



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LIDIANA RABELO DA SILVA

**TRIAGEM DE MICROALGAS VERDES, COLETADAS EM ONTÁRIO-CANADÁ,
COM POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO SOBRE
MACRÓFAGOS MURINOS J744A.1**

FORTALEZA

2023

LIDIANA RABELO DA SILVA

TRIAGEM DE MICROALGAS VERDES, COLETADAS EM ONTÁRIO-CANADÁ, COM
POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO SOBRE MACRÓFAGOS MURINOS J744A.1

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Coordenação do curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas da Universidade Federal
do Ceará, como requisito à obtenção do título
de Bacharelado em Ciências Biológicas. Área
de concentração: Biomedicina.

Orientador(a): Profa. Dra. Flávia Almeida
Santos

FORTALEZA
2023

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

- S581t Silva, Lidiana Rabelo da.
Triagem de microalgas verdes, coletadas em Ontário-Canadá, com potencial anti-inflamatório sobre macrófagos Murinos J744A.1 / Lidiana Rabelo da Silva. – 2023.
42 f. : il.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Flávia Almeida Santos .
1. Chlamydomonas sp.. 2. Coccomyxa sp.. 3. Senedmus sp.. 4. Lipopolissacarideo. 5. Inflamação. I.
Título.

CDD 570

LIDIANA RABELO DA SILVA

TRIAGEM DE MICROALGAS VERDES, COLETADAS EM ONTÁRIO-CANADÁ, COM
POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO SOBRE MACRÓFAGOS MURINOS J744A.1

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Coordenação do curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas da Universidade Federal
do Ceará, como requisito à obtenção do título
de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Data da aprovação: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Flávia Almeida Santos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Erika Freitas Mota
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Geanne Matos de Andrade
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico este trabalho aos meus pais, Edilson Firmino e Jucineida Rabelo, meu presente de Deus e minha base, pelo incentivo e amor em toda minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, por todas as bênçãos e conquistas que me foram concedidas até aqui e as que virão.

Aos meus pais, Jucineida Rabelo da Silva e Edilson Firmino da Silva, que sempre foram minha força e lar, por acreditarem em mim e estarem presentes em todos os momentos me encorajando e segurando minha mão, vocês são minha base.

Aos meus irmãos, Davison Rabelo da Silva e Dávila Rabelo da Silva, assim como minha sobrinha Cintia Helena Lima Rabelo, por todo amor, ajuda e companheirismo em todos as situações.

Ao meu querido esposo, Asafe Pereira da Silva, por estar ao meu lado, me dando forças e me acalmando quando preciso, por toda paciência, dedicação e amor, amo você.

À minha orientadora, Flávia Almeida Santos, por toda confiança, orientação, disponibilidade, acolhimento, palavras de amparo e por me mostrar como as mulheres fazem ciência.

A Profa. Erika Freitas Mota e Profa. Geanne Matos de Andrade por aceitar compor a banda, agregando conhecimento e participando da minha formação. Gostaria ainda de agradecer a Profa. Erika Mota, por sua tutoria, amizade e zelo com todos nós petianos, você fez nossa caminha ser mais leve e bonita, além de nos inspirar a sermos profissionais de excelência.

Aos meus colegas de bancada, Antonia Giovanna Gonçalves Ferreira, Benaya Sandres Carneiro, Francisca Tuelly Bandeira de Oliveira, Gabriel da Silva Procopio, João Guilherme Pereira Silva, Paulo Iury Gomes Nunes, Ramilly Rodrigues Cavalcante, Renan Pereira de Lima, pelo auxílio e companheirismo na pesquisa, sem vocês esse trabalho não seria possível.

Ao professor John Ashley Scott, por ter cedido as amostras, e colaborado com minha formação.

Ao grupo PET Biologia UFC, pelas amizades e mais belas experiências que foram tão importantes na minha formação profissional e pessoal. Minha casa dentro Universidade.

Aos amigos que fiz ao longo dessa caminhada e aos amigos que continuaram ao meu lado mesmo nos meus momentos mais conturbados. Pelo apoio e por acreditarem em mim mesmo quando nem eu não acreditava, muito obrigada pelo apoio.

A Universidade Federal do Ceará e a Coordenação do curso de Ciências Biológicas pela oportunidade de concluir este curso tão belo.

Obrigada a todos!

“Construí amigos, enfrentei derrotas, venci obstáculos, bati na porta da vida e disse-lhe: não tenho medo de vivê-la.”

Augusto Cury

RESUMO

A inflamação é uma resposta fisiológica protetora desencadeada por estímulos nocivos, caracterizada principalmente pela produção de mediadores pró e anti-inflamatórios. A inflamação ativada de forma excessiva, ou persistente, pode levar a danos teciduais podendo causar doenças inflamatórias crônicas. Dito isto, controlar a inflamação é vital para a prevenção e tratamento das doenças inflamatórias. O lipopolissacarídeo (LPS) estimula os macrófagos, através de receptores TLR4, ativando vias de sinalização inflamatória incluindo MAPK, NF- κ B e a produção de óxido nítrico, levando à ativação gênica e à produção de mediadores pró-inflamatórios e citocinas. Dessa forma, trata-se de um modelo bem estabelecido para seleção de compostos anti-inflamatórios. As algas despertam um interesse crescente na área farmacêutica devido ao fato de possuírem uma grande diversidade de compostos bioativos com potencial biológico. Nesse contexto, foi avaliado o efeito dos extratos aquosos, etanólicos e metanólicos de microalgas verdes (*Chlamydomonas sp.*, *Coccomyxa sp.*, *Scenedesmus sp.*), coletadas em Ontário-Canadá, em um total de 15 amostras, sobre a viabilidade celular, assim o seu potencial anti-inflamatório sobre a produção de nitrito em células J744A.1 estimuladas por LPS. A viabilidade celular foi avaliada para todos os extratos, nas concentrações de 25 e 50 μ g/mL, pelo método do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Os extratos que não mostraram citotoxicidade foram avaliados quanto a capacidade de redução da produção de nitrito em células J744A.1 estimuladas por LPS, usando para isso a técnica de Griess. Todos os extratos aquosos, e o extrato metanólico de *Coccomyxa sp.* apresentaram redução da viabilidade celular após exposição por 24h. Os extratos etanólicos de *Chlamydomonas sp.* (amostra LL2A), *Scenedesmus sp.* (amostras CC, LLI e P918), reduziram os níveis de nitrito em sobrenadante de células J744A.1 estimuladas por LPS. Os extratos etanólicos de *Scenedesmus sp.* (CC) e de *Chlamydomonas sp.* (amostra LL2A) demonstram potencial ação anti-inflamatória, em concentrações sem citotoxicidade, contudo mais estudos são necessários para uma maior compreensão desse efeito.

Palavras-Chave: *Chlamydomonas sp.*; *Coccomyxa sp.*; *Scenedesmus sp.*; lipopolissacarídeo; inflamação

ABSTRACT

Inflammation is a protective physiological response triggered by harmful stimuli, characterized mainly by the production of pro- and anti-inflammatory mediators. Excessively or persistently activated inflammation can lead to tissue damage and can cause chronic inflammatory diseases. That said, controlling inflammation is vital for the prevention and treatment of inflammatory diseases. Lipopolysaccharide (LPS) stimulates macrophages via TLR4 receptors, activating inflammatory signaling pathways including MAPK, NF- κ B and nitric oxide production, leading to gene activation and the production of pro-inflammatory mediators and cytokines. Thus, it is a well-established model for the selection of anti-inflammatory compounds. Algae are attracting increasing interest in the pharmaceutical field because they contain a wide range of bioactive compounds with biological potential. In this context, we evaluated the effect of aqueous, ethanolic and methanolic extracts of green microalgae (*Chlamydomonas sp.*, *Coccomyxa sp.*, *Scenedesmus sp.*), collected in Ontario-Canada, in a total of 15 samples, on cell viability, as well as their anti-inflammatory potential on nitrite production in J744A.1 cells stimulated by LPS. Cell viability was assessed for all the extracts, at concentrations of 25 and 50 μ g/mL, using the MTT method (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide). The extracts that showed no cytotoxicity were evaluated for their ability to reduce nitrite production in J744A.1 cells stimulated by LPS, using the Griess technique. All the aqueous extracts and the methanolic extract of *Coccomyxa sp.* showed a reduction in cell viability after exposure for 24 hours. The ethanolic extracts of *Chlamydomonas sp.* (sample LL2A), *Scenedesmus sp.* (samples CC, LLI and P918), reduced nitrite levels in the supernatant of J744A.1 cells stimulated by LPS. The ethanolic extracts of *Scenedesmus sp.* (CC) and *Chlamydomonas sp.* (sample LL2A) show potential anti-inflammatory action, at concentrations without cytotoxicity, but more studies are needed to better understand this effect.

