam capazes de estimular as células RAW 264.7 a liberar NO.

Apesar de muitos autores descreverem que a quantidade de grupos sulfatos presentes nos polissacarídeos são importantes para sua ação, à posição em que esses grupos estão distribuídos na molécula é um fator também muito determinante para que um polissacarídeo sulfatado apresente maior ou menor atividade (LIANG et al., 2014; HAROUN-BOUHEDJA et al., 2000). No presente estudo, o teor de sulfato em PHM e PSC foram semelhantes.

Estima-se que devido à posição do grupo sulfato na molécula pode apresentem atividades distintas. Os efeitos leishmanicidas dos polissacarídeos podem ocorrer por diferentes mecanismos (KANGUSSU-MARCOLINO et al.,2015),

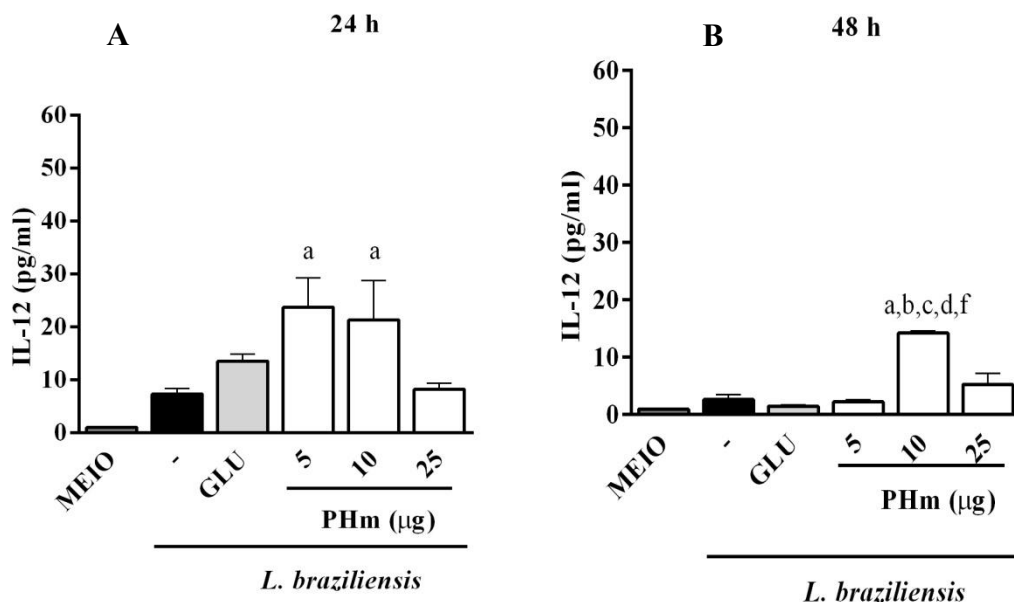
Sabe-se que diferentes polissacarídeos podem se ligar a vários receptores na superfície dos macrófagos, evidenciando que os polissacarídeos podem ser reconhecidos por macrófagos pelos receptores manose-fucose (MARTINEZ-POMARES et al., 2006; LEUNG et al., 2006; BOHN; BEMILLER, 1995). Essa interação pode desencadear a ativação de moléculas alvos, resultando em contribuições intracelulares para o efeito leishmanicida.

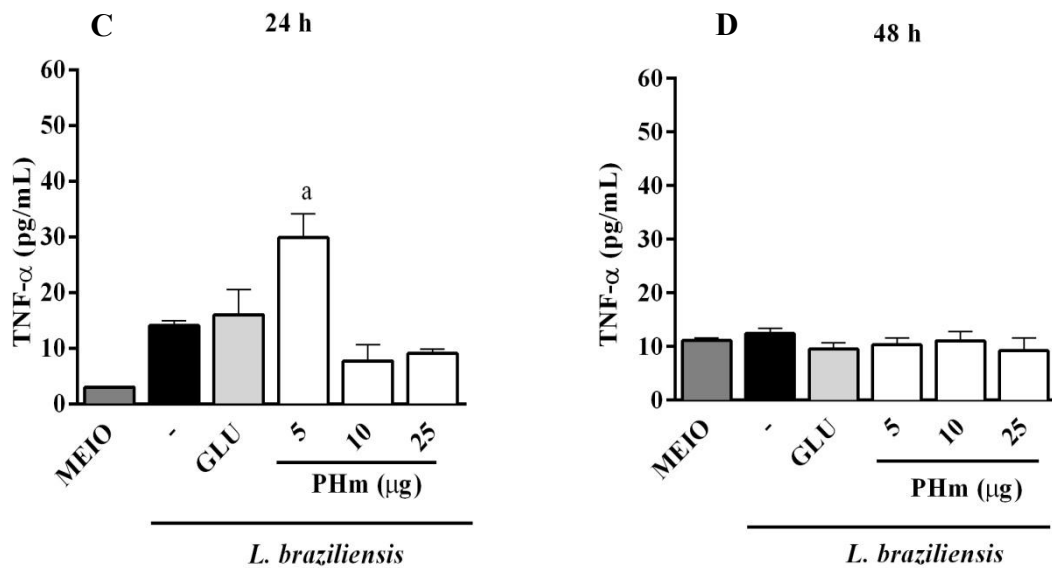
5.7 Efeito dos PHM e PSC sobre a concentração de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em macrófagos infectados com *Leishmania braziliensis*.

Macrófagos parasitados e tratados com a PHM, com 24 h, apresentaram um aumento significativo da produção de IL-12, nas concentrações de 5 $\mu\text{g/mL}$ ($23,70 \pm 5,53 \text{ pg/mL}$) e 10 $\mu\text{g/mL}$ ($21,28 \pm 7,45 \text{ pg/mL}$), quando comparado ao controle MEIO ($0,98 \pm 0,04 \text{ pg/mL}$) (figura 15A). Os grupos tratados com PHM não mostrando diferença significativa na produção de IL-12 em relação ao GLU nas 24h. Com 48h pós-tratamento, tão somente o grupo 10 $\mu\text{g/mL}$ ($14,20 \pm 0,37 \text{ pg/mL}$) conseguiu manter a produção de IL-12 significativa em relação aos de mais grupos, e ao Glucantime ($7,22 \pm 0,22 \text{ pg/mL}$) (figura 15B).

Na avaliação do efeito da PHM sobre a produção de $\text{TNF-}\alpha$, foi observado que ocorreu significância estaticamente nas 24h na concentração 5 $\mu\text{g/mL}$ ($20,12 \pm 7,02 \text{ pg/mL}$) quando comparado ao controle MEIO ($10,57 \pm 0,56 \text{ pg/mL}$). Após 48h de tratamento, os grupos tratados com PHM, nenhum apresentou significância estatisticamente (figura 15C e 15B).

Figura 15: Efeito de PHM na concentração de citocinas pró-inflamatórias em cultura de macrófagos infectados por *Leishmania braziliensis*.



