



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**KAYANNY QUEIROZ FERREIRA**

**LOBOFORENOS INÉDITOS OBTIDOS DA ALGA PARDA *Lobophora variegata* COM  
ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS TUMORAIS E MODULADORA DA  
RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS**

**FORTALEZA - CE**

**2018**

KAYANNY QUEIROZ FERREIRA

LOBOFORENOS INÉDITOS OBTIDOS DA ALGA PARDA *Lobophora variegata* COM  
ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS TUMORAIS E MODULADORA DA  
RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Diego Veras Wilke

FORTALEZA-CE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- F4411 Ferreira, Kayanny Queiroz.  
LOBOFORENOS INÉDITOS OBTIDOS DA ALGA PARDA *Lobophora variegata* COM ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS TUMORAIS E MODULADORA DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS / Kayanny Queiroz Ferreira. – 2018.  
90 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.  
Orientação: Prof. Dr. Diego Veras Wilke.
1. *Lobophora variegata*. 2. Produtos naturais marinhos. 3. citotoxicidade. 4. modulação da ativação de macrófagos. 5. antioxidante. I. Título.

CDD 615.1

---

LOBOFORENOS INÉDITOS OBTIDOS DA ALGA PARDA *Lobophora variegata* COM ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS TUMORAIS E MODULADORA DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Diego Veras Wilke (Orientador)

Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Nylane Maria Nunes de Alencar

Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Dr<sup>ª</sup>. Deysi Viviana Tenazoa Wong  
Instituto do Câncer do Ceará

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, sendo em todos os momentos o melhor amigo que alguém pode ter. Afinal, só Tua Graça me basta.

Ao **Prof. Dr. Diego Wilke**, que foi o orientador mais entusiasmado e paciente que eu poderia ter. Sou muito grata por ter feito parte do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha, tudo graças a confiança que depositou em mim para desenvolver esse trabalho. Lhe devo grande parte do crescimento profissional que adquiri nesses anos.

À Profa. **Dra. Otília Pessoa**, pelo apoio em todos os aspectos, sejam financeiros como de aprendizagem, e em especial ao doutorando **Fábio Nascimento Ávila**, por estar sempre dispostos a ajudar. Este trabalho certamente não teria acontecido sem sua ajuda e dedicação.

Aos amigos e colegas do grupo LaBBMar, pelo companheirismo durante essa fase, **Luciana Furtado, Katharine Gurgel, Erlânia Alves, Tamiris Goebel, Alexia Assef, Giovanna Riello, Felipe Teles**, aos ICs **Rhaynan Andrade, Clara, Laura, Keilla, Evelline, Matheus e Rennata**. Por todo o crescimento profissional e humano que me proporcionaram. Em especial agradeço a **Thaís Brito** por ter sido uma grande companheira de seleção até os últimos momentos, sempre me consolando e alegrando meus dias de laboratório.

Aos Doutores **Elthon Ferreira, Larissa Guimarães, Andréa Oliveira, Danilo Rocha, Renan Daku, Evelyne Alves, Camila Lima**, pela paciência em sempre ensinar.

Ao CNPq pelo apoio financeiro à dedicação exclusiva das atividades da pós-graduação.

Aos meus pais **João Carlos e Elizabete**, que me deram apoio e incentivo nas horas difíceis.

Aos meus irmãos **João, Gabriel e Matheus** que na correria dos dias me fazem lembrar a importância de cuidar da família e as alegrias que isso nos traz.

À toda a minha família avós, tios e primos que dividiram todas as alegrias e dificuldades

À **Comunidade Católica Shalom**, família que me acolheu, sendo consolo e sustento de Deus.

Aos meus grandes amigos **Priscilla Nascimento, Paulo Estevão, Luiza Braga, Josie Lima, Niedja Cavalcante, Evaldo Matias, Jany Rebouças, Irlana, Braga Neto, Monique Tavares, René Formiga e Daniele Cajaseiras** por todas as conversas, orações e amor.

À **família Tomaz de Castro** por me receber em suas vidas com tanto amor e carinho.

Ao meu namorado **Delano Tomaz De Castro**, pelo amor, dedicação, paciência e por sempre me incentivar a continuar. Obrigada por alegrar meus dias e sempre me fazer olhar para as coisas eternas, eu te amo.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização desse trabalho, muito obrigada!

*“Dê-me, Senhor, agudeza para entender,  
capacidade para reter, método e faculdade para  
aprender, sutileza para interpretar, graça e  
abundância para falar, acerto ao começar,  
direção ao progredir e perfeição ao concluir”*

(São Tomás de Aquino)

## RESUMO

LOBOFORENOS INÉDITOS OBTIDOS DA ALGA PARDA *Lobophora variegata* COM ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS TUMORAIS E MODULADORA DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS

**Aluna: Kayanny Queiroz Ferreira. Orientador: Prof. Diego Veras Wilke. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da UFC defendida em 2018.**

A macroalga *Lobophora variegata* é rica em ácidos graxos ômega-3, cálcio, fósforo e vitamina C, sendo uma espécie detentora de substâncias com efeitos antioxidante, antitumoral e anti-inflamatório. A inflamação é uma resposta fundamentalmente protetora do hospedeiro em resposta à uma infecção ou agressão. Porém, a inflamação prolongada está associada a uma diversidade de doenças progressivas como distúrbios metabólicos, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares e câncer. Novas substâncias com potencial anti-inflamatório são de grande relevância clínica, visto que, a abordagem tradicional para o tratamento da inflamação crônica é de alto custo e gera efeitos colaterais que diminuem a qualidade de vida dos pacientes. Adicionalmente, a associação de antineoplásicos com compostos citotóxicos de potência modesta e efeito anti-inflamatório, como o ácido graxo ômega 3, melhoram a resposta antitumoral ao passo que reduzem alguns dos efeitos colaterais. O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade e modulação da ativação de macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo bacteriano por substâncias extraídas da *L. variegata*, utilizando modelos *in vitro*. A citotoxicidade dos compostos extraídos em solvente hexânico, acetato e etanólico foi avaliada contra células de adenocarcinoma de cólon (linhagem HCT 116), sendo o extrato hexânico o mais potente apresentando valor da concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) de 5,4 µg/mL. Através de fracionamento químico guiado pela citotoxicidade, foram isolados 11 compostos do extrato hexânico, sendo 2 epóxidos henecosanóicos poliinsaturados inéditos, **1** e **2**. As estruturas dos loboforenos compartilham semelhanças com ácidos graxos poliinsaturados como ômega-3 e -6 e ácido araquidônico. Os loboforenos foram moderadamente citotóxicos contra HCT 116 apresentando valor da concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) de 8,6 µM e 8,1 µM, respectivamente. O potencial anti-inflamatório foi investigado em linhagem de macrófagos (RAW264.7). Os macrófagos, foram pré-tratados com **1** e **2**, nas concentrações de 3,5 e 35 µM por 1h e, em seguida estimulados com LPS. O ensaio de Griess foi realizado para dosar indiretamente o óxido nítrico (NO); ELISA para dosar a produção de citocinas, além da detecção do fator de transcrição NF-κB por imunoblot. Os compostos **1** e **2** nas concentrações de 35µM inibiram totalmente a produção de nitrito e IL-6, já ambas as concentrações inibiram 50% de IL-1β e acima de 80% a produção de TNF-α. Houve a inibição total de IL-10, citocina anti-inflamatória, na concentração de 35 µM pelo composto **1** e mais de 80% no composto **2**, sendo que nas concentrações de 3,5 µM não houve inibição. Ambos os compostos, inibiram a expressão de NF-κB nas concentrações de 3,5 e 35 µM e apresentaram atividade antioxidante em 35 µM. Desta forma, no presente trabalho foram identificadas 2 loboforenos inéditos isolados da alga *L. variegata* com citotoxicidade de potência moderada e efeito modulador da ativação de macrófagos *in vitro*.

**Palavras chave:** *Lobophora variegata*, Produtos naturais marinhos, citotoxicidade, modulação da ativação de macrófagos, antioxidante.

## ABSTRACT

LOBOPHORENES UNEDITED OBTAINED FROM BROWN SEAWEED *Lobophora variegata* WITH CYTOTOXIC ACTIVITY IN TUMOR CELLS AND MODULATOR OF INFLAMMATORY RESPONSE OF MACROPHAGOS

**Student: Kayanny Queiroz Ferreira. Advisor: Prof. Diego Veras Wilke. Master's Thesis** of the Pharmacology Postgraduate Program of UFC defended in 2018.

The *Lobophora variegata* macroalgae is rich in omega-3 fatty acids, calcium, phosphorus and vitamin C, being a species that has antioxidant, antitumor and anti-inflammatory effects. Inflammation is a fundamentally protective response of the host in response to an infection or aggression. However, prolonged inflammation is associated with a variety of progressive diseases such as metabolic disorders, neurodegenerative diseases, cardiovascular diseases and cancer. New substances with anti-inflammatory potential are of great clinical relevance, since the traditional approach to the treatment of chronic inflammation is costly and generates side effects that decrease patients' quality of life. Additionally, the association of antineoplastics with modest potency cytotoxic compounds and anti-inflammatory effect, such as omega 3 fatty acid, improves the antitumor response while reducing some of the side effects. The objective of this study was to evaluate the cytotoxicity and modulation of the activation of macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide by substances extracted from *L. variegata* using in vitro models. The cytotoxicity of compounds extracted in hexanic, acetate and ethanolic solvent was evaluated against colon adenocarcinoma cells (HCT 116 strain), the most potent hexanic extract having an average inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) value of 5.4 µg / mL. Eleven compounds of the hexanic extract were isolated, with 2 unpublished polyunsaturated henoecosanic epoxides, **1** and **2**. The structures of the lobophorenes share similarities with polyunsaturated fatty acids such as omega-3 and -6 and arachidonic acid. Lobophorenes were moderately cytotoxic against HCT 116 with a mean inhibitory concentration (IC 50) of 8.6 µM and 8.1 µM, respectively. The anti-inflammatory potential was investigated in macrophage lineage (RAW264.7). Macrophages were pretreated with **1** and **2** at concentrations of 3.5 and 35 µM for 1h and then stimulated with LPS. The Griess assay was performed to indirectly dose nitric oxide (NO); ELISA to measure the production of cytokines in addition to the detection of the transcription factor NF-κB by immunoblot. Compounds **1** and **2** at concentrations of 35 µM completely inhibited the production of nitrite and IL-6, since both concentrations inhibited 50% IL-1β and above 80% TNF-α production. There was total inhibition of IL-10, anti-inflammatory cytokine, at 35 µM concentration by compound **1** and more than 80% in compound **2**, and at concentrations of 3.5 µM there was no inhibition. Both compounds inhibited NF-κB expression at concentrations of 3.5 and 35 µM and showed antioxidant activity at 35 µM. Thus, in the present work, 2 unpublished lobophorenes isolated from the *L. variegata* alga were identified with moderate potency cytotoxicity and macrophages activation modulating effect in vitro.

**Key words:** *Lobophora variegata*, Marine natural products, cytotoxicity, macrophage activation, modulation, antioxidant.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - RESUMO DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL ADOTADO NESTE TRABALHO.....	29
<b>FIGURA 2</b> - PONTE DA PRAIA DA PEDRA RACHADA, MUNICÍPIO DE PARACURU-CE.....	31
<b>FIGURA 3</b> - COMPOSTOS ISOLADOS DA ALGA <i>LOBOPHORA VARIEGATA</i> . ....	46
<b>FIGURA 4</b> - TRIAGEM INICIAL DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DAS FRAÇÕES HEXÂNICAS ISOLADAS DA ALGA <i>LOBOPHORA VARIEGATA</i> EM CÉLULAS HCT 116.....	47
<b>FIGURA 5</b> - TRIAGEM INICIAL DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DAS FRAÇÕES HEXÂNICAS ISOLADAS DA ALGA <i>LOBOPHORA VARIEGATA</i> EM CÉLULAS HCT 116.....	50
<b>FIGURA 6</b> - FLUXOGRAMA DO FRACIONAMENTO BIOGUIADO PELA ATIVIDADE CITOTÓXICA EM HCT 116. ....	52
<b>FIGURA 7</b> - ESTRUTURA DOS LOBOPHORENOS COMPARADA COM O DHA.....	53
<b>FIGURA 8</b> - TRIAGEM INICIAL DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DAS FRAÇÕES HEXÂNICAS E COMPOSTOS PUROS ISOLADOS DA ALGA <i>LOBOPHORA VARIEGATA</i> EM RAW264.7.....	54
<b>FIGURA 9</b> - TRIAGEM INICIAL DO EFEITO DAS FRAÇÕES HEXÂNICAS E COMPOSTOS PUROS ISOLADOS DA ALGA <i>LOBOPHORA VARIEGATA</i> EM RAW264.7 DESAFIADA COM 100 NG/ML LPS NA PRODUÇÃO DE NITRITO.....	56
<b>FIGURA 10</b> - EFEITO DOS LOBOPHORENOS EM CÉLULAS RAW 264.7 ESTIMULADAS OU NÃO COM LPS NA PRODUÇÃO DE NITRITO.....	57
<b>FIGURA 11</b> - MORFOLOGIA DAS CÉLULAS RAW264.7 REGISTRADA POR MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE COM AUMENTO DE 400 VEZES. ....	59
<b>FIGURA 12</b> - PRODUÇÃO DE TNF-A EM RAW264.7 ESTIMULADAS COM LPS TRATADA COM OS LOBOPHORENOS INCUBADO POR 24H.....	61
<b>FIGURA 13</b> - - PRODUÇÃO DE CITOCINA IL-1 B EM RAW264.7 ESTIMULADAS COM LPS TRATADA COM OS LOBOPHORENOS INCUBADO POR 24H. ....	62

<b>FIGURA 14</b> - PRODUÇÃO DE CITOCINA IL-6 EM RAW264.7 ESTIMULADAS COM LPS TRATADA COM OS LOBOPHORENOS INCUBADO POR 24H. ....	63
<b>FIGURA 15</b> - PRODUÇÃO DE CITOCINA IL-10 EM RAW264.7 ESTIMULADAS COM LPS TRATADA COM OS LOBOPHORENOS INCUBADO POR 24H. ....	64
<b>FIGURA 16</b> - EXPRESSÃO DE NFkB-P65 EM MACRÓFAGOS MURINOS TRATADOS COM OS LOBOPHORENOS E ESTIMULADAS COM LPS INCUBADO POR 24H.....	65
<b>FIGURA 17</b> - POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS LOBOPHORENOS PELO TESTE DPPH. ....	67

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - PESO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO HEXÂNICO DA <i>L. VARIEGATA</i> (EH). .....	33
<b>TABELA 2</b> - PESO DAS SUB-FRAÇÕES DE EH-B.....	34
<b>TABELA 3</b> - LINHAGENS CELULARES UTILIZADAS NO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> .....	35
<b>TABELA 4</b> - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÉDIA DOS EXTRATOS ISOLADOS DA ALGA <i>LOBOPHORA VARIEGATA</i> EM CÉLULAS HCT 116. ....	48
<b>TABELA 5</b> - ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS COMPOSTOS PUROS ISOLADOS DA ALGA <i>LOBOPHORA VARIEGATA</i> EM CÉLULAS HCT 116. ....	48
<b>TABELA 6</b> - ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS COMPOSTOS 1 E 2 ISOLADOS DA ALGA <i>LOBOPHORA VARIEGATA</i> EM CÉLULAS HCT 116. ....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
COX	Ciclooxigenase
DHA	Ácido docosa-hexaenóico, do inglês <i>docosahexaenoic acid</i>
DMEM	Meio de cultura, do inglês <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
ELISA	Ensaio imunoenzimático, do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPA	Ácido eicosapentaenóico, do inglês <i>eicosapentaenoic acid</i>
FDA	Agência reguladora de drogas e alimentos, do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-6	Interleucina 6
LPS	Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
NF $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear- $\kappa$ B, do inglês <i>Nuclear Factor- kappa B</i>
NO	Óxido Nítrico, do inglês <i>Nitric Oxide</i>
PBS	Solução Salina Tamponada com fosfato, do inglês <i>Phosphate Buffer Solution</i>
PPAR- $\gamma$	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma, do inglês <i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
RAW 264.7	Linhagem macrófagos murinos
SNC	Sistema Nervoso Central
SRB	Sulforrodamina B
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês <i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>
WB	Imunoblot, do inglês <i>Western Blot</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1</b>	<b>PRODUTOS NATURAIS MARINHOS .....</b>	<b>15</b>
1.1.1	ALGA.....	16
<b>1.2</b>	<b>INFLAMAÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.2.1	VIAS DE SINALIZAÇÃO INFLAMATÓRIA .....	19
1.2.2	MACRÓFAGOS.....	22
<b>1.3</b>	<b>ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS (AGPI) .....</b>	<b>23</b>
<b>1.4</b>	<b>RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>26</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b>2.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>COLETA E IDENTIFICAÇÃO.....</b>	<b>30</b>
3.2.1	OBTENÇÃO DE EXTRATOS BRUTOS .....	31
3.2.2	FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO/ IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS .....	32
<b>3.3</b>	<b>LINHAGENS CELULARES .....</b>	<b>34</b>
3.3.1	CULTIVO CELULAR.....	35
<b>3.4</b>	<b>AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO .....</b>	<b>36</b>

3.4.1	ENSAIO DE MTT .....	36
3.4.2	ENSAIO DA SULFORODAMINA B.....	37
<b>3.5</b>	<b>AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR EM MACRÓFAGOS .....</b>	<b>39</b>
3.5.1	REAÇÃO DE GRIESS.....	39
3.5.2	DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA .....	40
<b>3.6</b>	<b>AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO EM MACRÓFAGOS .....</b>	<b>41</b>
3.6.1	DOSAGEM DE PROTEÍNAS POR IMUNOBLLOT .....	41
<b>3.7</b>	<b>ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....</b>	<b>44</b>
3.7.1	TESTE DPPH .....	44
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1</b>	<b>COLETA E FRACIONAMENTO QUÍMICO DO EXTRATO .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2</b>	<b>ATIVIDADE CITOTÓXICA .....</b>	<b>46</b>
4.2.1	ENSAIO DO MTT .....	47
4.2.2	ENSAIO DA SULFORODAMINA B.....	49
<b>4.3</b>	<b>EFEITO IMUNOMODULADOR.....</b>	<b>55</b>
4.3.1	ENSAIO DE GRIESS .....	55
4.3.2	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS MURINOS .....	60
<b>4.4</b>	<b>AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO POR WB .....</b>	<b>65</b>
<b>4.5</b>	<b>ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....</b>	<b>66</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>

<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>7 BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>78</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Produtos Naturais Marinhos

O estudo dos produtos naturais marinhos teve início na década de 50 com o isolamento dos compostos bioativos espongouridina e espongotimidina, obtidos da esponja *Cryptotethya crypta* que serviram de análogos sintéticos, para o desenvolvimento da adenina-arabinosídeo (ara-A) e da citosina-arabinosídeo (ara-C) aprovados para uso clínico como antiviral e quimioterápico respectivamente (BERGMANN; FEENEY, 1951). No entanto, apenas após a descoberta de grandes quantidades de prostaglandinas no octocoral *Plexaura homomalla*, o interesse e o investimento da indústrias farmacêutica em laboratórios de pesquisa de produtos naturais na busca de novos fármacos de origem marinha cresceu consideravelmente (BAYER; WEINHEIMER, 1974; GERHART, 1986).

Os organismos terrestres ainda correspondem a maior fonte de compostos potencialmente importantes. Contudo, isso se deve ao início recente da exploração do mundo marinho que é a maior fronteira a ser desvendada. Considerando que a biota marinha foi por muito tempo evitada, somente nas últimas décadas, este ecossistema foi reconhecido como fonte de produtos naturais com potencial terapêutico, já que ocupa cerca de 70% da superfície do planeta e que a mesma abriga uma extensa variedade de grupos de organismos vivos (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009).

Blunt e colaboradores (2013) trazem uma visão taxonômica geral do ambiente marinho ao descrever sua expressiva biodiversidade relativo aos altos níveis taxonômicos: a partir de 76 filos descrito para Eukariota, cerca de sessenta pode ser encontrada nas zonas marinhas, entretanto quarenta desses filos estão em ambientes terrestres ou de água doce.

Tapilatu e colaboradores (2015) destacou a importância de ampliarmos o conhecimento sobre a biota marinha, no âmbito de investigação regional e internacional, através de sólidas colaborações, pois é necessária uma grande infraestrutura de equipamentos e recursos humanos para concretizá-lo.

Considerando sua extensão e que a fauna marinha brasileira é praticamente inexplorada, e ainda, que os organismos marinhos são fontes promissoras de metabólitos potencialmente importantes do ponto de vista biológico, a costa brasileira representa uma incontestável fonte de substâncias ativas a serem exploradas (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009).

### 1.1.1 Alga

O termo “alga” foi proposto oficialmente como uma categoria taxonômica por Linnaeus (1753), no clássico *Species plantarum*, dessa forma é um termo usado para denominar uma enorme variedade de organismos. Apresentado no plural, *Algae*, o termo nomeia uma das 4 ordens de criptógamos e inclui 14 gêneros e 214 espécies, representados por líquens, hepáticas e macroalgas. Assim, entendemos por algas os talófitos e protistas clorofilados, alguns muito simples morfologicamente, os unicelulares, outros com gigantescas formas, habitantes dos mares frios, os vareques, que já apresentam talos multicelulares com formação de tecidos (inclusive vasos condutores) e elaborada divisão de trabalho (PERASSO et al., 1989).

Ao contrário do que acontece com os organismos terrestres, os organismos marinhos precisam adaptar-se a condições ambientais de extrema agressividade, como altas pressões, altas concentrações de sal, baixos níveis de nutrientes, baixas temperaturas, limitação de luz e baixo teor de oxigênio. Para se adaptarem a estas condições, e assim garantir sua sobrevivência, os organismos marinhos têm desenvolvido características únicas que os diferem dos organismos terrestres, tais como: metabolismo, comportamento, transferência de informação e estratégias de adaptação (HU et al., 2011). Estas peculiaridades são, sem dúvidas, as principais responsáveis pela extraordinária diversidade química de seu metabolismo secundário.

O gênero *Lobophora*, inclui algas marrons da ordem das Dictyotales de ampla distribuição sendo 22 espécies presentes em mares tropicais e subtropicais (SCHULTZ et al., 2015). A família Dictyotaceae possui uma variedade de moléculas com potencial farmacológico, predominantemente da classe dos diterpenos (BLUNT et al., 2013; MASCHEK; BAKER; AMSLER, 2008; VIEIRA et al., 2015).

A espécie *Lobophora variegata* está distribuída em mares de climas tropicais e subtropicais, geralmente é encontrada na maré baixa até uma profundidade de 36 m (WOMERSLEY, 1987). Possui *thallus* marrom amarelado, com ereto único para lâminas tufadas 1,0-6,0 cm de comprimento, 2,0-7,0 cm de largura e 95-145 mm de espessura (SCHULTZ et al., 2015).

As comunidades dessa alga sofrem níveis notavelmente baixos de infecção microbiana, o grupo do professor Willian Fenical (2003) demonstrou que a alga marinha *Lobophora variegata* usa estratégias de defesa química antimicrobiana direcionadas e que

metabólitos secundários importantes nas interações ecológicas entre os microorganismos marinhos são fontes promissoras de novos compostos bioativos.

A extração aquosa e com solventes orgânicos dessa alga levou a descoberta de fortes efeitos antiprotozoários (CANTILLO-CIAU *et al.*, 2010), anti-inflamatório (SIQUEIRA, RCL *et al.* 2011), antibacterianos (SOUSA, 2017) e antiproliferativo (ROCHA *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas, cada vez mais, o homem tem lançado mão das estruturas dos compostos biossintetizados pelos seres vivos para a produção de novos compostos de interesse terapêutico, quer seja usando, modificando ou copiando. Moléculas com potencial anti-infecciosos e anticâncer estão em desenvolvimento clínico e totalizam aproximadamente 100 novas substâncias (HARVEY, 2008).

Metade das moléculas aprovadas até 2014 pela agência reguladora de drogas e alimentos (FDA, do inglês *Food and Drug Administration*) para o tratamento do câncer são provenientes de produtos naturais. Newman e Cragg, (2016) destacam que 13 novos fármacos relacionados a produtos naturais foram aprovados apenas entre os anos 2005 e 2007, sendo que cinco representam novas classes de fármacos, incluindo o ziconotídeo (Prialt®) um derivado de veneno de molusco marinho usado no tratamento da dor crônica (POPE; DEER, 2013) e a trabectedina (Yondelis®) substância derivada de uma ascídia usada no tratamento do câncer. (TEPLINSKY; HERZOG, 2017)

A abordagem química de produtos naturais marinhos com o objetivo de descobrir metabólitos bioativos deve ser continuada para, assim, melhorar e enriquecer os dados da literatura em relação aos metabólitos produzidos por organismos marinhos (LA CLAIR; FENICAL; COSTA-LOTUFO, 2016). Uma análise envolvendo indicações médica tem demonstrado que os produtos naturais, incluindo as drogas desenvolvidas tendo produtos naturais como modelos, são usadas para tratar 87% de todas as categorias de doenças humanas, incluindo entre outros, agentes antibacterianos, anticâncer, anticoagulantes, antiparasitários e anti-inflamatórios (CRAGG; NEWMAN, 2013; NEWMAN; CRAGG, 2016).

## 1.2 Inflamação

Inflamação é uma resposta fundamentalmente protetora do hospedeiro em resposta à uma infecção ou agressão. Suas principais características ocorrem como resultado da produção de mediadores inflamatórios que ocasionam o aumento do fluxo sanguíneo, da permeabilidade vascular e do movimento de leucócitos da corrente sanguínea para o tecido circundante (diapedese) (LEWIS, 1980). Tudo isso permite que moléculas, como citocinas, anticorpos e mediadores inflamatórios, atravessem a parede dos vasos e migrem para o tecido causando os sinais cardinais da inflamação que são dor, vermelhidão, inchaço, calor, descobertos por Cornelius Celsus e a perda de função incorporada por Rudolf Virchow em 1858 (LUSTER; ALON; VON ANDRIAN, 2005; NOURSHARGH; ALON, 2014).

Os mediadores inflamatórios podem amplificar o sinal inflamatório inicial por todo o corpo através da ativação sistêmica dos processos imunológicos. Contudo, a resposta inflamatória possui mecanismos de retroalimentação negativa para minimizar danos excessivos ao tecido (ABBAS et al., 2015; MEDZHITOV, 2010).

A inflamação pode ser classificada como aguda ou crônica. Em ambas, as cascatas de eventos bioquímicos podem se intensificar além do necessário. Em regra, a inflamação aguda termina em um período de horas ou dias, e o prolongamento desses eventos por meses ou anos caracterizam a inflamação crônica responsável por doenças degenerativas graves (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2017; SHASTRI; BONIFATI; KISHORE, 2013).

A perda dos processos regulatórios por retroalimentação ou a superprodução de mediadores inflamatórios causam o aumento descontrolado da inflamação resultando em lesões irreversíveis aos tecidos do hospedeiro. A inflamação crônica é um fator primário envolvido em múltiplas doenças. Além disso, pacientes que possuem alguma doença inflamatória crônica estão mais susceptíveis a manifestarem outros tipos de condição inflamatória (EL-GABALAWY; GUENTHER; BERNSTEIN, 2010; GLOBAL POLICY AND INTERNATIONAL PUBLIC AFFAIRS, 2017).