Keywords: *Chlamydomonas sp.*; *Coccomyxa sp.*; *Senedesmus sp.*; lipopolysaccharide; inflammation.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efeito dos extratos da microalga <i>Coccomyxa sp.</i> (amostra S5) sobre a viabilidade celular de células J744A.1.....	27
Gráfico 2. Efeito dos extratos da microalga <i>Chlamydomonas sp.</i> (amostra LL2A) sobre a viabilidade celular de células J744A.1.....	28
Gráfico 3. Efeito do extrato da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> (amostra CC) sobre a viabilidade celular de células J744A.1.....	29
Gráfico 4. Efeito do extrato da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> (amostra LLI) sobre a viabilidade celular de células J744A.1.....	30
Gráfico 5. Efeito dos extratos da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> (amostra P918) sobre a viabilidade celular de células J744A.1.....	31
Gráfico 6. Efeito do Extrato Etanólico de <i>Chlamydomonas sp.</i> (amostra LL2A) sobre os níveis de Nitrito em Células J744A.1 estimuladas com LPS.....	32
Gráfico 7. Efeito do Extrato Etanólico de <i>Scenedesmus sp.</i> (amostra CC) sobre os níveis de Nitrito em Células J744A.1 estimuladas com LPS.....	33
Gráfico 8. Efeito do Extrato Etanólico de <i>Scenedesmus sp.</i> (amostra LLI) sobre os níveis de Nitrito em Células J744A.1 estimuladas com LPS.....	34
Gráfico 9. Efeito do Extrato Etanólico de <i>Scenedesmus sp.</i> (amostra P918) sobre os níveis de Nitrito em Células J744A.1 estimuladas com LPS.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µM	Micromolar
µmol	Micromol
ANOVA	Análise de variância
ATCC	American Type Culture Collection
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
CC	<i>Scenedesmus sp.</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
Dexa	Dexametasona
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
E.P.M.	Erro padrão da média
FBS	Soro fetal bovino
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
h	Hora
IFN-γ	Inferferon-gama
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-23	Interleucina 23
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
LLI	<i>Scenedesmus sp.</i>
LL2A	<i>Chlamydomonas sp.</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro

mm	Milímetro
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
O ₂	Oxigênio
ON	Ontário
P.A.	Para análise
PAMP	Padrão molecular associado a patógenos
P918	<i>Scenedesmus sp.</i>
PBS	Tampão Fosfato Salina
S5	<i>Coccomyxa sp.</i>
TGF-β	Fator de crescimento transformante beta
TLR4	Toll-like 4
TNF- α	fator de necrose tumoral- α
UFC	Universidade Federal do Ceará

LISTA DE SIMBOLOS

%	Percentual ou Porcentagem
±	Mais ou menos
<	Menor que
°C	Graus celsius
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
1.1.	Inflamação.....	16
1.1.1.	<i>Participação dos macrófagos no processo inflamatório.....</i>	17
1.2.	Algas.....	19
1.3.	Algas com ação anti-inflamatória.....	20
2.	JUSTIFICATIVA.....	21
3.	OBJETIVOS.....	22
3.1.	Objetivo Geral.....	22
3.2.	Objetivos Específicos.....	22
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1.	Materiais.....	23
4.1.1.	<i>Reagentes.....</i>	23
4.1.2.	<i>Coleta das Microalgas Verdes.....</i>	23
4.2.	Métodos.....	24
4.2.1.	<i>Obtenção dos extratos das microalgas.....</i>	24
4.2.2.	<i>Cultura de Células J744A.1.....</i>	24
4.2.3.	<i>Avaliação da Viabilidade Celular.....</i>	25
4.2.4.	<i>Avaliação da Atividade Anti-inflamatória.....</i>	25
4.2.4.1.	<i>Indução de Inflamação pelo Lipopolissacarideo (LPS) em Células J774A.1.....</i>	25
4.2.4.2.	<i>Dosagem de Nitrito em Células J774A.1 estimuladas pelo LPS.....</i>	26
4.3.	Análise Estatística.....	26
5.	RESULTADOS.....	26
5.1.	Efeito dos Extratos da Microalgas sobre a Viabilidade de Células J744A.1..	26
5.1.1.	<i>Efeito dos extratos da microalga <u>Coccomyxa sp</u> (amostra S5) sobre a viabilidade celular.....</i>	26
5.1.2.	<i>Efeito dos extratos da microalga <u>Chlamydomonas sp.</u> (amostra LL2A) sobre a viabilidade celular.....</i>	27
5.1.3.	<i>Efeito dos extratos da microalga <u>Scenedesmus sp.</u> (amostra CC, LLI, P918) sobre a viabilidade celular.....</i>	28
5.2.	Atividade Anti-inflamatória dos Extratos de Algas em Células J744A.1.....	31

5.2.1.	<i>Efeito do Extrato Etanólico de <u>Chlamydomonas sp.</u>(amostra LL2A) sobre os níveis de Nitrito em células J744A.1 na ausência e após o estímulo por LPS.....</i>	31
5.2.2	<i>Efeito do Extrato Etanólico de <u>Scenedesmus sp.</u> (amostra CC, LLI, P918) sobre os níveis de Nitrito em células J744A.1 na ausência e após o estímulo por LPS..</i>	32
6.	DISCUSSÃO.....	35
7.	CONCLUSÃO.....	38
8.	REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação

A inflamação, do latim, *inflammatio*, que significa atear fogo e refere-se ao processo inflamatório como uma resposta do organismo a uma agressão sofrida, sendo este, o principal componente dos mecanismos de defesa do organismo. Nesse contexto, classifica-se como agressão qualquer processo capaz de causar lesão celular ou tecidual. Essa resposta-padrão é comum a vários tipos de tecidos e pode ser mediada por diversas substâncias produzidas pelas células danificadas, bem como as células do sistema imune que se encontram eventualmente nas proximidades da lesão (BARARDI; CAROBREZ; PINTO, 2010).

A sobrevivência dos organismos requer a eliminação de invasores estranhos, como agentes infecciosos e tecidos lesados. A inflamação realiza sua função protetora mitigando, destruindo ou neutralizando os agentes nocivos. Ela estimula os eventos que reparam e curam os sítios de lesão. No contexto das infecções, a inflamação é parte de uma resposta protetora mais ampla, chamada de imunidade inata (ROBBINS *et al.*, 2013). O processo inflamatório envolve a ativação de macrófagos e neutrófilos, que produzem mediadores, como óxido nítrico (NO), prostaglandina E2, citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (APOSTOLOVA *et al.*, 2020).

As células do sistema imune interagem entre si durante os estágios de iniciação e efetor das respostas imunes. Muitas dessas interações são mediadas por citocinas que formam um extenso grupo de proteínas secretadas com diferentes estruturas e funções, que são responsáveis por regular e coordenar muitas atividades das células da imunidade inata e adaptativa (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019). Desta forma, as principais citocinas com ação na imunidade inata e inflamação, são o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina 1 (IL-1), um grupo de substâncias quimiotáticas chamadas de quimiocinas. Há também as interleucinas IL-12, IFN- γ , IL-6, IL-23 e outras citocinas que participam da resposta imunológica inata inicial, sendo consideradas marcadores de inflamação (ROBBINS *et al.*, 2013).

Adicionalmente, se a integridade e a homeostase dos tecidos forem restauradas, a inflamação desaparece durante o reparo. No entanto, se a resposta a inflamação excessiva não for adequadamente resolvida pode comprometer progressivamente a estrutura saudável dos tecidos, prejudicando sua função, podendo causar doenças inflamatórias crônicas. Portanto, controlar a inflamação é vital para a prevenção e tratamento das doenças inflamatórias. Isso

ocasiona um aumento na demanda por substâncias seguras administradas por via oral com propriedades anti-inflamatórias (OISHI; MANABE, 2018; APOSTOLOVA *et al.*, 2020; FACCHIN *et al.*, 2022).

1.1.1 Participação dos macrófagos no processo inflamatório

Os macrófagos estão presente em todos os tecidos e compartimentos do corpo sob condições fisiológicas homeostáticas. Sua função primordial é a fagocitose, no qual compõem a primeira linha de defesa contra infecções (LOCATI; CURTAL; MANTOVANI, 2020). Possuem mecanismos para reconhecer e reagir a patógenos, tornando-se importantes para imunidade inata, e participam da cooperação com os linfócitos para desenvolver respostas imunes adaptativas (PARHAM, 2001).

Além de agirem na defesa do hospedeiro, desempenham papéis fundamentais em quase todos os aspectos da biologia do organismo, desde o desenvolvimento, a homeostase, o reparo e as respostas imunológicas (WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013). A presença de infecção é percebida pelos macrófagos residentes, que são responsáveis por secretar moléculas, citocinas e outros mediadores, que induzem e regulam a resposta inflamatória (ROBBINS *et al.*, 2013). Essas células possuem receptores de padrão molecular associado a patógenos (PAMP), como por exemplo, o receptor Toll-like 4 (TLR4) capaz de reconhecer antígenos extracelulares, como lipopolissacarídeos bacterianos, e a partir disso desencadear diferentes vias de sinalizações envolvidas na resposta inflamatória, incluindo citocinas pró-inflamatórias, radicais superóxido e óxido nítrico (SOMENSI, 2019).

Os macrófagos são heterogêneos e seu fenótipo e funções são regulados pelo microambiente circundante, existindo em dois subconjuntos distintos, os macrófagos classicamente ativados (M1; inflamatórios) e os alternativamente ativados (M2; cicatrizantes). Os macrófagos M1 e M2 indicam seu estado e, dependendo de sua localização e ambiente, o M1 pode mudar para M2 e vice-versa (SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018; KADOMOTO; IZUMI; MIZOKAMI, 2021).

Desta forma, os macrófagos M1 são pró-inflamatórios e polarizados por lipopolissacarídeo (LPS), isoladamente ou em associação com citocinas Th1, como IFN- γ , GM-CSF, e produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 e TNF- α . Os macrófagos são capazes de matar organismos infecciosos e fagocitar células mortas (SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018). Enquanto, os M2 são anti-inflamatórios e imunorreguladores e são polarizados por citocinas Th2, como IL-4 e IL-13, e produzem

citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β . Os macrófagos M2 estão envolvidos na supressão da inflamação, contribuindo para o reparo tecidual, remodelação, vasculogênese e manutenção da homeostase. (KADOMOTO; IZUMI; MIZOKAMI, 2021).

Assim, quando estas células encontram um tecido infectado por patógenos ou danificado, eles podem iniciar duas respostas diferentes: destruir o tecido infectado (resposta inflamatória, M1) ou reparar o tecido danificado (resposta regenerativa, M2). Consequentemente, os fenótipos M1/M2 possuem diferentes programações metabólicas capazes de influenciar a resposta imune de maneiras oposta (SHAPOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2018).

Desta maneira, diversas diferenças metabólicas são encontradas entre macrófagos M1/M2 e as mais estudadas são aquelas relacionadas ao metabolismo da arginina. O fenótipo M2, ao contrário dos M1, exibe um aumento na via da arginina produzindo ornitina, um precursor da prolina que aumenta a síntese de colágeno e estimula a proliferação celular, necessária para a função reparadora dos M2, e simultaneamente inibe a atividade da óxido nítrico-sintase induzida (iNOS). Por outro lado, os fenótipos M1 são capazes de produzir níveis elevados de óxido nítrico (NO), a partir da iNOS (FUNES *et al.*, 2018). O NO, dessa forma, pode induzir reações tóxicas contra os tecidos do hospedeiro e, uma vez que é gerado em níveis elevados em certos tipos de inflamação, pode agir como um agente pró-inflamatório (COLEMAN, 2001).