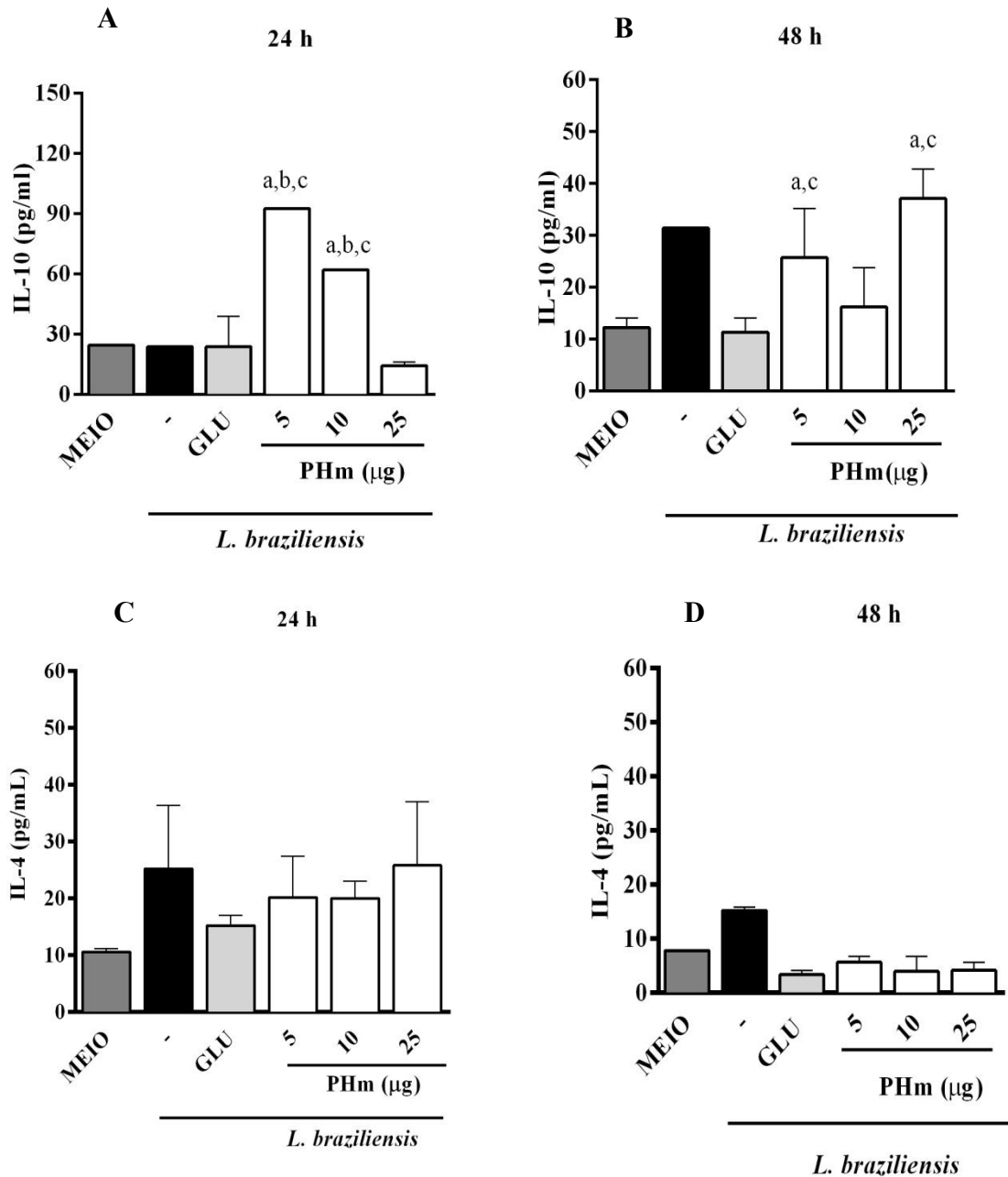


Fonte: Elaborado pelos autores. Macrófagos J774 foram incubados com foram incubados com glucantime (2mg/ mL) PHM (5, 10 e 25 $\mu\text{g/mL}$), após 24 e 48 horas, foi avaliada a produção de citocinas pró-inflamatórias. MEIO: macrófagos não infectados em meio RPMI suplementado; -: macrófago infectado e não tratado; Controle do veículo: GLU (2mg/mL). Realizado em triplicata e os resultados expressos como média \pm E.P.M. $p < 0,05$ vs a: MEIO, b: -, c: GLU, d: [5 $\mu\text{g/mL}$]; e: [10 $\mu\text{g/mL}$]; f: [25 $\mu\text{g/mL}$]; g: [50 $\mu\text{g/mL}$]. GLU = Glucantime. - = *L. braziliensis*. (ANOVA, Teste de Tukey).

Nas figuras 16A e 16B estão descritos os efeitos da PHM (5 – 25 $\mu\text{g/mL}$) sobre a produção IL-10. Nas primeiras 24h o tratamento com PHM em macrófagos infectados por *L. braziliensis* induziu a produção de IL-10, apresentando significância estatística nas concentrações 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ ($92,57 \pm 0,0$ pg/mL; $61,88 \pm 0,0$ pg/mL) respectivamente, sobressaindo-se ao grupo tratado com o antimônio ($23,78 \pm 15,19$ pg/mL). Após 48h de infecção, ocorreu uma indução na produção de IL-10 pelas células tratadas com PHM, nas concentrações 5 $\mu\text{g/mL}$ ($25,67 \pm 9,49$ pg/mL) e 25 $\mu\text{g/mL}$ ($37,08 \pm 5,71$ pg/mL), mostrando diferença significativa na produção de IL-10 em relação ao GLU ($11,34 \pm 2,75$ pg/mL).

Na avaliação do efeito da PHM na produção de IL-4 foi observado que não houve significância estatística indução na produção de dessa citocina em macrófagos infectados por *L. braziliensis* e tratados com PHM nas primeiras 24 horas. Esse padrão se estendeu para as 48h, em relação à produção de IL-4 (figura 16C e 16D).

Figura 16: Efeito de PHM na concentração de citocinas anti-inflamatórias em cultura de macrófagos infectados por *Leishmania braziliensis*.

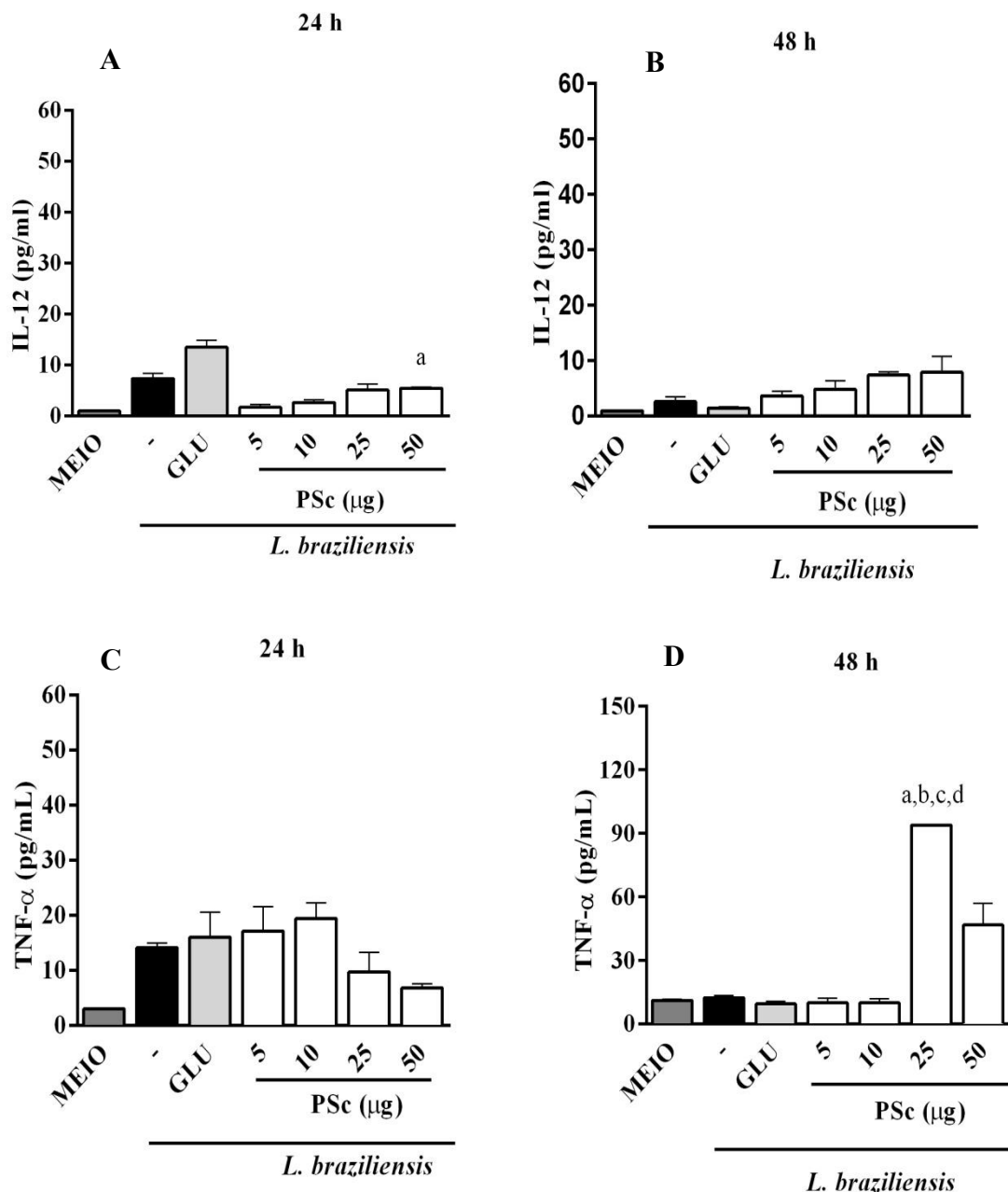


Fonte: Elaborado pelos autores. Macrófagos J774 foram incubados com foram incubados com glucantime (2mg/ mL) PHM (5, 10 e 25 µg/mL), após 24 e 48 horas, foi avaliada a produção de citocinas anti-inflamatórias. MEIO: macrófagos não infectados em meio RPMI suplementado; -: macrófago infectado e não tratado; Controle do veículo: GLU (2mg/mL). Realizado em triplicata e os resultados expressos como média ± E.P.M. $p < 0,05$ vs a: MEIO, b: -, c: GLU, d: [5 µg/mL]; e: [10 µg/mL]; f: [25 µg/mL]; g: [50 µg/mL]. GLU = Glucantime. - = *L. braziliensis*. (ANOVA, Teste de Tukey).

Nas primeiras 24h o PSC induziu a produção de citocina IL-12 concentração 50 ug/mL ($5,05 \pm 0,22$ pg/mL), a qual diferença significativa apenas com o MEIO ($0,98 \pm 0,04$ pg/mL) não ocorreu diferença significativa na produção de IL-12 em relação às concentrações e ao GLU. Com 48h pós-tratamento nenhum grupo apresentou significância estatisticamente (figura 17A e 17B).

Macrófagos parasitados e tratados com a PSC, com 24h, não apresentaram significância estatística na produção de TNF- α . Após 48h de tratamento, nos grupos tratados com PSC a concentração de 25 μ g/mL ($93,85 \pm 0,0$ pg/mL) apresentou um aumento significativo dessa citocina, enquanto aos outros grupos, apresentou também diferença significativa com o GLU ($9,49 \pm 1,19$ pg/mL) (figura 17C E 17D).

Figura 17: Efeito de PSC na concentração de citocinas pró-inflamatórias em cultura de macrófagos infectados por *Leishmania braziliensis*.