A inflamação crônica está associada a uma diversidade de doenças progressivas não transmissíveis como obesidade, distúrbios metabólicos, doenças cardiovasculares e câncer, sendo a principal causa de morte e incapacidade em todo o mundo. O câncer representa a segunda causa de óbitos, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2011; OLEFSKY; GLASS, 2010; ROSS, 1999; WHO, 2014).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2018) câncer é um termo genérico para um conjunto de mais de 100 doenças, que apesar da diversidade de tipos elas têm em comum o crescimento descontrolado, surgimento e espalhamento de células anormais pelo corpo. A Agência Internacional de Investigação do Câncer estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2012). O câncer colorretal é a terceira doença maligna mais incidente em homens e a segunda em mulheres. Tendo a perspectiva de mais de um milhão de novos casos por ano (TEBALA et al., 2018).

Em alguns tipos de câncer, a presença de condições inflamatórias favorecem o surgimento de alterações malignas. Contudo, por outro lado, em outros tipos de câncer, uma alteração oncogênica pode induzir a formação de um microambiente inflamatório que viabiliza o desenvolvimento de tumores. Independentemente da sua origem, a inflamação prolongada no microambiente tumoral tem muitos efeitos promotores de tumores. Ela auxilia na proliferação e sobrevivência de células malignas, promove a angiogênese e a metástase, subverte as respostas imunológicas adaptativas e altera as respostas a hormônios e agentes quimioterápicos. Os caminhos moleculares da inflamação relacionada ao câncer e uma área em constante avanço que prevê a melhora na qualidade de vida dos pacientes que fazem uso de substâncias que atuam em ambas as situações.

O investimento em novas formas de prevenção e tratamento impactam diretamente no desenvolvimento global. Nugent e colaboradores (2018) apresentam um plano de ação que prevê a redução da mortalidade prematura causado por doenças não transmissíveis em um terço até 2030. Além, da redução de impostos sobre os medicamentos e do controle a fatores de risco a busca por substâncias que apresentam efeito sobre mais de uma condição inflamatória é de imensa relevância clínica.

Kunnumakkara *et al.* (2018) reuniu substâncias derivadas de especiarias que possuem propriedades eficazes para o tratamento da inflamação crônica e do câncer. Os compostos derivados de especiarias podem interagir com múltiplos alvos tratando ou prevenindo diversas doenças simultaneamente.

### **1.2.1 Vias de sinalização inflamatória**

O fator de transcrição nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, do inglês *Nuclear Factor- kappaB*) é uma proteína que regulam a expressão de produtos gênicos inflamatórios e sua ativação leva à

proliferação, sobrevivência, invasão, angiogênese e metástase de células cancerígenas (TANIGUCHI; KARIN, 2018). Dessa forma substâncias que inative vias inflamatórias e atuem na prevenção e terapia do câncer influenciam muitas vezes no funcionamento das vias onde esse fator está envolvido e por isso a sua investigação é de grande relevância farmacológica (PLUMMER et al., 2016).

O NF- $\kappa$ B compõe uma família de fatores de transcrição, sendo um importante mediador da inflamação, pois regula grandes matrizes de genes que codificam a expressão de mediadores inflamatórios como ciclo-oxigenases (COX), óxido nítrico sintase induzível (iNOS, do inglês *inducible Nitric Oxide Synthase*), Fosfolipase A2 citosólica (cPLA2, do inglês *Cytosolic Phospholipase A2*), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , do inglês *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ) e interleucinas (IL). Em condições normais, o NF- $\kappa$ B é encontrado inibido no citosol celular pela subunidade inibitória do NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) que impede sua translocação para o núcleo (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Após a ativação por estímulos inflamatórios, o I $\kappa$ B sofre fosforilação por quinases e então é degradada por proteassomos permitindo que as subunidades, como por exemplo, p50 e p65 migrem para o núcleo e se ligam à região promotora de vários genes envolvidos na inflamação e outras doenças crônicas. Na inflamação crônica a subunidade p65 do NF- $\kappa$ B é a mais envolvida na produção de genes pró-inflamatórios. A ausência dessa subunidade causa fragilidade na resposta imune e deixa o indivíduo mais susceptível a doenças infecciosas severas (KARIN; BEN-NERIAH, 2000; VAKRAKOU et al., 2018).

A produção das enzimas ciclooxigenase do tipo 2 e da fosfolipase A2 citosólica via ativação de NF- $\kappa$ B ocasiona uma maior síntese de eicosanoides derivados de fosfolípidios de membrana como o ácido araquidônico (AA). A maioria dos eicosanoides pro-inflamatórios são derivados do AA. O ácido araquidônico por sua vez é um composto lipídico derivado da oxidação do ácido linoleico ( $\omega$ -6), ele é liberado da membrana celular por fosfolipases, principalmente, a fosfolipase A2 (PLA2, do inglês *Phospholipase A2*), quando a célula sofre algum tipo de agressão ou estresse, como a invasão por um patógeno (INNES; CALDER, 2018).

Em sua forma livre o AA serve posteriormente de substrato para COX ou lipo-oxigenase (LOX). A COX-1 e a COX-2 ativam cascatas de produção de prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs) que participam de diversas ações metabólicas, processos fisiológicos e patológicos, vasodilatação ou vasoconstrição; hiperalgesia; contração ou

relaxamento da musculatura brônquica e uterina; hipotensão e participam ativamente de outras condições da inflamação (KLAFKE K., 2015).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina secretada por células do sistema imune inclusive por macrófagos em resposta ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), que pode agir de maneira autócrina mediando os efeitos induzidos pelo LPS na via do NF- $\kappa$ B. Desempenhando funções importantes tanto na hiperalgesia inflamatória quanto em neuropática. Ele ativa a cascata de coagulação, estimula a PGE2 e a expressão de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 (CHOI et al., 1996).

Assim como o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  é muito predominante na cascata inflamatória sistêmica através da ativação da COX-2. Também está presente em macrófago ativado por LPS. Ela facilita o recrutamento de monócitos por induzir a secreção de quimiocinas (DINARELLO, 1996). Outra interleucina envolvida na inflamação periférica e sistêmica é a IL-6 que está envolvida no mecanismo da febre e na sensibilização de nociceptores. Participa da neurogênese e é produzida por células como neurônios, astrócitos e micróglia durante uma injúria. Além disso, é possível encontrar grandes quantidades de IL-6 em macrófagos ativados com LPS (ERTA; QUINTANA; HIDALGO, 2012).

Já a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que age como um modulador endógeno da inflamação em vários tecidos e órgãos e em diferentes contextos fisiológicos e patológicos. Consegue inibir a produção de IL-1 e de IL-6 expressas em macrófagos ativados. Na inflamação, a IL-10 ativa mecanismo de feedback negativo que iniciam entre 24 a 48 horas depois do estímulo agressivo. Além de inibir as citocinas pró-inflamatórias, ela também é responsável por inibir a produção de óxido nítrico. Dessa forma a inibição de IL-10 pode causar imunossupressão e dificultar a recuperação de pacientes que sofrem com alguma condição inflamatória (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000).

O óxido nítrico (NO, do inglês *Nitric Oxide*) é um gás lipossolúvel e permeável em membranas que possui elétron não pareado, tipo radical livre. Atua na regulação de diversas funções bioquímicas e fisiológicas, tais como, homeostase dos vasos sanguíneos, transmissão neuronal e resposta do hospedeiro à infecção (LUIKING; ENGELEN; DEUTZ, 2010). Este radical é produzido a partir da L-arginina, por uma reação mediada pelas enzimas óxido nítrico sintase constitutiva e induzível. A superprodução de óxido nítrico é observado na sepse, distúrbios neurodegenerativos, inflamação e câncer de cólon (HOBBS; HIGGS; MONCADA, 1999; SHASTRI; BONIFATI; KISHORE, 2013).

### 1.2.2 Macrófagos

O início do processo imunológico de eliminação de patógenos, de toxinas e reparo de tecido envolve uma cadeia de eventos ordenados, que regulam moléculas de adesão na superfície do endotélio e recrutam granulócitos, monócitos, macrófagos e posteriormente linfócitos. As células do sistema imunológico inato possuem em sua membrana Receptores de Reconhecimentos de Padrão (PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*), que identificam componentes microbianos presentes em vários microrganismos. Estas moléculas, essenciais para a sobrevivência dos microrganismos, são amplamente conhecidos como Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs, do inglês, *Pathogen Associated Molecular Patterns*) (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006).

A endotoxina, ou LPS, é um PAMP presente na parede celular de bactérias Gram-negativas, reconhecido por Receptores semelhantes ao *Toll* (TLR, do inglês *Toll-like Receptor*) tipo 4 (TLR-4) (HOSHINO et al., 1999; PARK et al., 2009) Os TLRs são glicoproteínas presentes na membrana plasmática ou no citoplasma de células imunes. Já foram descritos até o momento, 10 sub-famílias de TLRs em humanos e 13 em camundongos que reconhecem uma variedade de PAMPs (SHI et al., 2011; TAKEUCHI; AKIRA, 2010). A resposta ao LPS é comumente investigada na busca por drogas com potencial anti-inflamatório visto que o LPS é uma potente endotoxina bacteriana, podendo estar presente tanto na inflamação aguda quanto na crônica (ROSSOL et al., 2011).

O LPS modula a expressão de milhares de genes, principalmente os envolvidos na inflamação. Os eicosanoides pró-inflamatórios induzidos por LPS são substâncias chaves na regulação dos processos inflamatórios infecciosos. Contudo, a produção persistente de mediadores inflamatórios é uma das maiores causas de doenças inflamatórias (LEE; BAE; SONG, 2012; OLIVEIRA, 2013; WALL et al., 2010).

Os macrófagos são células de defesa, podendo ser derivadas dos monócitos, que por sua vez é um tipo de leucócito produzido na medula óssea, através da diferenciação de células-tronco. Os monócitos circulam na corrente sanguínea vigiando o corpo de qualquer possível invasão, ao migrarem para o tecido diferenciam-se em macrófagos. Os macrófagos possuem uma variedade de PRRs principalmente da família TLR. A ativação do macrófago desencadeia a produção de inúmeros mediadores inflamatórios e o recrutamento de outras células envolvidas na defesa do organismo (MANTOVANI; SICA; LOCATI, 2005; SHENG; RUEDL; KARJALAINEN, 2015).

O macrófago possui diversidade e plasticidade que permitem os macrófagos serem ativados por duas principais vias, a via clássica que ativa o macrófago em tipo M1 pró-inflamatório e a via alternativa que ativa macrófagos em tipo M2 anti-inflamatório. O perfil de ativação pode ser simulado *in vitro* para simular a ativação causada em patologias como a inflamação crônica e o câncer (MANTOVANI; ALLAVENA, 2015; SICA; MANTOVANI, 2012).

A linhagem celular RAW264.7 é um tipo de macrófagos transformado a partir da ascite induzida por tumor formado após injeção do vírus da leucemia murina de Abelson em camundongo, *Mus musculus* (linhagem BALB/c) altamente responsivos a estímulos inflamatórios. É excelente para investigar drogas anti-inflamatórias *in vitro* e avaliar inibidores de vias de sinalização que levam a indução de citocinas pró-inflamatórias (BONNARDEL; GUILLIAMS, 2018).

O macrófago ativado por LPS produz mediadores inflamatórios como, citocinas, TNF- $\alpha$ , interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8), eicosanoides; óxido nítrico; e outros que participam do desenvolvimento de diversas doenças crônicas (CUNHA *et al.*, 2017). Dessa forma, substâncias que inibam a ativação do macrófago por LPS são ditas anti-inflamatórias por reduzirem a produção e liberação de mediadores inflamatórios (OZANNE; PRESCOTT; CLARK, 2015).

Saqib e colaboradores (2018) reuniram diversos trabalhos com compostos naturais que são capazes de modular a ativação de macrófagos para o fenótipo inflamatório M1 ou anti-inflamatório M2, e essa característica se dá por uma variedade de vias. Sendo a busca por novas moléculas terapêuticas com propriedades anti-inflamatórias de significativa importância farmacológica.

### 1.3 Ácidos graxos poli-insaturados (AGPI)

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) contêm duas ou mais ligações duplas e são classificados com base na localização da última dupla ligação em relação a extremidade do terminal metil da molécula, as classes mais estudadas são Ômega-6 e Ômega-3. O ácido araquidônico (AA) deriva do Ômega-6, é encontrado em carnes, óleos vegetais e em algumas sementes oleaginosas. O aumento na ingestão desse óleo está diretamente relacionado ao

aumento de mediadores inflamatórios e crescente incidência de doenças inflamatórias crônicas (INNES; CALDER, 2018).

O Ômega-3, cujos principais representantes são o ácido eicosapentaenoico (EPA, do inglês *eicosapentaenoic acid*) e o ácido docosa-hexaenóico (DHA, do inglês *docosahexaenoic acid*) são encontrados em peixes, como atum, salmão e sardinha. O aumento no consumo de Ômega-3 causa diminuição na concentração do ácido araquidônico nas células. Isso ocorre pois há uma competição pela enzima desaturase 6, que participa tanto da cadeia da transformação do ácido linoleico em ácido araquidônico, como também da cadeia de transformação do ácido linolênico em ácido eicosapentaenoico. Dessa forma a ingestão de Ômega-3 impede que se forme as enzimas ciclooxigenases e lipooxigenases diminuindo consequentemente a formação de mediadores inflamatórios como interleucinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (DELPECH et al., 2015; SETE; FIGUEREDO, 2013; SORGI et al., 2007).

Estudos preventivos constataram que suplementos de Ômega-3 diminuem o índice de inflamações prolongadas. Testes realizados com EPA e DHA em macrófagos mostraram diminuição da resposta inflamatória causada pelo LPS assim, comprovando *in vitro* seu potencial imunomodulador (ALLAM-NDOUL et al., 2017). Consequentemente a incorporação dos ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) na bicamada lipídica da membrana das células, pode determinar a severidade do processo inflamatório (SERHAN et al., 2000).

O fármaco Lovaza® (ésteres etílicos de ácido ômega-3) derivado de ácido graxo de peixe, é indicado como adjuvante da dieta para reduzir os triglicerídeos em pacientes adultos com hipertrigliceridemia. Sendo, a composição de EPA e DHA as principais responsáveis por seus efeitos benéficos (FDA, 2008).

Estudos indicam que o DHA é capaz de polarizar macrófagos para fenótipo M2 através de vias dependentes de PPAR- $\gamma$ , dessa forma ele pode promover a resolução da inflamação crônica (CHANG et al., 2015). Serini e colaboradores (2016) analisaram achados pré-clínicos que revelaram as vias moleculares utilizadas pelos ômega-3, que lhe confere efeitos na polarização dos macrófagos M2 durante a resposta inflamatória. Mostrando seu potencial para inibir a inflamação e a proliferação de células tumorais. Oono e colaboradores (2017) sugeriram a administração de ômega-3 combinado a fármacos antitumorais para potencializar a eficácia do tratamento e a diminuição dos efeitos colaterais.

O DHA-paclitaxel é um conjugado formado pela ligação covalente do ácido graxo DHA ao paclitaxel e está em fase 3 de ensaios clínicos. Permite o aumento da exposição do tumor ao paclitaxel sem o aumento da toxicidade. Os esquemas quimioterápicos combinados podem melhorar a sobrevida em pacientes com adenocarcinoma gástrico e esofágico avançado (BEDIKIAN et al., 2011; JONES et al., 2008)

Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) DHA e EPA são enzimaticamente metabolizados em mediadores que iniciam a resolução de condições inflamatórias, esses precursores foram descobertos a pouco tempo e seus efeitos tem sido apontado como os responsáveis pelo potencial benéfico desse ácidos graxos (SERHAN, 2014). As resolvinas, protectinas, e maresinas são reguladores potentes da infiltração de neutrófilos, produção de citocinas e quimiocinas e depuração de neutrófilos apoptóticos por macrófagos, promovendo um retorno à homeostase tecidual (DUVALL; LEVY, 2016).

O EPA é convertido pela 15-Lipoxigenase e 5-Lipoxigenase em resolvinas de várias séries, enquanto que o DHA é convertido pela 5-Lipoxigenase em resolvinas de série D. O DHA também é convertido a maresinas 1 e 2 e a protectinas, sendo o mais potente entre os tipos de AGPI, já que essas substâncias promovem a resolução da resposta inflamatória.

A adoção de práticas saudáveis como exercício físico e uma alimentação equilibrada aumentam a qualidade de vida dos pacientes com doenças crônicas e em tratamento do câncer. Assim, a introdução de alimentos ricos em ômega-3 protege as células da superprodução de citocinas inflamatórias e do estresse oxidativo causados durante o estímulo inflamatório (DE OLIVEIRA et al., 2017; HABEL et al., 2009; WERNER et al., 2017).

Os alimentos funcionais e os nutracêuticos comumente têm sido considerados sinônimos, no entanto, os alimentos funcionais devem estar na forma de alimento comum, serem consumidos como parte da dieta e assim produz benefícios específicos à saúde; por outro lado, os nutracêuticos são substâncias presentes nos alimentos que apresentam benefícios à saúde, como a prevenção ou o tratamento de doenças. O ômega-3 já é recomendado como nutracêutico em casos de doenças com alguma condição inflamatória crônica (GUERTIN *et al.*, 2018; MORAES; COLLA, 2006; WERNER *et al.*, 2017).

#### 1.4 Relevância e justificativa

A inflamação descontrolada está associada a uma diversidade de doenças progressivas como distúrbios metabólicos, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares e câncer. Embora seja significativo o número de drogas e fármacos existentes, a busca por substâncias naturais com perfil imunomodulador é de grande relevância visto que a abordagem tradicional para tratar doenças crônicas é de alto custo e os fármacos possuem intensos efeitos colaterais que diminuem a qualidade de vida dos pacientes (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009).

Dessa forma, novos mecanismos de ação estão sendo explorados no desenvolvimento de medicamentos provenientes de fontes naturais para controlar a inflamação (ZHANG; LIN; YE, 2018). Os estudos nesta área são considerados estratégicos por envolver o conhecimento da biodiversidade num sentido amplo, além de fontes renováveis de substâncias com importância biomédica.

O ambiente marinho possui mais de 80% das espécies animais e vegetais do mundo, além de ter mais de 150 mil algas encontradas nas zonas entremares e águas tropicais dos oceanos sendo, assim, uma importante fonte primária de produtos naturais (BLUNT *et al.*, 2017). O Brasil apresenta uma grande extensão litorânea de aproximadamente 7.408 km e, apesar de apresentar uma atraente biodiversidade, as informações científicas relatando substâncias isoladas de algas marinhas, bem como a investigação da atividade biológica são escassas.

O nordeste brasileiro possui rica biodiversidade, o Estado do Ceará, ao longo dos seus 573 km de litoral correspondendo a 7,8% do país, e possui uma vasta diversidade de algas marinhas, muito embora, o domínio de seu conhecimento químico e biológico seja ainda incipiente. Algumas comunidades de pescadores se especializam no cultivo de algas, como uma fonte de renda extra, na produção de cosméticos e alimentos. As mulheres são as protagonistas nesse cultivo porém, dependem diretamente da pesquisa científica para descoberta de novas utilizações das algas. Por isso a importância dos estudos com as algas do litoral cearense pela busca de novas moléculas com interesse químico e farmacológica.

A introdução de compostos nutracêuticos na dieta, durante o tratamento, protege as células da superprodução de citocinas inflamatórias e do estresse oxidativo causados durante o estímulo inflamatório. Sabemos que a macroalga *Lobophora variegata* é uma rica fonte de ácidos graxos ômega-3, cálcio, fósforo e vitamina C, sendo assim, uma espécie

promissora para a investigação de possíveis substâncias com potencial farmacológico (THENNARASAN; MURUGESAN, 2015).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Prospectar substâncias com potenciais anticâncer e anti-inflamatório em modelos *in vitro* de citotoxicidade e modulação da ativação de macrófagos obtidos da alga parda *Lobophora variegata*.

### 2.2 Objetivos Específicos

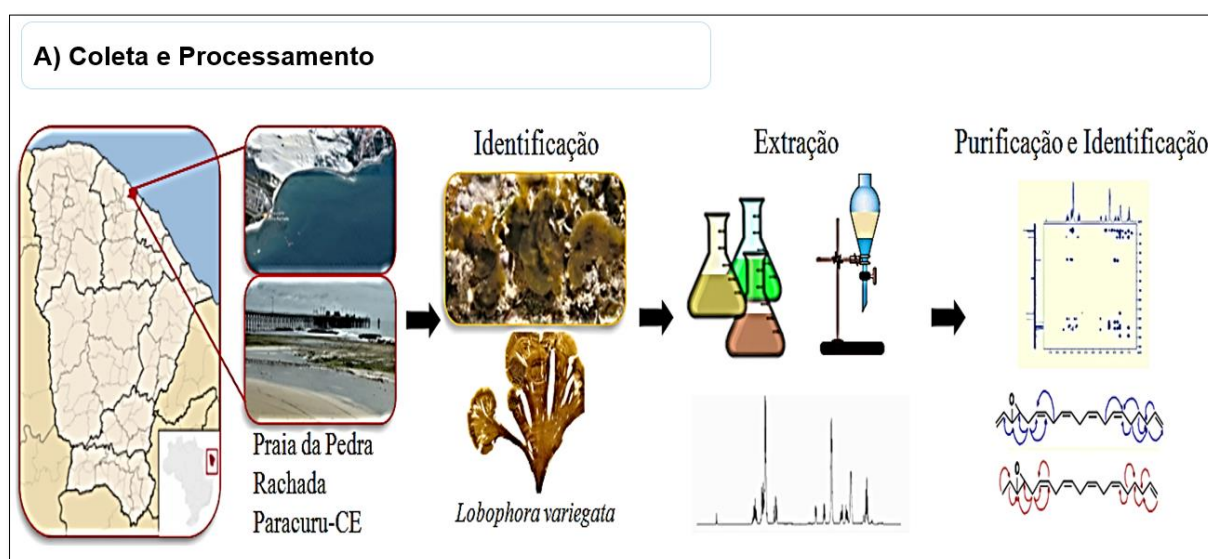
- Realizar fracionamento químico guiado pela atividade citotóxica dos extratos da *L. variegata*.
- Avaliar a citotoxicidade das substâncias isoladas de *L. variegata* através de testes *in vitro* sobre a linhagem tumoral HCT 116 e de macrófagos RAW264.7.
- Avaliar a ativação clássica de macrófagos RAW264.7 tratados com amostras de *L. variegata*, em concentrações não tóxicas, através da dosagem NO produzido pelos macrófagos.
- Avaliar a modulação da ativação de macrófagos RAW264.7 desafiados com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) tratados com compostos isolados de *L. variegata* em concentrações não tóxicas, através da dosagem de mediadores inflamatórios TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 produzido pelos macrófagos.
- Avaliar a modulação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B relacionado à inflamação por meio do lisado de macrófagos desafiados com LPS tratados com compostos isolados de *L. variegata*.
- Avaliar o potencial antioxidante das substâncias puras isoladas.

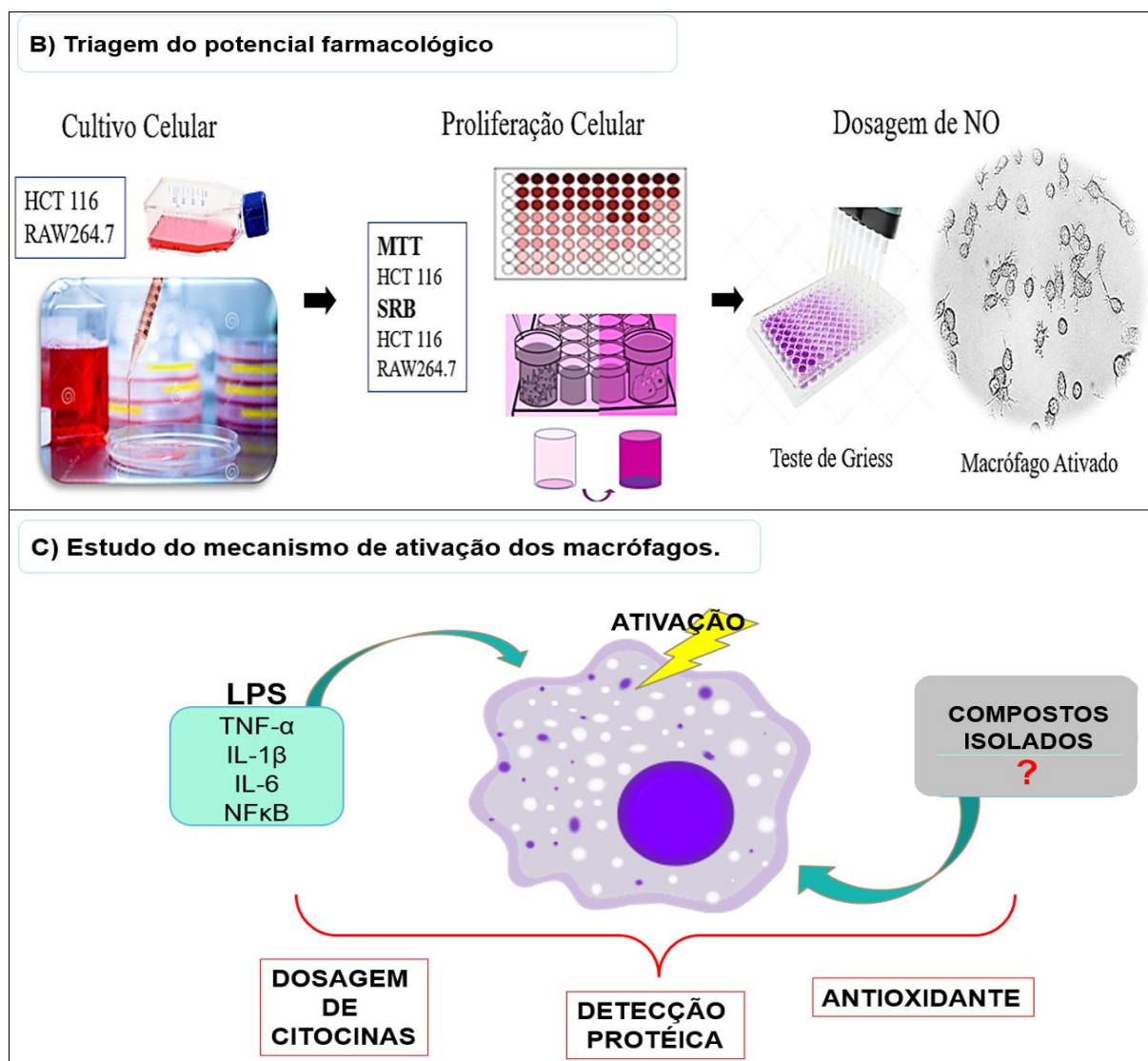
### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Planejamento Experimental

Após coleta e identificação dos espécimes da alga *Lobophora variegata*, foram preparados extratos orgânicos hexano (EH), acetato de etila (EA) e etanólico (EE) para obtenção de compostos de polaridades variadas. Os extratos foram fracionados para identificação e purificação dos compostos bioativos. O fracionamento foi bioguiado por ensaios de avaliação de atividade biológica *in vitro* com célula tumoral, para avaliar o potencial antiproliferativo, e com macrófagos para investigar o potencial imunomodulador. Os compostos de interesse seguiram para avaliação inicial do mecanismo de ação através da dosagem de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória pelo ensaio de ELISA, bem como a detecção do NF- $\kappa$ B através de imunoblot como esquematizado na Figura 1 Com as substâncias puras também foi avaliado o efeito antioxidante através do ensaio DPPH.