O Óxido Nítrico (NO) é um vasodilatador, que apresenta citotoxicidade mediada por macrófagos e modulam reações inflamatórias e anti-inflamatórias, dependendo do estímulo e do tipo celular (ADAMS, 1996). O óxido nítrico pode ser um redutor ou um oxidante a depender do meio em que ele está e é rapidamente destruído pelo oxigênio, como resultado da sua oxidação, produz nitrito e nitrato (KIECHELE, 1993).

À vista disso, durante a inflamação aguda e consecutivos processos de cicatrização desencadeados por agressões, os macrófagos são essenciais para uma reparação eficiente e recuperação da homeostase. No entanto, sob condições de estresses contínuos resultantes por exemplo, distúrbios genéticos ou desregulação metabólica sistêmica, as suas funções contribuem para o desenvolvimento patológico de fibrose, aterosclerose, cancro e outras doenças crônicas (OISHI; MANABE, 2018).

1.2 Algas

As algas são organismos protistas fotossintetizantes (RAVEN, 2014). Assim, apresentam uma vasta distribuição geográfica, podendo ser encontradas em quase todas as condições ambientais do mundo (GRAHAM; GRANHAM; WILCOX, 2009). São classificadas em três grupos, as algas vermelhas (Rhodophyceae), pardas (Phaeophyceae) e algas verdes (Chlorophyceae). Cada grupo possui propriedades biológicas únicas com um amplo espectro de aplicações (PALANIYAPPAN *et al.* 2023) São produtores primários e atuam na base da cadeia trófica, desempenhando importante papel para o funcionamento e equilíbrio ecológico (VALENTIN, 2010). Podemos citar as algas como fontes ricas em metabólitos bioativos estruturalmente diversos. Estudos sobre sua importância, como novas fontes de compostos bioativos, está crescendo rapidamente, e pesquisas têm revelado que compostos originados de algas apresentam inúmeras atividades biológicas (WIJESEKARA; YOON; KIM, 2010).

Desta forma, produtos naturais derivados de diferentes espécies de algas, como alcaloides, flavonoides, terpenoides, esteroides e fenóis, têm recebido maior atenção devido às suas diversas propriedades farmacológicas, dentre essas, ações antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética, atividade citotóxica, antitumoral e antimicrobiana (ABO-SHADY, 2023).

Ante o exposto, a triagem de extratos de microalgas é um método comumente utilizado para determinar a atividade biológica desses componentes. Estas têm sido retratadas como fontes ricas de diversos compostos bioativos e de interesse comercial (VOLK; FURKERT, 2006).

O estresse oxidativo causado pela acidez, metais, radiação ultravioleta e limitações de nutrientes pode induzir a produção de antioxidantes em muitas espécies de microalgas verdes fotossintéticas, além disso, sua composição bioquímica ajusta-se às mudanças no ambiente permitindo que esses organismos sirvam de modelos para inúmeros testes, visto sua versatilidade e resistência (GAUTHIER; SENHORINHO; SCOTT, 2020).

A microalga *Scenedesmus*, pertencente à ordem Chlorococcales da família Scenedesmaceae, é frequentemente dominante em lagos e rios de água doce (GUIRY; GUIRY, 2014). Muitas espécies desse gênero estão sendo usadas em todo o mundo para várias finalidades devido à sua capacidade de se adaptar a condições ambientais adversas, à capacidade de crescer rapidamente e à sua capacidade de se desenvolver em condições de alta temperatura.

1.3 Algas com ação anti-inflamatória

Microalgas produzem altos níveis de metabólitos primários, incluindo proteínas, carboidratos e lipídios. Além de possuírem metabólitos secundários como ácidos graxos ômega-3 e carotenóides. Esses bioativos, em especial os carotenóides, possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenos (LAAMANEN *et al.*, 2021)

Ademais, propriedades anti-inflamatórias foram encontradas anteriormente em outras microalgas, como *Dunaliella Bardawil*, em diatomáceas *Porosira glacialis*, *Atheya longicornis* e no dinoflagelado *Phaeodactylum tricornutu*. O extrato da microalga *Scenedesmus bajacalifornicus* também apresentou atividades inibitórias contra bactérias patógenas (PATIL; KALIWAL, 2019). Estudo mostrou que a ficocianina, uma proteína auxiliar fotossintética, componente ativo da alga verde, *Microcystis aeruginosa*, demonstraram atividades anti-inflamatórias (LI *et al.*, 2016). Assim como, produtos do metabolismo secundário, chamados de micosporina, de *Chlamydomonas sp.* possuem atividade biológica e antioxidante. Atuando como compostos absorventes de UV, modulando a expressão de genes associados ao estresse oxidativo, a inflamação e ao envelhecimento da pele causado pelos raios UV (SUH *et al.* 2014).

Em complemento, a microalgas *Chlamydomonas sp.*, *Coccomyxa sp.*, *Scenedesmus sp.* presentes em corpos d'água impactados pela mineração, apresentaram atividade biológica, como por exemplo antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. As microalgas *Coccomyxa onubensis* possuem ação contra: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus* (LITTLE, *et al* 2021).

O presente estudo investigou o potencial anti-inflamatório de extratos algais em macrófagos J744A.1. sobre a viabilidade celular e produção de nitrito como resposta inflamatória induzida por LPS.

2. JUSTIFICATIVA

A inflamação estimulada de forma excessiva, ou persistente, pode causar inúmeras doenças autoimunes incluindo artrite reumatoide, psoríase, esclerose múltipla, lúpus eritematoso e doença inflamatória intestinal. Outrossim, a inflamação aguda dando origem a um processo crônico é um colaborador para doenças como câncer, arteriosclerose, diabetes, asma e doenças neurodegenerativas (CALDER 2009). Nesse contexto, há uma busca contínua por novos anti-inflamatórios, onde anualmente centenas de compostos são avaliados experimentalmente.

A escolha dessas células de linhagem macrófágica para os ensaios foi baseada na premissa que tais células possuem uma importante função do sistema imune, participando da resposta inata, através da fagocitose de microrganismos e partículas estranhas ao hospedeiro, e condicionamento da resposta adaptativa pela sua função de apresentação de antígenos (NEVES, 2015). Essas células, além de desempenhar um papel importantíssimo na iniciação, desenvolvimento e resolução da inflamação, são fundamentais na remoção de células danificadas e patógenos por fagocitose e na ativação de células do sistema imunológico (YANG et al., 2014).

Macrófagos murinos ativados por LPS são amplamente utilizados como um modelo celular essencial para rastrear potenciais compostos anti-inflamatórios e seu mecanismo de ação subjacente *in vitro* (FANG et al., 2021). Nesse contexto, o ensaio com macrófagos *in vitro* é um modelo padronizado para identificar extratos/compostos com potencial ação anti-inflamatória (FACCHIN et al., 2022).

Em revisão realizada por Sathasivam et al. 2019, as microalgas são apresentadas como uma rica fonte de metabólitos que promovem a saúde e suprimem doenças, apresenta diversas atividades biológicas desses organismos, dentre elas, fonte potencial de compostos antibacterianos que podem atuar contra patógenos humanos, além de possuírem propriedades de proteção UV, antioxidantes, anti-inflamatórias, imunossupressoras, anticâncer, antiobesidade, prevenção de cardiopatias, dentre outras. Dessa forma, estudar os extratos desses indivíduos é de suma importância para que novos insumos sejam descobertos para o desenvolvimento farmacêutico e científico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial efeito anti-inflamatório de extratos de microalgas verdes *Coccomyxa sp.*, *Scenedesmus sp.* e *Chlamydomonas sp.* coletadas em Ontário-Canadá em macrófagos J744A.1.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os extratos aquoso, etanólico e metanólico das microalgas verdes *Coccomyxa sp.*, *Scenedesmus sp.* e *Chlamydomonas sp.* sobre a viabilidade celular de macrófagos J744A.1.
- Avaliar os extratos aquoso, etanólico e metanólico de microalgas *Coccomyxa sp.*, *Scenedesmus sp.* e *Chlamydomonas sp.* sobre a produção de nitrito em macrófagos J744A.1 estimulados com lipopolissacarídeo (LPS).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes

Substância	Fabricante
Ácido Fosfórico	Dinâmica, Brasil
Dexametasona	Sigma, Aldrich, EUA
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Dinâmica, Brasil
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	Gibco by Life Technologies, EUA
Lipopolissacarídeo	Sigma, Aldrich, EUA
Naftil)-etilenodiamina	Sigma, Aldrich, EUA
Nitrito de Sódio (NaNO ₂)	Vetec Química, Brasil
Soro bovino fetal	Gibco, EUA
Sulfanilamida	Sigma, Aldrich, EUA
Penicilina/estreptomicina	Gibco, EUA
3-(4,5-dimetil-tiazol-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT)	Sigma, Aldrich, EUA

4.1.2 Coleta das *Microalgas Verdes*

Todas as microalgas foram coletas na cidade de Sudbury, em Ontário, Canadá. A microalga *Scenedesmus sp.* foi obtida de uma mina ativa encontrada atrás da Escola Pública Copper Cliff, e de uma lagoa de polimento. Enquanto *Chlamydomonas sp.* e *Scenedesmus sp.* foram coletadas de bacias de rejeitos encontradas na mina de ouro abandonada de Long Lake e de um outro tanque de polimento (resíduo da fundição).

A coleta das microalgas e a preparação dos extratos foram realizadas pelo Prof. Dr. John Ashley Scott, da *Laurentian University* (Sudbury, em Ontário, Canadá) e de seus pesquisadores Gerusa Senhorinho e Corey Laamanen da *Ongen R&D*.