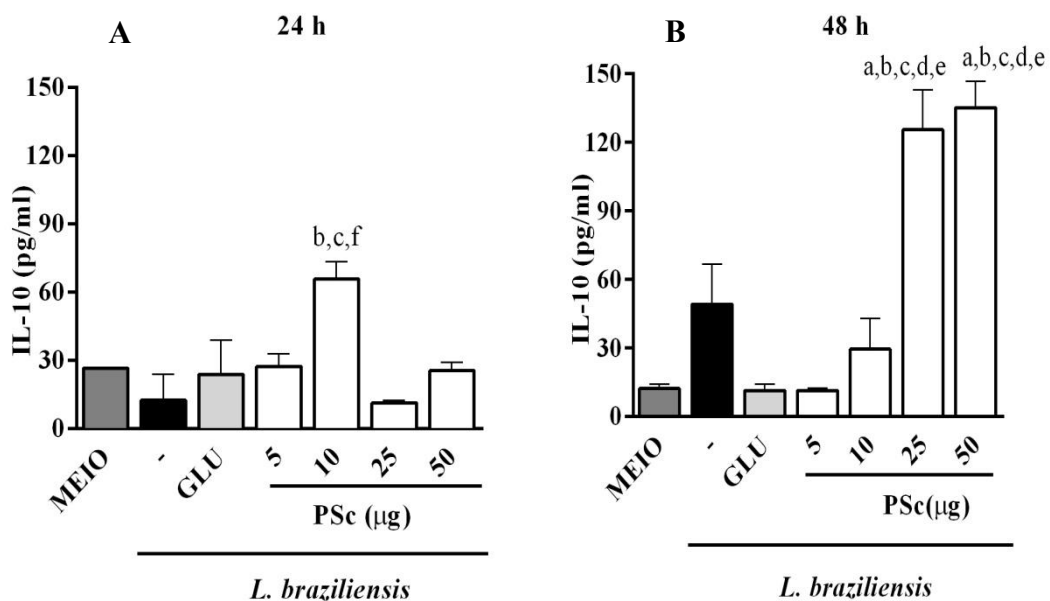


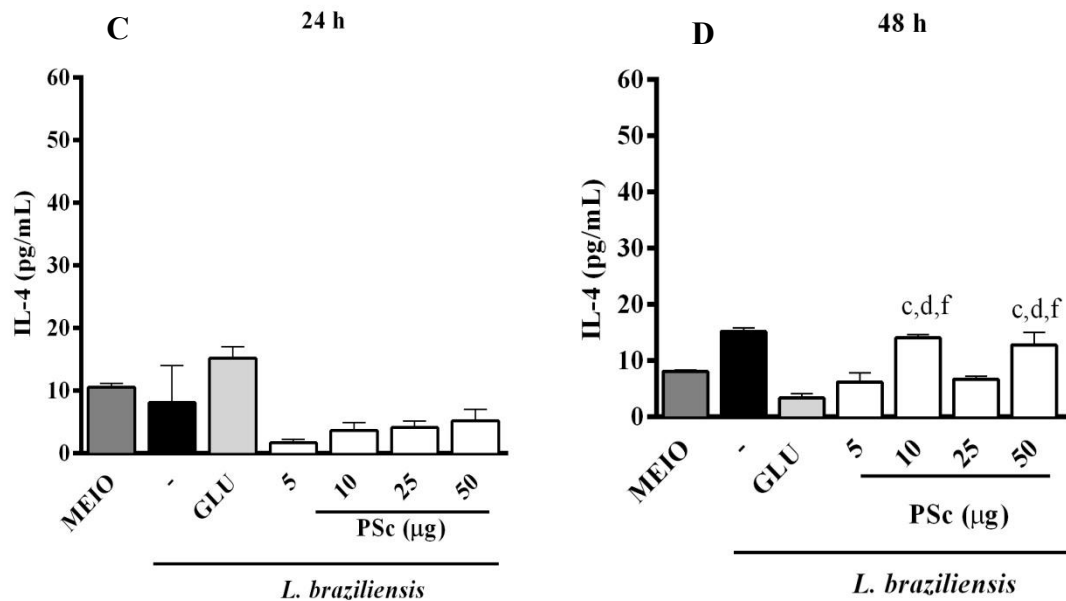
Fonte: Elaborado pelos autores. Macrófagos J774 foram incubados com foram incubados com glucantime (2mg/ mL) PSC (5, 10, 25 e 50 µg/mL), após 24 e 48 horas, foi avaliada a produção de citocinas pró-inflamatórias. MEIO: macrófagos não infectados em meio RPMI suplementado; -: macrófago infectado e não tratado; Controle do veículo: GLU (2mg/mL). Realizado em triplicata e os resultados expressos como média ± E.P.M. $p < 0,05$ vs a: MEIO, b: -, c: GLU, d: [5 µg/mL]; e: [10 µg/mL]; f: [25 µg/mL]; g: [50 µg/mL]. GLU = Glucantime. - = *L. braziliensis*. (ANOVA, Teste de Tukey).

A adição de PSC (5 – 50 µg/mL) em macrófagos infectados por *L. braziliensis* causou uma indução na produção de IL-10 com significância estatística pelas células tratada na concentração de 10 µg/mL ($65,71 \pm 7,65$ pg/mL) sobressaindo-se ao grupo tratado com o antimônio ($23,78 \pm 15,19$ pg/mL). As 48h seguidas ocorreu produção de citocina IL-10 significativamente nas concentrações 25 µg/mL ($125,4 \pm 17,42$ pg/mL) e 50 µg/mL ($135,1 \pm 11,63$ pg/mL), havendo significância estatística com o grupo GLU ($11,34 \pm 2,75$ pg/mL). (figuras 18A e 1B).

Na avaliação do efeito do PSC sobre a produção de IL-4, que não houve significância estatística na indução na produção dessa citocina. Após 48h de tratamento, os grupos tratados com PSC nas concentrações de 10 e 50 µg/mL ($14,02 \pm 0,58$ pg/mL, $12,78 \pm 1,29$ pg/mL, respectivamente) apresentaram um aumento significativo dessa citocina, em relação aos outros grupos, inclusive o grupo GLU ($3,32 \pm 0,74$ pg/mL) (figura 18C e 18D).

Figura 18: Efeito de PSC na concentração de citocinas anti-inflamatórias em cultura de macrófagos infectados por *Leishmania braziliensis*.





Fonte: Elaborado pelos autores. Macrófagos J774 foram incubados com foram incubados com glucantime (2mg/ mL) PSC (5, 10, 25 e 50 µg/mL), após 24 e 48 horas, foi avaliada a produção de citocinas anti-inflamatórias. MEIO: macrófagos não infectados em meio RPMI suplementado; -: macrófago infectado e não tratado; Controle do veículo: GLU (2mg/mL). Realizado em triplicata e os resultados expressos como média ± E.P.M. $p < 0,05$ vs a: MEIO, b: -, c: GLU, d: [5 µg/mL]; e: [10 µg/mL]; f: [25 µg/mL]; g: [50 µg/mL]. GLU = Glucantime. - = *L. braziliensis*. (ANOVA, Teste de Tukey).

O importante papel dos macrófagos no sistema imune é amplamente estabelecido na ciência médica, sendo células que atuam na “linha de frente” da imunidade inata, liberando mediadores imunológicos e exercendo a fagocitose e pinocitose de diversos materiais (YIN; ZHANG; LI, 2019). Os Macrófagos são as principais células hospedeiras da *Leishmania ssp.* tem um relevante papel no controle imunológico de parasitos intracelulares. Estudos demonstraram que polissacarídeos sulfato podem regular a fagocitose de macrófagos. Para enxertar suas atividades microbicidas os macrófagos desenvolveram mecanismos estruturais e moleculares (aumento do nível de citocinas e NO) causando danos nas proteínas e DNA do parasito (CARVALHO et al.,2017; KIM et al., 2011)

O resultado da infecção da leishmaniose humana depende do tipo de resposta imunológica que se desenvolve. O tipo de resposta Th1 é favorável à resistência ao parasito, enquanto uma resposta Th2 promove a susceptibilidade. O mecanismo de ação é baseado no estímulo imunológico, com ativação da resposta imune e produção de citocinas inflamatórias tal como IL-12, TNF- α , como também de mediadores químicos como NO e reativos de oxigênio (DUARTE et al.,2016).

As citocinas, especificamente IL-12 e IL-4, desempenham um papel crítico na diferenciação das células T helper, embora outros fatores também influenciem o desenvolvimento dos subconjuntos de célula T (HONDOWICZE & SCOTT, 2002). O

controle da *L. braziliensis* está associado com uma resposta imunológica Th1 específica contra o parasito. A produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas, leva à produção de IFN- γ por células NK e diferenciação de células Th0 em células Th1, que também produzirão IFN- γ que irá fornecer um estímulo chave para o desenvolvimento da resistência de macrófagos e a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por estes (ANDRADE et al., 2014; GIUDICE et al., 2007).

No presente estudo a PHM tem potencial de imunomodular a resposta de macrófagos frente à infecção por *L. braziliensis*, principalmente pela forma mucosa que é devido a alta produção de inflamação, com aumento na indução de TNF- α , IL-12 e IL-10 esta última que se comporta como uma citocina regulatória, e diminuição da citocina IL-4 que apresenta um perfil anti-inflamatório. PSC induziu a produção de citocinas, mediante a resposta de macrófagos frente à infecção por *L. braziliensis*, com aumento na indução de IL-12, TNF- α , IL-10 e IL-4.

A susceptibilidade à *Leishmania* é apoiada, na maior parte dos casos, na produção precoce de IL-4 que promove o desenvolvimento de lesões durante as fases iniciais da infecção (VASQUEZ et al., 2008). Está bem estabelecido que IL-10 endógeno é um mediador central da homeostase imunológica, necessária para modular a forte reação inflamatória que pode acompanhar a resposta imunológica contra patógenos nos tecidos (OLIVEIRA & BRODSKYN, 2012).

Os Polissacarídeos de algas podem ter ação imunoestimulatória (induzindo o processo inflamatório) ou anti-inflamatória (amenizando o processo inflamatório). Polissacarídeos de algal de *Fucus vesiculosus*, estimularam a produção de IL-12, TNF- α e expressão de receptores classe I, II, CD54 e CD86, maturação de células dendríticas e Induziram a síntese de óxido nítrico (KIM & JOO, 2008; YANG et al., 2006). Chen *et al.*, (2012), descreve em seu estudo que, polissacarídeos da alga *Sargassum fusiforme* tem potencial para estimular a secreção de IL-2, IL-6 e IFN- γ por linfócitos.

Segundo Anderson et al., 2007 que sugere que a produção de IL-10 é uma via reguladora em um ambiente de forte resposta pró-inflamatória mediado por células Th1. Níveis mais altos de IL-10 acompanham a diminuição dos níveis de IL-12 (VAN ASSCHE et al., 2011), como observado em nosso estudo no qual a PHM e PSC foram capazes de imunomodular a resposta frente a infecção *in vitro* de *L. braziliensis*, com diminuição de IL-12 e um aumento de IL-10.