**Figura 1 - Resumo do planejamento experimental adotado neste trabalho.**





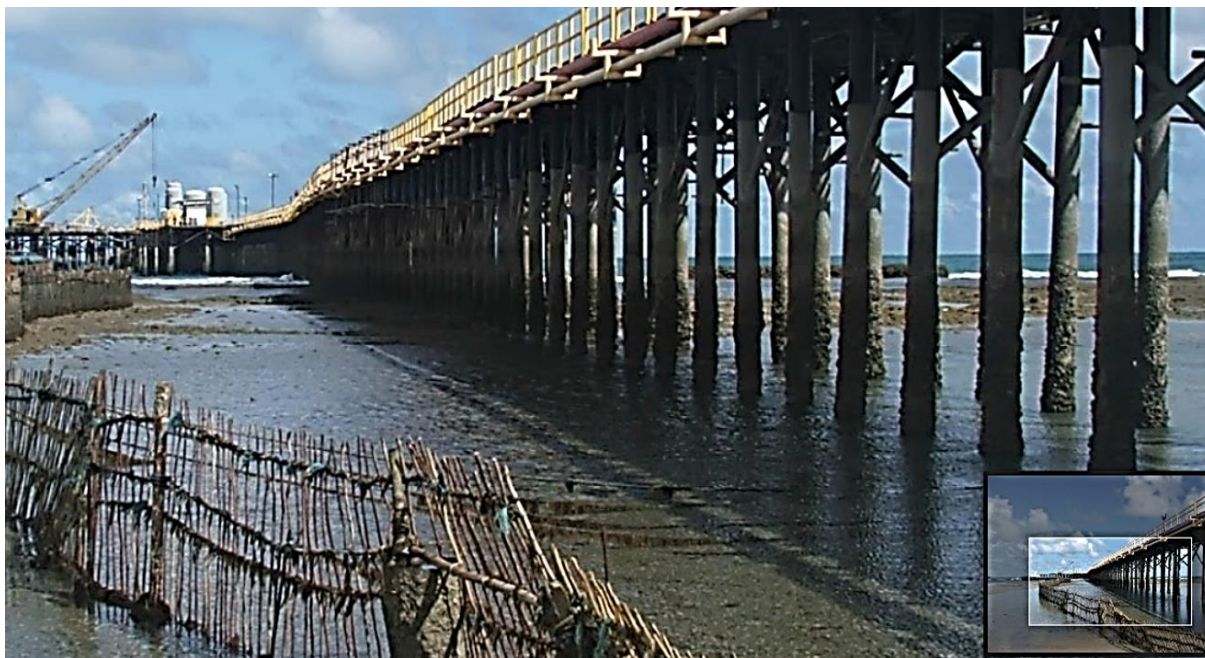
Fonte: Arquivo pessoal da autora

### 3.2 Coleta e Identificação

Os espécimes da alga utilizada neste trabalho foram coletados durante a maré baixa na praia da Pedra Rachada (03°23'S; 39°54'O) Figura 2, no município de Paracuru e na praia do Pacheco (03°44'S; 38°39' O), no município de Caucaia. Após a coleta, as amostras obtidas foram devidamente processadas para remoção de areia e impurezas. Em seguida foram secas a temperatura ambiente, trituradas e submetidas a extrações com solventes orgânicos em gradiente de polaridade, sendo utilizados hexano (EH) como solvente mais apolar, seguido de acetato de etila (EA), de polaridade intermediária e por fim, etanol (EE), resultando nos respectivos extratos orgânicos. A *L. variegata* foi identificada pelo Dr. Pedro

Bastos de Macedo Carneiro, responsável pelo Herbário de Ficologia do Laboratório de Macroalgas, integrante do Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará.

**Figura 2 - Ponte da praia da pedra rachada, município de Paracuru-CE**



Fonte: Google Earth. Disponível em: <<https://www.google.com.br/maps>>

A macroalga marinha foi coletada com auxílio de espátula estéril, foi realizado uma limpeza superficial e borrifado etanol 70% para a descontaminação superficial e lavagem em água do mar previamente esterilizada. As amostras permaneceram resfriadas e seguiram para o transporte até o laboratório e posterior processamento do material. Um espécime foi depositado no Herbário Professora Francisca Pinheiro sob o número HMAR 2997.

### **3.2.1 Obtenção de extratos brutos**

A preparação dos extratos e o isolamento dos constituintes químicos foram realizados no Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará através de colaboração com o MSc. Fábio Nascimento Ávila sob a orientação da professora, Dra. Otilia Pessoa.

O material, após seco e triturado foi submetido a extrações com hexano (2X), acetato de etila (2X) e etanol (2X) no intervalo de 48 horas para cada extração. Os respectivos

extratos foram filtrados e os solventes removidos através de evaporador rotativo, sob pressão reduzida a temperatura máxima de 35 °C.

Os extratos fracionados e as substâncias purificadas foram diluídos em solvente Dimetilsulfóxido (DMSO 0,4%, Sigma-Aldrich) para os testes *in vitro* de avaliação da atividade biológica: sendo elas o em células tumorais, para avaliar o potencial anti-proliferativo, e macrófagos desafiados com LPS.

### 3.2.2 Fracionamento cromatográfico/ Identificação de compostos

Todo o fracionamento dos extratos brutos foi realizado no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará sob a coordenação da Profa. Dra. Otília Pessoa. Os extratos brutos foram submetidos ao fracionamento químico direcionado pela atividade biológica. Inicialmente, fez-se análises preliminares da natureza química dos componentes dos extratos brutos através de placas de cromatografia de camada delgada comparativa e revelada com diversos reveladores (UV, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dragendorff, ninidrina, etc). A partir destas análises foi determinada qual a melhor forma de processamento de cada extrato bruto. Em termos gerais, foram feitas partições do extrato bruto em outros solventes orgânicos (hexano, acetato de etila, etanol) e as partições obtidas seguiram para processamento em cromatografia de coluna de Sephadex LH-20 ou Sílica Gel 60. As frações mais purificadas seguiram para separação por cromatografia de camada delgada preparativa, em placas de sílica, e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se de colunas preparativas C18. Mais adiante, as amostras tiveram seus espectros de ressonância analisados por ressonância nuclear magnética de prótons (RNM H<sup>+</sup>), sendo a análise estrutural auxiliada por espectrometria de massa. Os dados de espectrometria de massa e RNM obtidos foram utilizados para desreplificação. A desreplificação em banco de dados possibilita a identificação de moléculas já conhecidas precocemente em extratos e frações, o que acelera a prospecção de moléculas inéditas.

O extrato EH, obtido de *L. variegata*, foi submetido a um fracionamento cromatográfico em gel de sílica, utilizando a mistura binária de hexano e AcOEt, resultando em sete frações de 300,0 mL cada (**Tabela 1**).

**Tabela 1 - Peso das frações obtidas do extrato hexânico da *L. variegata* (EH).**

Frações	Eluente	Código	Peso da amostra
1	Hexano puro	EH-A	0,2 g
2	Hexano/AcOEt 9:1	EH-B	2,16 g
3	Hexano/AcOEt 8:2	EH-C	1,28 g
4	Hexano/AcOEt 7:3	EH-D	0,15 g
5	Hexano/AcOEt 6:4	EH-E	0,11 g
6	Hexano/AcOEt 5:5	EH-F	0,05 g
7	AcOEt puro	EH-G	0,02 g

Legenda: EH=Extrato hexânico, AcOEt= solvente acetato de etila, EH-A a G= frações do extrato hexânico.

A fração EH-B foi a que teve o maior rendimento e seguiu para um segundo fracionamento com coluna cromatográfica aberta, utilizando a mistura de hexano (970,0 mL) e AcOEt (130,0 mL) nas seguintes razões volumétricas: 100:0; 98:2; 96:4; 94:6; 0:100, resultando em 7 sub-frações BA-BG (**Tabela 2**).

A sub-fração **EH-BG** foi a que apresentou maior rendimento e seguiu para análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com coluna de fase reversa C-18 (Phenomenex), acetonitrila pura como fase móvel e fluxo constante de 3,0 mL/min, em 20 minutos, resultando em dois picos, EH-BG-P1 (76,1 mg; Rt 6,3 min) e EH-BG-P2 (73,1 mg; Rt 6,75 min). Esses picos apresentaram-se como óleos amarelos, com 95% de pureza, sendo posteriormente codificados como **1** e **2**, respectivamente.

**Tabela 2 - Peso das sub-frações de EH-B.**

Frações	Código	Peso (mg)
1	BA	2,9
2	BB	1,9
3	BC	1,3
4	BD	56,7
5	BE	40,4
6	BF	314,2
7	BG	408,0

Legenda: EH-B= fração do extrato hexânico; EH-BA a BG= sub-frações da fração B do extrato hexânico.

A pesquisa na base de dados AntiMarin foi feita através da comparação das massas exatas de cada composto presente no cromatograma do LC/MS de cada extrato. A busca foi realizada com massas obtidas no modo positivo ( $[M+H]^+$  ou  $[M+Na]^+$ ) e/ou no modo negativo ( $[M-H]^-$ ). Essa análise no banco de dados permitiu a identificação da estrutura química dos compostos estudados nesse trabalho.

### 3.3 Linhagens Celulares

As linhagens celulares utilizadas nos experimentos de avaliação da atividade citotóxica estão listadas na Tabela 3 (**pag. 35**) com especificações quanto à procedência e a concentração de plaqueamento. O fracionamento químico dos extratos obtidos foi direcionado também pela atividade citotóxica *in vitro*.

Para este estudo, foi utilizada a linhagem celular humana de câncer colorretal HCT116, com perfil aderente e que apresenta alta responsividade e moderada resistência. É um modelo *in vitro* muito utilizado para avaliação do efeito anti-proliferativo de substâncias com potencial antitumoral. Também foi utilizado a linhagem de macrófago RAW 264.7, obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro, que foi transformada a partir da ascite induzida por tumor formado após injeção do vírus da leucemia murina de Abelson em camundongo macho, nível de biossegurança 2. São células com características de crescimento aderente e

consideradas um modelo *in vitro* excelente para a prospecção de compostos com atividade tanto inflamatória como anti-inflamatória (FENGYANG et al., 2012; HARTLEY et al., 2008). As células foram mantidas em nitrogênio líquido (criopreservação) em solução de congelamento composta por meio DMEM (Lonza) suplementado com 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO-Sigma) e 90% de soro fetal bovino inativado (SFB, marca GIBCO).

**Tabela 3 - Linhagens celulares utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro*.**

Linhagem Celular	Tipo Histológico	Procedência	Concentração de plaqueamento (cél/s/mL)
HCT 116	Carcinoma de cólon	BCRJ	3,0 x 10 <sup>4</sup>
RAW264.7	Macrófago murino	BCRJ	1,5 x 10 <sup>5</sup>

Legenda: BCRJ= Banco de Células do Rio de Janeiro.

### 3.3.1 Cultivo celular

Para os ensaios *in vitro* as células foram descongeladas à temperatura de 37°C, expandidas e cultivadas em frasco plástico para cultura (Sarsted, 25 cm<sup>2</sup>, volume de 50 mL ou 75 cm<sup>2</sup>, volume de 250 mL) utilizando o meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB inativado e 1% de antibióticos (100 U/mL penicillina e 100 µg/mL estreptomicina).

As culturas foram manipuladas em câmara de fluxo laminar vertical (ESCO, modelo Airstream classe II-B2) e mantidas em estufa incubadora a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> (SANYO, modelo MCO-19AIC). O crescimento das culturas foi acompanhado diariamente com auxílio de microscópio invertido de contraste de fase (LABOMED, modelo TCM 400). Após a formação da monocamada de células com confluência de 60% a 70%, o meio DMEM completo das garrafas foi descartado com o auxílio de uma pipeta sorológica, sendo os frascos lavados com 3 mL de Tampão fosfato-salino (PBS, do inglês, *phosphate buffered saline*) por 2 vezes para evitar que células mortas fossem plaqueadas. Em seguida, foram adicionados 5ml de DMEM e as células que permaneceram nas superfícies dos frascos foram destacadas por meio de raspagem com suporte plástico (SPL Life Science). O meio contendo as células foi então retirado e adicionado em falcon de 15 mL, uma alíquota foi retirada e contada em câmara de Neubauer utilizando solução de Azul de Trypan para avaliar a viabilidade celular e possibilitar a contagem adequada do número total de células viáveis.

As células em suspensão foram diluídas em meio de cultura para serem utilizadas em experimentos e/ou devolvidas a garrafa para manutenção da cultura. Quando necessário, novos vials com HCT116 ou RAW264.7 criopreservadas foram descongelados para iniciar nova cultura. Todo o resíduo produzido (líquido ou sólido) foi inativado com hipoclorito de sódio (solução comercial de 2% de cloro ativo, 1:5 hipoclorito:resíduo líquido, quando for o caso) por 18h a 24h. Após esse período, os resíduos foram esterilizados a 121°C por 30 min e descartados como lixo hospitalar.

### 3.4 Avaliação do efeito citotóxico

#### 3.4.1 Ensaio de MTT

Para avaliação da inibição do crescimento das células, após o tratamento com as amostras extraídas da *L. variegata*, foi utilizado o ensaio colorimétrico MTT. A linhagem celular de câncer colorretal (HCT 116) foi cultivada como descrito no item 3.3.1 (pag. 35). Na triagem realizada, as amostras que inibiram a proliferação celular acima de 80% na concentração de 50µg/mL foram consideradas promissoras para prosseguir no fracionamento químico.

O teste do MTT consiste em uma análise colorimétrica que quantifica indiretamente as células viáveis, baseada na conversão do sal 3-(4,5dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolina bromida (MTT), um composto de cor amarela, a formazan, de coloração púrpura, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente nas mitocôndrias ativas das células vivas (MOSMANN, 1983). Este ensaio também foi utilizado para determinar o valor da inibição do crescimento celular (CI<sub>50</sub>) a partir de uma curva concentração x efeito para as amostras selecionadas.

##### 3.4.1.1 Procedimento experimental

O ensaio do MTT foi utilizado para rastrear e monitorar a atividade citotóxica dos extratos brutos da alga *L. variegata* e alguns compostos puros que estão melhor representados em um manuscrito enviado para publicação. Para a realização desse ensaio, as células foram plaqueadas na concentração descritas na Tabela 3 (pag. 35) e incubadas *overnight* em estufa incubadora a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

As amostras testadas foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO, 0,4%) e testada quanto a viabilidade da mitocôndria em células HCT 116. Para a avaliação do percentual de inibição do crescimento foram utilizadas diluições seriadas em triplicatas de concentrações variando de 0,032 a 50 µg/ml. Em seguida, as células foram incubadas em volume final de

200  $\mu\text{L}$  permanecendo por 72h em contato com o tratamento, em estufa incubadora a 5% de  $\text{CO}_2$  a 37 °C.

Após o término do tempo de incubação, o sobrenadante foi descartado e, em seguida, 150  $\mu\text{L}$  da solução de MTT (Sigma) a 5 mg/mL em meio DMEM foi adicionado a cada poço da placa, que foi reincubada por mais 3 horas. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de cada poço foi ressuspêndido em 150  $\mu\text{L}$  de DMSO e agitado até sua completa dissolução, quando pôde, então, ter as absorvâncias lidas em leitor de placa (*Fisher Scientific*, modelo Multiskan FC) no comprimento de onda de 595 nm.

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos desvios-padrão. Para as amostras testadas em triplicatas, a porcentagem de inibição do crescimento celular foi obtida a partir da média dos valores de absorvância convertidos em porcentagem, relativa ao controle. Para as amostras testadas em diluições seriadas, também em triplicatas, um gráfico de absorvância x concentração foi plotado para determinação da inibição do crescimento média capaz de provocar 50% do efeito máximo ( $\text{CI}_{50}$ ) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) a partir de regressão não-linear no programa GraphPad Prism (GraphPad Software versão 6.1).

### 3.4.2 Ensaio da Sulforodamina B

Para avaliar a crescimento das células após o tratamento com amostras de *L. variegata* foi utilizado o ensaio da Sulforodamina B (SRB). O corante utilizado é uma aminoxantina de cor rosa brilhante, que possui dois grupos sulfônicos que são capazes de formar um complexo eletrostático com resíduos de aminoácidos básicos de proteínas em condições ligeiramente ácidas, ligando-se às porções terminais dos aminoácidos das células que foram fixadas com o ácido tricloroacético, sob condições básicas, mas pode dissociar (SKEHAN et al, 1990). E, portanto, diferentemente do MTT, o método independe da atividade metabólica celular. Quanto maior o número de células viáveis, maior a captação do corante e maior é o valor da absorvância. (HOUGHTON et al., 2007).

#### 3.4.2.1 Procedimento experimental

Para a realização desse ensaio, as células foram plaqueadas na concentração descritas na Tabela 3 (**pag. 35**) e incubadas *overnight* em estufa incubadora a 37 °C com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . As amostras testadas foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) e testada quanto a viabilidade em células HCT116 e RAW 264.7 (**Item 3.3.1; pag. 35**). Para a avaliação da proliferação foram utilizadas diluições seriadas em triplicatas de concentrações

variando de 0,032 a 50  $\mu\text{g/ml}$ . Em seguida, as células foram incubadas em volume final de 200  $\mu\text{L}$  permanecendo por 24 h ou 72h em contato com o tratamento, em estufa incubadora a 5% de  $\text{CO}_2$  a 37 °C. No momento em que as células foram tratadas, a placa tempo zero (não tratada) foi fixada com ácido tricloroacético (TCA) a 10%, e a placa reservada a uma temperatura de 4 °C.

Após o tempo de incubação, 24h e/ou 72h, as células aderidas foram fixadas com TCA a 10%, sendo então guardadas a uma temperatura de 4°C por no mínimo 1 hora. Após o período de fixação, as placas foram lavadas 4 vezes com água destilada e secas até não haver umidade aparente. Em seguida adicionou-se 60  $\mu\text{L}$  da solução de SRB a 0,4%, e as placas foram mantidas em estufa a 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C por 30 minutos. Ao término do tempo de incubação, as placas foram lavadas usando 400  $\mu\text{l}$  de ácido acético a 1% por 4 vezes para remover o excesso de SRB que não ficou ligado aos aminoácidos celulares. Já as paredes dos poços foram limpas cuidadosamente para remover qualquer excesso de SRB que possa falsear o teste.

Para realização da leitura das placas, o SRB que estava ligado aos aminoácidos fixados, foi solubilizado em 200  $\mu\text{L}$  de tampão Tris base 10 mM a 4°C, e homogeneizadas em mesa agitadora (*shaker*) por pelo menos 10 minutos, em temperatura ambiente. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro de placa (*Fisher Scientific*, modelo Multiskan FC) no comprimento de onda 570 nm.

#### 3.4.2.2 Determinação de Proliferação Celular

Os valores de absorbância foram normalizados em excel para  $X=\log[X]$  e em seguida os gráficos de absorbância x concentração foram plotados para determinar em que concentrações a amostra foi citotóxica ou citostática, com seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) a partir de regressão não-linear no programa GraphPad Prism (GraphPad Software versão 5.1).

As equações a seguir são utilizadas para a normalizar os valores de absorbância obtidos. Essa etapa é feita no excel:

Se  $T \geq T_0$  e  $< CN \rightarrow$  efeito citostático

Fórmula:  $\% \text{ proliferação celular} = 100 \times (T - T_0) / (CN - T_0)$

Se  $T < T_0 \rightarrow$  efeito citocida

Fórmula:  $\% \text{ proliferação celular} = 100 \times (T - T_0) / T_0$

onde T: Absorbância das células tratadas

T0: Absorbância das células da placa tempo zero

CN: Absorbância das células do controle negativo

### **3.4.2.3 Determinação de Inibição da Proliferação celular**

Para análise de inibição de proliferação celular, os experimentos foram analisados segundo suas médias. Para a análise das amostras testadas em diluição seriada, em triplicatas, um gráfico de absorbância x concentração foi plotado para determinação da concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>), com o seu efeito citostático obtido pelo cálculo da concentração de inibição total (CIT) e seu efeito citotóxico com a concentração letal média (CL<sub>50</sub>) a partir de interpolação de regressão não-linear GraphPad Prism (GraphPad Software versão 7.0).

## **3.5 Avaliação do efeito imunomodulador em macrófagos**

### **3.5.1 Reação de Griess**

O teste de Griess (GREEN; TANNENBAUM; GOLDMAN, 1981) é um ensaio colorimétrico que permite a quantificação indireta de óxido nítrico (NO) a partir da detecção de nitrito em solução. Na reação o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido formando um sal de diazônio que reage por acoplamento com o cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NEED) gerando um composto de coloração rosa intensa, que apresenta um máximo de absorção em torno de 540nm (RAMOS; CAVALHEIRO; CAVALHEIRO, 2006).

#### **3.5.1.1 Procedimento**

Para a realização desse ensaio, as células RAW264.7 foram plaqueadas na concentração de  $1,5 \times 10^5$  células por mL e incubadas *overnight* em incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As amostras foram diluídas em DMSO (0,4 %) usado como controle negativo (C-) e testadas para avaliação do efeito imunomodulador. Após 1h alguns grupos foram desafiados com endotoxina bacteriana (LPS-Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), utilizado como controle positivo na concentração de 100 ng/mL. O DHA (4,7,10,13,16,19 - ácido docosa-hexaenóico-Sigma) a 50µM foi usado como controle positivo por apresentar atividade imunomodulador. Após o período de 24h de incubação, 50 µl do sobrenadante foi coletado para teste de Griess.

A alíquota de 50 µl do sobrenadante foi adicionada a 50 µl do reagente de Griess [sulfanilamida 1% em ácido acético 30% / N-(1-naftil)-etilenodiamina 0,1 % em ácido

acético 60%] em ambiente sem iluminação num período de 10 minutos e a absorbância medida em espectrofotômetro a 450 nm. A concentração de nitrito ( $\mu\text{M}$ ) é determinada a partir de uma curva-padrão utilizando solução de  $\text{NaNO}_2$  a uma concentração inicial de 200  $\mu\text{M}$  seguida de diluições seriadas com fator de diluição igual a 2, com a menor concentração sendo 1,56  $\mu\text{M}$ . Assim, foi possível encontrar a concentração de nitrito através da absorbância. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados expressos em  $\mu\text{M}$ .

Os dados foram analisados a partir da curva padrão do nitrito usando regressão linear para determinar a concentração de  $\text{NO}_2$  em cada amostra. Esses valores foram interpolados e seguiram para Análise de Variância (ANOVA) com pós teste de Dunnett utilizando o programa GraphPadPrism (\* $p < 0,05$ ).

### **3.5.2 Dosagem de Citocinas por ELISA**

Para detecção e quantificação as citocinas, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 no sobrenadante de macrófagos estimulados, foi utilizado o ensaio imunoenzimático ELISA. Nesse ensaio um anticorpo reconhece um antígeno para o qual é específico e a enzima covalentemente ligada ao anticorpo catalisa uma reação gerando um corante que pode ser detectado por espectrofotometria.

#### **3.5.2.1 Procedimentos**

Para detecção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 foi realizada por meio do Kit DuoSet (R&D Systems, EUA) e a IL-6 por meio do Kit Bio Science (BD, EUA). Resumidamente, as placas para ELISA de 96 poços foram incubadas com o anticorpo de captura para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-6 por 16h em temperatura ambiente com 100 $\mu\text{L}$  de anticorpo para cada poço. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 400 $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem e bloqueadas com 300 $\mu\text{L}$  de BSA 1% por 1 h. Após o bloqueio, 100 $\mu\text{L}$  das amostras, de sobrenadantes das células RAW 264.7 tratadas como no item 3.5.1.1 (**pag. 39**), e da curva padrão foram adicionadas em cada poço e incubadas por 2h. As placas foram lavadas três vezes com 400 $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-6 em temperatura ambiente sendo 2 h para o Kit DuoSet (R&D Systems, EUA) e 1 h para o Kit Bio Science. Na etapa seguinte, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 400 $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem e incubadas com 100  $\mu\text{L}$  de estreptavidina em temperatura ambiente por 20 minutos.

Novamente as placas foram lavadas três vezes com 400µL de tampão de lavagem. Na etapa seguinte, 100 µL da solução substrato para revelação foi adicionado em cada poço e incubado por 20 min à temperatura ambiente, protegido da luz. A reação enzimática foi cessada, adicionando 50 µL solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Enfim, a absorbância foi medida à 540nm. O ensaio foi realizado em triplicata e o resultado expresso em pg/mL.

Os dados foram analisados a partir da regressão linear da curva padrão das citocinas a fim de se obter a equação da reta que permite determinar a concentração de cada citocina em função da sua absorbância. Após essas etapas, os valores das concentrações de citocinas obtidos foram interpolados e as diferenças entre os grupos analisadas por análise de variância (One-way ANOVA) seguido de teste de Dunnett utilizando o programa GraphPadPrism versão 6. O nível de significância estatístico máximo para amostras consideradas diferentes foi de 5% (p<0,05). As amostras foram comparadas com os controles negativo (C-) e positivo (C+).

### 3.6 Avaliação da modulação de fatores de transcrição em macrófagos

#### 3.6.1 Dosagem de Proteínas por Imunoblot

O imunoblot (western blot), é um método bioquímico e molecular utilizado para detectar a expressão proteica de uma determinada proteína em uma amostra, por exemplo, de extrato celular total, usando um anticorpo mono ou policlonal específico para verificar a expressão aumentada ou diminuída de proteínas-chave associadas a diversas vias de sinalização celular. (SIVIERO, 2013).

A realização do ensaio do imunoblot consiste em várias etapas: extração, quantificação de proteínas totais (30µg) das células submetidas ao tratamento pelo método de Bradford e separação das proteínas desnaturadas por peso molecular em eletroforese vertical em gel de poliacrilamida, (SDS PAGE). Após a corrida, por eletrotransferência, as proteínas separadas no gel são transferidas para uma membrana de PVDF (BioRad) a fim de torná-las acessíveis a detecção pelos anticorpos. Posteriormente, a membrana é tratada para bloquear as ligações com Albumina (BSA) a 5% em sítios inespecíficos e exposta aos anticorpos primários e secundários. A detecção é feita pelo método colorimétrico utilizando fosfatase alcalina sobre o substrato NBT/BCIP, resultando em uma marcação de cor púrpura na membrana. (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979)

### 3.6.1.1 Procedimento

O anticorpo primário utilizado no experimento foi o NF $\kappa$ B p65 (C-20): sc-372 de Santa Cruz (TX, EUA). O anticorpo  $\alpha$ -tubulina (CellSignaling Technology®) é utilizado como referência experimental. O anticorpo secundário anti- mouse IGg (CellSignaling Technology®) ligado a fosfatase alcalina é utilizado na detecção final das proteínas. Todos os anticorpos são solubilizados em BSA 5%, diluídos de 1:1000, exceto a  $\alpha$ -tubulina e os anticorpos secundários que são preparados em diluição de 1:2000.

#### 3.6.1.1.1 Extração de proteínas totais

As células RAW 264.7 foram plaqueadas em placas de 6 poços na concentração de  $1,5 \times 10^5$  células por mL e incubadas *overnight* em incubadora de CO<sub>2</sub> a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As amostras foram diluídas em DMSO (C-) e testadas para avaliação do efeito imunodulador. Após 1h alguns grupos foram desafiados com LPS utilizado como controle positivo na concentração de 100 ng/mL, o DHA (4,7,10,13,16,19 - ácido docosa-hexaenóico-Sigma) a 50 $\mu$ M, também foi usado como controle positivo por ter ação inibitória de NF $\kappa$ B em células desafiadas com LPS.

Para o processo de extração, as células foram soltas do fundo do poço com raspador e armazenadas em microtubos, em seguida foram centrifugadas e lavada duas vezes com PBS. Após outra centrifugação o pellet foi ressuscitado em tampão RIPA *Lysis Buffer* (Milipore) 1X acrescido de um coquetel de inibidores de proteases (1:100 v/v) e ortovanodato de sódio um inibidor de fosfatase (1:100 v/v)

#### 3.6.1.1.2 Quantificação das proteínas

A quantificação de proteínas totais extraídas das células foi realizada por meio de método colorimétrico de Bradford com o kit ProteinAssay (BioRadLaboratories). As amostras foram incubadas por 10 minutos no escuro sob agitação leve e lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm.