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção dos extratos das microalgas

Para preparação dos extratos, as algas foram crescidas em 1L de líquido BBM em frascos de 2 L por 28 dias, à 2 °C, sob um ciclo claro:escuro de 12:12 h (70–80 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Os procedimentos de extração foram de acordo com Wathnani *et al.* (2012) com modificações. As algas foram colhidas, lavadas duas vezes em água estéril, centrifugadas (2.000 \times g por 15 min) e liofilizadas, sendo então congeladas a -80 °C. A biomassa seca (108–297 mg) foi pesada e foram adicionados 0,08 ml de metanol (mg^{-1}) de biomassa seca. Os tubos foram agitados por 24 h à temperatura ambiente. Para o extrato aquoso e etanólico, após a centrifugação, foi utilizado um sonicador (*Sonic Dismembrator, Fisher Scientific*, modelo 150E). As células foram sonicadas por 30 min em ciclos de 5 segundos sonicando e 15 segundos em repouso. O procedimento foi repetido três vezes. Os tubos foram então colocados sob vácuo para evaporar o solvente, após o qual os extratos foram pesados (10–49 mg) e 100% de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado para criar uma concentração final de 50 mg/mL^{-1} . Para cada alga, três extratos foram preparados para triagem (metanólico, etanólico e aquoso).

4.2.2 Cultura de Células J744A.1

Foi utilizada a linhagem de macrófagos murinos J744A1 (ATCC[®] TIB-67), obtidos do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em frascos para cultura (K11-2250, 250mL, estéril, Kasvi[®]) com meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) *high glucose*, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico contendo 100 unidades/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina (*Penincilin/Streptomycin*, Gibco[®]), em atmosfera umidificada a 37 °C e 5% de CO₂. A manutenção das garrafas ocorreu em média de 3 - 4 dias de passagem, até atingir a confluência de 70 - 80% das células na garrafa. Para a desagregação das células, foi utilizado um recurso mecânico, *scraper*, que é um raspador de haste fixa e ponta flexível (K26-0025, 25 cm, estéril, Kasvi[®]).

Todos os testes *in vitro* foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina da UFC. Os protocolos de cultura foram realizados em cabine de fluxo laminar ESCO classe II, modelo AC2-4E8.

4.2.3 Avaliação da Viabilidade Celular

O teste de viabilidade celular foi feito pelo método do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), descrito inicialmente por Mosmann (1983) e adaptado por outros autores (TWENTYMAN; LUSCOMBE, 1987; REILLY *et al.*, 1998), tendo por base a avaliação da atividade metabólica de células viáveis por desidrogenases mitocondriais, a partir da redução do MTT ao sal de formazan, que possui uma coloração violeta característica.

Para os testes de viabilidade celular, as células foram incubadas em placas de fundo chato de 96 poços (K12 - 096, 200 µL/poço, estéril, Kasvi®) em uma concentração de 1×10^5 células/mL, entre 24 - 48h. As células foram tratadas com as concentrações (25 e 50 µg/mL) dos extratos aquosos, etanólicos e metanólicos de *Coccomyxa sp.* (S5), *Scenedesmus sp.* (CC, LL1, P918), *Chlamydomonas sp.* (LL2A) por 24h. Utilizou-se como grupo controle, o veículo com o dimetilsulfóxido (DMSO 2%, empregado na diluição dos extratos), e como controle de citotoxicidade o DMSO 100%, sendo este um estímulo lesivo às células. Após o período de incubação, 100 µL do sobrenadante foi desprezado, sendo adicionados a cada poço 100 µL do MTT dissolvido em tampão fosfato salina (PBS), pH 7,4, em uma concentração final de 500 µg/mL. Após incubação por 4 h, a 37 °C, em estufa com 5% de CO₂, o sobrenadante foi descartado, adicionando-se 150 µL de DMSO P.A. para solubilizar os cristais de formazan. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Asys UVM340, Biochrom®), sob comprimento de onda de 570 nm. Para calcular a viabilidade foi usado a equação:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{(\text{Absorbância da amostra} \times 100)}{\text{Absorbância do grupo controle}}$$

4.2.4 Avaliação da Atividade Anti-inflamatória

4.2.4.1 Indução de Inflamação pelo Lipopolissacarídeo (LPS) em Células J774A.1

Para testar a modulação da inflamação os macrófagos foram estimulados com Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*. As células J744A.1 foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/poço, em placas de fundo chato de 96 poços e incubadas por 24 h em ambiente com 5% de CO₂ a 37 °C. As células foram pré-tratadas com as concentrações de 25 e 50 µg/mL, dos extratos etanólicos de *Coccomyxa sp.* (S5), *Scenedesmus sp.* (CC, LL1, P918) e *Chlamydomonas sp.* (LL2A). Passada 1h de incubação, metade dos poços de cada

grupo foram estimulados com LPS 1 µg/mL. Após 24h de incubação com o LPS, o sobrenadante de cada poço foi coletado para a determinação dos níveis de nitrito.

4.2.4.2 Dosagem de Nitrito em Células J744A.1 estimuladas pelo LPS

Para a dosagem dos níveis de nitrito, o sobrenadante de cada poço do protocolo 4.2.4.1 foi adicionado em placa de fundo chato de 96 poços, acrescidos de 150 µL do reagente de Griess (75 µL de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico a 5%, em seguida adicionado 75 µL N-(1-naftil)-etilenodiamina a 0,1% em água destilada) (GREEN *et al.*, 1982; GASPARRINI *et al.*, 2018). As placas passaram por um intervalo de incubação de 10 min, a temperatura ambiente e sobre a proteção da luz. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Biochrom® Asys UVM340) em comprimento de onda de 540 nm, sendo os resultados expressos como µM Nitrito (NO₂)/mL, a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂; 3,12 - 200 µM/mL).

4.3 Análise Estatística

Os valores médios e seus respectivos desvios padrão foram calculados a partir de triplicatas biológicas. A significância estatística da diferença entre as médias foi testada usando ANOVA unidirecional, seguida por um teste multivariado de Tukey, usando o programa GraphPadPrism® versão 5.00. Valores de $p < 0,05$ foram considerados para indicar significância estatística. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M) para as variáveis com distribuição normal.

5. RESULTADOS

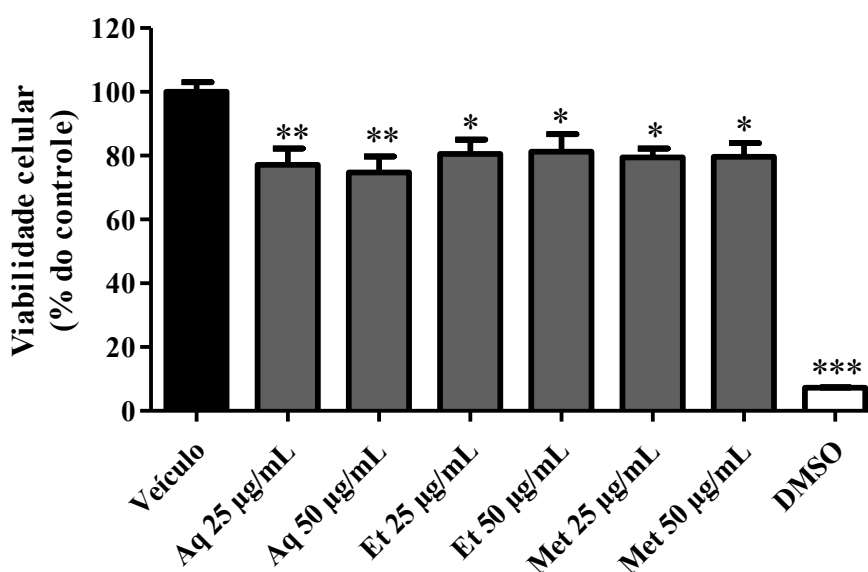
5.1 Efeito dos Extratos de Microalgas sobre a Viabilidade de Células J744A.1

5.1.1 Efeito dos extratos da microalga *Coccomyxa sp.* (amostra S5) sobre a viabilidade celular

O efeito dos extratos aquoso, etanólico e metanólico de *Coccomyxa sp.* (amostra S5), nas concentrações de 25 e 50 µg/mL, sobre a viabilidade de células J744A.1, estão demonstrados no Gráfico 1.

Os resultados evidenciaram que todos os extratos reduziram a viabilidade celular quando comparados com o grupo veículo (22,8%; 25,2%; 19,5%; 18,7%, 20,54 e 20,31% respectivamente) dessa forma, esses extratos não foram selecionados para avaliação atividade anti-inflamatória. O DMSO 100% reduziu a viabilidade celular em 92,7%.

Gráfico 1 - Efeito dos extratos da microalga *Coccomyxa sp.* (amostra S5) sobre a viabilidade celular de células J744A.1



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

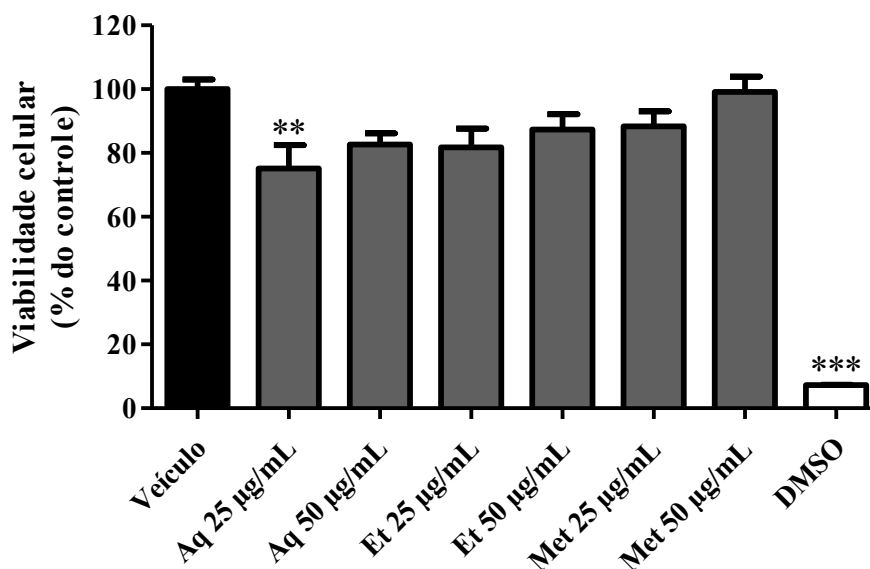
Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. e representaram a porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle (veículo) (ANOVA, seguindo do Teste de Tukey). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo veículo. Veículo (2% DMSO em meio DMEM); Extrato aquoso (Aq), etanólico (Et) e metanólico (Met). DMSO: Estímulo lesivo (DMSO 100%).