Estudos com polissacarídeos sulfatados como o descrito por Leiro et al., (2007) demonstrou que os resultados obtidos no presente estudo indicam que os polissacarídeos

sulfatados da *Ulva rigida* (alga verde) pode modular a atividade dos macrófagos. Kar et al., (2011) expos que o tratamento *in vitro* com fucoidanas em cepas de *L. donovani*, apresentou liberação de citocinas IL-10 e TGF- β e citocinas IL-12 e TNF- α . Conforme descrito por Cunha e Grenha, 2016 carragenanas podem aumentar as atividades de ligação e morte por macrófagos, esse mecanismo pode ser muito apropriado em infecção por leishmaniose, visto que é um patógeno intracelular.

Alguns estudos indicam que a atividade imunológica dos polissacáridos sulfatados não depende apenas da fonte, mas também de características estruturais, desse modo a sulfatação de polissacarídeos pode levar a uma boa resposta imunológica e, dependem dos rearranjos e exposição de determinados grupos moleculares. Outros autores citam que a massa molecular, grupos substituintes, a composição monossacarídica, também pode influenciar na atividade dos polissacarídeos (WANG et al., 2013; LI, et al., 2008).

Supõe-se também que polissacarídeos ativam a ação de macrófagos principalmente pelo reconhecimento e, ligação a receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) na superfície celular, sugerindo que esses receptores podem ter sítios de ligação específicos para esses polímeros, uma vez reconhecidos pelos receptores na superfície dos macrófagos, os polissacarídeos podem então desencadear uma série de cascatas de sinalização (YIN; ZHANG, LI, 2019).

A atividade imunológica dos polissacáridos sulfatados não é afetada por um único fator, mas por uma combinação de vários fatores relacionados. Estudos sobre os mecanismos da função imunológica indicam que a ação dos polissacarídeos sulfatados é um processo complexo que pode ser regulado por uma ou mais vias. (HUANG et al., 2019; DI et la., 2019).

6. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou na bioprospecção de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas vermelhas *H. Musciformis* e *S. Coronopifolius* contra promastigotas de *L. braziliensis*, no entanto PHM apresentou melhor resultado com redução de até 76% dos parasitos.

Foi observada baixa citotoxicidade em algumas concentrações estudadas dos PHM (5 - 25 µg/mL) e PSC (5 - 50 µg/mL) em macrófagos J774. No entanto a citotoxicidade apresentada pelas demais concentrações inviabilizou os testes posteriores com essas dosagens.

O tratamento *in vitro* com o polissacarídeo sulfatado de *H. Musciformis* demonstrou capacidade de reduzir a carga parasitária em macrófagos infectados por cepa de *Leishmania braziliensis*, induziu produção de óxido nítrico e citocinas IL-12, TNF- α , IL-10, provavelmente inibindo a secreção de IL-4, sugerindo uma imunomodulação da resposta inflamatória.

O tratamento *in vitro* com o polissacarídeo sulfatado de *S. Coronopifolius* demonstrou capacidade de reduzir a carga parasitária em macrófagos infectados por cepa de *Leishmania braziliensis*, induziu produção de óxido nítrico e citocinas IL-12, TNF- α , IL-10 e IL-4.

Os dados deste trabalho sugerem um promissor efeito imunomodulador da PHM na infecção por *L. braziliensis*, 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.

No entanto, estudos adicionais são necessários para compreender melhor os mecanismos de ação dos polissacarídeos sulfatados e sua eficácia em diferentes modelos experimentais e condições clínicas.

REFERÊNCIAS

- ALCOLEA, P. J.; ALONSO, A.; MOLINA, R.; JIMÉNEZ, M.; MYLER, P. J.; LARRAGA, V. Functional genomics in sand fly–derived *Leishmania* promastigotes. **PLOS Neglected Tropical Disease**, 2019.
- ANDERSON, C.F.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.J.; SACKS, D. CD4+CD25–Foxp3–Th1 cells are the source of IL-10–mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Experimental Medicine (JEM)**, v. 204, n.2, p.285–297, 2007.
- ANDRADE, A. C.; FRANÇA, L. A.; ARAUJO, C.F.; ROCHA, V.J.; SILVA, M.C.B.; FIGUEIRAS, C.P.; OLIVEIRA, P.R.; FREITAS, L.A.R.; VERAS, P.S.T.; CARVALHO, L.P. Extracellular Vesicles from Leishmania-Infected Macrophages Confer an Anti-infection Cytokine-Production Profile to Naïve Macrophages. **PLoS neglected Tropical Diseases**, v.8, n.9, p.3161, 2014.
- ANDRADE, Renato Martins. **Carragenana de alga marinha vermelha *Solieria Filiformis*: caracterização estrutural e avaliação da atividade cicatrizante**. 2016. 80 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Bioquímica) Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Fortaleza, 2016.
- AHMADI, A.; MOGHADAMTOUSI, S. Z.; ABUBAKAR, S.; ZANDI, K. Antiviral Potential of Algae Polysaccharides Isolated from Marine Sources: a review. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 1-10, 2015.
- ALBALASMEH, A. A.; BERHE, A. A.; GHEZZEHEI, T. A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 253–261, 2013.
- 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, C.P.; CAVALCANTE, F.R.A.; MORENO, J. O.; FLORÊNCIO, C. M. G. D.; CAVALCANTE, K.K.S.; ALENCAR, C. H. Leishmaniose visceral: distribuição temporal e espacial em Fortaleza, Ceará, 2007-2017. **Epidemiol. Serv. Saude, Brasília**, v. 29, n. 5, p.e2019422, 2020.
- ALVES C, SILVA J, PINTEUS S, GASPAR H, ALPOIM MC, BOTANA LM AND PEDROSA R. From Marine Origin to Therapeutics: The Antitumor Potential of Marine Algae-Derived Compounds. **Front. Pharmacol.** N. 9, p. 777, 2018.
- ALVES, C.; SILVA, J.; PINTÉUS, S.; GUEDES, R. A.; GUEDES, R. C.; ALVARIÑO, R.; FREITAS, R.; GOETTERT, M. I.; GASPAR, H.; ALFONSO, A. Bromoditerpenes from the Red Seaweed *Sphaerococcus coronopifolius* as Potential Cytotoxic Agents and Proteasome Inhibitors and Related Mechanisms of Action. **Marine Drugs**, v. 20, n. 10, p. 652, out. 2022.

ALVES, M. G. C. F.; ALMEIDA J. L.; PAIVA, A. A. O.; LEITE, E. L.; ROCHA.; H. A. O. Extraction process optimization of sulfated galactan-rich fractions from *Hypnea musciformis* in order to obtain antioxidant, anticoagulant, or immunomodulatory polysaccharides. **Journal Of Applied Phycology**, v. 28, n. 3, p. 1931-1942, 2015.

ARAÚJO, I. W. F.; CHAVES, H. V.; PACHÊCO, J. M.; VAL, D. R.; VIEIRA, L. V.; SANTOS, R.; FREITAS, R. S.; RIVANOR, R. L.; MONTEIRO, V. S.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T. Role of central opioid on the antinociceptive effect of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Solieria filiformis* in induced temporomandibular joint pain. **International Immunopharmacology**, v. 44, p. 160-167, 2017.

ARAÚJO, I. S.; MOREIRA, A. L.; AGUIAR, R. Doenças negligenciadas, comunicação negligenciada. Apontamentos para uma pauta política e de pesquisa. **RECIIS – Revista Eletronica de Comunicação Informação e Inovação em Saúde**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 4. 2013.

ARAÚJO, I.W.F., *et al.* Effects of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation. **Carbohydrate Polymers**, v.86, n.3, p.1207– 1215, 2011.

ARMAHA, F. A.; AMPONSAHB, I. K.; MENSAHB, A. Y.; DICKSONB, R. A.; STEENKAMPC, P. A.; MADALAE, N. E.; ADOKOH, C. K. Leishmanicidal activity of the root bark of *Erythrophleum Ivorense* (Fabaceae) and identification of some of its compounds by ultra-performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS/MS). **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 211, p. 207-216. 2018.

ARAÚJO, F.; WIVIANNE, I.; RODRIGUES, G.; ARIÉVILO, J.; VANDERLEI, S. O.; EDFRANCK, ALMEIDA, P.; BRITO LIMA, G. B.; ABREU, T. M.; BENEVIDES, N.M.B. Iota-carrageninas de *Solieria filiformis* (Rhodophyta) e seus efeitos na inflamação e coagulação. **Acta Scientiarum. Tecnologia**. v. 34, n. 2, p.127-135, 2012

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J Med Res**, v. 119, n. 6, p. 238-258, 2004.

BANDYOPADHYAY, S.S.; NAVID, M.H.; GHOSH, T.; SCHNITZLER, P.; RAY,B. Structural features and in vitro antiviral activities of sulfated polysaccharides from *Sphacelaria indica*. **Phytochemistry**, v.72, n. 2-3, p. 276-283, 2011.

BAÑULS, A.L.; HIDE, M.; PRUGNOLE, F. *Leishmania* and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans *Leishmania* and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. **Advances in Parasitology**, v. 64, p.1-113, 2007.

BARAHONA, T.; CHANDÍA, N.P.; ENCINAS, M.V.; MATSUHIRO, B.; ZÚÑIGA, E.A. Antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from seaweeds. A kinetic approach. **Food Hydrocolloids**, v.25, p.529-535, 2011.