A curva de padrão foi gerada por regressão linear no programa GraphPadPrism 6.0, sendo plotado um gráfico da absorbância versus quantidade de proteínas. Os valores de absorbância obtidos de cada amostra foram aplicados a equação da curva para determinar as concentrações de proteína.

#### 3.6.1.1.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A separação das proteínas totais baseada no peso molecular foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida em um sistema vertical (TOWBIN; STAEHELIN;

GORDON, 1979). Após a montagem do sistema vertical (BioRad, modelo mini-PROTEAN® Tetra Cell), o gel de resolução foi confeccionado para uma concentração final de 12,5% em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 (BioRadLaboratories). O gel de concentração foi colocado sobre o gel de 12,5%, com concentração final de 5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 (BioRadLaboratories). O marcador de peso molecular Full-Range RainbowMarker (12-225 kDa; GE Healthcare) é usado sempre no primeiro poço da esquerda para monitorar a separação das proteínas. Sendo aplicado nos poços do gel de concentração 30 µg de proteína total de cada amostra, carregada com o tampão Blue Juice 5X (5:1 v/v; Invitrogen). A corrida de eletroforese foi realizada sob voltagem constante de 100 V e amperagem livre (para duas placas; fonte elétrica PowerPac™, modelo HCPowerSupply) à temperatura ambiente, utilizando um tampão de corrida para eletroforese. O tempo de corrida variou entre 1h e 40 minutos a 2 horas.

#### **3.6.1.1.4 Eletrotransferência**

As proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de PVDF Hybond-P (BioRad). Para isso, o gel é colocado em contato com a membrana previamente lavada em metanol entre esponjas e papéis de filtro banhados na solução de transferência. A eletrotransferência foi realizada pelo modo de imersão (BioRad, modelo MiniTransPlot Modulo) sob voltagem livre e amperagem de 400 mA por 1h e 20 minutos a 4°C (fonte elétrica PowerPac™, modelo HCPowerSupply)

#### **3.6.1.1.5 Imunodeteção**

Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução de BSA 5% por uma hora sob agitação constante, a fim de bloquear ligações proteicas inespecíficas. Após o período de incubação, foram realizadas três lavagens com TBS-Tween 0,1% (TBS-T) de 5 minutos. As membranas foram, então, incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos primários diluídos em solução de BSA 5% em TBS. Após o mesmo processo de lavagens realizadas anteriormente com TBS-T e TBS, as membranas foram incubadas por duas horas com o anticorpo secundário acoplado à enzima fosfatase alcalina diluído em solução de BSA 5% em TBS por 1 hora, sob agitação. Em seguida, as membranas foram novamente lavadas para a revelação com aproximadamente 1 mL de solução reveladora (BCIP®/NBT solution, premixed-Sigma) e incubadas no escuro até a indicação colorimétrica desejada. Após a revelação, as membranas foram lavadas em água destilada.

As membranas foram fotografadas por um captador de imagens (GE Healthcare, modelo Image Quant® 300), utilizando para aquisição e edição o programa ImageQuant®300 (GE Healthcare).

### 3.7 Atividade Antioxidante

#### 3.7.1 Teste DPPH

O radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) é considerado um radical livre estável, no entanto, falta um elétron em sua estrutura. Este radical é utilizado como ferramenta para estudo da ação de compostos sequestradores de radicais livres, e a técnica que utiliza esse radical é independente de qualquer atividade enzimática. Substâncias antioxidantes evitam a formação de radicais livres doando elétrons para evitar a oxidação. Uma substância ao doar um elétron para o DPPH faz com que este se torne mais estável, perdendo sua cor púrpura, permitindo o monitoramento da reação por espectrofotômetro. (LEE et al., 2012)

##### 3.7.1.1 Procedimento

Para viabilizar a reação de substâncias isoladas com o DPPH foram preparados estoque de amostras diluídas em DMSO. Em uma placa de 96 poços foi adicionado 292 µL de DPPH (0,3 mM, veículo - metanol:etanol 1:1) e 8 µL das amostras testes, foram elas, os compostos 1 e 2 nas concentrações 35, 65 e 100 µM, o cis - 4,7,10,13,16,19 - ácido docosa-hexaenóico (DHA-Sigma) a 50µM, vitamina E ( $\alpha$ -tocopherol) substância padrão a 50 µg/mL, e o veículo (DMSO 4%, controle negativo). As soluções foram agitadas por 1 minuto com auxílio do espectrofotômetro de placa (*Fisher Scientific*, modelo Multiskan FC), mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos e a absorbância foi determinada em comprimento de onda 517 nm. (DE GAULEJAC; PROVOST; VIVAS, 1999)

O percentual de inibição foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ INIBIÇÃO} = \left[ A_0 - \left( \frac{A_c}{A_0} \right) \right] \times 100$$

Onde A0 representa a absorbância do controle negativo e Ac, a absorbância das drogas teste. A Vitamina E funciona como um controle positivo, visto que tem alto potencial antioxidante.

## 4 RESULTADOS

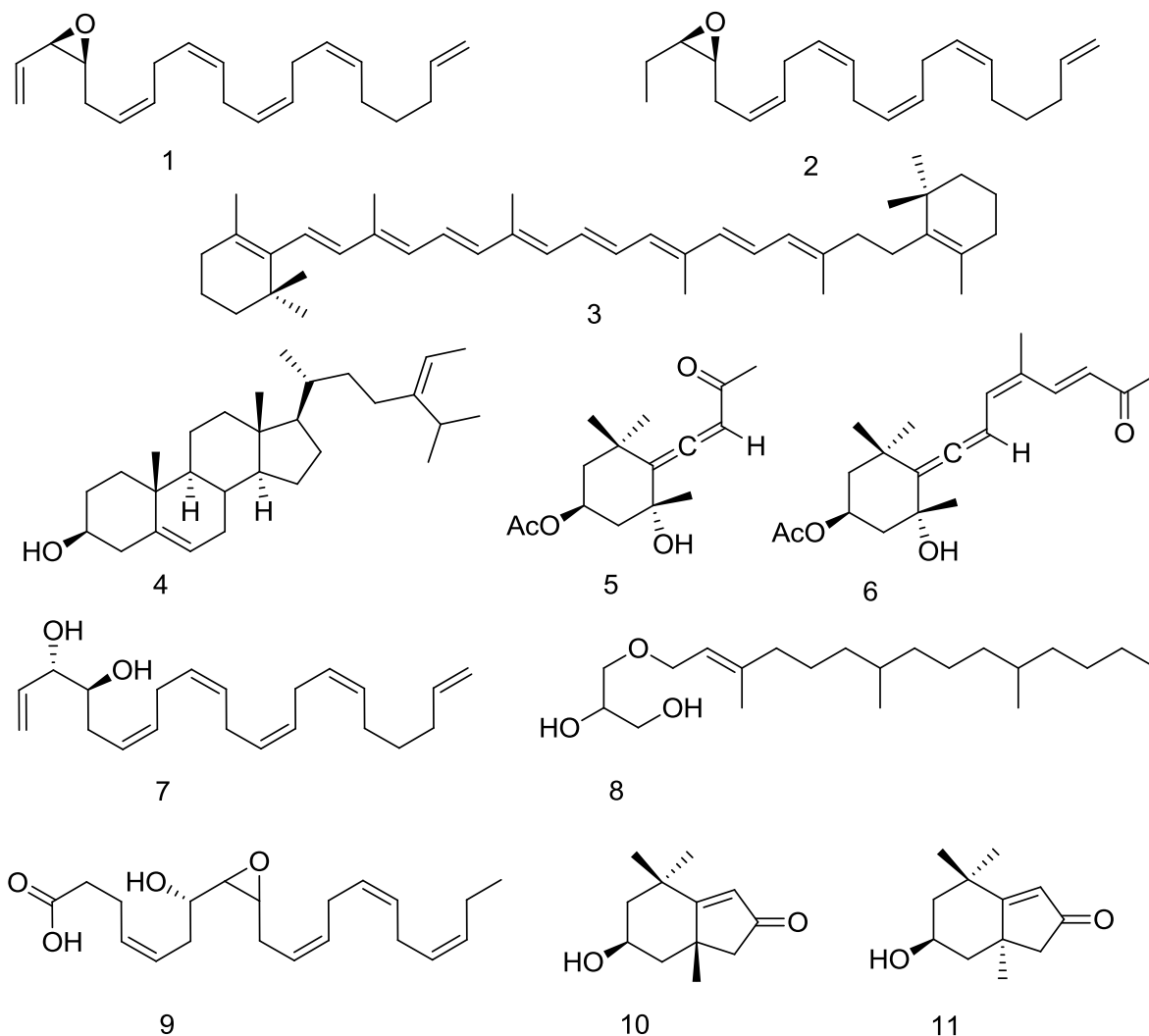
### 4.1 Coleta e Fracionamento Químico do Extrato

Foi coletado aproximadamente 12 kg, peso fresco, da alga *Lobophora variegata*. Após ser lavado abundantemente com água corrente e feita a remoção mecânica de algas epífitas, o material foi seco a temperatura ambiente por cinco dias foi possível recuperar 1,4 kg do material seco. A preparação dos extratos e o isolamento dos constituintes químicos foram realizados no Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará pelo MSc. Fábio Nascimento Ávila sob a orientação da professora Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa. Após a extração com os solventes orgânicos foi obtido 4,20 g do EH, 18 g do EA e 12 g do EE. Ambos foram submetidos a diversos fracionamentos cromatográficos, incluindo cromatografia em coluna (CC), Sephadex LH-20 e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Todo o fracionamento foi direcionado pela quantidade de material obtido e pelos resultados nos ensaios de triagem de citotoxicidade, como mostrado a seguir. A atividade biológica do extrato aquoso (EE) já havia sido explorada por alguns autores, o que nos direcionou para o estudo de compostos apolares encontrados em abundância no extrato hexânico e um pouco no extrato acetato que possui polaridade intermediária.

Com o isolamento, de vários compostos da alga *Lobophora variegata*, no extrato hexano (EH) e acetato (EA) foi possível caracterizar dois novos epóxidos henecosanóicos poliinsaturados, juntamente com outros compostos já conhecidos.

**Figura 3 - Compostos isolados da alga *Lobophora variegata*.**



Fonte: Arquivo pessoal do MSc. Fábio Ávila. Legenda: Os compostos epóxido heptacosanóide poliinsaturado (1), epóxido heptacosanóide poliinsaturado (2),  $\beta$ -caroteno (3) e fucosterol (4) foram extraídos do extrato hexânico. Já os compostos apo-9'-fucoxantina (5), apo-13'-fucoxantina (6), lobophorenol B (7), éter glicérfico de fitano (8), 7,8-HepETE (9), loliolide (10) e isololiolide (11) foram extraídos do extrato etanólico.

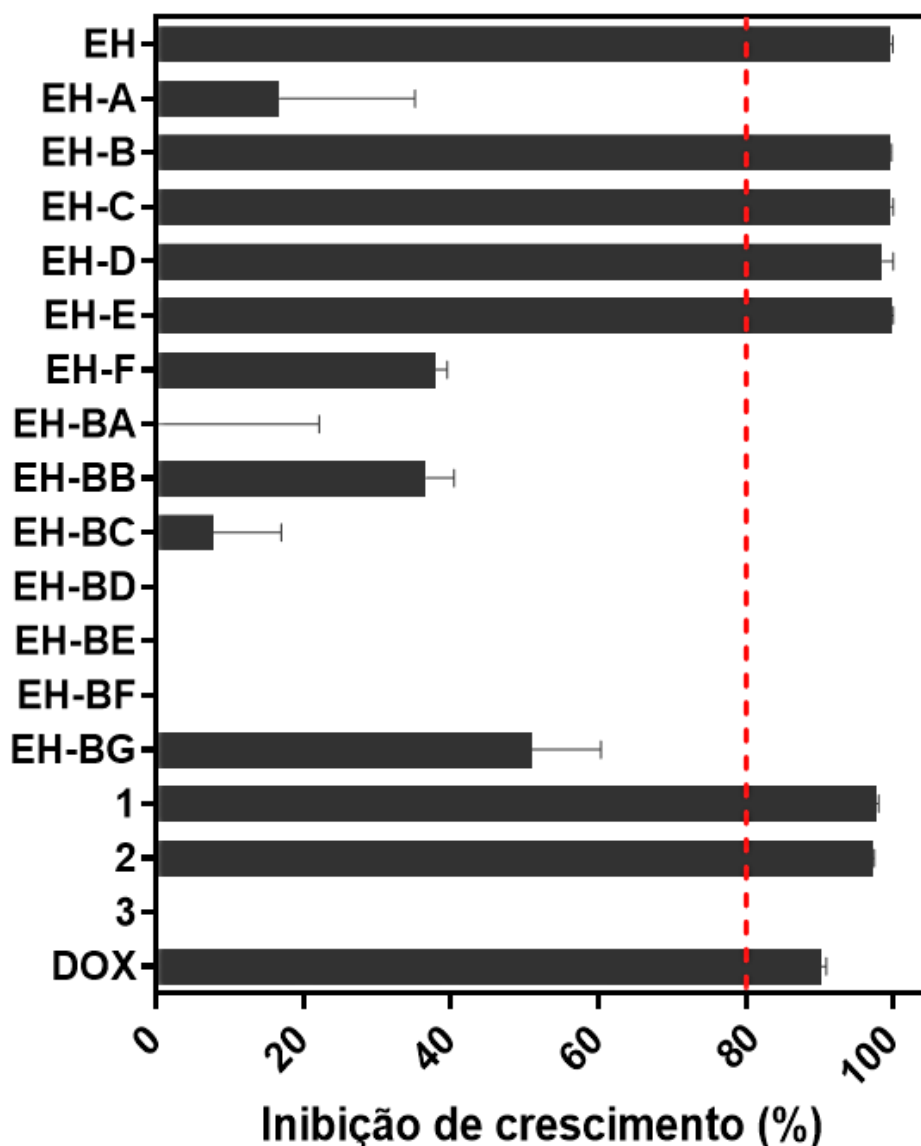
#### 4.2 Atividade citotóxica

Os extratos obtidos da alga *Lobophora variegata* em solventes hexano (EH), acetato (EA) e etanol (EE) foram avaliados quanto a inibição do crescimento em células HCT 116 após 72h de incubação pelos ensaios do MTT e SRB. Na linhagem de macrófagos RAW264.7 após 24h de incubação foi realizado pelo ensaio do SRB.

#### 4.2.1 Ensaio do MTT

A triagem inicial foi realizada pelo ensaio do MTT com as concentrações de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As frações determinantes para a triagem que melhor inibiram o crescimento de células adenocarcinoma levaram a descoberta de dois compostos inéditos (1 e 2).

**Figura 4 - Triagem inicial da atividade citotóxica das frações hexânicas isoladas da alga *Lobophora variegata* em células HCT 116.**



Legenda: EH= extrato hexânico, EH-A a EH-F frações do extrato hexânico, EH-BA a EH-BG= frações da fração B do extrato hexânico, 1-2-3 = compostos puros isolados da *Lobophora variegata*. A inibição do crescimento da linhagem HCT 116 foi avaliada na concentração de 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  após 72h de incubação pelo ensaio do MTT. A doxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo, na concentração de 12,5  $\mu\text{M}$ . Os dados estão apresentados como percentual de inibição do crescimento. Foram 3 experimentos em triplicata.

**Tabela 4- Concentração inibitória média dos extratos isolados da alga *Lobophora variegata* em células HCT 116.**

<b>Compostos</b>	<b>CI<sub>50</sub></b>	<b>(CI95%) em µg/mL</b>
Doxorrubicina	0,4	(0,2 a 0,6)
<b>EH</b>	5,4	(4,9 a 5,8)
<b>EA</b>	35,95	(31,48 a 41,05)
<b>EE</b>	>50	-

Legenda: EH= extrato hexânico, EA= extrato acetato, EE= extrato etanólico. A inibição do crescimento da linhagem HCT 116 foi avaliada nas concentrações de 0,78 a 100 µg/ml após 72h de incubação pelo ensaio do MTT. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Os dados estão apresentados como valores de concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) e respectivos intervalos de confiança de 95% (CI95%) obtidos por regressão não-linear. Foram realizados 3 experimentos em triplicata.

**Tabela 5 - Atividade citotóxica dos compostos puros isolados da alga *Lobophora variegata* em células HCT 116.**

<b>Compostos</b>	<b>CI<sub>50</sub> (CI95%) em µM</b>
Doxorrubicina	0,4 (0,2 a 0,6)
<b>1</b>	12,2 (7,1 a 21,1)
<b>2</b>	44,3(30,0 a 65,0)
<b>4</b>	>120
<b>5</b>	>180
<b>6</b>	50 (22,3 a 112,0)
<b>7</b>	23,4 (10,0 a 55,0)
<b>8</b>	41,5 (4,5 a 375,0)
<b>9</b>	84,5 (48,6 a 147,0)
<b>10</b>	>250

Legenda: A inibição do crescimento da linhagem HCT 116 foi avaliada nas concentrações de 0,009 a 250 µM após 72h de incubação pelo ensaio do MTT. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Os dados estão apresentados como valores de concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) e respectivos intervalos de confiança de 95% (CI95%) obtidos por regressão não-linear. Foram realizados 3 experimentos em triplicata.

A extração da alga parda *Lobophora variegata* rendeu o isolamento de dois lobophorenos e outros compostos que seguiram para investigação dos valores da concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) em células HCT 116 incubadas por 72h, pelo método do MTT. O composto **3** não mostrou inibição do crescimento, como visto na Figura 4 e os demais compostos (**4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9** e **10**) não possuem dados na literatura sobre sua atividade citotóxica.

Dos compostos testados, **1** foi o que apresentou menor CI<sub>50</sub> contra a linhagem celular de adenocarcinoma humano HCT 116 pelo ensaio do MTT. Os compostos **2**, **6**, **7**, **8** e **9** apresentaram CI<sub>50</sub> moderada, enquanto que **4**, **5** e **10** não foram citotóxicos nas concentrações testadas.

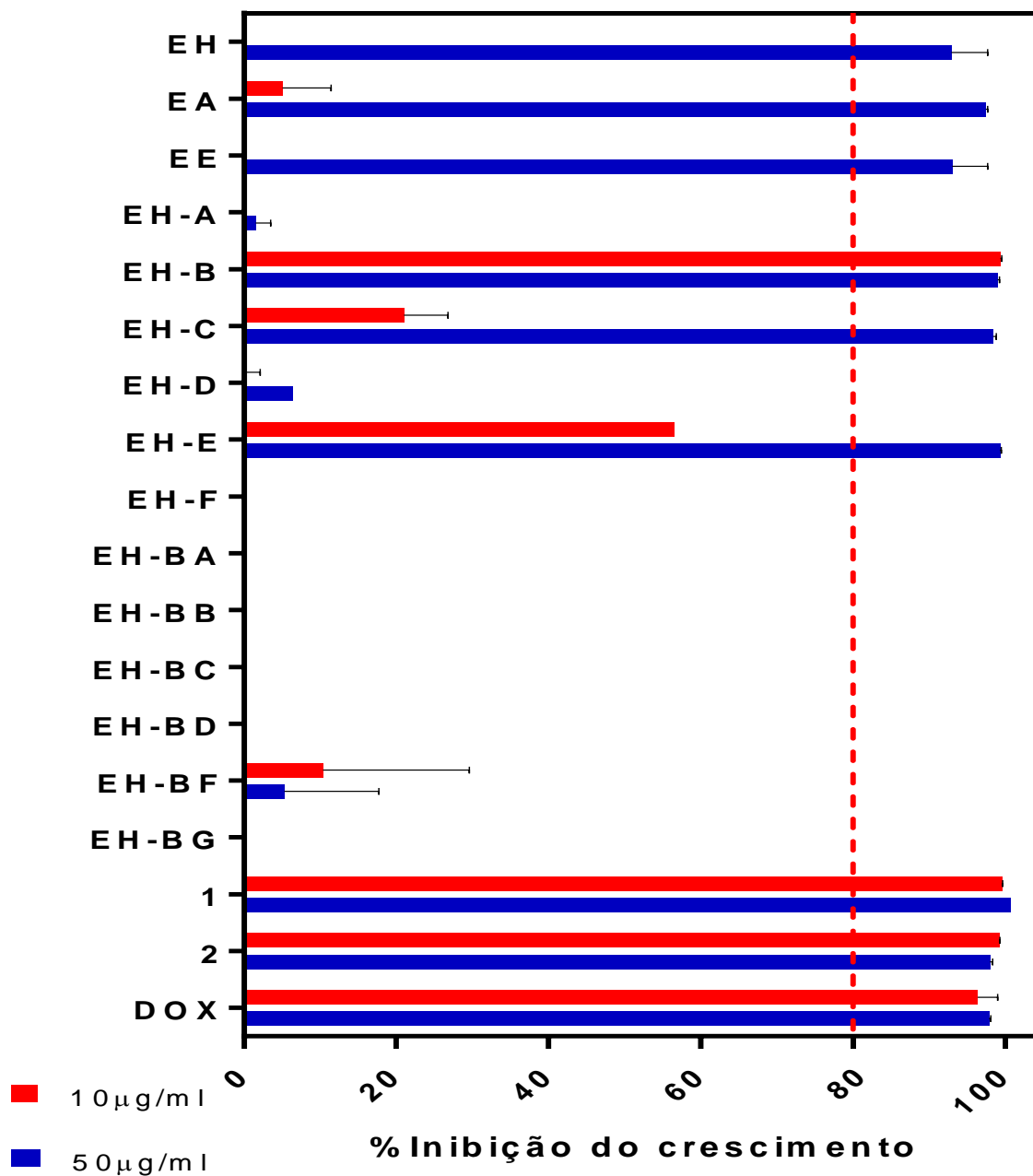
#### **4.2.2 Ensaio da Sulforodamina B**

O efeito na densidade celular tumoral, com base na medição do teor de proteínas totais na célula, foi avaliado pelo ensaio da sulforodamina B (SRB). Diferente do MTT esse método é independente da atividade metabólica celular. Assim, quanto maior o número de células viáveis, maior a captação do corante e maior é o valor da absorbância. Sendo, mais seguro em encontrar substâncias que interferem ou não na proliferação celular.

##### **4.2.2.1 Linhagem celular de adenocarcinoma humano (HCT 116)**

Inicialmente, assim como no MTT, os três extratos brutos isolados da alga *Lobophora variegata*, todas as frações do extrato hexânico (EH) e alguns compostos do extrato acetato (EA) seguiram para investigação do efeito sobre a proliferação em células HCT 116 incubadas por 72h. As frações determinantes para a triagem foram as mesmas das usadas para o MTT, para confirmar a manutenção do seu efeito.

**Figura 5 - Triagem inicial da atividade citotóxica das frações hexânicas isoladas da alga *Lobophora variegata* em células HCT 116.**



Legenda: EH= extrato hexânico, EA=extrato acetato, EE= extrato etanólico, EH-A a EH-F frações do extrato hexânico, EH-BA a EH-BG= frações da fração B do extrato hexânico, 1 e 2 =lobophorenos. A inibição do crescimento da linhagem HCT 116 foi avaliada na concentração de 10 e 50 µg/ml após 72h de incubação pelo ensaio do SRB. A doxorubicina nas concentrações de 2,5 µM (vermelho) e 12,5µM (azul) foi utilizada como controle positivo. Os dados estão apresentados como percentual de inibição do crescimento. Foram 3 experimentos em triplicata.

A fração B teve o maior rendimento, frente as demais frações no fracionamento químico, e ainda apresentou uma significativa inibição do crescimento celular em relação as demais frações, sendo a única a mostrar inibição nas duas concentrações utilizadas. Porém, nenhuma das suas 7 subfrações apresentou inibição do crescimento semelhante a sua fração de origem. Ainda assim, a subfração BG com o maior rendimento entre as demais seguiu para a elucidação de moléculas puras presentes em sua composição. Os dois novos epóxidos henecosanóicos poliinsaturados isolados do extrato hexânico tiveram seus valores médios de inibição do crescimento avaliados em HCT 116.

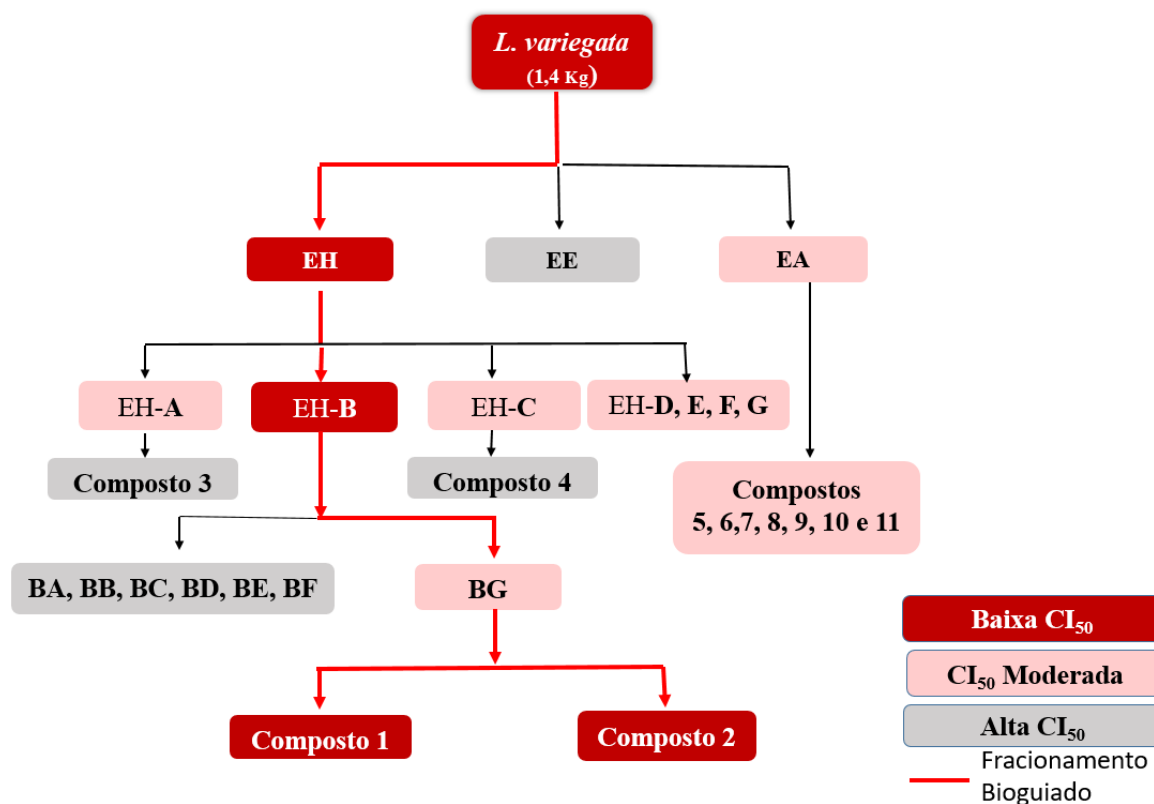
**Tabela 6 - Atividade citotóxica dos compostos 1 e 2 isolados da alga *Lobophora variegata* em células HCT 116.**

Compostos	CI <sub>50</sub>	CIT	CL <sub>50</sub>
Doxorrubicina	0,4	6,02	73,4
<b>1</b>	8,6	103,7	>335
<b>2</b>	8,1	93,1	>335

Legenda: A inibição do crescimento da linhagem HCT 116 foi avaliada nas concentrações de 0,01 a 165  $\mu\text{M}$  após 72h de incubação pelo ensaio do SRB. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Valores da concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>), da concentração de inibição total (CIT) e da concentração letal (CL<sub>50</sub>) foram investigados por interpolação da regressão não-linear. Foram realizados 3 experimentos em triplicata.

A citotoxicidade apresentada no modelo de célula tumoral foi moderada, e o extrato hexânico apresentou compostos com a menor CI<sub>50</sub> tanto no teste do MTT quanto do SRB, reforçando o interesse em seguir com o fracionamento desse extrato para encontrar a molécula alvo dessa atividade. A (**Figura 6**) é um esquema resumido da atividade citotóxica em HCT 116 que levou ao isolamento dos compostos estudados nesse trabalho.