5.1.2 Efeito dos extratos da microalga *Chlamydomonas sp.* (amostra LL2A) sobre a viabilidade celular

O efeito dos extratos aquoso, etanólico e metanólico de *Chlamydomonas sp.*, nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, sobre a viabilidade de células J744A.1 estão representados no Gráfico 2.

Os resultados evidenciaram que a exposição ao extrato aquoso na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ apresentou redução (24,8%) na viabilidade celular em relação ao grupo veículo, já as amostras etanólica e metanólica, assim como a amostra aquosa na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, não apresentaram redução na viabilidade celular, assim sendo, os extratos etanólico e metanólico possuem potencial para investigação da atividade anti-inflamatória.

Gráfico 2 - Efeito dos extratos da microalga *Chlamydomonas sp.* (amostra LL2A) sobre a viabilidade celular de células J744A.1



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. e representaram a porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle (veículo) (ANOVA, seguindo do Teste de Tukey). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo veículo. Veículo (2% DMSO em meio DMEM); Extrato aquoso (Aq), etanólico (Et) e metanólico (Met). DMSO: Estímulo lesivo (DMSO 100%).

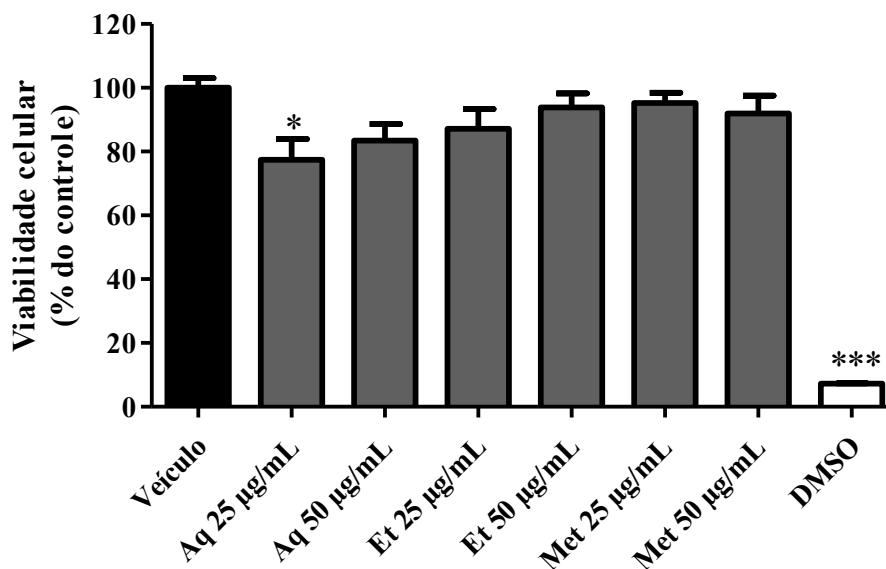
5.1.3 Efeito dos extratos da microalga *Scenedesmus sp.* (amostras CC, LLI, P918) sobre a viabilidade celular

O efeito dos extratos aquoso, etanólico e metanólico de *Scenedesmus sp.* (amostras CC, LLI, P918), nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, sobre a viabilidade de células J744A.1, estão demonstrados nos Gráficos 3 – 5.

A amostra CC refere-se à coleta da microalga em uma mina ativa, a amostra LLI refere-se à coleta em bacias de rejeitos encontradas na mina de ouro abandonada, enquanto para a amostra P918 a coleta foi feita em tanque de polimento.

Os resultados demonstram que os extratos etanólico e metanólico (25 e 50 $\mu\text{g/mL}$), assim como o extrato aquoso (50 $\mu\text{g/mL}$) da amostra CC, não demonstraram citotoxicidade quando comparados ao veículo (gráfico 3). Apenas o extrato aquoso (25 $\mu\text{g/mL}$) foi capaz de reduzir a viabilidade celular em 22,5%. Assim sendo, os extratos etanólico e metanólico de CC demonstraram potencial para a avaliação de atividade anti-inflamatória. O DMSO 100% reduziu a viabilidade celular em 92,7%.

Gráfico 3 - Efeito do extrato da microalga *Scenedesmus sp.* (amostra CC) sobre a viabilidade celular de células J744A.1



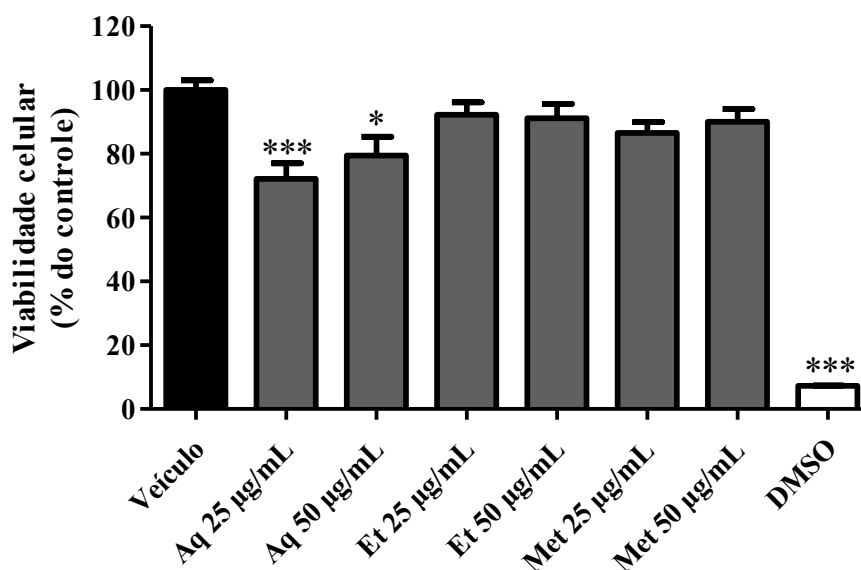
Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. e representaram a porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle (veículo) (ANOVA, seguindo do Teste de Tukey). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo veículo. Veículo (2% DMSO em meio DMEM); Extrato aquoso (Aq), etanólico (Et) e metanólico (Met). DMSO: Estímulo lesivo (DMSO 100%).

O efeito dos extratos aquoso, etanólico e metanólico de *Scenedesmus sp.* (amostra LLI), nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, sobre a viabilidade de células J744A.1, estão demonstrados no Gráfico 4.

Os resultados evidenciaram que a exposição ao extrato aquoso, nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram redução significativa na viabilidade celular (27,85% e 20,52%, respectivamente) quando comparada com o grupo veículo. As amostras etanólica e metanólica de LLI, nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, não apresentaram diferença estatística significativa na viabilidade celular quando comparada com o grupo veículo. Assim sendo, as amostras etanólicas e metanólicas de LLI mostraram potencial para a avaliação de atividade anti-inflamatória.

Gráfico 4 - Efeito do extrato da microalga *Scenedesmus sp.* (amostra LLI) sobre a viabilidade celular de células J744A.1



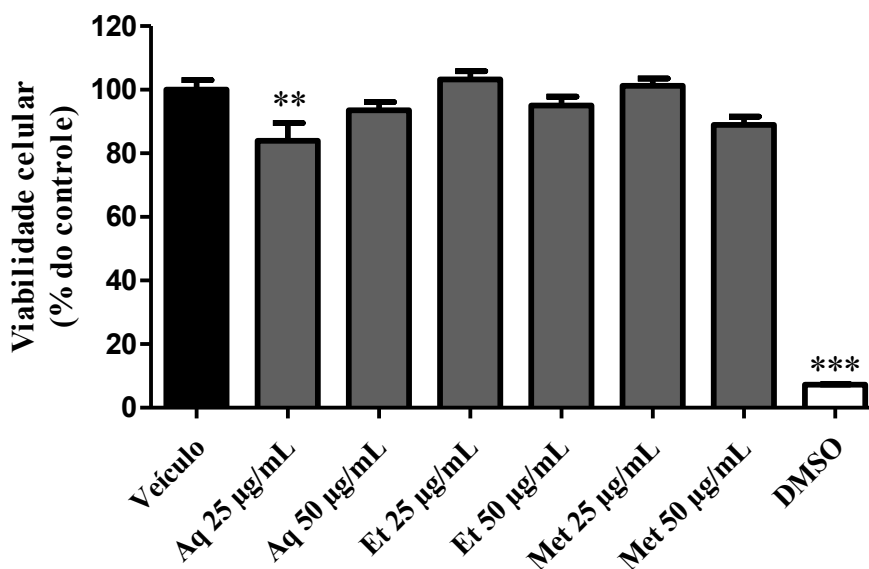
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. e representaram a porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle (veículo) (ANOVA, seguindo do Teste de Tukey). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo veículo. Veículo (2% DMSO em meio DMEM); Extrato aquoso (Aq), etanólico (Et) e metanólico (Met). DMSO: Estímulo lesivo (DMSO 100%).

O efeito dos extratos aquoso, etanólico e metanólico de *Scenedesmus sp.* (P918), nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, sobre a viabilidade de células J744A.1 estão representados no Gráfico 5.

Os resultados evidenciaram que a exposição ao extrato aquoso, na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ apresentou redução significativa na viabilidade celular (16,02%) quando comparada com o grupo veículo. A amostra etanólica e metanólica (25 e 50 $\mu\text{g/mL}$), assim como a amostra aquosa, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ não apresentaram redução significativa na viabilidade celular quando comparada com o grupo veículo, assim sendo, o extrato etanólico P918 foi selecionado para investigação da atividade anti-inflamatória.

Gráfico 5 - Efeito dos extratos da microalga *Scenedesmus sp.* (amostra P918) sobre a viabilidade celular de células J744A.1



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. e representaram a porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle (veículo) (ANOVA, seguindo do Teste de Tukey). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação ao grupo veículo. Veículo (2% DMSO em meio DMEM); Extrato aquoso (Aq), etanólico (Et) e metanólico (Met). DMSO: Estímulo lesivo (DMSO 100%).