- BARBOSA, Rodrigo César Fernandes. **Prospecção de macroalgas marinhas para avaliação da atividade contra *Leishmania infantum* e determinação do perfil de esteróis de *Neobenedenia melleni***. dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.
- BARROSO, D.H. *et al.* PD-L1 May Mediate T-Cell Exhaustion in a Case of Early Diffuse Leishmaniasis Caused by *Leishmania (L.) amazonensis*. **Frontiers In Immunology**, v. 9, p. 1-7, 2018.
- BENNOUNA, S.; DENKERS E. Y. Microbial Antigen Triggers Rapid Mobilization of TNF- to the Surface of Mouse Neutrophils Transforming Them into Inducers of High-Level Dendritic Cell TNF- α Production. **The Journal Of Immunology**, v. 174, n. 8, p. 4845-4851. 2005.
- BENEKE, C.E.; VILJOEN, A.M.; HAMMAN, J.H. Polymeric plant-derived excipients in drug delivery. **Molecules**, v. 14, p. 2602-2620, 2009.
- BERBERT, T. R. N.; MELLO, T. F. P.; NASSIF, P. W.; MOTA, C. A.; SILVEIRA, A. V.; DUARTE, G. C.; DEMARCHI, I. G.; ARISTIDES, S. M. A.; LONARDONI, M. V. C.; TEIXEIRA, J. J. V.; SILVEIRA, T. G. V. Pentavalent Antimonials Combined with Other Therapeutic Alternatives for the Treatment of Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: a systematic review. **Dermatology Research And Practice**, v. 2018, p. 1-21, 2018
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, 2017.
- BRITO, T. V.; BARROS, F. C.N.; SILVA, R. O.; DIAS JÚNIOR, G. J.; C. JÚNIOR, J. S.; FRANCO, Á. X.; SOARES, P. M.G.; CHAVES, L. S.; ABREU, C. M.W.s.; PAULA, R. C.M. de. Sulfated polysaccharide from the marine algae *Hypnea musciformis* inhibits TNBS-induced intestinal damage in rats. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 957-964. 2016.
- BOUHLAL, R. *et al.* Antiviral Activities of Sulfated Polysaccharides Isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta, Gigartinales) and *Boergeseniella thuyoides* (Rhodophyta, Ceramiales). **Marine Drugs**, v. 9, p. 1187-1209; 2011.
- BOHN, J. A.; BeMILLER, J. N. (1 \rightarrow 3) β -d-glucans as biological response modifiers: areview of structure-functional activity relationships. **Carbohydr. Polym.**, v. 28, p. 3-14,1995.
- CAETANO, D.C.D.S. *et al.* Parâmetros clínicos, diagnóstico e tratamento da leishmaniose tegumentar e visceral. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 29, p. 2087-2105. 2019.
- CASTILHO T.M. *et al.* New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. **J Clin Microbiol.**, v. 41, p. 540-6, 2003.

CARNEIRO, J. G.; RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI, E. S. O.; SOUZA, R. B.; QUINDERÉ, A. L. G.; COURA, C. O.; ARAÚJO, I. W. F.; CHAVES, H. V.; BEZERRA, M. M.; BENEVIDES, N. M. B. Peripheral Antinociception and Anti-Inflammatory Effects of Sulphated Polysaccharides from the Alga *Caulerpa mexicana*. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 115, n. 4, p. 335-342, 2014.

CIANCIA, M.; QUINTANA, I.; CERESO, A. S. Overview of Anticoagulant Activity of Sulfated Polysaccharides from Seaweeds in Relation to their Structures, Focusing on those of Green Seaweeds. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 23, p. 2503–2529, 2010.

CHAGAS, F. D. *et al.* Sulfated polysaccharide from the red algae *Gelidiella acerosa*: Anticoagulant, antiplatelet and antithrombotic effects. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 159, p. 415–421, 2020.

CHAGAS, Francisco Diêgo da Silva. **Caracterização estrutural e propriedades bioativas dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Gelidiella acerosa***. 2018. 88f. dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

CHENG, A.; KESSLER, D.; MACKINNON, R. *et al.* Reporting guidelines for health care simulation research: extensions to the CONSORT and STROBE statements. **Adv Simu**, v. 1, n. 1, p. 25, 2016.

CHEN, X.; NIE, W.; FAN, S.; ZHANG, J.; WANG, Y.; LU, J.; JIN, LIQIN. A polysaccharide from *Sargassum fusiforme* protects against immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 2, p. 1114–1119, 2012.

CHEN, X.; NIE, W.; YU, G.; LI, Y.; HU, Y.; LU, J.; JIN, L. Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from *Sargassum fusiforme*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 3-4, p. 695–700, 2012.

CHEUKA, P.M. *et al.* The role of natural products in drug discovery and development against neglected tropical diseases. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 58, 2016.

CAMPO, V.L.; KAWANO, D.F.; SILVA, D.B.; CARVALHO, I. Carrageenans: biological properties, chemical modifications and structural analysis – a review. **Carbohydrate Polymers**, v.77, n.2, p.167-180, 2009.

COSTA, A.B.G.; VIEIRA, T.S.S.; SILVA, R.P.; MESQUITA, A.L.F.; FERNANDES, J.R.M.; SARAIVA, E.M. 3'nucleotidase/nuclease activity allows *leishmania* parasites to escape killing by neutrophil extracellular traps. **Infection and immunity**, v.82, n.4, p.1732-1740, 2014.

COSTA, J.M.L. *et al.* Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose tegumentar no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**. Bahia, Brasil. v.3 p,70-83. 2009.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. (org.). Leishmanioses do continente americano. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**, E-book, 2014.

COURA, C.O.; ARAÚJO, I.W.F.; VANDERLEI, E.S.O.; RODRIGUES, J.A.G.; QUINDERÉ, A.L.G.; FONTES, B.P.; QUEIROZ, I.N.L.; MENEZES, D.B.; BEZERRA, M.M.; SILVA, A.A.R.; CHAVES, H.V.; JORGE, R.J.B.; EVANGELISTA, J.S.A.M.; BENEVIDES, N.M.B. Antinociceptive and Anti Inflammatory Activities of Sulfated Polysaccharides from the Red Seaweed *Gracilaria cornea*. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.110, p. 335-341, 2012.

CUNHA, L.; GREHA, A. Sulfated seaweed polysaccharides as multifunctional materials in drug delivery application. **Marine Drugs**, v. 14, p. 1-41, 2016.

GUANGLING, J. *et al.* Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Mar Drugs**, v. 9, p. 196–233, 2011.

DI, TONG *et al.* Antioxidant and immunostimulating activities *in vitro* of sulfated polysaccharides isolated from *Gracilaria rubra*. **Journal of Functional Foods**, v. 28, p. 64-75, 2017.

DIBYENDU, P.; DAS, P.; DE, T.; CHAKRABORTI, T. *In vitro* anti-leishmanial efficacy of potato tuber extract (PTE): Leishmanial serine protease(s) as putative target. **Experimental Parasitology**, v. 146, p. 11-19, 2014.

DUARTE, M. C. *et al.* A. Antileishmanial activity and mechanism of action from a purified fraction of *Zingiber officinalis* Roscoe against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v.166, p. 21-8, 2016.

DUTRA, F. L.; OLIVEIRA, M. M.; SANTOS, R. S.; SILVA, W. S.; ALVIANO, D. S.; VIEIRA, D. P.; LOPES, A. H. Effects of linalool and eugenol on the survival of *Leishmania (L.) infantum* chagasi within macrophages. **Acta Tropica**, v. 164, p. 69-76. 2016.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G.; A note on the determination of the ester sulfate content of sulphated polysaccharides. **Biochemistry Journal**, v.84, p. 350-356, 1962.

ETAHIRI, SAMIRA; BULTEL-PONCÉ, VALÉRIE; CAUX, CHRISTELLE; GUYOT, MICHÈLE. New Bromoditerpenes from the Red Alga *Sphaerococcus coronopifolius*. **Journal Of Natural Products**, v. 64, n. 8, p. 1024-1027, 2001.

EVARISTO, A. M. C. F.; SILVA, I. W. G.; OLIVEIRA, G. M. B.; SILVA, R. E.; COSTA, J. O. J.; VESCHI, J. L. A.; MARCILI, A.; HORTA, M. C. Detecção e caracterização molecular de *Leishmania* em cães do Nordeste do Brasil. **Brazilian Journal of Global Health**, v. 4, n. 1. p. 23-29, 2021.

FARIAS, W. R. L. *et al.* Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29299–29307. 2000.

FAVERI, C.; SCHMIDT, É. C.; SIMIONI, C.; MARTINS, C. D. L.; BONOMI-BARUFI, J.; HORTA, P. A.; BOUZON, Z. L. Effects of eutrophic seawater and temperature on the physiology and morphology of *Hypnea musciformis* J. V. Lamouroux (Gigartinales, Rhodophyta). **Ecotoxicology**, v. 24, n. 5, p. 1040-1052. 2015.

FONSECA, R.J.C.; OLIVEIRA, S.N.M.C.G.; MELO, F.R.; PEREIRA, M.G.; BENEVIDES, N.M.B.; MOURÃO, P.A.S. Slight differences in sulfatation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities. **Thrombosis and Haemostasis**, v.99, n.3, p.539-545, 2008.

GANESAN, A. R.; TIWARI, U.; RAJAURIA, G. Seaweed nutraceuticals and their therapeutic role in disease prevention. **Food Science And Human Wellness**, v. 8, n. 3, p. 252-263, 2019.

GIUDICE, A. *et al.* Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, p. 1-9, 2012.

GIUDICE, A.; CAMADA, I.; LEOPOLDO, P.T.G.; PEREIRA, J.M.B.; RILEY, L.W.; WILSON, M.E.; HO, J.L.; DE JESUS, A.R.; CARVALHO, E.M.; ALMEIDA, R.P. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BioMedCentral Infectious Diseases**, v.7, n.7, 2007.

GLANS, H., DOTEVALL, L., SÖBIRK, S. K., FÄRNERT, A., MARIA BRADLEY, M. Cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis in Sweden from 1996–2016: a retrospective study of clinical characteristics, treatments and outcomes. **BMC Infectious Diseases**. v. 18, n. 1, p. 632, 2018.

GONG, YUFENG *et al.* Structural characteristics and anti-inflammatory activity of UV/H₂O₂-treated algal sulfated polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 152, p. 112157, 2021.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R.; Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GOMES, C. M.; PAULA, N. A.; MORAIS, O. O.; SOARES, K. A.; ROSELINO A. M.; SAMPAIO R. N. R. Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis. **Anais Brasileiros De Dermatologia**, v. 89, n. 5, p. 701–709, 2014.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GUAN, X. L.; MASER, P. Comparative sphingolipidomics of disease-causing trypanosomatids reveal unique lifecycle- and taxonomy-specific lipid chemistries. **Scientific reports**, v. 7, n. 13617, 2017.