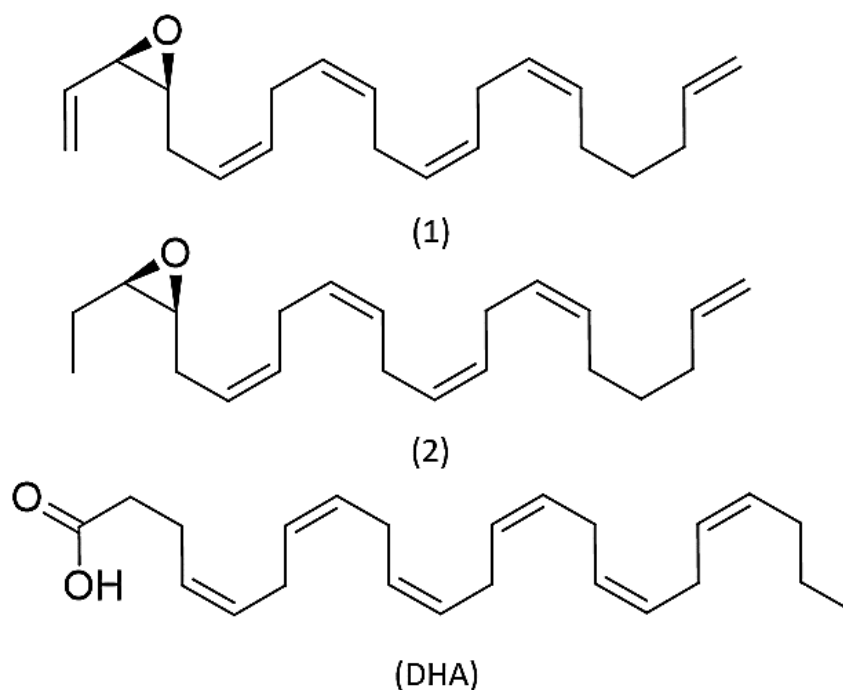
**Figura 6 - Fluxograma do fracionamento bioguiado pela atividade citotóxica em HCT 116.**



Legenda: EH= extrato hexânico, EE= extrato etanólico, EA=extrato acetato, EH-A a EH-G frações do extrato hexânico, EH-BA a EH-BG= frações da fração B do extrato hexânico, 1 e 2 = compostos puros isolados da *Lobophora variegata*. A inibição do crescimento da linhagem HCT 116 foi avaliada após 72h de incubação pelos ensaios do MTT e SRB. O fluxograma apresenta uma representação dos valores de concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ) das amostras testadas.

O potencial de inibição do crescimento no ensaio do SRB (Tabela 6, pag 51) foi mais alto do que no ensaio do MTT (Tabela 5, pag. 48). Os compostos 1 e 2, além de serem semelhantes quimicamente entre si, possuem significativa semelhança com o ácido graxo Ômega 3, especificamente, o ácido docosa-hexaenoico (DHA) (Figura 7). O DHA é um consagrado inibidor de mediadores inflamatórios e mesmo tendo efeito anti-tumoral sobre diversos tipos de linhagens celulares sua principal ação biológica é como nutracêutico antioxidante e anti-inflamatório. Assim, resolvemos investigar os efeitos dos lobophorenos sobre células do sistema imune, utilizando a linhagem de macrófago murino RAW 264.7 para seguir com os demais testes de efeitos biológicos semelhantes aos realizados na literatura com o DHA.

**Figura 7- Estrutura dos lobophorenos comparada com o DHA. Fórmula molecular 1 (C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O), 2 (C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O) e DHA (C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>)**

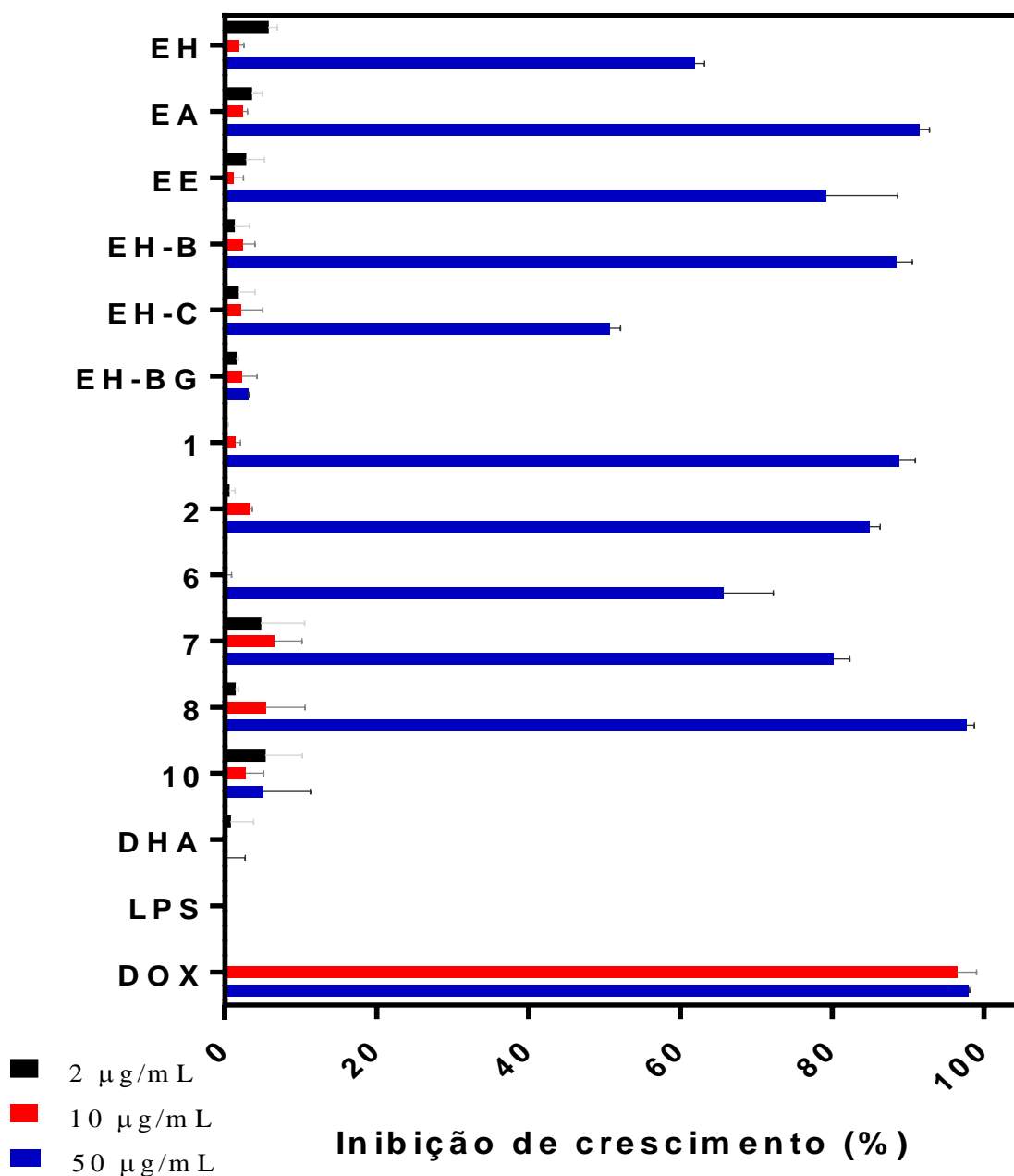


Fonte: Arquivo pessoal da autora. Legenda: DHA= ácido docosa-hexaenóico.

#### 4.2.2.2 Linhagem celular de macrófago murino (RAW264.7)

Para avaliar o efeito imunomodulador em macrófagos é necessário a integridade celular. Foi realizado uma triagem com os três extratos obtidos da alga *Lobophora variegata*, todas as frações do extrato hexânico (EH) que originaram os lobophorenos e alguns compostos do extrato acetato (EA) para investigação do efeito sobre a proliferação de macrófagos incubados por 24h. Para definir qual concentração não possui toxicidade em RAW264.7 e, ainda, produza efeito imunomodulador em macrófagos estimulados ou não com 100 ng/ml LPS.

**Figura 8 - Triagem inicial da atividade citotóxica das frações hexânicas e compostos puros isolados da alga *Lobophora variegata* em RAW264.7.**



Legenda: EH= extrato hexânico, EA=extrato acetato, EE= extrato etanólico, EH-B e EH-C frações do extrato hexânico, EH-BG = frações da fração B do extrato hexânico, 1-2-6-7-8-10 = compostos puros isolados da *Lobophora variegata*, DHA= ácido docosa-hexaenóico, LPS= lipopolissacarídeo. A inibição do crescimento da linhagem RAW 264.7 foi avaliada na concentração de 3,5 µM (preto), 35 µM (vermelho) e 165 µM (azul) após 24h de incubação pelo ensaio do SRB. A doxorrubicina (DOX) nas concentrações de 2,5 µM (vermelho) e 12,5 µM (azul) e o DHA foram utilizados como drogas padrão ouro. Os dados estão apresentados como percentual de inibição do crescimento. Foram 3 experimentos em triplicata.

Como mostrado na figura 8, o LPS 100ng/mL e o DHA não apresentaram efeito antiproliferativo em macrófagos. E embora todas as amostras obtidas de *L. variegata* tenham causado inibição da proliferação dos macrófagos na concentração 165  $\mu\text{M}$ , a partir de 35  $\mu\text{M}$ , não foi observado tal efeito (**Figura 8**). Desta os loboforenos nas concentrações 3,5 e 35  $\mu\text{M}$ , as quais não interferiram na proliferação de RAW264.7, foram utilizadas nos ensaios para avaliação do efeito modulador da resposta de macrófagos tratados com LPS 100ng/mL.

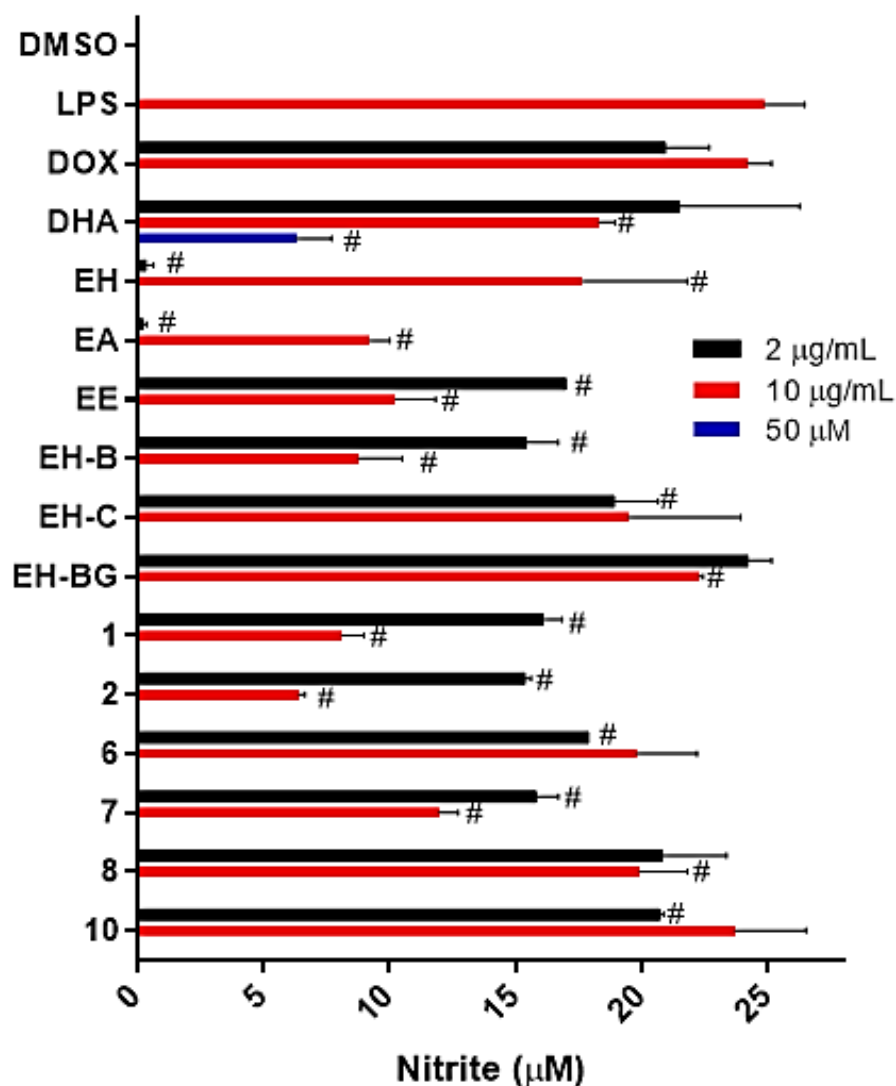
### 4.3 Efeito imunomodulador

#### 4.3.1 Ensaio de Griess

O potencial farmacológico de compostos lipídicos provenientes de produtos naturais marinhos sobre a modulação de macrófago murino estimulado com LPS ainda pode ser melhor explorado. O extrato hexânico foi o mais rico em ácidos graxos poli-insaturados sendo seu efeito sobre a modulação de macrófago murino investigado.

Uma triagem, com os três extratos obtidos da alga *Lobophora variegata*, todas as frações do extrato hexânico (EH) que originaram os compostos **1** e **2** e alguns compostos do extrato acetato (EA), nas concentrações não tóxicas para as macrófagos murinos RAW264.7 foi realizada através da detecção do nitrito ( $\text{NO}^{2-}$ ), dissolvido no sobrenadante das células estimuladas com LPS através do ensaio do Griess. A fim de encontrar efeito modulador na resposta de macrófagos ao LPS. A produção de NO foi avaliada indiretamente através da detecção de nitrito ( $\text{NO}^{2-}$ ), composto estável derivado de NO.

**Figura 9 - Triagem inicial do efeito das frações hexânicas e compostos puros isolados da alga *Lobophora variegata* em RAW264.7 desafiada com 100 ng/mL LPS na produção de nitrito.**

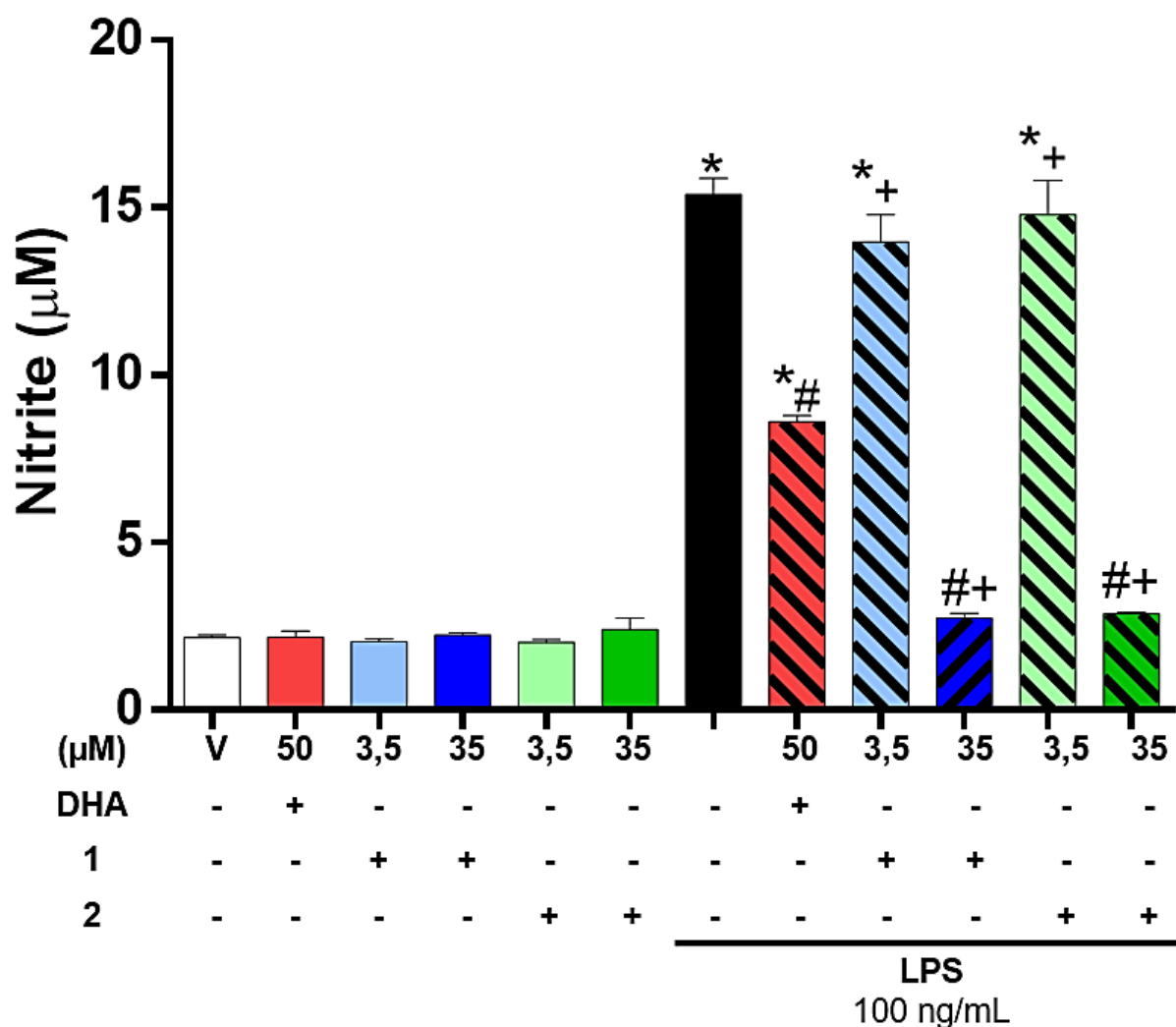


Legenda: EH= extrato hexânico, EA=extrato acetato, EE= extrato etanólico, EH-B e EH-C frações do extrato hexânico, EH-BG = frações da fração B do extrato hexânico, 1-2-6-7-8-10 = compostos puros isolados da *Lobophora variegata*, DHA= ácido docosa-hexaenóico, LPS= lipopolissacarídeo. O potencial imunomodulador das amostras foi avaliado nas concentrações de 2 e 10 µg/ml sob agitação por 1 hora, antes de serem estimuladas com LPS por 24h pelo ensaio do griess. O DMSO como veículo. A doxorrubicina (DOX) nas concentrações de 2,5 µM(preto) e 6,5 µM(vermelho) e o DHA [2, 10 e 50 µM] foram usados como drogas padrão ouro. Os dados estão apresentados como concentração de nitrito (µM). Foram 3 experimentos em triplicata

Todos os compostos usados no tratamento das células sem LPS não estimularam a produção de nitrito. Apenas os compostos puros **1**, **2** e **7** na concentração de 10 µg/ml foram capazes de inibir em menos da metade a produção de Nitrito em células estimuladas com

LPS. Sendo considerados compostos com potencial para modular a ativação de macrófagos. Os experimentos a seguir investigam o perfil modulador dos compostos inéditos **1** e **2**.

**Figura 10 - Efeito dos lobophorenos em células RAW 264.7 estimuladas ou não com LPS na produção de Nitrito.**



Legenda: V= veículo (DMSO 0,4%). As concentrações de 3,5 e 35 µM dos compostos 1 e 2 não tóxicas em células RAW264.7 foram usadas 1 hora antes da ativação dos macrófagos pelo LPS. O DHA (ácido docosa-hexaenóico) foi usado como droga padrão ouro. Após 24h de incubação o sobrenadante foi recolhido e o nitrito dosado pelo ensaio de Griess. Os dados apresentados são a média de três experimentos independentes a partir da curva padrão de nitrito e foram interpolados e analisados por meio da análise de variância (ANOVA) seguido de Dunnett. \* p < 0,05 versus grupo C-; # p < 0,05 versus grupo LPS; + p < 0,05 versus DHA com LPS.

Na Figura 10 tanto o composto **1** quanto o **2**, numa menor concentração que o DHA, inibiram (p < 0,05) a produção de nitrito nas células estimuladas com LPS quando comparados com as células tratadas apenas com LPS. Nas células não estimuladas com LPS

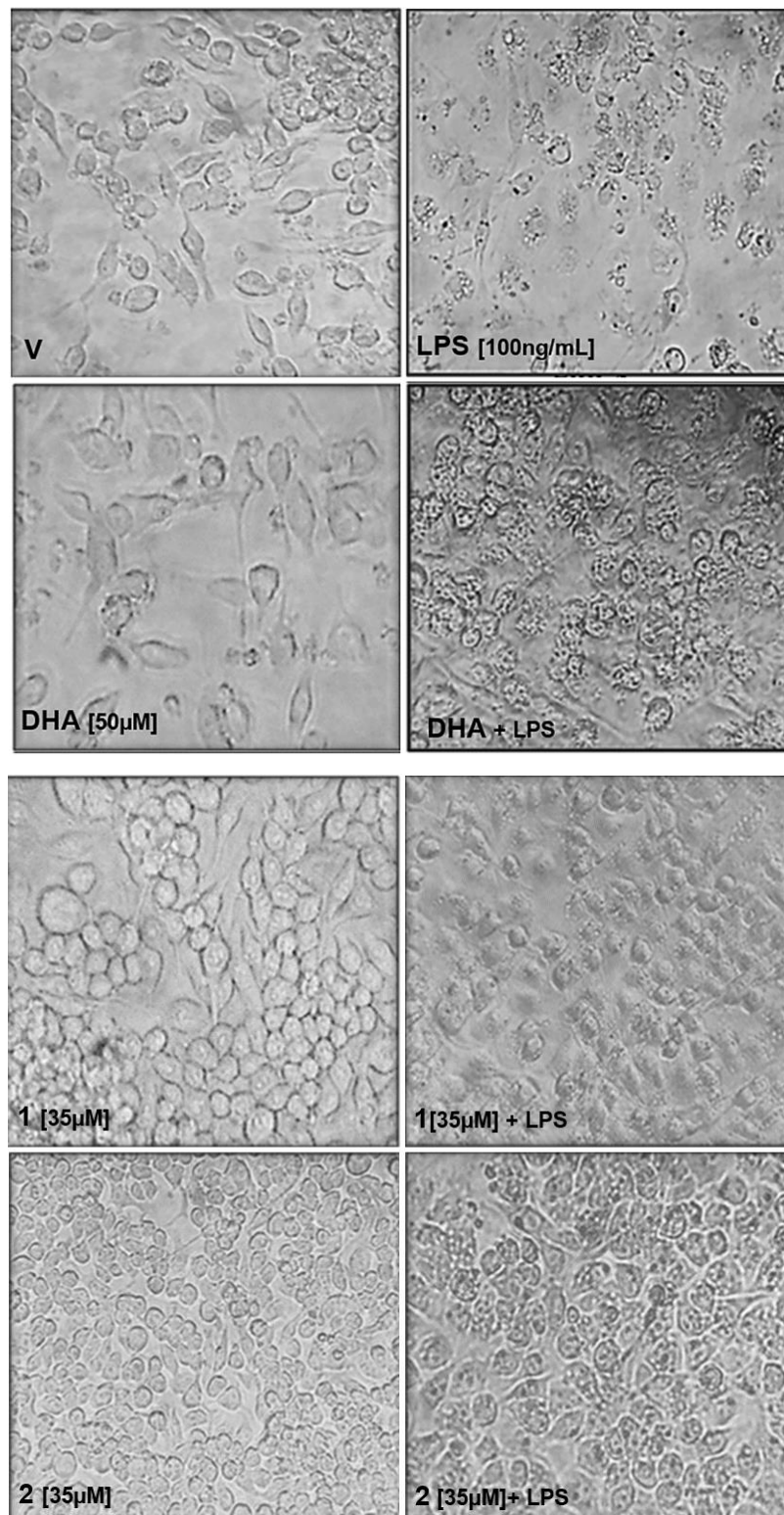
os compostos não produziram nitrito. A baixa presença de Nitrito no sobrenadante das células indica a baixa produção de óxido nítrico, que é um importante mediador inflamatório que está aumentado na inflamação aguda, podendo causar danos ao tecido. Substâncias que inibem a produção de óxido nítrico pode também inibir a produção de outros mediadores inflamatórios.

Os compostos **1** e **2** na modulação do perfil fenotípico dos macrófagos estimulados ou não com LPS foi observado através da morfologia celular registada por microscopia de contraste de fase. Essa observação nos trouxe indícios de uma possível alteração no metabolismo dos macrófagos incubados com os compostos **1** e **2**.

Na fFigura 11 observamos as células com aumento de 400 vezes. Como veículo foi usado o (DMSO 0,4%), o LPS usado como modelo de inflamação *in vitro* mostrou ativação clássica com grânulos e vacúolos presentes no citoplasma das células. Já os compostos **1** e **2** sem LPS, não apresentou toxicidade. E quando as células, após 1 hora de tratamento com os compostos **1** e **2** sob agitação, são desafiadas com LPS é possível visualizar uma alteração morfológica do fenótipo esperado quando as células são desafiadas apenas com LPS.

Mesmo sem podermos afirmar qual o mecanismo de ativação causado pelos compostos **1** e **2** em macrófagos com esse ensaio, este favoreceu a investigação da produção de citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias. Essa investigação foi realizada pelo ensaio de ELISA com as concentrações de 3,5 e 35  $\mu\text{M}$  dos compostos **1** e **2** e 50  $\mu\text{M}$  da droga padrão ouro DHA.

**Figura 11 - Morfologia das células RAW264.7 registada por microscopia de contraste de fase com aumento de 400 vezes.**



Fonte: arquivo pessoal. V=veículo, LPS= lipopolissacarídeo, DHA=ácido docosa-hexaenóico, 1 e 2 = lobophrenos, células incubada por 24h.

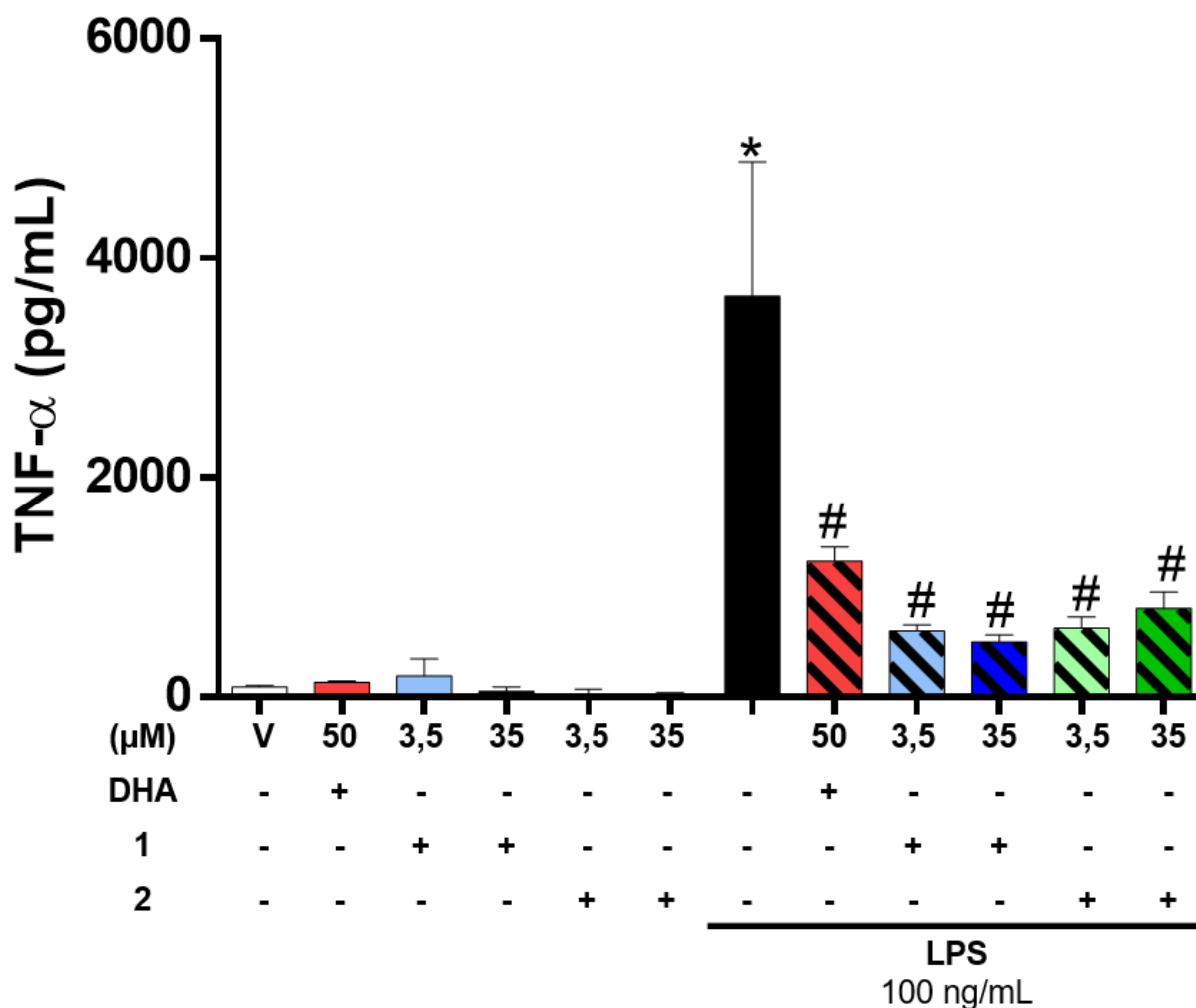
### 4.3.2 Avaliação da produção de citocinas por macrófagos murinos RAW264.7.