5.2 Atividade Anti-inflamatória dos Extratos de Algas em Células J744A.1

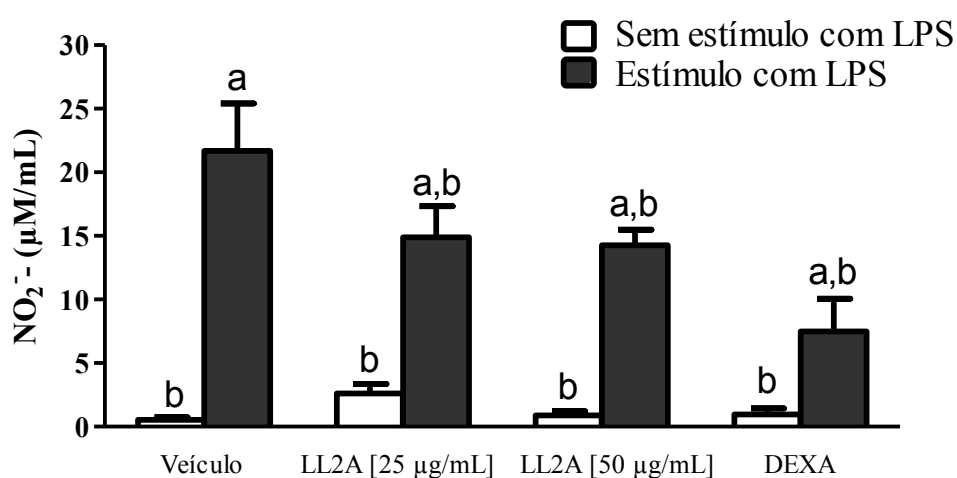
Considerando todos os resultados obtidos nos ensaios de avaliação da viabilidade celular, observou-se que todos os extratos de *Coccomyxa sp.* (S5) demonstraram citotoxicidade e não seguiram para os ensaios de avaliação do potencial anti-inflamatório. De todas as outras amostras, os extratos etanólico e metanólico não demonstraram citotoxicidade, apenas por uma questão de comparação com os resultados obtidos com os outros laboratórios que também estão estudando as mesmas amostras, decidiu-se avaliar a o potencial anti-inflamatório dos extratos etanólicos.

5.2.1 Efeito do Extrato Etanólico de *Chlamydomonas sp.* (amostra LL2A) sobre os níveis de Nitrito em células J744A.1 na ausência e após o estímulo por LPS

LPS (1 ug/mL) foi capaz de aumentar os níveis de nitrito em células J744A.1 quando comparada às células que não receberam o LPS (Gráfico 6).

O extrato etanólico de *Chlamydomonas sp.* (amostra LL2A), nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, assim como a dexametasona (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) não foram capazes de aumentar *per se* os níveis de nitrito, quando comparado ao grupo veículo (Gráfico 6). Contudo, foram capazes de reduzir em 31,2% e 42,4%, respectivamente, os níveis de nitrito quando as células foram estimuladas com LPS (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Efeito do Extrato Etanólico de *Chlamydomonas sp.* (amostra LL2A) sobre os níveis de Nitrito em Células J744A.1 estimuladas com LPS



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. e representaram os níveis de nitrito (NO_2^- $\mu\text{M}/\text{mL}$) em sobrenadante de células estimulas ou não com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Veículo (2% DMSO em meio DMEM). Dexametasona (DEXA, 1 $\mu\text{M}/\text{mL}$). ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo sem estímulo com LPS; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo estimulado com LPS (ANOVA, seguindo do Teste de Tukey).

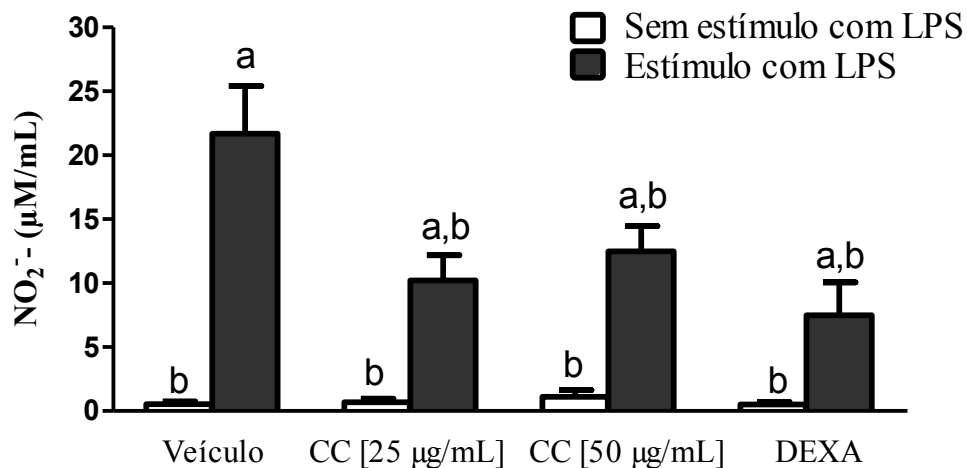
5.2.2 Efeito dos Extratos Etanólicos de *Scenedesmus sp.* (amostras CC, LLI, P918) sobre os níveis de Nitrito em células J744A.1 na ausência e após o estímulo por LPS

LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi capaz de aumentar os níveis de nitrito em células J744A.1 quando comparada às células que não receberam o LPS (Gráficos 7 – 9).

O extrato etanólico de *Scenedesmus sp.* (amostra CC), nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, assim como a dexametasona (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) não foram capazes de aumentar *per se* os níveis de nitrito, quando comparado ao grupo veículo (Gráfico 7). Contudo, foram capazes de

reduzir em 52,9% e 34,1%, respectivamente, os níveis de nitrito quando as células foram estimuladas com LPS (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Efeito do Extrato Etanólico de *Scenedesmus sp.* (amostra CC) sobre os níveis de Nitrito em Células J744A.1 estimuladas com LPS

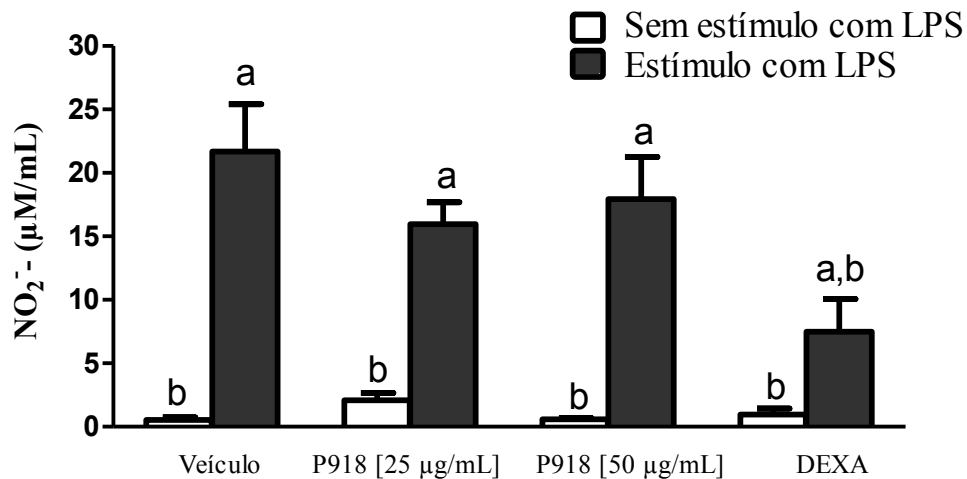


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. e representaram os níveis de nitrito (NO_2^- $\mu\text{M/mL}$) em sobrenadante de células estimulas ou não com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). Veículo (2% DMSO em meio DMEM). Dexametasona (DEXA, 1 $\mu\text{M/mL}$). ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo sem estímulo com LPS; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo estimulado com LPS (ANOVA, seguindo do Teste de Tukey).

O extrato etanólico de *Scenedesmus sp.* (amostra LLI), nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, assim como a dexametasona (1 $\mu\text{g/mL}$) não foram capazes de aumentar *per si* os níveis de nitrito, quando comparado ao grupo veículo (Gráfico 6). Contudo, reduziram em 36,2% e 27,8 %, respectivamente, os níveis de nitrito os nitritos quando as células foram estimuladas com LPS. Porém, os valores não representam diferença estatística significativa em relação ao grupo LPS (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Efeito do Extrato Etanólico de *Scenedesmus sp.* (amostra LLI) sobre os níveis de Nitrito em Células J744A.1 estimuladas com LPS

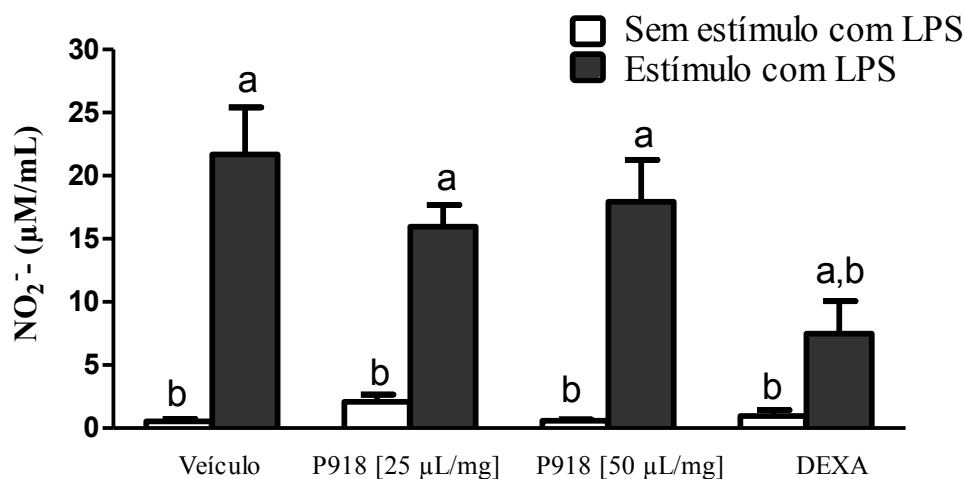


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. e representaram os níveis de nitrito (NO_2^- $\mu\text{M/mL}$) em sobrenadante de células estimulas ou não com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). Veículo (2% DMSO em meio DMEM). Dexametasona (DEXA, 1 $\mu\text{M/mL}$). ^a $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo sem estímulo com LPS; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo estimulado com LPS (ANOVA, seguindo do Teste de Tukey).