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M.; MORRISON, L.; RINDI, F.; MIRANDA, S. V.; MATHIESON, A. C.; PARKER, B. C.; LANGANGEN, A.; JOHN, D. M.; BÁRBARA, I. AlgaeBase: an on-line resource for algae. **Cryptogamie, Algologie**, v. 35, n. 2, p. 105-115, 2014.

HAROUN-BOUHEDJA, F.; ELLOUALI, M.; SINQUIN, C.; BOISSON-VIDAL, C. Relationship between Sulfate Groups and Biological Activities of Fucans. **Thrombosis Research**, v. 100, n. 5, p. 453-459, 2000.

HENDRICKX, S.; CALJON, G.; MAES, L. Need for sustainable approaches in antileishmanial drug discovery. **Parasitology Research**, v. 118, n. 10, p. 2743-2752, 2019.

HE, D. *et al.* Gamma-irradiation degraded sulfated polysaccharide from a new red algal strain *Pyropia yezoensis* Sookwawon 104 with *in vitro* antiproliferative activity. **Oncol Lett.** v. 20, n. 4, p. 91, 2020.

HENTATI, F. *et al.* Bioactive polysaccharides from seaweeds. **Molecules**, v. 25, p. 3152, 2020.

HOLANDA, M.L. **Iota-carragenana da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* versus iota-carragenana comercial: propriedades estruturais e reológicas.** 121f. 2007. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

HONG, A.; ZAMPIERI, R. A.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M.; LARANJEIRA-SILVA, M. F. One Health Approach to Leishmaniasis: understanding the disease dynamics through diagnostic tools. **Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 809, 2020.

HONDOWICZE, B.; SCOTT, P. Influence of Parasite load on the ability of Type 1 T Cells to control *Leishmania major* Infection. **Infection and Immunize**, v. 70, n. 2, p. 498-503, 2002.

HUANG, LIXIN *et al.* Sulfated polysaccharides: Immunomodulation and signaling mechanisms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 92, p. 1-11, 2019.

ISMAIL, M. M.; AMER, M. S. Characterization and biological properties of sulfated polysaccharides from *Corallina officinalis* and *Pterocladia capillacea*. **Brazilian Botanical Acta**, v. 34, p. 623-632, 2021

IQBAL, H. *et al.* Therapeutic modalities to combat leishmaniasis, a review. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 6, p. 1-5, 2016.

JAFARZADEH, A.; NEMATI, M.; SHARIFI, I.; NAIR, A.; SHUKLA, D.; CHAUHAN, P.; KHORRAMDELAZAD, H.; SARKAR, A.; SAHA, B. *Leishmania* species-dependent functional duality of toll-like receptor 2. **IUBMB Life**, v. 71, n. 11, p. 1685-1700, 2019.

JESUS, P B; GUIMARÃES, S. M. P. B; NUNES, J M C. *Hypnea platyclada*, a new species of red alga (Rhodophyta, Cystocloniaceae) from Brazil. **Phytotaxa**, v. 85, n. 1, p.26-34. 2013.

JESUS, P. B; SCHNADELBACH, A. S.; NUNES, J. M. DE C. The genus *Hypnea* (Cystocloniaceae, Rhodophyta) on the coast of Bahia, Brazil. **Sitientibus série ciências biológicas**, v. 13, 2013.

JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H. Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. **Marine Drugs**, v. 9, n. 2, p. 196-223, 2011.

KAPIL, S.; SINGH, P.K.; SILAKARI, O. An update on small molecule strategies targeting leishmaniasis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, p. 339-367, 2018.

KAR, S.; SHARMA, G.; DAS, P.K. Fucoïdan cures infection with both antimony-susceptible and -resistant strains of *Leishmania donovani* through Th1 response and macrophage-derived oxidants. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, p. 618–625, 2011.

KAR, N.; CHAKRABORTY, S.; KUMAR, A.; GHOSH, S.; BERA, T. Development and evaluation of a cedrol-loaded nanostructured lipid carrier system for *in vitro* and *in vivo* susceptibilities of wild and drug resistant *Leishmania donovani* amastigotes. **Sciences**, v. 104, p. 196-211, 2017.

KALANTARI, H; HEMMATI, A; BAVARSAD, N; REZAIE, A; AHMADI, S. Effect of topical Nanoliposomes of Paromomycin on Rats Liver and Kidney. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v.9, n.4, p. e17565, 2014.

KANGUSSU-MARCOLINO, MÔNICA MENDES et al. Acidic heteropolysaccharides with potent antileishmanial effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 165-170, 2015.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011.

KIM, JIN-KYUNG *et al.* *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 5, pág. 1051-1058, 2011.

KIM, M.; JOO, H. Immunostimulatory effects of fucoidan on bone marrow-derived dendritic cells. **Immunology Letters**, v. 115, p. 138–143, 2008.

KORHONEN, RIKU *et al.* Nitric oxide production and signaling in inflammation. **Current Drug Targets-Inflammation & Allergy**, v. 4, n. 4, p. 471-479, 2005.

KOUTSONI, O; BARHOUMI, M; GUIZANI, I; DOTSIKA, E. *Leishmania* eukaryotic initiation factor (LeIF) inhibits parasite growth in murine macrophages. **PLoS One**, v.9, 2014.

LEITE, P. M.; GOMES, R. S.; FIGUEIREDO, A. B.; SERAFIM, T. D.; TAFURI, W. L.; DE SOUZA, C. C.; MOURA, S. A. L.; FIETTO, J. L. R.; MELO, M. N.; RIBEIRO-DIAS, F.; OLIVEIRA, M. A. P.; RABELLO, A.; AFONSO, L. C. C. Ecto-Nucleotidase Activities of Promastigotes from *Leishmania (Viannia) braziliensis* Relates to Parasite Infectivity and Disease Clinical Outcome. **Plos Neglected Tropical Disease**, 2012.

LEANDRO, A.; PACHECO, D.; COTAS, J.; MARQUES, J. C.; PEREIRA, L.; GONÇALVES, A. M. M. Seaweed's Bioactive Candidate Compounds to Food Industry and Global Food Security. **Life**, v. 10, n. 8, p. 140, 2020.

LEIRO, J.M. *et al.* Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. **Int Immunopharmacol**, v. 7, p. 879-888, 2007.

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.** v. 18, p. 591-98, 2016.

LI, H.; MAO, W.; ZHANG, X.; QI, X.; CHEN, Y.; CHEN, Y.; XU, J.; ZHAO, C.; HOU, Y.; YANG, Y.; LI, N.; WANG, C. Structural characterization of an anticoagulant-active sulfated polysaccharide isolated from green alga *Monostroma latissimum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 2, p. 394-400, 2011.

LIU, D; UZONNA, J.E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular Microbiology and Infection**, v. 2, n. 83, 2012.

LIANG W, MAO X, PENG X, TANG S. Effects of sulfate group in red seaweed polysaccharides on anticoagulant activity and cytotoxicity. **Carbohydr Polym.** v. 30; n.101: p.776-85. 2014

LIBERMAN, G. N.; OCHBAUM, G.; MEJUBOVSKY-MIKHELIS, M.; BITTON, R.; ARAD, S. (Malis). Physico-chemical characteristics of the sulfated polysaccharides of the red microalgae *Dixoniella grisea* and *Porphyridium aerugineum*. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 1171-1179. 2020.

LIESE, J.; SCHLEICHER, U.B.; BOGDAN, C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. **Immunobiology**, v. 213, n. 3, p. 377–387, 2008.

LINS, K.O.A.L.; BEZERRA, D.P.; ALVES, A.P.N.N.; ALENCAR, N.M.N.; LIMA, M.W.; TORRES, V.M.; FARIAS, W.R.L.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Dias-Pifferer). **Journal of Applied Toxicology**, v.29, n.1, p.20-26, 2009.

LOPES, E. G. P. Dinâmica da transmissão da leishmaniose visceral em uma coorte de cães em Juatuba-MG de 2010 a 2011. **Iareferencia**. v. 44, n. 2, p. 352-357. 2014.

MARINHO-SORIANO, E.; BOURRET, E. Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria species* (Gracilariaceae, Rhodophyta). **Bioresource Technology**, n. 90, n.3, p.329-333, 2003.

MAKKAR, H. P. S.; TRAN, G.; HEUZÉ, V.; GIGER-REVERDIN, S.; LESSIRE, M.; LEBAS, F.; ANKERS, P. Seaweeds for livestock diets: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 212, p. 1-17, 2016.

MACIEL, J. S.; CHAVES, L. S.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; FREITAS, A. L. P.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, R. C. M. Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharides from red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Carbohydrate Polymers**, **Oxford**, v.71, n.4, p. 559-565, 2008.

MARTINEZ-POMARES, L. *et al.* Carbohydrate-independent recognition of collagens by the macrophage mannose receptor. **Eur. J. Immunol.**, v. 36, p. 1074–1082, 2006.