O equilíbrio entre as citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias é fundamental para uma resposta imune eficiente. Porém, a produção prolongada de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 causa danos significativos e até irreversíveis ao organismo. Em doenças inflamatórias crônicas substâncias que diminuam a produção dessa citocinas podem melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Porém, a inibição total pode causar a imunossupressão do sistema imune e levar à morte.

Em nosso estudo as células foram incubadas por 1 hora sob agitação com os compostos **1** e **2** em concentrações, não tóxicas, 3,5 e 35  $\mu$ M e em seguida desafiadas por 100 ng/ml de LPS, a incubação total foi de 24h. O (DMSO 0,4%) foi usado como veículo. O LPS foi usado como modelo inflamatório e o DHA como droga padrão ouro para comparar a potência dos compostos testado. Após a incubação os níveis de citocina no sobrenadante da cultura foram dosados por ELISA.

O TNF- $\alpha$  é uma potente citocina pró-inflamatória que pode levar a produção de mediadores inflamatórios que favorecem uma variedade de doenças crônicas, incluindo o câncer. Farmacos aprovados como bloqueadores de TNF- $\alpha$  são caros e produzem inúmeros efeitos colaterais. Na Figura 12 notasse a significativa diminuição na produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos murinos RAW264.7 após incubação do composto **1** e **2** na vigência de LPS ( $p < 0,05$ ).

Figura 12 - Produção de TNF- $\alpha$  em RAW264.7 estimuladas com LPS tratada com os lobophorenos incubado por 24h.



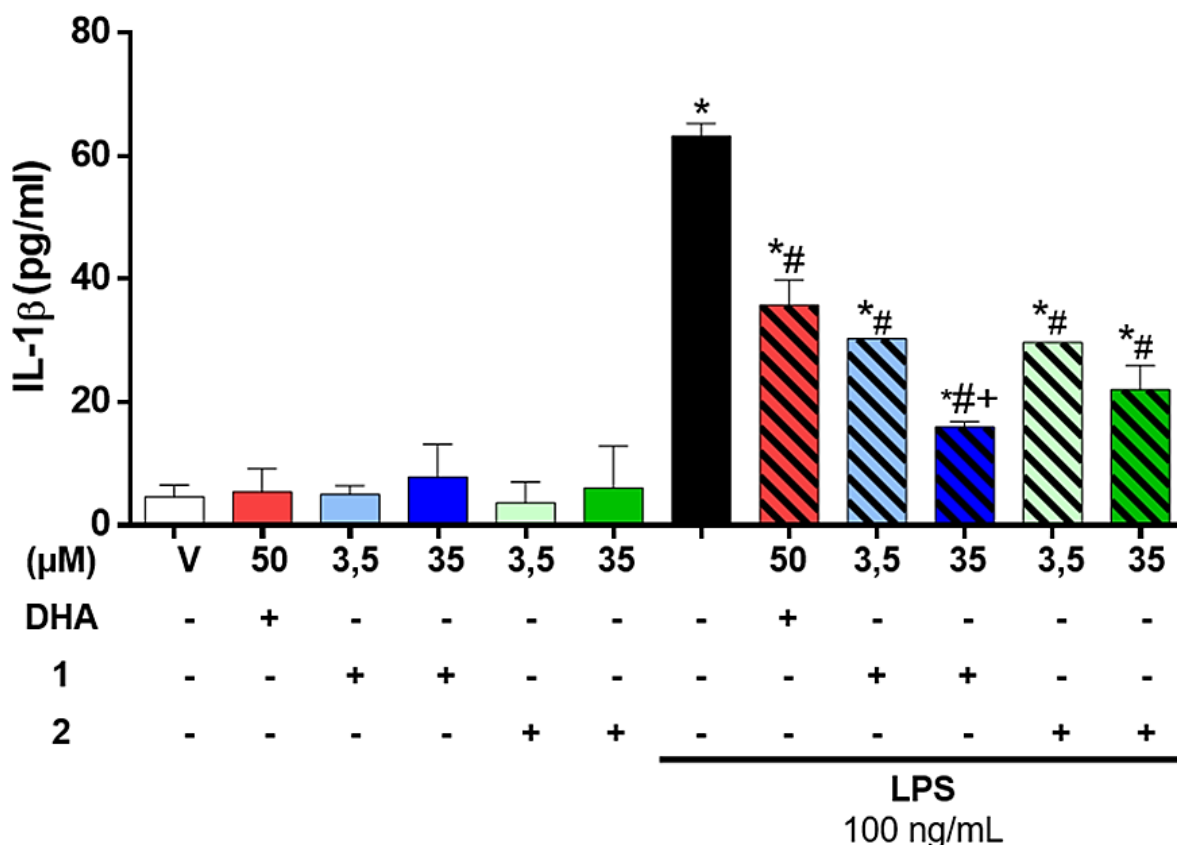
Legenda: V=veículo, LPS = lipopolissacarídeo. A dosagem de TNF- $\alpha$  no sobrenadante de células tratadas com os compostos 1 e 2 nas concentrações não tóxicas de 3,5 e 35  $\mu$ M. O DHA (ácido docosa-hexaenóico) foi usado como droga padrão ouro. Os níveis de TNF- $\alpha$  no sobrenadante da cultura de célula foi medido por ELISA. Os dados apresentados são a média de dois experimentos independentes a partir da curva padrão do TNF- $\alpha$  e foram interpolados e analisados por meio da análise de variância (ANOVA) seguido de Dunnett. \*  $p < 0,05$  versus grupo controle; #  $p < 0,05$  versus grupo LPS; +  $p < 0,05$  versus DHA com LPS.

Os lobophorenos isolados da *L. variegata* mesmo em baixas concentrações foram capazes de bloquear expressivamente a produção de TNF- $\alpha$  semelhante ao DHA, já conhecido por diminuir a produção de TNF- $\alpha$ , ativado via NF $\kappa$ B.

A IL-1 $\beta$  desencadeia alterações fisiológicas e morfológicas semelhantes às do TNF- $\alpha$ . Alguns pesquisadores apostam na ação sinérgica das duas durante a resposta inflamatória. A IL-1 $\beta$  estimula a produção de prostaglandinas locais e aumenta a percepção da dor por aumentar o número de receptores centrais. Conforme observado na fFigura 13 os

lobophorenos nas concentrações de 3,5 e 35  $\mu\text{M}$  inibiram significativamente a presença de IL-1 $\beta$  no sobrenadante de macrófagos estimulados por LPS.

**Figura 13 - - Produção de citocina IL-1  $\beta$  em RAW264.7 estimuladas com LPS tratada com os lobophorenos incubado por 24h.**



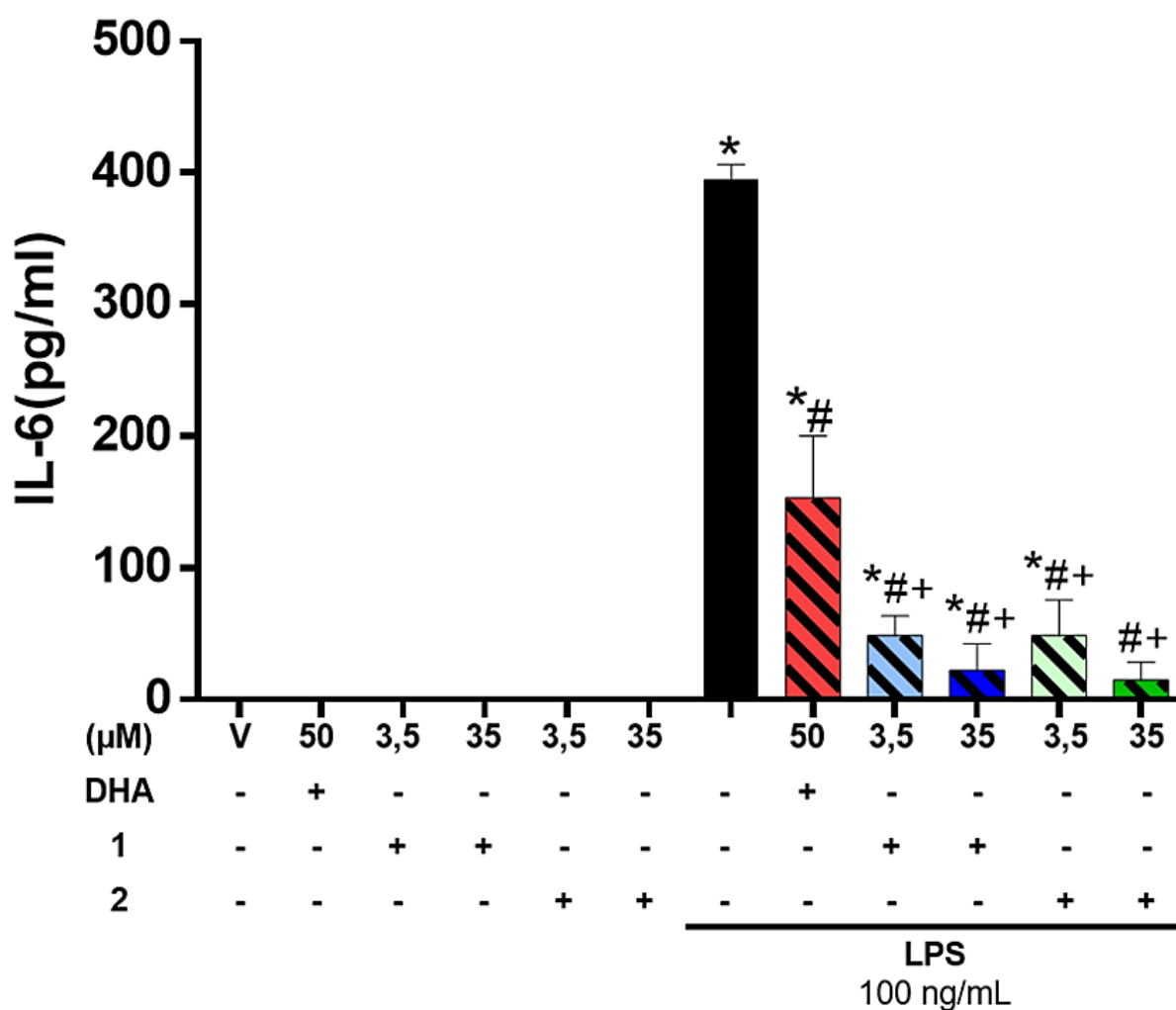
Legenda: V=veículo, LPS = lipopolissacarídeo. A dosagem de IL-1 $\beta$  no sobrenadante de células tratadas com os compostos **1** e **2** nas concentrações não tóxicas de 3,5 e 35  $\mu\text{M}$ . O DHA (ácido docosaenoico) foi usado como droga padrão ouro. Os níveis de IL-1 $\beta$  no sobrenadante da cultura de célula foi medido por ELISA. Os dados apresentados são a média de dois experimentos independentes a partir da curva padrão do IL-1 $\beta$  e foram interpolados e analisados por meio da análise de variância (ANOVA) seguido de Dunnett. \*  $p < 0,05$  versus grupo controle; #  $p < 0,05$  versus grupo LPS; +  $p < 0,05$  versus DHA com LPS.

Nas células desafiadas com LPS a produção total em pg/ml de IL-1 $\beta$  foi bem menor do que a de TNF- $\alpha$ . Apesar disso ainda foi possível mensurar estatisticamente a diminuição em células pré-tratadas com os lobophorenos. A concentração de 3,5 e 35  $\mu\text{M}$  produziu efeito inibitório semelhante ao DHA.

Na fFigura 14 é possível observar a diminuição na produção da citocina pró-inflamatória IL-6 por macrófagos estimulados por LPS tratados com os lobophorenos nas

concentrações de 3,5 e 35  $\mu\text{M}$ . Os compostos inibiram significativamente a presença de IL-6 no sobrenadante de macrófagos estimulados por LPS quando comparadas com as células estimuladas mas, não tratadas. O TNF- $\alpha$  e a IL-1 são indutores potentes da produção de IL-6, esta é um importante mediador da resposta imune a inflamação de fase aguda.

**Figura 14 - Produção de citocina IL-6 em RAW264.7 estimuladas com LPS tratada com os lobophorenos incubado por 24h.**



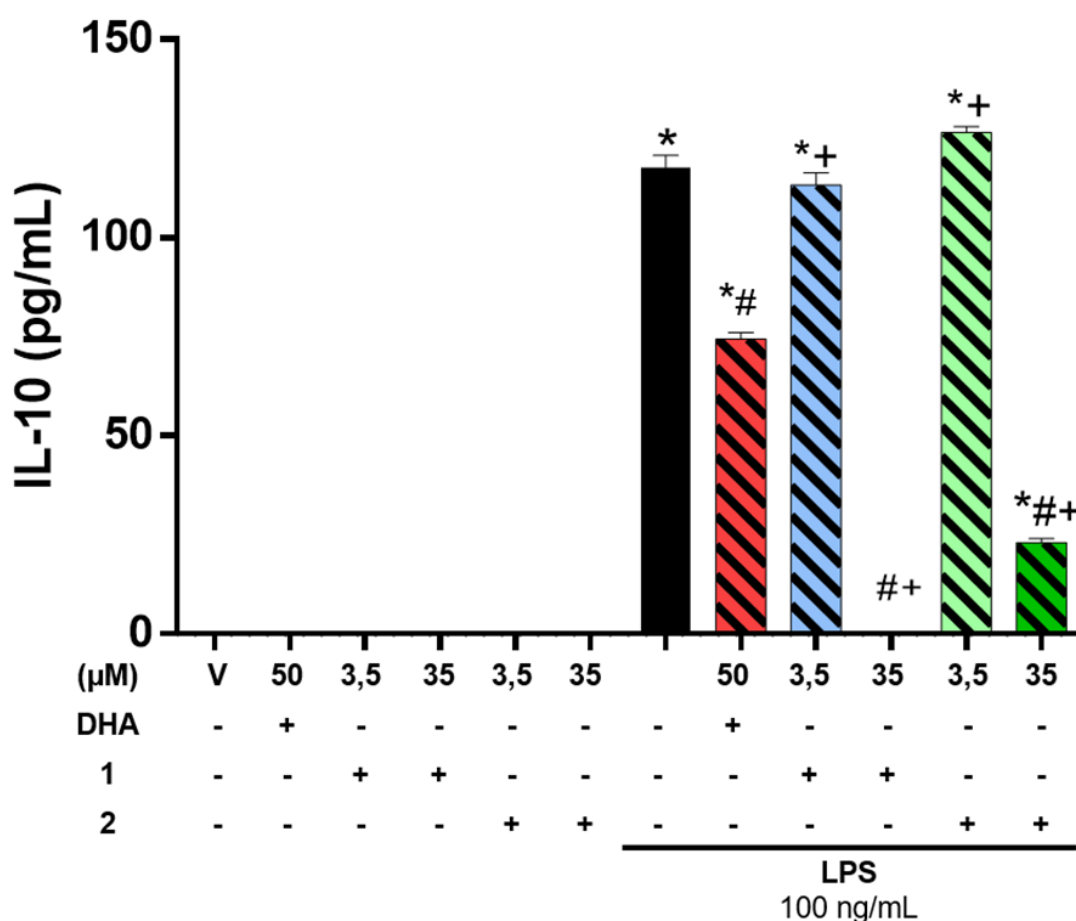
Legenda: V=veículo, LPS = lipopolissacarídeo. Dosagem de IL-6 no sobrenadante de células tratadas com os compostos **1** e **2** nas concentrações não tóxicas de 3,5 e 35  $\mu\text{M}$ . O DHA (ácido docosa-hexaenóico) foi usado como droga padrão ouro. Os níveis de citocinas em sobrenadantes de cultura foram medidos por ELISA. Os dados apresentados são a média de dois experimentos independentes a partir da curva padrão da citocina e foram interpolados e analisados por meio da análise de variância (ANOVA) seguido de Dunnett. \*  $p < 0,05$  versus grupo controle; #  $p < 0,05$  versus grupo LPS; +  $p < 0,05$  versus DHA com LPS.

A diminuição total de IL-6 pelos compostos **1** e **2** na concentração de 35  $\mu\text{M}$  não tóxica para macrófagos e moderadamente citotóxica para células de câncer de coloretal sugere

uma relevante utilização farmacológica anti-inflamatória e anticâncer desses compostos inéditos.

A citocina IL-10 é uma das mais importantes citocinas anti-inflamatória e é responsável pela inibição de citocinas pró-inflamatórias durante a resposta imunológica. Ela regula os sinais prolongados da inflamação. Na Figura 15 mensuramos a presença de IL-10 no sobrenadante de macrófagos murinos estimulados com LPS e tratados com os compostos **1** e **2** na concentração de 3,5 e 35  $\mu\text{M}$ . O DMSO foi usado como controle negativo. O LPS e o DHA foram usados como controle positivo.

**Figura 15 - Produção de citocina IL-10 em RAW264.7 estimuladas com LPS tratada com os lobophorenos incubado por 24h.**



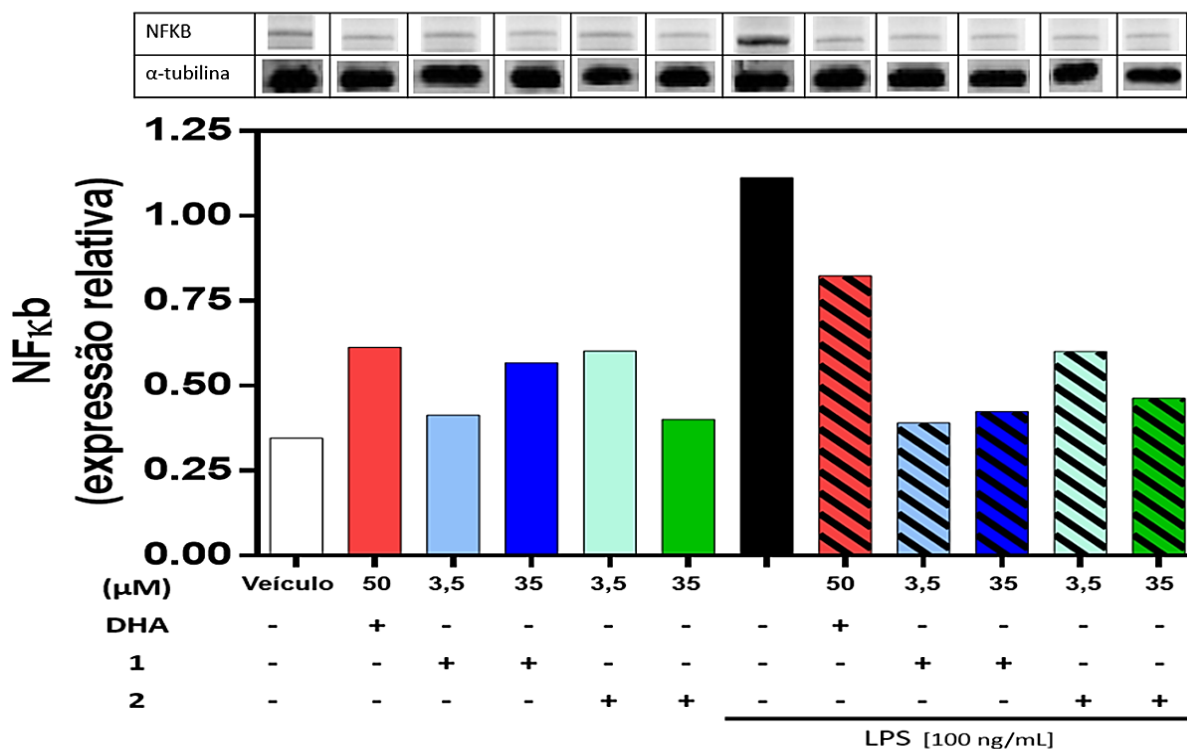
Legenda: V=veículo, LPS = lipopolissacarídeo. Dosagem de citocina IL-10 no sobrenadante de células tratadas com os compostos **1** e **2** nas concentrações não tóxicas de 3,5 e 35  $\mu\text{M}$ . O DHA (ácido docosa-hexaenóico) foi usado como droga padrão ouro. Os níveis de IL-10 no sobrenadante da cultura de célula foi medido por ELISA. Os dados apresentados são a média de dois experimentos independentes a partir da curva padrão do TNF- $\alpha$  e foram interpolados e analisados por meio da análise de variância (ANOVA) seguido de Dunnett. \*  $p < 0,05$  versus grupo controle; #  $p < 0,05$  versus grupo LPS; +  $p < 0,05$  versus DHA com LPS.

A produção de IL-10 em pg/mL foi baixa comparada as demais citocinas devido ao tratamento ter sido de apenas 24h de incubação. Visto que a IL-10 é expressa mais tardiamente após a lesão, com o intuito de realizar um efeito retroativo das citocinas pró-inflamatórias. Nas células tratadas com compostos **1** e **2** na concentração 3,5  $\mu$ M não houve diminuição de IL-10 enquanto que em 35  $\mu$ M foi possível notar a ausência de IL-10 no sobrenadante da RAW264.7.

#### 4.4 Avaliação da modulação de fatores de transcrição por WB

O NFkB é um importante regulador da inflamação, desempenhando um papel essencial na indução de vários genes pró-inflamatórios envolvidos em doenças crônicas como inflamação e até mesmo no câncer por participar ativamente da resposta imunológica do organismo. Os lobophorenos demonstraram diminuir a produção de citocinas que são moduladas por NFkB e na Figura 16 demonstramos que esses compostos na concentração de 35  $\mu$ M também diminuem a produção de NF-kB-p65 em macrófagos murino.

**Figura 16 - Expressão de NFkB-p65 em macrófagos murinos tratados com os lobophorenos e estimuladas com LPS incubado por 24h.**



Legenda: V=veículo, LPS = lipopolissacarídeo. Dosagem de NFkB-p65 foi feita com o lisado de células tratadas com os lobophorenos nas concentrações de 3,5 e 35  $\mu$ M. O DHA (ácido docosa-hexaenóico) foi usado como droga padrão ouro. A expressão total de NFkB-p65 da cultura de célula foi medido por Imunoblot. Os dados apresentados são a média de um experimento a partir da curva padrão do NFkB-p65 que foi interpolado. \* p < 0,05 versus grupo controle; # p < 0,05 versus grupo LPS; + p < 0,05 versus DHA com LPS.

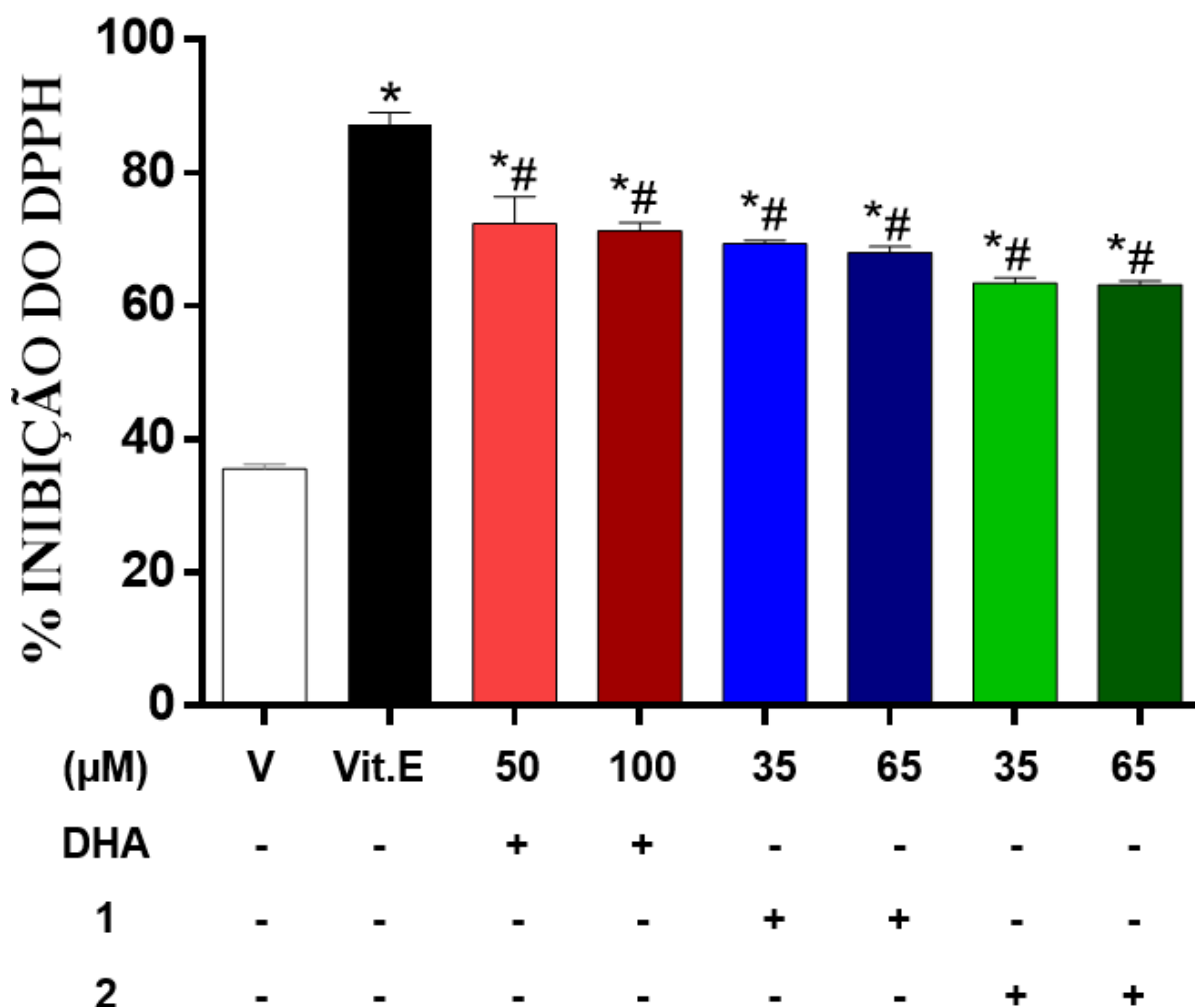
Apesar de ter sido apenas um experimento os dados sugerem que os lobophorenos nas concentrações 3,5 e 35  $\mu\text{M}$  possuem o potencial de diminuir a expressão de NF $\kappa$ B-p65 total em macrófagos estimulados com LPS por 24h. Sugerindo que as moléculas atuem na inibição dessa via de transcrição.