O extrato etanólico de *Scenedesmus sp.* (amostra P918), nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, assim como a dexametasona (1 $\mu\text{g/mL}$) não foram capazes de aumentar *per si* os níveis de nitrito, quando comparado ao grupo veículo (Gráfico 9). Contudo, não foram capazes de reduzir os níveis de nitrito quando as células foram estimuladas com LPS, apresentando uma redução de 26% e 17%, respectivamente. A dexametasona (1 $\mu\text{g/mL}$) reduziu em 65,5% os níveis de nitrito quando comparado ao grupo LPS (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Efeito do Extrato Etanólico de *Scenedesmus sp.* (amostra P918) sobre os níveis de Nitrito em Células J744A.1 estimuladas com LPS



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. e representaram os níveis de nitrito (NO₂⁻ µM/mL) em sobrenadante de células estimulas ou não com LPS (1 µg/mL). Veículo (2% DMSO em meio DMEM). Dexametasona (DEXA, 1 µM/mL). ^a p < 0,05 comparado ao grupo veículo sem estímulo com LPS; ^b p < 0,05 comparado ao grupo veículo estimulado com LPS (ANOVA, seguindo do Teste de Tukey).

6. DISCUSSÃO

A busca por propriedades farmacológicas de produtos naturais, bem como o melhoramento dos métodos de triagem de compostos, tem permitido a descoberta de substâncias biológicas farmacologicamente ativas que apresentem importantes aplicações tanto na área experimental, como na identificação de princípios ativos (PERAZA *et al.*, 2007). Dado exposto, trabalhar com microalgas torna-se vantajoso uma vez que o seu cultivo possui alta produtividade e uma ampla gama de compostos que podem ser produzidos, quando comparado a cultivos tradicionais de outros microrganismos (BARROS, 2015).

O teste de viabilidade celular pelo método MTT é um modelo bastante utilizado devido à sua sensibilidade de detecção de citotoxicidade. Esse teste quantifica o dano induzido por um composto no metabolismo celular, pela avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. Dessa forma, a viabilidade mitocondrial é então quantificada pela redução do

MTT a sal de formazan. Em suma, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Os extratos algais foram obtidos em diferentes regiões de Ontário, Província Canadense. Notou-se que as amostras P918, extraída de um tanque de polimento, e a amostra CC, obtida em uma mina ativa, apresentaram menor citotoxicidade ou ausência de citotoxicidade quando em comparação com as amostras LL1, encontrada em mina desativada, porém todas pertencem a espécie *Scenedesmus sp.* Nesse contexto, a quantidade de compostos bioativos nas algas sofre influência de fatores como a própria espécie e as condições ambientais, que variam desde exposição à luz, estação do ano, disponibilidade de nutrientes, temperatura, presença de contaminantes, salinidade, disponibilidade CO₂ e interações bióticas, dessa forma, indivíduos da mesma espécie podem produzir diferentes conteúdos bioquímicos (CARILLO *et al.*, 2020; PALANIYAPPAN *et al.*, 2023).

As amostras utilizadas foram cedidas pelo professor John Ashley Scott, da *Laurentian University*, em Sudbury, Canadá, para a realização do trabalho, as concentrações dos extratos que apresentaram menor toxicidade em modelos com células cancerígenas, realizados por laboratório parceiro, foram selecionadas para serem testadas em macrófagos J744A.1. Os dados não foram trazidos para o presente trabalho, pois ainda não foram publicados. Nossos resultados mostraram que a viabilidade das células não foi afetada nas condições testadas pelas microalgas verdes, com exceção dos extratos aquosos na concentração de 25 µg/mL, assim como a amostra S5 de *Coccomyxa sp.* que apresentou toxicidade em todos os diluentes e concentrações trabalhadas. Dessa forma, os extratos etanólicos e metanólicos das amostras CC, LLI, LL2A e P918, uma vez que não apresentam toxicidade para macrófagos J744A.1, apresentam potencial para serem avaliados quanto ao efeito anti-inflamatório e imunomodulador, afim de estudar as vias de sinalização dessas células mais profundamente.

No trabalho executado por Senhorinho, Lannér e Scott (2018), foram realizados testes sobre viabilidade celular pelo método MTT de amostras de *Chlamydomonas sp.* selvagens em células malignas e não malignas. Os resultados mostraram que todos os extratos diminuíram a viabilidade celular de linhagens malignas, e para células não malignas os extratos afetaram a viabilidade nas concentrações acima de 50 µg/mL, e ainda, alguns extratos afetaram as células nas concentrações mais baixas. Esse comportamento também foi observado em nossos resultados, haja vista que as amostras de *Chlamydomonas sp.* (LL2A), *Scenedesmus sp.* (CC, LLI e P918) apresentaram maior toxicidade na concentração mais baixa (25 µg/mL) sobre macrófagos J744A.1.

A inflamação é uma resposta importante que envolve a participação de vários mediadores químicos e vias de sinalização. A princípio, a resposta inflamatória padrão pode ser controlada por 4 componentes principais: os indutores da inflamação, os sensores que são responsáveis pelo reconhecimento dos indutores, os mediadores inflamatórios e o tecido alvo que são os componentes afetados pelos mediadores. Cada um desses componentes irá atuar de diferentes formas e vias inflamatórias (MEDZHITOV, 2010). Nesse contexto, o LPS, componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas, é detectado por receptores do sistema imune, os receptores Toll-like (TLRs), que são expressos em macrófagos presentes nos tecidos induzindo e modulando a produção de citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, inclusive, óxido nítrico (NO) (MEDZHITOV, 2010; SOMENSI *et al.*, 2019).

Dessa forma, os macrófagos são peça-chave associadas à modulação da resposta imune inata e uma vez ativados, induzem inflamação ao liberar mediadores pró-inflamatórios como o NO (WADLEIGH *et al.*, 2000; MA *et al.*, 2015). Stuchr e Marletta relataram que os macrófagos de camundongos produzem nitrito e nitrato em resposta ao lipopolissacarídeo bacteriano. Em soluções aquosas o NO prontamente reage com o oxigênio (O₂) formando trióxido dinitrogênio (N₂O₃) em um processo denominado autooxidação do NO. O N₂O₃ é decomposto rapidamente em íon nitrosônio (NO⁺) e nitrito (NO₂). A taxa de autooxidação depende principalmente das concentrações de NO e oxigênio, isto significa que a taxa de formação de N₂O₃ é alta no local de síntese de NO (STAMLER; LAMAS; FANG, 2001).

Em suma, o NO é reconhecido como um agente regulador e mediador das respostas inflamatórias. Ele possui propriedades citotóxicas contra organismos infecciosos, mas também pode ter efeitos prejudiciais nos tecidos do hospedeiro. O NO reage com a guanilato ciclase solúvel (GCs), para formar o monofosfato de guanosina cíclico (GMPC), que por sua vez, modulam muitos dos efeitos do NO. Pode ainda, interagir com o oxigênio molecular e o ânion superóxido para produzir espécies reativas de nitrogênio que modificam várias funções nas células. Esses efeitos indiretos do NO têm um papel importante na inflamação, é produzido em grandes quantidades pela óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e espécies reativas de oxigênio são sintetizadas por células inflamatórias ativadas (KIECHELE, 1993; COLEMAN, 2001; KORHONEN *et al.*, 2005).

Os dados por nós obtidos demonstraram que os extratos etanólicos de *Chlamydomonas sp.* (LL2A) e *Scenedesmus sp.* (CC, LLI e P918), nas concentrações empregadas, não foram capazes de estimular por si só a produção de nitrito no sobrenadante de células J744A.1 quando em comparação com células estimuladas por LPS, demonstrando assim que eles não são capazes de induzir uma resposta inflamatória em macrófagos J744A.1. Outrossim, os poços

tratados com extratos etanólicos de *Chlamydomonas sp.* (LL2A) e *Scenedesmus sp.* (CC), estimulados com LPS, reduziram os níveis de nitrito em comparação com o grupo Veículo, enquanto as amostras de LLI e P918 de *Scenedesmus sp.* não apresentaram redução estatisticamente significativa nos níveis de NO₂. Os níveis teciduais de nitrito são um importante e bem estabelecido marcador do processo inflamatório no sobrenadante de células (GREEN et al., 1982; GASPARRINI et al., 2018).

As microalgas são importantes reservatórios de compostos bioativos, produzem inúmeros metabólitos secundários que lhes conferem essa característica, dentre os principais estão: compostos fenólicos, flavonóides e carotenóides (PATIL & KALIWAL, 2019). A produção desses metabólitos nas microalgas responde a alterações do ambiente externo, assim, a manipulação das condições de cultivo é capaz de estimular a biossíntese de compostos bioativos específicos (SUASNAVAS et al., 2018).

Nesse contexto, o solvente extrator constitui um importante fator e deve ser avaliado em função da quantidade e dos metabólitos presentes na amostra (ANIBAL; PEIXOTO; FOGGIO; HÖFLING, 2013). Embora os metabólitos responsáveis pela ação antiproliferativa e anti-inflamatória das espécies de algas estudadas não tenham sido caracterizados quimicamente neste estudo, sabe-se que o etanol é um solvente no qual apresenta caráter anfifílico, permitindo a extração tanto de substâncias com características apolares quanto polares, apresentando maior teor de substâncias fenólicas no extrato etanólico. Os extratos aquosos extraem substâncias com potencial atividade antimicrobiana, como os flavonoides. São hidrofóbicos, não interagem com substâncias polares e tem a capacidade de formação de micelas. Já a utilização do metanol na fase de extração de compostos químicos é considerada um dos mais eficientes em relação a extração dos compostos fenólicos (SIMÕES, 2010; CRUZ et al., 2013; OLIVEIRA, 2016).

7. CONCLUSÃO

Os extratos aquosos de *Coccomyxa sp.*, *Scenedesmus sp.* e *Chlamydomonas sp.* são citotóxicos para macrófagos J744A.1, assim como o extrato etanólico e metanólico de *Coccomyxa sp.* Os extratos etanólicos e metanólicos de *Scenedesmus sp.* e *Chlamydomonas sp.*, nas concentrações utilizadas, não são citotóxicos para macrófagos J744A.1.

O extrato etanólico de *Scenedesmus sp.* (amostra CC) foi aquele que demonstrou maior ação anti-inflamatória, seguido do extrato etanólico de *Chlamydomonas sp.* (amostra LL2A). Os extratos de *Scenedesmus sp.* (amostra P918 e LLI) não demonstraram atividade anti-

inflamatória. Porém a amostra P918, foi a amostra que apresentou menor toxicidade, apresentando potencial para outros testes de atividade biológica. Assim sendo, a amostra CC é aquela que demonstrou um maior potencial para a continuidade dos estudos de sua ação anti-inflamatória.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; PILLAI, S.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019, ISBN: 978-85-352-9074-5.