- MCHUGH, DENNIS J. A guide to the seaweed industry. **FAO fisheries technical paper**, v. 441, p. 105, 2003.
- MINODIER, P.; PAROLA, P. Cutaneous leishmaniasis treatment. **Travel Medicine And Infectious Disease**, v. 5, n. 3, p. 150-158, 2007.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Coeficiente de detecção de casos de leishmaniose tegumentar por 100.000 habitantes: Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2021. 2022. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/situacao-epidemiologica/arquivos/lt-coef_deteccao.pdf. Acesso em: 4 jul. 2023.
- 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.
- MOLAIE, S.; FATEMEH, G.; ABDOHOSEIN, D.; MOHAMMAD, H. Z.; ZOHREH, S. Evaluation of synergistic therapeutic effect of shark cartilage extract with artemisinin and glucantime on visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 22, n. 2, p.146–153, 2019.
- MONTEIRO, V. S.; TELES, F. B.; COURA, C. Oliveira; SOUZA, R. B.; LIMA, C. N. de C.; COSTA, D. V. S.; HONÓRIO JUNIOR, E. R.; ESCUDEIRO, S. S.; CHAVES, E. M. C.; VASCONCELOS, S. M. M. Involvement of the GABAergic system in the anxiolytic effect of sulfated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Journal Of Applied Phycology**, v. 28, n. 3, p. 1997-2004, 2015.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- NAKAMURA, T.; SUZUKI, H.; WADA, Y.; KODAMA, T. T. Fucoidan induces nitric oxide production via p38 mitogen-activated protein kinase and NF- κ B-dependent signaling pathways through macrophage scavenger receptors. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 343, n. 1, p. 286-294, 2006.
- NA, Y. S.; KIM, W. J.; KIM, S. M.; PARK, J. W.; LEE, S. M.; KIM, S. O. *et al.* Purification, characterization and immune stimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens*. **Int Immunopharmacol**, v.10, p. 364–370, 2010.
- NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L. Carrageenan: a review. **Veterinární Medicína**, v. 58, n. 4, p. 187-205, 2013.
- NEGREIROS, M. M. F.; ALMEIDA-LIMA, J.; ROCHA, H. A. O. Sulfated Polysaccharides from Unusual Natural Sources. In Sulfated Polysaccharides. **Nova Science Publishers**, v. 1, p. 217–234, 2015.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. The use of visceral leishmaniasis rapid diagnostic tests. Geneve, 2008. Disponível em: www.who.int/entity/tdr/publications/year/2008/en/ Acesso em: 7 nov. 2023.

- OLIVEIRA, F. *et al.* Lesionsizecorrelates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 85, p. 70-73, 2011.
- OLIVEIRA, C. I.; BRODSKYN, C. I. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Frontiers in Immunology**, v.3, n.145, 2012.
- OZAKY, C. Y. **Perfil de expressão gênica de célula monocítica humana infectada por *Leishmania (Leishmania) infantum***. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo. p. 199. 2018.
- PAL, A.; KAMTHANIA, M. C.; KUMAR, A. Bioactive Compounds and Properties of Seaweeds - A Review. **Oalib**, v. 01, n. 04, p. 1-17, 2014
- PAHO - Pan American Health Organization [Internet]. Report Leishmaniasis; 2019 [cited 2020 Mar 10]. Disponível:
https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51738/leishreport8_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y. (accessed 20.08.2022). 2019.
- PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B.; MELO, M. R. S.; VALENTE, A. P.; MELO, F.R.; MOURÃO, P.A.S. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? **Carbohydrate Research**, v.340, n.12, p.2015-2023, 2005.
- PINHEIRO, C. V. G.; SILVA, W. M. B. da; RODRIGUES, J. P. V.; ROCHA, Y. M.; TEIXEIRA, M. J.; OLIVEIRA, R. N. de; SOUZA, N. V. de; NICOLETE, R. Anti-*Leishmania infantum* *in vitro* effect of n-cyclohexyl-1,2,4-oxadiazole and its ADME/TOX parameters. **Journal Of Parasitic Diseases**, v. 46, n. 2, p. 317-322, 2021.
- PIRES, C. L. *et al.* Evaluation of macroalgae sulfated polysaccharides on the *Leishmania (L.) amazonensis* promastigote. **Marine Drugs**, v. 11, n. 3, p. 934–943, 2013.
- POMIN, V. H; MOURAO, P. A. S. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. **Glycobiology**, v. 18, n. 12, p. 1016-1027, 2008.
- QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. R.; VANDERLEI, E. S. O.; QUEIROZ, I. N.L.; RODRIGUES, J. A.G.; ARAÚJO, I. W.F.; JORGE, R. J.B.; MENEZES, D. B.; SILVA, A. A.R.; CHAVES, H. V. Peripheral antinociception and anti-edematogenic effect of a sulfated polysaccharide from *Acanthophora muscoides*. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 3, p. 600-613, 2013.
- RAVEENDRAN, S. *et al.* Pharmaceutically versatile sulfated polysaccharide based bionano platforms. **Nanomedicine**, v. 9, p. 605-626, 2013.
- RAVEN P. H.; EVERT R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 2007.
- REY, L. **Parasitologia**. 4. d. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 14. Cimerman, B, 2008.

RODRIGUES, S.; GRENHA, A. Activation of macrophages: Establishing a role for polysaccharides in drug delivery strategies envisaging antibacterial therapy. **Curr Pharm Des**, v. 21, p. 4869–4887, 2015.

RODRIGUES *et al.* *In vitro* inhibition of thrombin generation by sulfated polysaccharides from the tropical red seaweed *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveir. **Acta Of Fisheries and Aquatic Resourcer**. v.5, n.1, p. 22-32, 2017.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. *In vitro* cytotoxicity test: comparative study between two methodologies. **Material Research**, v. 6, n.3, p.317-320, 2003.

RIBEIRO, C. V. P. E. **Estrutura e atividade antidiarreica de polissacarídeos da algamarinha vermelha *Bryothamnion triquetrum* s. g.gmelin.** 2016. 80f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

RIBEIRO, P. A. F. *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of a new *Leishmania* hypothetical protein applied as a DNA vaccine or in a recombinant form against *Leishmania infantum* infections. **Molecular Immunology**, v. 106, p. 108-118. 2019.

RICCIO, G.; LAURITANO, C. Microalgae with immunomodulatory activities. **Marine Drugs**, v. 18, n. 1, p. 2, 2019.

RIBEIRO, R. R. P.; MOREIRA, O. C.; OSORIO, E. Y.; CYSNE, N. L. F.; GOMES, A. S.; VALVERDE, J. G.; PIRMEZ, C.; DA CRUZ, A. M.; PINTO, E. F. Comparative Evaluation of Lesion Development, Tissue Damage, and Cytokine Expression in Golden Hamsters (*Mesocricetus auratus*) Infected by Inocula with Different *Leishmania (Viannia) braziliensis* Concentrations. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 12, p.5203-5213, 2014.

RIBEIRO, N. A.; ABREU, T. M.; CHAVES, H. V.; BEZERRA, M. M.; MONTEIRO, H. S. A.; JORGE, R. J. B.; BENEVIDES, N. M. B. Sulfated polysaccharides isolated from the green seaweed *Caulerpa racemosa* plays antinociceptive and anti-inflammatory activities in a way dependent on HO-1 pathway activation. **Inflammation Research**, v. 63, n. 7, p. 569-580, 2014.

ROCHA, T. M. D. D.; SILVEIRA, M. B.; QUIXABEIRA, V. B. L. Leishmaniose tegumentar americana em humanos: uma revisão dos aspectos envolvidos na doença. **Saúde & ciência em ação**. v. 5, n. 1, p. 1-13, 2019.

RODRIGUES, D.; ALVES, C.; HORTA, A.; PINTEUS, S.; SILVA, J.; CULIOLI, G.; THOMAS, O.; PEDROSA, R. Antitumor and Antimicrobial Potential of Bromoditerpenes Isolated from the Red Alga, *Sphaerococcus coronopifolius*. **Marine Drugs**, v. 13, n. 2, p. 713-726, 2015.

RODRIGUES, J.A.G. *et al.* Carragenana da epífita *Hypnea musciformis* obtida do cultivo experimental de *Solieria filiformis* em Flecheiras, Estado do Ceará, Brasil. **Acta Scientiarum. Technology**, v.33, n. 2, p.137-144, 2011.

RODRIGUES, J. A. Gurgel *et al.* Isolamento, fracionamento e avaliação toxicológica in vivo de polissacarídeos sulfatados de *Hypnea musciformis*. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.41, n. 7, p.1211-1217, 2011.

RUOCCO, N. *et al.* Polysaccharides from the marine environment with pharmacological, cosmeceutical and nutraceutical potential. **Molecules**, v. 27, p. 1-16, 2016.

SACKS, D. L.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 453-483, 2001.

SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **Int. Immunopharmacol.**, v. 6, p.317–333, 2006.

SANTOS, A.O. *et al.* 4-Acetydolastane diterpene from the Brazilian brown alga *Canistrocarpus cervicornis* as antileishmanial agent. **Marine Drugs**, v. 9, n. 11, p. 2369-2383, 2011.

SANTOS, G. R. de A. C. *et al.* Perfil epidemiológico dos casos de leishmaniose tegumentar americana no Brasil. **Enfermagem em Foco**, v. 12, n. 5, 2021.

SANTOS, C. R. O. **Uso da anfotericina B lipossomal e de outras drogas no tratamento de pacientes com leishmaniose mucosa: análise da experiência em um serviço de referência para o diagnóstico e tratamento das leishmanioses, 2000-2015.** 2018. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2018.

SANTIAGO, A. S.; PITA, S. S. da R.; GUIMARÃES, E. T. Leishmaniasis treatment, current therapy limitations and new alternative requirements: A narrative review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e29510716543, 2021.

SAMARAKOON, K.; JEON, Y. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae - A review. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 948-960, 2012.

SÁNCHEZ, R. A. R. *et al.* *Gracilariopsis hommersandii*, a red seaweed, source of agar and sulfated polysaccharides with unusual structures. **Carbohydrate polymers**, 213, 138–146, 2019.

SALEHI, B.; SHARIFI-RAD, J.; SECA, A.M.L.; PINTO, D.C.G.A.; MICHALAK, I.; TRINCONE, A.; MISHRA, A.P.; NIGAM, M.; ZAM, W.; MARTINS, N. Current Trends on Seaweeds: Looking at Chemical Composition, Phytopharmacology, and Cosmetic Applications. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4182, 2019.

SENNI, K., PEREIRA, J., GUENICHE, F., DELBARRE-LADRAT, C., INQUIN, C., RATISKOL, J., GODEAU, G., FISCHER, A., HELLEY, D., COLLIEC JOUAULT, S. Marine Polysaccharides: A Source of Bioactive Molecules for Cell Therapy and Tissue Engineering. **Mar. Drugs**. v. 9, p. 1664-1681, 2011.