#### 4.5 **Atividade antioxidante**

A determinação do efeito antioxidante de substâncias na análise de misturas com vários compostos causam o chamado efeito sinérgico que resulta numa maior capacidade antioxidante do que apresentada quando o composto está purificado. Com o objetivo de apresentar mais precisão nos resultados o ensaio de DPPH foi realizado apenas com substâncias puras.

Para conhecermos a concentração ideal de substância pura em  $\mu\text{M}$  que possua atividade antioxidante foram testadas as concentrações de 35, 65 e 100  $\mu\text{M}$  dos compostos 1 e 2. O DMSO foi o solvente diluidor das amostras e por isso foi utilizado como controle negativo (V). A vitamina E (Vit. E) por ser um potente agente antioxidante foi utilizado como controle positivo e o DHA nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$  por já possui capacidade antioxidante, e por ser lipofílico também foi usado como controle positivo, permitindo determinar o percentual de inibição do DPPH causado pelos lobophorenos.

Figura 17 - Potencial antioxidante dos lobophorenos pelo teste DPPH.



Legenda: V=veículo, O sequestro de radicais livres em solução foi avaliado pelo ensaio do DPPH. A vitamina E (Vit. E,) na concentração de 50 µg/mL e o ácido docosa-hexaenóico (DHA) foram usados como controles positivos. Os dados estão apresentados como valor de percentual de inibição do DPPH. Foram dois experimentos independentes analisados por meio da análise de variância (ANOVA) seguido de Dunnett. \* p < 0,05 versus o controle negativo; # p < 0,05 versus Vit. E.

Segundo os resultados acima todas as concentrações testadas apresentaram inibição significativa de DPPH o que sugere que as substâncias testadas conseguiram sequestrar o DPPH e reduzir a presença de radicais livres em solução. Dessa forma são consideradas substâncias com potencial antioxidantes. Foi possível observar também que a potência antioxidante dos lobophorenos foram semelhantes as do DHA, o que potencializa a investigação de efeito anti-inflamatório dessas novas moléculas extraídas da alga *Lobophora variegata*. Com esse teste também foi possível confirmar que a concentração de 35 µM é a concentração ideal de trabalho em células RAW264.7 por não ser tóxica e ainda apresentar significativa ação antioxidante.

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenvolvido a partir da triagem de compostos bioativos, visando a busca por novas substâncias com potencial biotecnológico que pudessem auxiliar em estudos relacionados ao tratamento do câncer e da inflamação crônica. A descoberta de novas substâncias com potencial farmacológico provenientes de produtos naturais marinhos aumenta o arsenal de substâncias químicas que favorecem o prognóstico do paciente colaborando com o aumento da qualidade de vida dos que fazem uso de medicamentos por longos períodos de tempo (KALLIFATIDIS; HOY; LOKESHWAR, 2016; STONIK; FEDOROV, 2014).

A extração com três solventes diferentes, sendo eles de polaridades distintas, expandiu as possibilidades de encontrarmos metabólitos bioativos. O rendimento, das frações dos extratos, foi variado mas, permitiu a realização de uma triagem quanto a atividade inibitória em célula de adenocarcinoma e em macrófagos murino. Na triagem realizada o extrato hexânico, mais apolar, deteve a menor  $CI_{50}$  contra células tumorais HCT 116 já os extratos acetato e etanólico tiveram a  $CI_{50}$  moderadamente alta.

Estudos sobre a atividade citotóxica de extratos de *L. variegata* se limitaram a investigar compostos com afinidade polar pois, frações do extrato aquoso do macerado da *L. variegata* foram capazes de inibir o crescimento de células de melanoma com  $CI_{50}$  variando de 14 a 18  $\mu\text{g/mL}$  (ROCHA et al., 2007). Kremb e colaboradores (2014) demonstraram que o extrato bruto da *L. variegata* extraído com solvente orgânico de acetona em fase aquosa não mostrou atividade citotóxica em células mononucleares do sangue periférico. Contudo, a baixa citotoxicidade dos compostos polares em células normais permitiu investigar outras ações farmacológicas que só é possível em células viáveis como a inibição do mecanismo de ativação do vírus HIV-1.

A inibição do crescimento celular pelo extrato hexânico nos fez investigar as frações mais apolares, que também se encontravam em algumas frações do extrato acetato, que possui polaridade intermediária. As frações seguiram para a rastreio de moléculas bioativas com perfil apolar e foi possível isolarmos 10 compostos puros com estruturas químicas interessantes, dentre elas os compostos epóxido henecosanóide poliinsaturado (1), epóxido henecosanóide poliinsaturado (2) inéditos. Os demais compostos não possuíam atividade biológica investigada ou nunca foram encontrados nessa espécie de alga. São eles os compostos,  $\beta$ -caroteno (3) fucosterol (4), apo-9'-fucoxantinona (5), apo-13'-fucoxantinona (6), lobofoenol B (7), éter glicérfico de fitano (8), 7,8-HepETE (9), loliolídeo (10) e

isolololilídeo (**11**) (EL HATTAB et al., 2008; FONTANA et al., 2007; HAM et al., 2010; PAN et al., 2014; TSUKIDA; SAIKI; SUGIURA, 1981; URATA; TAKAISHI, 1994; VIEIRA et al., 2016).

Em (1989) os pesquisadores Coen e Tanner demonstraram que a alga *L. variegata* apresentava um padrão de inibição de herbivoria que a classificava como não palatável a peixes e ouriços-do-mar. Hernández e colaboradores (2008) sugeriram que a macroalga fosse um amortecedor contra as tendências de dominação dos ouriços-do-mar. Mecanismos que favoreçam esse perfil inibitório aumentam a sobrevivência de organismos sésseis e indicam a presença de substâncias bioativas que podem ser de interesse farmacológico.

As triagens *in vitro* dos extratos, frações e compostos isolados foram realizadas com a concentração de 2, 10 e 50 µg/mL. Os testes com cultura de células simulam, em parte, o ambiente *in vivo*, evitando despesas desnecessárias e alta reprodutibilidade. O ensaio de viabilidade celular tem se destacado como uma alternativa ao uso de animais (MOSMMAN et al., 1983).

Considerando a necessidade de avaliar se os extratos utilizados nos experimentos apresentam citotoxicidade, foram utilizados dois métodos colorimétricos *in vitro* para determinar a melhor concentração capaz de desempenhar atividade biológica. A investigação do crescimento de célula tumoral mostrado nas triagens revelou o perfil inibitório das frações que levou a purificação dos compostos **1** e **2**. Eles e os demais compostos puros também foram avaliados em sua CI<sub>50</sub>, porém, apenas os compostos **1**, **2** e **7** induziram a morte celular em linhagem de HCT 116, incubada por 72h, através do ensaio do MTT. Esse ensaio utiliza o metabolismo da mitocôndria funcional para converter o sal do MTT em formazan, dessa forma substâncias que alterem essa via podem produzir resultados falseados.

A triagem em HCT 116 foi repetida pelo método do SRB que se propõe a determinar a proliferação celular, com base na medição do teor de proteína celular. É um ensaio que independe do metabolismo celular e permite o teste de várias amostras de uma única vez, além de ser bem econômico e estável (VICHAI; KIRTIKARA, 2006). Nele a CI<sub>50</sub> do composto **1** foi 12,4 µM em MTT e 8,6 µM no SRB. Apesar de pouca diferença o ensaio do SRB ainda se sobressai por permitir a investigação da CI<sub>50</sub> de substâncias menos tóxicas e até mesmo das que apresentam efeito citostático, além de calcular a concentração inibitória total e letal.

O controle positivo usado foi o quimioterápico doxorrubicina (DOX), esse é um fármaco amplamente usado na clínica que age intercalando o DNA. Apesar da eficiência é um fármaco agressivo para o paciente por causar severos efeitos adversos (KANG et al., 2017).

Os lobophorenos são substâncias com uma longa cadeia poli-insaturada bem semelhante a cadeia dos lipídeos ômega. Essa propriedade química da molécula pode lhes proporcionar ações biológicas semelhantes às dos AGPI. Visto que, o DHA é um conhecido inibidor de mediadores inflamatórios, realizamos uma triagem, em macrófago murino RAW264.7, incubados por 24h, das frações que levaram a descoberta dos lobophorenos. A triagem em RAW264.7 foi importante para encontrarmos as concentrações não-tóxicas para essa linhagem. Na triagem as concentrações de 2 e 10 µg/mL não apresentaram efeito antiproliferativo e o que possibilitou a investigação da modulação de macrófagos.

O DHA foi usado como droga padrão ouro já que possui efeito anti-inflamatório, antioxidante e antitumoral comprovados (D'ELISEO; VELOTTI, 2016; SI et al., 2016; WALL et al., 2010). Segundo o trabalho de Allam-ndoul e colaboradores (2017) o DHA na concentrações de 50 µM é capaz de modular perfis de expressão gênica de vias da resposta imune em macrófagos estimulados com 100 ng/mL de LPS. Essa concentração não mostrou toxicidade nas triagens realizadas em nosso trabalho e foi escolhida para ser usada como controle positivo na investigação do efeito imunomodulador.

O DHA também diminui a expressão de iNOS e de COX-2 limitando a produção do NO exibindo efeito neuroprotetor (MORI et al., 2017; OSHIMA et al., 1996). A ingestão de DHA como nutracêutico preveniu a hipertensão induzida por Angiotensina II e disfunção endotelial em ratos, provavelmente por prevenção do estresse oxidativo (NIAZI et al., 2017). Ele também diminui a expressão de importantes mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  que inibe a ativação do inflamassoma, sugerindo seu efeito anti-inflamatório (BOULIS et al., 2014; CHOI et al., 2014; TIAN et al., 2017; WILLIAMS-BEY et al., 2014)

Observando a semelhança estrutural e o efeito imunomodulador do DHA, investigamos modulação dos lobophorenos sobre os macrófagos estimulados. O desafio de macrófagos com LPS induz a alta produção de NO, pela iNOS, e PGE<sub>2</sub>, pela ciclooxigenase (COX-2), portanto, uma substância que previna a liberação desses mediadores ou regule a expressão de iNOS e COX-2 pode possuir atividade anti-inflamatória (HOBBS; HIGGS; MONCADA, 1999). Estudo realizado com polissacarídeos de *L. variegata* identificou a presença de fucanas capazes de diminuir os níveis de óxido nítrico em células RAW264.9 estimuladas com LPS (PINHEIRO et al., 2017).

Em nossos resultados os extratos EH, EA, a fração B e os compostos **1**, **2** e **7** na concentração de 10 µg/mL, não tóxica em macrófagos, conseguiram prevenir a produção de nitrito em mais da metade quando comparados com células não tratadas. Esse efeito sugere a diminuição de óxido nítrico e consequente prevenção do efeito inflamatório causado pelo

LPS. O grupo de pesquisa da professora Edda Leite já encontrou polissacarídeos presentes na alga parda *Lobophora variegata* que apresentam efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antitumorais (CASTRO et al., 2014, 2015).

A concentração de 35  $\mu\text{M}$  dos compostos puros **1** e **2** produziram efeito imunodepressor em macrófagos estimulados com LPS ao inibir, totalmente a ativação clássica enquanto 50  $\mu\text{M}$  do DHA inibiu 44%. Outro resultado interessante foi a morfologia celular, observada ao microscópio de contraste de fase, onde foi possível ver que as células tratadas com os lobophorenos, sem LPS, estimularam a proliferação celular. Dessa forma os compostos mostram está alterando morfologicamente o metabolismo das células.

Diante desses resultados o potencial imunomodulador dos lobophorenos, nas concentrações de 3,5 e 35  $\mu\text{M}$ , em linhagem de macrófagos estimulados com LPS foi investigado através do ensaio imunoenzimático ELISA. A produção de citocinas envolvidas na inflamação é um indicativo para sugerir qual o fenótipo de ativação dos macrófagos por determinadas substâncias de interesse (SAQIB et al., 2018).

A capacidade de produção do TNF- $\alpha$  em células do sistema imunológico é bastante elevada, visto que quando as células sofrem alguma lesão essa citocina ajuda a eliminar o patógenos e estimula a produção de outras citocinas pro-inflamatórias envolvidas na resposta imunológica. O TNF- $\alpha$ , também promove a expressão da iNOS no sistema nervoso central, levando a uma rápida evolução de doenças inflamatórias crônicas quando sua produção não é controlada por retroalimentação (MEDEIROS et al., 2007).

Em nossos resultados as células estimuladas com LPS, que não tiveram contato com nenhuma substância protetora, produziram mais de 3.500 pg/mL de TNF- $\alpha$ . Contudo, as células tratadas 1 hora antes com os lobophorenos inibiram acentuadamente os níveis de TNF- $\alpha$ . O composto **1** na concentração de 35  $\mu\text{M}$  chegou a inibir 86,31% comparado com o LPS, enquanto que o DHA a 50  $\mu\text{M}$  inibiu 66,2%.

Substâncias que inibam a citocina TNF- $\alpha$  têm grande potencial para melhorar a evolução e o prognóstico de doença inflamatórias crônicas. Os inibidores dessa citocina são usados como fármacos no tratamento de doenças auto-imunes (MARTIN; MEDEIROS; GOLDENSTEIN-SCHAINBERG, 2006). Os bloqueadores mais usados na clínica são o etanercepte, o infliximabe e o adalimumabe usados no tratamento da artrite reumatoide, espondilite anquilosante, doença de Crohn, psoríase crônica e artrite reumatoide juvenil (BRAUN et al., 2007; KNIGHT et al., 1993; WEINBLATT et al., 2003). Apesar de eficaz o tratamento de um único paciente chega a custar de 20 a 30 mil reais por ano na rede pública.

Além, dos efeitos adversos, como a imunossupressão, que podem levar o paciente a desistir do tratamento (Ministério da Saúde, 2012).

A síntese de IL-1 $\beta$ , pode ser induzida por TNF- $\alpha$ , esta é uma citocina que modula intimamente o mecanismo da febre, atuando no hipotálamo, estimula a adesão de leucócitos na fases iniciais da resposta inflamatória, dentre outras ações periféricas e sistêmicas (DINARELLO, 1996). O mecanismo de inibição natural dessa citocina envolve o bloqueio da ligação ao receptor de IL-1 $\beta$ . O anakinra, é um fármaco que bloqueia receptores de IL-1 $\beta$  usado no tratamento de doenças inflamatórias refratárias (SO et al., 2007).

Mesmo em concentrações baixíssimas é possível perceber os efeitos inflamatórios causados pela IL-1 $\beta$ . Em nossos experimentos macrófagos desafiados com LPS produziram uma média de 63 pg/mL de IL-1 $\beta$ . Já os lobophorenos não chegaram a produzir metade desse valor, nem mesmo na concentração de 3,5  $\mu$ M, o que destaca o potencial inibitório desses compostos. O DHA usado como controle positivo na concentração de 50  $\mu$ M inibiu pela metade a produção de IL-1 $\beta$ . Esse resultado colabora com os estudos feitos por Williams-bey e colaboradores (2014) que investigaram a inibição da IL-1 $\beta$  pelo DHA em macrófagos, usando a concentração de 50  $\mu$ M. O DHA foi capaz de inibir metade da produção de IL-1 $\beta$ , além de inibir a ativação de NF $\kappa$ B e aumentar a autofagia. Borsini e colaboradores (2017) mostraram também que 10  $\mu$ M de DHA produziu efeito protetor contra a influência prejudicial da IL-1 $\beta$  na neurogênese do hipocampo humano.

A cascata de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  também desencadeia produção de IL-6, além do estímulo causado pelo LPS. A mesma tem conhecida atividade pró-inflamatória e favorece a transição da inflamação aguda em crônica (GABAY, 2006). O tocilizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado que bloqueia a ligação da IL-6 ao seu receptor e é um fármaco usado no tratamento da artrite e da dor radicular (MIHARA et al., 2005; OHTORI et al., 2012).

Os macrófagos desafiados com LPS por 24h produziram quase 400 pg/ml de IL-6 enquanto que os tratados uma hora antes com os compostos **1**, **2** e o DHA expressaram baixíssimos níveis. Os lobophorenos na concentração de 3,5  $\mu$ M produziram ambos 12% de IL-6 quando comparados ao controle LPS. Enquanto, na concentração de 35  $\mu$ M produziram 5,6% e 3,7%, respectivamente, o que estatisticamente consideramos a inibição total da maior concentração. Já o DHA em 50  $\mu$ M produziu 38,7% de IL-6.

Tan e colaboradores (2018) mostraram os efeitos da suplementação com EPA e DHA em adultos de 50 a 85 anos com alguma condição inflamatória não autoimune. Os pacientes foram tratados com 2,5 g de ômega 3 por dia, enquanto o grupo placebo foi tratado com óleo mineral. A terapia com EPA e DHA teve um efeito redutor significativo nos níveis

de IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  após 4 semana, e ainda maior após 8 semanas. Sugerindo então que a suplementação dietética do DHA é efetiva para aliviar os efeitos nocivos da inflamação.

Outro parâmetro avaliado em nossa investigação foi a presença de IL-10 no sobrenadante das células pré-tratadas com os compostos e desafiadas com LPS. Estudos mostraram que a produção de IL-10 está aumentada em processos inflamatórios e desempenha papel imunomodulador nessas condições. A IL-10 é capaz de reduzir os níveis de produção de várias citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (HOWARD et al., 1993; KITAGAKI et al., 2006). Assim, regula negativamente os sinais tardios da inflamação e por isso é dita como uma importante citocina anti-inflamatória (CINTRA et al., 2008; IP et al., 2017).

A IL-10 é uma citocina produzida tardiamente por células de macrófagos desafiados com LPS e tem seu pico de produção *in vitro* entre 20 a 48 horas (MALEFYT et al., 1991; MOORE et al., 2001). Apesar da produção tardia foi possível ver a expressão de IL-10 nos grupos com LPS em nossos experimentos com 24h de incubação. O tratamento com os compostos 1 e 2, uma hora antes da ativação dos macrófagos pelo LPS produziu baixos níveis de IL-10 sugerindo que as células foram protegidas do estresse inflamatório.

O DHA chegou a inibir 36,8 % da produção de IL-10 comparado com a produção do grupo controle LPS, enquanto na concentração de 35  $\mu$ M do composto 1 não produziu IL-10 e o 2 inibiu 80,3 %. Os efeitos vistos pelo tratamento com os lobophorenos na concentração de 35  $\mu$ M indicam um possível efeito imunossupressor enquanto que nas concentração de 3,5  $\mu$ M que inibiu citocinas pró-inflamatórias mas, não inibiu IL-10 os compostos parecem expressar um efeito imunodulador.

O grupo de pesquisa da professora Vera Silvestre em colaboração com cientistas da faculdade de medicina do Reino Unido mostrou os efeitos do consumo de até 2,4 g/dia de DHA por pacientes idosos em uma unidade de terapia intensiva. Nas primeiras 24h notou-se a baixa produção de IL-10 enquanto que em 72h a concentração da citocina quase triplica. Nessa situação os pacientes já sofriam algum nível de inflamação, tendo citocinas pró-inflamatórias circulantes e o DHA estimulou a produção de IL-10 (BARROS et al.,2014).

Em todos os nossos tratamentos os lobophorenos e DHA foram adicionados antes da injuria e resultaram na redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória, sugerindo um mecanismo de proteção celular contra a injúria. Contudo, é necessária a realização de mais ensaios para elucidar melhor o mecanismo de ação usado pelos compostos.

A inibição causada pelos lobophorenos dos mediadores envolvidos na inflamação NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10, podem estar associada a redução da transcrição do NF- $\kappa$ B, um dos principais reguladores da transcrição dos genes envolvidos na produção dos mediadores inflamatórios (GUHA; MACKMAN, 2001). Essa proteína foi inicialmente relacionada a infecções persistentes e crônicas com o aumento do risco de câncer. Essa ligação entre inflamação e câncer através dessa molécula levou a uma melhor compreensão da inflamação provocada pelo tumor e seus efeitos sobre a imunidade anticâncer (KARIN; GRETEN, 2005).

As proteínas NF- $\kappa$ B são reguladores chave de respostas imunes inatas e adaptativas e podem acelerar a proliferação celular, inibir a apoptose, promover a migração e invasão celular e estimular a angiogênese e a metástase (TANIGUCHI; KARIN, 2018). Em nossos experimentos esse fator de transcrição foi detectado através do ensaio imunoblot. Essa técnica detectar proteínas-chave associadas a diversas vias de sinalização celular. Por isso, moléculas que atuem nessa via trazem grande relevância farmacológica (MONISHA et al., 2016).

A subunidade investigada foi p65 por ser a mais investigada quando se trata de ativação clássica do NF- $\kappa$ B em macrófagos por LPS (CHRISTIAN; SMITH; CARMODY, 2016; YANG et al., 2003). Os dados obtidos são preliminares por falta de repetições mas, demonstram a redução da expressão relativa do NF- $\kappa$ B-p65, em relação ao controle positivo (LPS). He e colaboradores (2017) demonstraram que o DHA em 50  $\mu$ M inibiu 50% da resposta inflamatória estimulada por LPS em células mamárias bovinas suprimindo a ativação de NF- $\kappa$ B através de um mecanismo parcialmente dependente da ativação de receptores ativados por proliferador de peroxissoma-PPAR $\gamma$  (do inglês, *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*).

Em células não estimuladas, as subunidades de NF- $\kappa$ B estão restritas ao citoplasma na forma inativa, devido aos efeitos inibitórios da ikB impedindo a fosforilação de NF- $\kappa$ B-p65 (MILANOVIC; KRACHT; SCHMITZ, 2014). Nosso controle de LPS aumentou a expressão desse fator de transcrição, comparado com o controle negativo, como visto na literatura (SAKAI et al., 2017). Porém, esse aumento não foi detectado quando as células foram tratadas com os lobophorenos e DHA por 1 hora antes do estímulo. Assim, podemos sugerir que os lobophorenos agem inibindo a ativação causada pelo LPS via NF- $\kappa$ B em macrófagos, impedindo a transcrição dos genes que participam da resposta inflamatória.

Dang, Lee e colaboradores (2008, 2009) isolaram várias substâncias da alga *Gracilaria verrucosa*, dentre elas dois ácidos graxos que inibiram a produção de mediadores

inflamatórios (NO, TNF- $\alpha$  e IL-6) suprimindo a ativação de NF-kB, na concentração de 100  $\mu$ M em células RAW264.7 estimuladas com LPS. Calder, (2017) traz uma revisão completa com os mecanismos de ação do DHA que lhe permitem inibir várias citocinas inflamatórias e impedir a ativação do NF-kB. Esses efeitos quando combinados através de suplementos nutracêuticos de ômega-3 no tratamento de doenças inflamatórias crônicas melhoram a qualidade de vida dos pacientes.

Em nossos resultados é possível notar a potência dos lobophorenos frente ao DHA, sendo esses compostos uma opção nutracêutica de origem não animal para aliviar os efeitos nocivos da inflamação. A ingestão de alga marinha como fonte de ômega-3 faz parte da culinária tradicional asiática, principalmente japonesa, e é associada a taxa extremamente baixa de doença não transmissíveis, como doenças inflamatórias e danos oxidativos causados por radicais livre (KHATIBZADEH et al., 2016).

O radical livre refere-se ao átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. As espécies reativas de oxigênio são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas no metabolismo celular aeróbio podem causar muitos danos ao organismo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

As substâncias antioxidantes sequestram os radicais livres em excesso que causar danos ao tecido. Estudos envolvendo esses danos na inflamação impulsiona a busca por substâncias com potencial antioxidante e também anti-inflamatório (MELLO FILHO; HOFFMANN; MENEGHINI, 1984). O estresse oxidativo e condições de inflamação crônica estão relacionados a prejuízos neurobiológicos como envelhecimento celular acelerado e neuroprogressão (MILLER et al., 2017).

Todas as concentrações testadas dos lobophorenos foram capazes de inibir significativamente o DPPH. O que sugere que as substâncias testadas conseguem sequestrar o DPPH e reduzir a presença de radicais livres em soluções. Dessa forma podem ser consideradas substâncias com potencial antioxidantes. Esse resultado impulsiona a investigação do potencial anti-inflamatório dessas novas moléculas extraídas da alga *Lobophora variegata*.

O desempenho antioxidante dos lobophorenos foi semelhante ao do DHA e próximo do potencial mostrado pela vitamina E em inibir o DPPH. O potencial de ácidos graxos poli-insaturados como moléculas antioxidantes é muito explorado como recomendação de nutracêuticos para pacientes com doenças progressivas (OLIVERA-PUEYO; PELEGRÍN-VALERO; PUEYO, 2017).

Gerwick e Fenical (1982), encontraram compostos lipídicos em algas do gênero *Lobophora*. Apesar de compostos lipídicos serem moléculas orgânicas essenciais nos seres vivos, a quantidade significativa de ácidos graxos poli-insaturados em *L. variegata* foi apontada, por Ambrozova e colaboradores (2010), como sendo a responsável, em partes, por reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio. Essa investigação foi realizada em células de macrófago murino (RAW264.7) estimuladas com LPS na mesma concentração utilizada em nossos experimentos.

Paiva e colaboradores (2011) encontraram efeito antioxidante em polissacarídeos sulfatados obtidos por extração aquosa da alga parda *Lobophora variegata* em concentrações de até 300µg/ml. Essas fucanas, além de serem capazes de reduzir e remover espécies reativas de oxigênio, como ânions superóxido e radicais hidroxila, também diminuiu o TNF $\alpha$  e o edema da pata de ratos desafiados com zymosan, sugerindo efeito anti-inflamatório na artrite reumatoide.

Os compostos estudados mostraram significativa relevância farmacológica devido a diversidade de aplicações terapêuticas, visto que, foram capazes de produzir efeito citotóxico em células tumorais, atividade moduladora da resposta inflamatória de macrófagos estimulados com LPS e potencial antioxidante. Todos os efeitos investigados abrem perspectivas para busca dos seus alvos moleculares e investigação do possível mecanismo de proteção celular, quando aplicados em combinação com fármacos antineoplásicos para potencializar seu efeito sem aumentar a toxicidade comum a esse tipo de tratamento.

O estudo de substâncias extraídas de algas da costa cearense além de enriquecer o conhecimento da biodiversidade local, ainda expande as possibilidades de utilização dessa alga para fins comerciais e futuro potencial nutracêutico. Contudo, ainda é necessário estudos que reforcem os resultados obtidos, além de ensaios que certificam seus efeitos em modelos in vivo.

O potencial de substâncias bioativas derivadas de algas marinhas para tratar doenças é bastante promissor na indústria nutracêutica, além da utilização em medicamentos fitoterápicos que melhoram os sinais da inflamação e danos oxidativos (COLLINS et al., 2016). O consumo dessas algas marinhas podem proteger as células de muitas doenças inflamatórias, câncer e estresse oxidativo. Os fitoquímicos de algas têm o potencial de serem usados como terapêuticos ou na síntese de análogos estruturais com profunda atividade anti-inflamatória e antioxidante (FERNANDO; NAH; JEON, 2016).