ABO-SHADY, A. M *et al.* Antioxidant and Antidiabetic Activity of Algae. **Life**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 460, 7 fev. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/life13020460>.

ADAMS HR. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. **J Am Med Assoc** 1996; 209:1297-302.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC). ATCC Guide to Packaging and Shipping of Biological Materials. American Type Collection Culture. EUA. Disponível em: <https://www.atcc.org>. Acesso em: 12 out 2023, 13:31

ANIBAL P. C.; PEIXOTO I. T. A., FOGGIO M.A.; HÖFLING J. F. Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. **Braz J Microbiol.** 2013; 44 (3):839-848. ISSN: 1517-8382.

APOSTOLOVA, *et al.* Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Effects of Fucoidan: a review. **Polymers**, [S.L.], v. 12, n. 10, p. 2338, 13 out. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/polym12102338>.

BARARDI, C. R. M; CAROBREZ, S. G.; PINTO, A. R. **Imunologia**. Florianópolis: UFSC, CCB, 2010. ISBN 9788561485382.

BARROS, A. I., GONÇALVES, A. L., SIMÕES, M., & PIRES, J. C. M. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 1489–1500. doi:10.1016/j.rser.2014.09.037. 2015

CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. **Biochimie**, v. 91, p.791-795, 2009.

CARILLO, P. *et al.* Enhancing Sustainability by Improving Plant Salt Tolerance through Macro- and Micro-Algal Biostimulants. **Biology**, [S.L.], v. 9, n. 9, p. 253, 28 ago. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biology9090253>.

COLEMAN, John W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 1, n. 8, p. 1397-1406, ago. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1567-5769\(01\)00086-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1567-5769(01)00086-8).

CRUZ E. D. E. M., *et al.* Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. **Phytochemistry**. 2013; 89:71-7. ISSN: 0031-9422.

FACCHIN, B. M *et al.* Inflammatory biomarkers on an LPS-induced RAW 264.7 cell model: a systematic review and meta-analysis. **Inflammation Research**, [S.L.], v. 71, n. 7-8, p. 741-758, 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-022-01584-0>.

- FANG, Y. *et al.* Plantanone C attenuates LPS-stimulated inflammation by inhibiting NF- κ B/iNOS/COX-2/MAPKs/Akt pathways in RAW 264.7 macrophages. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 143, p. 112104, nov. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112104>.
- FUNES, S. C. *et al.* Implications of macrophage polarization in autoimmunity. **Immunology**, [S.L.], v. 154, n. 2, p. 186-195, 8 mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/imm.12910>.
- GASPARRINI, M. *et al.* Protective effects of Manuka honey on LPS-treated RAW 264.7 macrophages. Part 2: Control of oxidative stress induced damage, increase of antioxidant enzyme activities and attenuation of inflammation. **Food and chemical toxicology**, v. 120, p. 578-587, 2018.
- GAUTHIER, M.R.; SENHORINHO, G.N.A.; SCOTT, J.A. Microalgae under environmental stress as a source of antioxidants. **Algal Research**, [S.L.], v. 52, p. 102104, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2020.102104>.
- GRANHAM, L. E.; GRANHAM, J. M.; WILCOX, L. W. **Algae**. 2. ed. São Francisco: Pearson Education, 2009.
- GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 10, p.131-138, 1982
- GUIRY M. D, GUIRY G. M. **Algaebase**. In: World-wide electronic publication Universidade Nacional da Irlanda, Galway. 2014.
- KADOMOTO, S.; IZUMI, K.; MIZOKAMI, A. Macrophage Polarity and Disease Control. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 144, 23 dez. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23010144>.
- KIECHELE FL, MALINSKI T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology, and detection. **Am J Clin Pathol**, 1993; 100:567-75.
- KORHONEN, R. *et al.* Nitric Oxide Production and Signaling in Inflammation. **Current Drug Target -Inflammation & Allergy**, [S.L.], v. 4, n. 4, p. 471-479, 1 ago. 2005. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1568010054526359>.
- LAAMANEN, C.A *et al.* Harvesting microalgae for health beneficial dietary supplements. **Algal Research**, [S.L.], v. 54, p. 102189, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2021.102189>.
- LI, *et al.* C-phycoyanin protects against low fertility by inhibiting reactive oxygen species in aging mice. **Oncotarget**, [S.L.], v. 7, n. 14, p. 17393-17409, 2016. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.8165>.
- LITTLE, S. *et al.* Antibacterial compounds in green microalgae from extreme environments: a review. **Algae**. 36. 61-72. 2021.
- LOCATI, M; CURTALE, G; MANTOVANI, A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. **Annual Review Of Pathology: Mechanisms of Disease**, [S.L.], v. 15,

n. 1, p. 123-147, 24 jan. 2020. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718>.

MA, C. *et al.* Anti-inflammatory effect of resveratrol through the suppression of NF- κ B and JAK/STAT signaling pathways. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, [S.L.], v. 47, n. 3, p. 207-213, 1 mar. 2015. China Science Publishing & Media Ltd. <http://dx.doi.org/10.1093/abbs/gmu135>.

MEDZHITOV, Ruslan. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, [S.L.], v. 140, n. 6, p. 771-776, mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>.

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

NEVES, E. M. S. F. T. **Macrófago: Biologia, Diversidade e Função**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2015.

OISHI, Y.; MANABE, I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. **International Immunology**, [S.L.], v. 30, n. 11, p. 511-528, 25 ago. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxy054>.

OLIVEIRA V. B., *et al.* Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por CLAE-DAD de *Dicksonia sellowiana* (presl.) Hook, dicksoniaceae. **Rev Bras Plantas Med**. 2016; 18 (1):230-239. ISSN: 1516-0572.

PALANIYAPPAN S. *et al.* Thirumurugan. Evaluation of Phytochemical Screening, Pigment Content, In Vitro Antioxidant, Antibacterial Potential and GC-MS Metabolite Profiling of Green Seaweed *Caulerpa racemosa*. **Marine Drugs**, [S.L.], v. 21, n. 5, p. 278, 28 abr. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md21050278>.

PARHAM, P. **O Sistema Imune**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001.

PATIL, L.; KALIWAL, B. B. Microalga *Scenedesmus bajacalifornicus* BBKLP-07, a new source of bioactive compounds with in vitro pharmacological applications. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [S.L.], v. 42, n. 6, p. 979-994, 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-019-02099-5>.

PERAZA, G.G.; RODRIGUES, S.T.; MEDEIROS, S.H.L.; MUCCILLO-BAISCH, A.L. O uso de modelos animais para avaliar o potencial antinociceptivo dos produtos de origem natural. *Vittalle*, v. 19, n. 1, p. 35-44, 2007.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 8ª ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 2014. ISBN: 9788527723626.

REILLY, T. P. *et al.* Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochem Pharmacol**, v. 55, p. 803-10, 1998.

ROBBINS, S. L.; KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Patologia: Bases Patológicas das doenças**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. ISBN: 978-85-5352-8163-7.

SATHASIVAM, R. *et al.* Microalgae metabolites: a rich source for food and medicine. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 709-722, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.003>.

SENHORINHO, G. N.A.; LANNÉR, C.; SCOTT, J. A. Effect of green microalgal extracts exhibiting antibacterial activity on viability of human malignant and non-malignant cells. **Phycological Research**, [S.L.], v. 67, n. 2, p. 145-151, 21 dez. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/pre.12362>.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A., *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal Of Cellular Physiology**, [S.L.], v. 233, n. 9, p. 6425-6440, mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.26429>.

SIMÕES C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: UFRGS Ed. 2010. ISBN: 978-85-7025-927-1.

SOMENSI, N. *et al.* Carvacrol suppresses LPS-induced pro-inflammatory activation in RAW 264.7 macrophages through ERK1/2 and NF-κB pathway. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 75, p. 105743, out. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105743>.

STAMLER, J.S.; LAMAS, S.; FANG, F.C. **Cell**, 2001, 106, 675.

SUH, S. S. *et al.* Anti-Inflammation Activities of Mycosporine-Like Amino Acids (MAAs) in Response to UV Radiation Suggest Potential Anti-Skin Aging Activity. **Marine Drugs**, [S.L.], v. 12, n. 10, p. 5174-5187, 14 out. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/md12105174>.

STUCHR, DJ. MARLETTA, M.A Proc. Nall. Acad. Sci. USA, 1985,82, 7738.

TWENTYMAN, P. R.; LUSCOMBE, M. **A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity**. **Brithish Journal of Cancer**, v. 56, n. 3, p. 279-285, 1987.

VALENTIN, Y. Y. Macroalgas marinhas e biotecnologia, companheiras inseparáveis. Universidade Federal do Rio de Janeiro. **Anais da 62ª Reunião Anual da SBPC - Natal, RN, julho, 2010**.

VOLK, R.B.; FURKERT, F. H. Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. **Microbiological Research**, [S.L.], v. 161, n. 2, p. 180-186, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2005.08.005>.

WADLEIGH, D. J. *et al.* Transcriptional Activation of the Cyclooxygenase-2 Gene in Endotoxin-treated RAW 264.7 Macrophages. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 275, n. 9, p. 6259-6266, mar. 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.275.9.6259>.

WATHNANI H. A. L., *et al.* 2012. Bioactivity of natural compounds isolated from cyanobacteria and green algae against human pathogenic bacteria and yeast. **Journal of Medicinal Plants Research** 6: 3425–3433.

WIJESEKARA, I ; YOON, N. Y.; KIM, S. K. Phlorotannins from *Ecklonia cava* (Phaeophyceae): Biological activities and potential health benefits. **Biofactors**, doi: 10.1002/biof.114,2010.

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, [S.L.], v. 496, n. 7446, p. 445-455, abr. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12034>.

YANG, L.; CHEN, M.; XIE, H.; LIAO, Z.; YU, J. In vitro anti-influenza virus activities of sulfated polysaccharide fractions from *Gracilaria lemaneiformis*. **Virologia Sinica**. v. 25, n.5.