SCHNORR, D.; MUNIZ, A. C.; PASSOS, S.; GUIMARÃES, L. H.; LAGO, E. L.; OLÍVIA BACELLAR, O.; GLESBY, M. J.; CARVALHO, E. M. IFN- γ Production of *Leishmania* Supplements Antigen the skin test *Leishmania* in the identification of exposure to *L. braziliensis* Infection. **PLoS neglected Tropical Disease**, v. 6, n. 12. 2012.

SHASHIDHAR, G. M.; GIRIDHAR, P.; MANOHAR, B. Functional polysaccharides from medicinal mushroom *Cordyceps sinensis* as a potent food supplement: extraction, characterization and therapeutic potentials a systematic review. **Rsc Advances**, v. 5, n. 21, p. 16050-16066, 2015.

SILVA, F. R. F.; DORE, C. M. P. G.; MARQUES, C. T.; NASCIMENTO, M. S.; BENEVIDES, N. M. B.; ROCHA, H. A. O.; CHAVANTE, S. F.; LEITE, E. L. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: action of major types of commercial carrageenans. **Carbohydrate Polymers**, v.79, n.1, p.29-33, 2010.

SILVA, A. G.; BITTAR, R. C.; NOGUEIRA, R. S.; AMATO, V. S.; MATTOS, M. S.; NETO, M. P. O.; COUTINHO, S. G.; CRUZ, A. M.; Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection?. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 149, n. 3, p. 440–444, 2007.

SOUZA, B. W. S. *et al.* Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Food Hydrocolloids**, v.27, p.287-292, 2012.

SOUZA, R. B.; FROTA, A. F.; SILVA, J.; ALVES, C.; NEUGEBAUER, A. Z.; PINTEUS, S.; RODRIGUES, J. A. G.; CORDEIRO, E. M. S.; ALMEIDA, R. R. de; PEDROSA, R. *In vitro* activities of kappa-carrageenan isolated from red marine alga *Hypnea musciformis*: antimicrobial, anticancer and neuroprotective potential. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 1248-1256, 2018.

SOUZA, W. M.; *et al.* Sulfated polysaccharide fraction from marine algae *Solieria filiformis*: structural characterization, gastroprotective and antioxidant effects. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 152, p. 140-148, 2016.

SCORZA, B.; CARVALHO, E.; WILSON, M. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1296, 2017.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581-592, jul. 2016.

SILVA, J. *et al.* Antioxidant and neuroprotective potential of the brown alga *Bifurcaria bifurcata* in an *in vitro* model of Parkinson's disease. **Marine drugs**, v. 17, n. 2, pág. 85, 2019.

SMYRNIOTOPOULOS, V.; VAGIAS, C.; BRUYÈRE, C.; LAMORAL-THEYS, D.; KISS, R.; ROUSSIS, V. Structure and *in vitro* antitumor activity evaluation of brominated diterpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 3, p. 1321-1330, 2010.

SMYRNIOTOPOULOS, Vangelis *et al.* Ionióis I e II, diterpenos tetracíclicos com atividade antibacteriana, de *Sphaerococcus coronopifolius*. **Química & Biodiversidade**, v. 7, n. 3, pág. 666-676, 2010.

SOARES, D. C., *et al.* A compound from *Dictyota pfaffii* algae, inhibits the infection by *Leishmania amazonensis*. **Plos Neglect.** v. 6, p.1787, 2012.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 82, fev. 2017.

STEPHANIE, B.; ERIC, D.; SOPHIE, F.M.; CHRISTIAN, B.; YU, G. Carrageenan from *Solieria chordalis* (Gigartinales): Structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions. **Carbohydrate Polymers**, v.81, p.448–460, 2010.

STORTZ, C. A.; CASES, M. R.; CEREZO, A. S. The system of agaroids and carrageenans from the soluble fraction of the tetrasporic stage of the red seaweed *Iridea undulosa*. **Carbohydr. Res.**, v 34, p61-65, 1997.

SYNYTSYA, A.; KIM, W. J.; KIM, S. M.; POHL, R.; SYNYTSYA, A.; KVASNICKA, F *et al.* Structure and antitumor activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean seaweed *Undaria pinnatifida*. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p.41–48, 2010.

SUN, Y. DI, T.; CHEN, G.; ZENG, X.; YE, H. Antioxidant and immunostimulating activities *in vitro* of sulfated polysaccharides isolated from *Gracilaria rubra*. **Journal Of Functional Foods**, v. 28, p. 64-75, 2011

TAKANO, R. *et al.* Occurrence of carrageenan structure in an agar from the red seaweed *Digenea simplex* (Wulfen) C. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales) with a short review of carrageenan-agarocolloid hybrid in the Florideophycidae. **Botanica Marina**, v. 46, n.2, p. 142-150. 2003.

TAVARES, N. M. *et al.* Estratégias de vacinação contra Leishmaniose Visceral e Cutânea: Lições dos modelos experimentais. **Gazeta Média da Bahia**, v. 79, n.143, p.110-121, 2009.

TAYLOR, V. M.; CEDEÑO, D. L.; MUÑOZ, D. L.; JONES, M. A.; LASH, T. D.; YOUNG, A. M.; CONSTANTINO, M. H.; ESPOSITO, N.; VÉLEZ, I. D.; ROBLEDO, S. M. *In Vitro* and *In Vivo* Studies of the Utility of Dimethyl and Diethyl Carbaporphyrin Ketals in Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4755-4764, 2011.

TEIXEIRA, C. R. *et al.* Potential of KM⁺ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. **Vaccine**, v. 24, n. 15, p. 3001-3008, 2006.

TEIXEIRA, V. C; AMORIM, A. C. O; RODRIGUES, C. R; SAMPAIO F. H. C; CAMBUY, M. R. T; MACHADO, R. D; DE CAYRES, T. B; DOS SANTOS, Y. R. A Miltefosina no tratamento da *Leishmaniose Tegumentar*: eficácia e limitações da primeira terapia oral autorizada no Brasil. **Revista Brasileira de Revisão de Saúde**, v.4, pág.17261–17272, 2023.

TELLES, C.B.S, MENDES-AGUIAR, C., FIDELIS, G.P *et al.* "Efeitos imunomoduladores e atividade antimicrobiana de heterofucanos de *Sargassum filipendula* ". **Journal of Applied Phycology**. v.30 , p.569–578.2015.

TERUYA T, TAKEDA S, TAMAKI Y, AND TAKO M, BIOSCI. Fucoidan Isolated from *Laminaria angustata* var. *longissima* Induced Macrophage Activation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v74, p 1960–1962, 2010.

TIWARI, N.; GEDDA, M. R.; TIWARI, V. K.; SINGH, S. P.; SINGH, R. K. Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. v. 18, n. 1, p. 26-41. 2018.

USOV, Anatolii I. Polysaccharides of the red algae. **Advances In Carbohydrate Chemistry And Biochemistry**, p. 115-217, 2011.

VANDERLEI, E.S.O. *et al.* The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Inflammation Research**, v.60, n.12, p.1121-1130, 2011.

VAN ASSCHE, T.; DESCHACHT, M.; DA LUZ, R. A. I.; MAES, L.; COS, P. *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. **Free radical biology & medicine**, v. 51, n. 2, p. 337-51, 2011.

VASCONCELOS, J. M.; GOMES, C. G.; SOUSA, A.; TEIXEIRA. A. B.; LIMA, J. M. Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. **RBAC**. v. 50, n. 3, p. 221-7, 2018.

VASCONCELOS, A. G.; ARAUJO, K. V. DE; SANTANA, L. DE A. B. Polissacarídeos extraídos de algas marinhas e suas aplicações biotecnológicas: uma revisão. **Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde**, p. 27, 2015.

VASQUEZ, R.E.; XIN, L.; SOONG, L. Effects of CXCL10 on Dendritic Cell and CD4 + T-Cell Functions during *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, v.76, n.1,p.161. 2008.

VALADARES, D. G.; DUARTE, M. C.; OLIVEIRA, J. S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; MARTINS, V. T.; COSTA, L. E.; LEITE, J. P. V.; SANTORO, M. M.; RÉGIS, W. C.B.; TAVARES, C. A.P. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. **Parasitology International**, v. 60, n. 4, p. 357-363, 2011.

VAVILALA, Sirisha Lakshmi; D'SOUZA, Jacinta Seraphina. **Marine Algae Extracts Processes, Products, and Applications: Algal Polysaccharides and their biological applications**. 1. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2015.

Eds. Kim SK, Chojnacka K. (Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons;), 2015.

WASSIE, T.; NIU, K.; XIE, C.; WANG, H.; XIN, W. EXTRACTION Techniques, Biological Activities and Health Benefits of Marine Algae *Enteromorpha prolifera* Polysaccharide. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, n. 8, p. 327-345, 2021.

WANG, J.; NIU, S.; ZHAO, B.; WANG, X.; YAO, J.; ZHANG, J.; ZHAO, W.; ZHAO, Y. Regioselective synthesis of sulfated guar gum: Comparative studies of structure and antioxidant activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 734–740, 2013.

WIJESEKARA, I.; PANGESTUTI, R.; KIM, S. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 14-21. 2011.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. **Wkly Epidemiology Record**, v. 92, n. 38, p. 557–65, 2017.

WHO. Leishmaniasis. 2019. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em: 02 out. de 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. WHO, 2019. Disponível em <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>.

YIN, M.; ZHANG, Y.; LI, H. Advances in research on immunoregulation of macrophages by plant polysaccharides. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 145, 2019.

YANG, J. W.; YOON, S. Y.; OH, S. JI.; KIM, SA. K.; KANG, K. W. Bifunctional effects of fucoidan on the expression of inducible nitric oxide synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 346, n. 1, p. 345–350, 2006.

XIE, J.; TANG, W.; JIN, M. LI, J.; XIE, M.. Recent advances in bioactive polysaccharides from *Lycium barbarum* L., *Zizyphus jujuba* Mill, *Plantago* spp., and *Morus* spp.: structures and functionalities. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 148-160, 2016.

ZHANG, M. *et al.* Mushroom polysaccharide lentinan for treating different types of cancers: A review of 12 years clinical studies in China. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 163, p. 297-328, 2019.