## 6 CONCLUSÃO

Os dados apresentados nesse trabalho permitem concluir que:

- Substâncias isoladas da alga *Lobophora variegata* apresentaram citotoxicidade moderada contra células de adenocarcinoma HCT 116 e não apresentaram citotoxicidade contra macrófagos RAW264.7 *in vitro* nas concentrações testadas;
- Os lobophorenos isolados da alga *L. variegata* foram capazes de diminuir a produção de NO por macrófagos ativados com LPS;
- Ambos os lobophorenos nas concentrações de 3,5 e 35  $\mu\text{M}$  diminuíram a produção de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 em macrófagos ativados com LPS;
- A concentração de 3,5  $\mu\text{M}$  do **1** e **2** não diminui a produção de IL-10 mas, a de 35  $\mu\text{M}$  diminuiu;
- Ambos os lobophorenos, nas concentrações de 3,5 e 35  $\mu\text{M}$ , mostraram tendência para diminuir a expressão do fator de transcrição NF- $\kappa\text{B}$  em macrófagos ativados com LPS;
- Os lobophorenos, na concentração de 35  $\mu\text{M}$ , inibiu DPPH, reduzindo a presença de radicais livres em solução.

A união desses resultados demonstra o potencial imunomodulador dos lobophorenos quanto a utilização dos seus efeitos para uso em várias doenças com um componente inflamatório. Sendo esses compostos extraídos de alga, eles são uma alternativa vegana ao uso de ômega 3 extraído de peixes. Além disso, ainda não há trabalhos relatando o efeito modulador de compostos lipofílicos extraídos da alga parda marinha *Lobophora variegata*.

## 7 BIBLIOGRAFIA

ABBAS, A. K. et al. **Imunologia Celular e Molecular**. [s.l.] Elsevier, 2015.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.

ALLAM-NDOUL, B. et al. A Study of the Differential Effects of Eicosapentaenoic Acid (EPA) and Docosahexaenoic Acid (DHA) on Gene Expression Profiles of Stimulated Thp-1 Macrophages. **Nutrients**, v. 9, n. 5, p. 424, 2017.

AMBROZOVA, G.; PEKAROVA, M.; LOJEK, A. Effect of polyunsaturated fatty acids on the reactive oxygen and nitrogen species production by raw 264.7 macrophages. **European Journal of Nutrition**, v. 49, n. 3, p. 133–139, 2010.

BARROS, K. V. et al. Pharmaconutrition: Acute fatty acid modulation of circulating cytokines in elderly patients in the ICU. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 38, n. 4, p. 467–474, 2014.

BAYER, F. M.; WEINHEIMER, A. J. Prostaglandins from *Plexaura homomalla*: Ecology, Utilization and conservation of a major medical marine resource. **Studies in Tropical Oceanography**, n. 12, p. xii & 165 pp, 1974.

BEDIKIAN, A. Y. et al. Phase 3 study of docosahexaenoic acid-paclitaxel versus dacarbazine in patients with metastatic malignant melanoma. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 4, p. 787–793, 2011.

BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. Contributions to the study of marine products. XXXII. the nucleosides of sponges. I. **Journal of Organic Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 981–987, 1951.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 30, n. 2, p. 237–323, 2013.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 34, p. 235–294, 2017.

BONNARDEL, J.; GUILLIAMS, M. Developmental control of macrophage function. **Current Opinion in Immunology**, v. 50, p. 64–74, 2018.

BORSINI, A. et al. Rescue of IL-1 $\beta$ -induced reduction of human neurogenesis by omega-3 fatty acids and antidepressants. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 65, p. 230–238, out. 2017.

BOULIS, T. S. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids enhance cytokine production and oxidative stress in a mouse model of preterm labor. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 42, n. 6, p. 693–698, 2014.

BRASIL, M. DA S. S. DE C.-T. E I. E. **Medicamentos Biológicos (infiximabe, etanercepte, golimumabe e certolizumabe pegol) para o tratamento da Artrite Reumatóide**. Brasília (DF): [s.n.].

- BRAUN, J. et al. Improvement in patient-reported outcomes for patients with ankylosing spondylitis treated with etanercept 50 mg once-weekly and 25 mg twice-weekly. n. March, 2007.
- CALDER, P. C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. **Biochemical Society Transactions**, n. September, p. BST20160474, 2017.
- CALDER, P. C. P. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. **The Journal of nutrition**, v. 142, n. 3, p. 592S–599S, 2012.
- CANTILLO-CIAU, Z. et al. The tropical brown alga *Lobophora variegata*: A source of antiprotozoal compounds. **Marine Drugs**, v. 8, n. 4, p. 1292–1304, 2010.
- CASTRO, L. S. E. P. W. et al. Fucose-containing sulfated polysaccharides from brown macroalgae *Lobophora variegata* with antioxidant, anti-inflammatory, and antitumoral effects. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 4, p. 1783–1790, ago. 2014.
- CASTRO, L. S. E. P. W. et al. Potential anti-angiogenic, antiproliferative, antioxidant, and anticoagulant activity of anionic polysaccharides, fucans, extracted from brown algae *Lobophora variegata*. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 3, p. 1315–1325, jun. 2015.
- CHANG, H. Y. et al. Docosahexaenoic acid induces M2 macrophage polarization through peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activation. **Life Sciences**, v. 120, p. 39–47, 2015.
- CHOI, E.-Y. et al. DHA suppresses *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide-induced production of proinflammatory mediators in murine macrophages. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 7, p. 1221–1230, 2014.
- CHOI, S. S. et al. Prostaglandin-E2 regulation of tumor necrosis factor receptor release in human monocytic THP-1 cells. **Cellular immunology**, v. 170, n. 2, p. 178–84, 1996.
- CHRISTIAN, F.; SMITH, E.; CARMODY, R. The Regulation of NF- $\kappa$ B Subunits by Phosphorylation. **Cells**, v. 5, n. 1, p. 12, 2016.
- CINTRA, D. E. et al. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. **Journal of Hepatology**, v. 48, n. 4, p. 628–637, 2008.
- COEN, L. D.; TANNER, C. E. Morphological variation and differential susceptibility to herbivory in the tropical brown alga *Lobophora variegata*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 54, p. 287–298, 1989.
- COLLINS, K. G. et al. Looking beyond the terrestrial: The potential of seaweed derived bioactives to treat non-communicable diseases. **Marine Drugs**, v. 14, n. 3, p. 1–31, 2016.
- COSTA-LOTUFO, L. V. et al. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: historico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 703–716, 2009.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

CUNHA, L. D. et al. AIM2 Engages Active but Unprocessed Caspase-1 to Induce Noncanonical Activation of the NLRP3 Inflammasome. **Cell Reports**, v. 20, n. 4, p. 794–805, 2017.

D'ELISEO, D.; VELOTTI, F. Omega-3 Fatty Acids and Cancer Cell Cytotoxicity: Implications for Multi-Targeted Cancer Therapy. **Journal of Clinical Medicine**, v. 5, n. 2, p. 15, 2016.

DANG, H. et al. Anti-inflammatory constituents of the Red Alga *Gracilaria verrucosa* and their synthetic analogues. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 2, p. 232–240, 2008.

DE GAULEJAC, N. S. C.; PROVOST, C.; VIVAS, N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 425–431, 1999.

DE OLIVEIRA, M. R. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and mitochondria, back to the future. **Trends in Food Science and Technology**, v. 67, p. 76–92, 2017.

DELPECH, J.-C. et al. Dietary n-3 PUFAs Deficiency Increases Vulnerability to Inflammation-Induced Spatial Memory Impairment. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 12, p. 2774–2787, 2015.

DINARELLO, C. A. Biologic Basis for Interleukin-1 in Disease. **The Journal of The American Society of Hematology**, v. 87, n. 6, 1996.

DUVALL, M. G.; LEVY, B. D. DHA- and EPA-derived resolvins, protectins, and maresins in airway inflammation. **European Journal Pharmacol.**, v. 785, p. 144–155, 2016.

EL-GABALAWY, H.; GUENTHER, L. C.; BERNSTEIN, C. N. Epidemiology of immune-mediated inflammatory diseases: Incidence, prevalence, natural history, and comorbidities. **Journal of Rheumatology**, v. 37, n. SUPPL. 85, p. 2–10, 2010.

EL HATTAB, M. et al. Apo-fucoanthinoids and loliolide from the brown alga *Cladostephus spongiosus* f. *verticillatus* (Heterokonta, Sphacelariales). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 5–6, p. 447–451, maio 2008.

ERTA, M.; QUINTANA, A.; HIDALGO, J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 9, p. 1254–1266, 2012.

FDA. FDA - Prescribing Information - Lovaza. p. 1–12, 2008.

FENGYANG, L. et al. Stevioside suppressed inflammatory cytokine secretion by downregulation of NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways in LPS-Stimulated RAW264.7 cells. **Inflammation**, v. 35, n. 5, p. 1669–1675, 2012.

FERNANDO, I. P. S.; NAH, J. W.; JEON, Y. J. Potential anti-inflammatory natural products from marine algae. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 48, p. 22–30, 2016.

FONTANA, A. et al. LOX-Induced Lipid Peroxidation Mechanism Responsible for the

Detrimental Effect of Marine Diatoms on Zooplankton Grazers. **ChemBioChem**, v. 8, n. 15, p. 1810–1818, out. 2007.

GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Research and Therapy**, v. 8, n. SUPPL. 2, p. 1–6, 2006.

GERHART, D. J. Prostaglandin A2 in the caribbean gorgonian *Plexaura homomalla*: Evidence against allelopathic and antifouling roles. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, n. 4, p. 417–421, 1986.

GERWICK, W.; FENICAL, W. Phenolic lipids from related marine algae of the order dictyotales. **Phytochemistry**, v. 21, n. 3, p. 633–637, 1982.

GLOBAL POLICY AND INTERNATIONAL PUBLIC AFFAIRS. Chronic Inflammation and Inflammatory Disease. **ValueOfMedicines**, p. 1–5, 2017.

GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate Synthesis in the Germfree and Conventional Rat. **SCIENCE**, v. 212, n. 4490, p. 56–58, 1981.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 2011.

GUERTIN, M.-H. et al. Effects of concentrated long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation before radical prostatectomy on prostate cancer proliferation, inflammation, and quality of life: study protocol for a phase IIb, randomized, double-blind, placebo-contr. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 64, 2018.

GUHA, M.; MACKMAN, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. **Cellular Signalling**, v. 13, n. 2, p. 85–94, 2001.

HABEL, P. et al. Docosahexaenoic acid suppresses arachidonic acid-induced proliferation of LS-174T human colon carcinoma cells. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 9, p. 1079–1084, 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 1–85, 1990.

HAM, Y. M. et al. **Chemical Constituents from *Sargassum micracanthum* and Antioxidant Activity** **International Journal of Pharmacology**, 2010.

HARTLEY, J. W. et al. Expression of infectious murine leukemia viruses by RAW264.7 cells, a potential complication for studies with a widely used mouse macrophage cell line. **Retrovirology**, v. 5, p. 1, 2008.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19–20, p. 894–901, 2008.

HE, X. et al. Docosahexaenoic acid attenuates LPS-stimulated inflammatory response by regulating the PPAR $\gamma$ /NF- $\kappa$ B pathways in primary bovine mammary epithelial cells. **Research in Veterinary Science**, v. 112, p. 7–12, 2017.

HERNÁNDEZ, J. C. et al. The key role of the sea urchin *Diadema aff. antillarum* in controlling macroalgae assemblages throughout the Canary Islands (eastern subtropical Atlantic): An spatio-temporal approach. **Marine Environmental Research**, v. 66, n. 2, p. 259–270, 2008.

HOBBS, A J.; HIGGS, A; MONCADA, S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 39, p. 191–220, 1999.

HOSHINO, K. et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 162, n. 7, p. 3749–52, 1999.

HOUGHTON, P. et al. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 377–387, 2007.

HOWARD, M. et al. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. **The Journal of experimental medicine**, v. 177, n. 4, p. 1205–8, 1993.

HU, G. P. et al. Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. **Marine Drugs**, v. 9, n. 4, p. 514–525, 2011.

INNES, J. K.; CALDER, P. C. Omega-6 fatty acids and inflammation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, mar. 2018.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Colorectal cancer. Estimated incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012.**

IP, W. K. E. et al. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. **Science**, v. 356, n. 6337, p. 513–519, 2017.

JONES, R. J. et al. A phase II open-label study of DHA-paclitaxel (Taxoprexin) by 2-h intravenous infusion in previously untreated patients with locally advanced or metastatic gastric or oesophageal adenocarcinoma. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 61, n. 3, p. 435–441, 2008.

KALLIFATIDIS, G.; HOY, J.; LOKESHWAR, B. L. Bioactive natural products for chemoprevention and treatment of castration-resistant prostate cancer HHS Public Access. **Semin Cancer Biol**, v. 1, n. 706, p. 40–41, 2016.

KANG, Y. et al. Assessment of Subclinical Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in a Rat Model by Speckle-Tracking Imaging. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, p. 132–139, 2017.

KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. P HOSPHORYLATION MEETS UBIQUITINATION: The Control of NF- $\kappa$ B Activity. **Annual Review of Immunology**, p. 621–663, 2000.

KARIN, M.; GRETEN, F. R. NF- $\kappa$ B: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 10, p. 749–759, 2005.

KHATIBZADEH, S. et al. A global database of food and nutrient consumption. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 12, p. 931–934, 2016.

KITAGAKI, K. et al. Intestinal Helminths Protect in a Murine Model of Asthma. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 3, p. 1628–1635, dez. 2006.

KLAFKE K. Determinação do papel das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-8 na proliferação, resistência quimioterápica e invasão celular em glioblastoma humano. 2015.

KNIGHT, D. M. et al. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. **Molecular immunology**, v. 30, n. 16, p. 1443–53, nov. 1993.

KREMB, S. et al. Aqueous extracts of the marine brown alga *Lobophora variegata* inhibit HIV-1 infection at the level of virus entry into cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1–12, 2014.

KUBANEK, J. et al. Seaweed resistance to microbial attack: A targeted chemical defense against marine fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 12, p. 6916–6921, 2003.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins basic pathology**. 10. ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier, 2017.

KUNNUMAKKARA, A. B. et al. Chronic diseases, inflammation, and spices: how are they linked? **Journal of Translational Medicine**, v. 16, n. 1, p. 14, 2018.

LA CLAIR, J. J.; FENICAL, W.; COSTA-LOTUFO, L. V. Elucidating the mode of action of marine natural products through an Immunoaffinity Fluorescent (IAF) approach. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 8, p. 1346–1354, 2016.

LEE, H. J. et al. Two enone fatty acids isolated from *Gracilaria verrucosa* suppress the production of inflammatory mediators by down-regulating NF- $\kappa$ B and STAT1 activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 3, p. 453–462, 2009.

LEE, H. S. et al. Anti-inflammatory effects of dichloromethane fraction from *Orostachys japonicus* in RAW 264.7 cells: Suppression of NF- $\kappa$ B activation and MAPK signaling. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 271–276, 2012.

LEE, Y.-H.; BAE, S.-C.; SONG, G.-G. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and the Treatment of Rheumatoid Arthritis: A Meta-analysis. **Archives of Medical Research**, v. 43, n. 5, p. 356–362, 2012.

LEWIS, G. P. First of a series on inflammation. **Nature**, v. 286, p. 89–90, 1980.

LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, n. 2, p. 117–126, 2000.

LINNAEUS, C. **Species plantarum**. [s.l.] Edinburgh University Press The Tun - Holyrood Road, 12(2f) Jackson's Entry, Edinburgh EH8 8PJ UK, 1753.

LUIKING, Y.; ENGELEN, M.; DEUTZ, N. Regulation of nitric oxide production in health and disease. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 13, n. 1, p. 97–104, 2010.

LUSTER, A. D.; ALON, R.; VON ANDRIAN, U. H. Immune cell migration in inflammation: Present and future therapeutic targets. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p. 1182–1190, 2005.

MALEFYT, R. DE W. et al. Interleukin 10(EL.,10) Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes: An Autoregulatory Role of IL-10 Produced by Monocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. November, 1991.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 212, n. 4, p. 435–445, 2015.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage polarization comes of age. **Immunity**, v. 23, n. 4, p. 344–346, 2005.

MARTIN, P.; MEDEIROS, A. C. DE; GOLDENSTEIN-SCHAINBERG, C. O Papel dos Inibidores do Fator de Necrose Tumoral no Tratamento da Artrite Idiopática Juvenil The Role of Tumor Necrosis Factor Inhibitors in the Treatment of Juvenile Idiopathic Arthritis. n. 11, p. 126–133, 2006.

MASCHEK, J. A.; BAKER, B. J.; AMSLER, C. D. The Chemistry of Algal Secondary Metabolism Algal Chemical Ecology. p. 1–24, 2008.

MEDEIROS, R. et al. Connecting TNF-  $\alpha$  Signaling Pathways to iNOS Expression in a Mouse Model of Alzheimer ' s Disease : Relevance for the Behavioral and Synaptic Deficits Induced by Amyloid  $\beta$  Protein. v. 27, n. 20, p. 5394–5404, 2007.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771–776, 2010.

MELLO FILHO, A. C.; HOFFMANN, M. E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **The Biochemical journal**, v. 218, n. 1, p. 273–5, 1984.

MIHARA, M. et al. Tocilizumab inhibits signal transduction mediated by both mIL-6R and sIL-6R, but not by the receptors of other members of IL-6 cytokine family. **International Immunopharmacology**, v. 5, n. 12, p. 1731–1740, 2005.

MILANOVIC, M.; KRACHT, M.; SCHMITZ, M. L. The cytokine-induced conformational switch of nuclear factor  $\kappa$ B p65 is mediated by p65 phosphorylation. **The Biochemical journal**, v. 457, n. 3, p. 401–13, fev. 2014.

MILLER, M. W. et al. Oxidative Stress, Inflammation, and Neuroprogression in Chronic PTSD. **Harvard Review of Psychiatry**, n. May, p. 1, 2017.

MONISHA, J. et al. NF-KB Blockers Gifted by Mother Nature: Prospectives in Cancer Cell

Chemosensitization. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 27, p. 4173–4200, 2016.

MOORE, K. W. et al. Interleukin -10 and the Interleukin -10 Receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, n. 1, p. 683–765, 2001.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109–122, 2006.

MORI, M. A. et al. Neuroprotective effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the 6-OHDA model of Parkinson's disease is mediated by a reduction of inducible nitric oxide synthase. **Nutritional Neuroscience**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NIAZI, Z. R. et al. EPA:DHA 6:1 prevents angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: Role of NADPH oxidase- and COX-derived oxidative stress. **Hypertension Research**, v. 40, n. 12, p. 966–975, 2017.

NOURSHARGH, S.; ALON, R. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. **Immunity**, v. 41, n. 5, p. 694–707, 2014.

NUGENT, R. et al. Investing in non-communicable disease prevention and management to advance the Sustainable Development Goals. **The Lancet**, v. 6736, n. 18, p. 1–7, 2018.

OHTORI, S. et al. Efficacy of epidural administration of anti-interleukin-6 receptor antibody onto spinal nerve for treatment of sciatica. **European Spine Journal**, v. 21, n. 10, p. 2079–2084, 2012.

OLEFSKY, J. M.; GLASS, C. K. **Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance**. [s.l.: s.n.]. v. 72

OLIVEIRA, L. S. DE. **Mecanismos moleculares determinantes da sensibilidade diferencial de macrófagos de camundongos C57BL/6 e BALB/c a LPS para produção de NO**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

OLIVERA-PUEYO, J.; PELEGRÍN-VALERO, C.; PUEYO, J. O. Dietary supplements for cognitive impairment Introduction: the Mediterranean diet: Myth or reality? **Actas Esp Psiquiatr Actas Esp Psiquiatr Actas Esp Psiquiatr**, v. 454545, p. 37–4737, 2017.

OONO, K. et al. Inhibition of PC3 human prostate cancer cell proliferation, invasion and migration by eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. **Molecular and clinical oncology**, v. 7, n. 2, p. 217–220, 2017.

OSHIMA, M. et al. Suppression of intestinal polyposis in Apc( $\Delta$ 716) knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). **Cell**, v. 87, n. 5, p. 803–809, 1996.

OZANNE, J.; PRESCOTT, A. R.; CLARK, K. The clinically approved drugs dasatinib and bosutinib induce anti-inflammatory macrophages by inhibiting the salt-inducible kinases. **Biochemical Journal**, v. 465, n. 2, p. 271–279, 2015.

PAIVA, A. A. D. O. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Lobophora variegata* on zymosan-induced arthritis in rats. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 9, p. 1241–1250, 2011.

PAN, W. et al. Bioactive Compounds from *Vitex leptobotrys*. **J Nat Prod**, v. 77, n. 3, p. 663–667, 2014.

PARK, B. S. et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1191–1195, 2009.

PERASSO, R. et al. Origin of the algae. **Nature**, v. 339, n. 6220, p. 142–144, 1989.

PINHEIRO, T. DE S. et al. A fucan of a brown seaweed and its antitumoral property on HT-29 and immunomodulatory activity in murine RAW 264.7 macrophage cell line. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 4, p. 2061–2075, ago. 2017.

PLUMMER, M. et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. **The Lancet Global Health**, v. 4, n. 9, p. e609–e616, set. 2016.

POPE, J. E.; DEER, T. R. Ziconotide: a clinical update and pharmacologic review. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 14, n. 7, p. 957–966, maio 2013.

RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C. C. S.; CAVALHEIRO, É. T. G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1114–1120, 2006.

ROCHA, F. D. et al. Potential Cytotoxic Activity of Some Brazilian Seaweeds on Human Melanoma Cells. **Wiley InterScience**, v. 22, n. April 2008, p. 557–559, 2007.

ROSS, R. Inflammation or Atherogenesis. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 2, p. 115–126, 1999.

ROSSOL, M. et al. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. **Critical Reviews in Immunology**, v. 31, n. 5, p. 379–446, 2011.

SAKAI, J. et al. Lipopolysaccharide-induced NF- $\kappa$ B nuclear translocation is primarily dependent on MyD88, but TNF $\alpha$  expression requires TRIF and MyD88. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.

SAQIB, U. et al. Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. **Oncotarget**, v. 9, n. 25, p. 17937–17950, 2018.

SCHULTZ, N. E. et al. A barcode analysis of the genus *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae) in the western Atlantic Ocean with four novel species and the epitypification of *L. variegata* (J.V. Lamouroux) E.C. Oliveira. **European Journal of Phycology**, v. 50, n. 4, p. 481–500, 2015.

SERHAN, C. N. et al. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. **J. Exp. Med.**, v. 192, n. 8, p. 1197–1204, 2000.

SERHAN, C. N. Novel Pro-Resolving Lipid Mediators in Inflammation Are Leads for Resolution Physiology. v. 510, n. 7503, p. 92–101, 2014.

SERINI, S. et al. Epigenetic regulation of gene expression and M2 macrophage polarization as new potential omega-3 polyunsaturated fatty acid targets in colon inflammation and cancer. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 20, n. 7, p. 843–858, 2016.

SETE, M.; FIGUEREDO, C. M. Periodontite e ômega 3: o papel dos ácidos graxos no processo inflamatório. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 12, n. 1, 2013.

SHASTRI, A.; BONIFATI, D. M.; KISHORE, U. Innate immunity and neuroinflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, 2013.

SHENG, J.; RUEDL, C.; KARJALAINEN, K. Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. **Immunity**, v. 43, n. 2, p. 382–393, 2015.

SHI, Z. et al. A novel toll-like receptor that recognizes vesicular stomatitis virus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 6, p. 4517–4524, 2011.

SI, T.-L. et al. Enhanced anti-inflammatory effects of DHA and quercetin in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 macrophages by inhibiting NF-κB and MAPK activation. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 1, p. 499–508, 2016.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Mphage\_M1-M2\_rev\_JCI2012. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 3, p. 787–795, 2012.

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BOKESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anti- cancer-drug screening. **Journal of National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107, 1990.

SO, A. et al. A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout. **Arthritis Research and Therapy**, v. 9, n. 2, p. 1–6, 2007.

SORGI, P. J. et al. Effects of an open-label pilot study with high-dose EPA/DHA concentrates on plasma phospholipids and behavior in children with attention deficit hyperactivity disorder. **Nutrition Journal**, v. 6, p. 1–8, 2007.

SOUSA, K. C. DE. **ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA, ANTIBIOFILME E CITOTÓXICA DE EXTRATOS DA MACROALGA MARINHA PARDA *Lobophora variegata* (J. V. LAMOUREUX)**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ CENTRO, 2017.

STONIK, V. A.; FEDOROV, S. N. Marine low molecular weight natural products as potential

cancer preventive compounds. **Marine Drugs**, v. 12, n. 2, p. 636–671, 2014.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, 2010.

TAN, A. et al. Supplementation with eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid reduces high levels of circulating proinflammatory cytokines in aging adults: a randomized, controlled study. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, p. 30, 2018.

TANIGUCHI, K.; KARIN, M. NF- $\kappa$ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. **Nature Reviews Immunology**, 2018.

TAPILATU, Y. H. Status of drug discovery research based on marine organisms from Eastern Indonesia. **Procedia Chem**, v. 14, p. 484–492, 2015.

TEBALA, G. D. et al. Emergency treatment of complicated colorectal cancer. **Cancer Management and Research**, v. Volume 10, p. 827–838, abr. 2018.

TEPLINSKY, E.; HERZOG, T. J. The efficacy of trabectedin in treating ovarian cancer. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 18, n. 3, p. 313–323, 2017.

THENNARASAN, S.; MURUGESAN. Biochemical composition of marine brown alga *Lobophora variegata* from Mandapam in the South East Coast of Tamil Nadu. **Ijpp**, v. 5, n. 3, p. 25–29, 2015.

TIAN, Y. et al. Docosapentaenoic Acid (22:5n-3) Downregulates mRNA Expression of Pro-inflammatory Factors in LPS-activated Murine Macrophage Like RAW264.7 Cells. **Journal of Oleo Science J. Oleo Sci**, v. 66, n. 10, p. 1149–1156, 2017.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350–4, 1979.

TSUKIDA, K.; SAIKI, K.; SUGIURA, M. Structural elucidation of the main cis beta-carotenes. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 27, n. 6, p. 551–61, 1981.

URATA, K.; TAKAISHI, N. The alkyl glycidyl ether as synthetic building blocks. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 9, p. 1027–1033, 1994.

VAKRAKOU, A. G. et al. Impaired anti-inflammatory activity of PPAR $\gamma$  in the salivary epithelia of Sjögren's syndrome patients imposed by intrinsic NF- $\kappa$ B activation. **Journal of Autoimmunity**, v. 86, p. 62–74, 2018.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.

VIEIRA, C. et al. Biological activities associated to the chemodiversity of the brown algae belonging to genus *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae). **Phytochemistry Reviews**, v. 16, n. 1, p. 1–17, 2015.

- VIEIRA, C. et al. Allelopathic interactions between the brown algal genus *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae) and scleractinian corals. **Scientific Reports**, v. 6, n. November 2015, p. 1–11, 2016.
- WALL, R. et al. Fatty acids from fish: The anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. **Nutrition Reviews**, v. 68, n. 5, p. 280–289, 2010.
- WEINBLATT, M. E. et al. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: The ARMADA trial. **Arthritis and Rheumatism**, v. 48, n. 1, p. 35–45, 2003.
- WERNER, K. et al. Dietary supplementation with n-3-fatty acids in patients with pancreatic cancer and cachexia: marine phospholipids versus fish oil - a randomized controlled double-blind trial. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2017.
- WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2014. **World Health**, p. 176, 2014.
- WILLIAMS-BEY, Y. et al. Omega-3 free fatty acids suppress macrophage inflammasome activation by inhibiting NF- $\kappa$ B activation and enhancing autophagy. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–8, 2014.
- WOMERSLEY, H. B. S. **The Marine Benthic Flora of Southern Australia. Part III.** [s.l.: s.n.].
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **U.S. Cancer Mortality Trends.**
- YANG, F. et al. IKK Plays an Essential Role in the Phosphorylation of RelA/p65 on Serine 536 Induced by Lipopolysaccharide. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 11, p. 5630–5635, 2003.
- ZHANG, Q.-W.; LIN, L.-G.; YE, W.-C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. **Chinese Medicine**, v. 13, n. 1, p. 20, 2018.