

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS OBTIDOS DE
ASSOCIAÇÃO DE DIATOMÁCEAS E BRIOZOÁRIOS COLETADOS NO BALNEÁRIO
CAMBORIÚ-SC**

TATIANA ALVES NEGREIROS

Porto Alegre

2012

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS OBTIDOS DE ASSOCIAÇÃO DE DIATOMÁCEAS E BRIOZOÁRIOS COLETADOS NO BALNEÁRIO CAMBORIÚ-SC

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado por Tatiana Alves Negreiros junto à Disciplina Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Farmacêutico.

Prof. Dr. Gilsane L. von Poser
Orientador

Dr. Luisa de Andrade Salles
Co-orientador

Porto Alegre, 2012

Dedico este trabalho a minha mãe, que sempre me incentivou na conquista do título de farmacêutica.

Agradecimentos

Agradeço enormemente a minha co-orientadora Dra. Luisa Salles, pela atenção minuciosa em toda a parte técnica e por ter dedicado grande parte do seu tempo para que a execução deste trabalho fosse possível. A minha orientadora professora Dra. Gilsane von Poser pelo acolhimento no seu laboratório e pela assistência desde a escolha do tema até os últimos detalhes na execução do trabalho. Ao Dr. Alexandre Fuentesfria, por ter cedido seu laboratório e equipe para realização dos testes em leveduras. Ao Dr. Leonardo Rubi Rörig, da UFSC, por ter compartilhado seu projeto disponibilizando a parte de investigação de propriedades terapêuticas para o presente estudo. Aos demais colaboradores que auxiliaram com material, auxílio técnico e também aos meus colegas do Laboratório de Farmacognosia da UFRGS. Aos meus pais por todo incentivo.

RESUMO

NEGREIROS, Tatiana Alves. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS OBTIDOS DE ASSOCIAÇÃO DE DIATOMÁCEAS E BRIOZOÁRIOS COLETADOS NO BALNEÁRIO CAMBORIÚ-SC**; Prof. Orientador: Gilsane von Poser.; Porto Alegre : UFRGS, 2012, 35_folhas fl., Relatório de Conclusão de Estágio.

Organismos são importante fonte de moléculas bioativas de potencial uso farmacêutico. Entre os organismos mais estudados no ambiente marinho estão os briozoários e algas. Além disso, a mortalidade de toneladas de florações e subsequentes arribadas formadas pelos briozoários *Membraniporopsis tubigera* (Osburn) e *Electra bellula* (Hincks) coletadas na enseada de Camboriú em Balneário Camboriú, Estado de Santa Catarina (Brasil), gerou uma forte demanda por soluções de uso. Desequilíbrios ecológicos podem resultar em morte e complexação destes organismos, com deposição deste material a beira mar. Nessa perspectiva, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a atividade antifúngica de extratos obtidos por diferentes métodos de extração, maceração em banho de ultrassom e extração por fluido supercrítico com dióxido de carbono. Também procurou-se avaliar a composição fitoquímica em busca de alcalóides, flavonóides, taninos, saponinas, quinonas e compostos fenólicos, além da obtenção de um perfil cromatográfico para os extratos em diferentes sistemas eluentes. O *screening* químico para alcalóides, flavonóides, taninos, saponinas e quinonas realizado com extrato metanólico apresentou indicativos de ausência destas classes de substâncias. O teor de compostos fenólicos totais foi obtido por técnica espectrofotométrica e resultou em 10,68 mg de quercetina/grama de extrato seco. A avaliação do perfil cromatográfico do extrato metanólico através de cromatografia em camada delgada, utilizando sistema cromatográfico específico para flavonóides, apresentou coloração incomum indicando a presença de produtos diferentes. Foi realizado ensaio *in vitro* da atividade antifúngica dos extratos frente a leveduras do gênero *Candida*. O extrato metanólico apresentou atividade fungistática seletiva frente às cepas de *Candida albicans* com CIM 50 de 125 µg/ml. No entanto, não apresentou atividade frente as outras espécies *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

Palavras-chave: Floração, Diatomácea, Briozoário, Antifúngico, *Candida*, compostos marinhos.

ABSTRACT

NEGREIROS, Tatiana Alves. **ANTIFUNGAL ACTIVITY OF EXTRACTS OBTAINED FROM AN ASSOCIATION OF DIATOMACE AND BRYOZOA COLLECTED FROM BALNEÁRIO CAMBURIÚ-SC**; Prof. Orientador: Gilsane von Poser.; Porto Alegre : UFRGS, 2012, 35_folhas fl., Relatório de Conclusão de Estágio.

Marine organisms are an important source of bioactive molecules with potential pharmaceutical use. The bryozoans and the algae are among the most studied organisms in the marine environment. Furthermore, tons of these organisms association - formed by bryozoans *Membraniporopsis tubigera* (Osburn) and *Electra bellula* (Hincks) - shored at Balneario Camboriú in the Santa Catarina state, Brazil, offering a opportunity for useful solutions to it. The aim of this study is the evaluation of the *in vitro* antifungal activity of extracts obtained from the association. Different extraction methods such as: maceration in a bath of ultrasound and supercritical fluid extraction with carbon dioxide, were performed. In addition, an evaluation of the chemical composition in the search for alkaloids, flavonoids, tannins, saponins, quinones and phenolic compounds. Also chromatographic profiles for the extracts in different solvents systems were obtained. The chemical screening for alkaloids, flavonoids, tannins, saponins and quinones performed with methanol extract indicates the absence of these classes of substances. The content of total phenolic compounds was obtained by spectrophotometric method and resulted in 10.68 mg of quercetin / g of dry extract. The evaluation of the chromatographic profile of the methanol extract by thin layer chromatography, using a chromatographic system specific to flavonoids, showed unusual coloration indicating the presence of different products. The assay of the extracts was performed to evaluate the *in vitro* antifungal activity against species. The methanol extract showed selective fungistatic activity against the strains of *Candida albicans* with an MIC 50 of 125 mg / ml, however, showed no activity against other species *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*.

Key words: Diatomace, Briozoary, Antifungic, *Candida*, marine compounds.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	16
3.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	16
3.2.1 <i>Extração por fluido supercrítico</i>	16
3.2.2. <i>Extração por maceração</i>	16
3.3. SCREENING QUÍMICO	17
3.3.1 <i>Presença de Alcalóides</i>	17
3.3.2 <i>Presença de flavonóides, saponinas, taninos e quinonas</i>	17
3.3.2.1 Flavonóides	17
3.3.2.2. Saponinas.....	18
3.3.2.3. Taninos.....	18
3.3.2.4 Quinonas	18
3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	18
3.5 PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS	19
3.6. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5. CONCLUSÕES	29
PERSPECTIVAS:.....	30
REFERÊNCIAS.....	31

1. Introdução

O estudo de produtos naturais visando à busca de novas moléculas ou modelos moleculares para o desenvolvimento de fármacos que atuem de forma diferenciada, ou que apresentem atividade em diferentes alvos terapêuticos tem-se concentrado na investigação do metabolismo secundário de plantas terrestres e micro-organismos. Alguns dados demonstram que cerca de 25 % dos medicamentos vendidos são substâncias de origem vegetal, enquanto 12 % de origem microbiana (Já e Zi-rong, 2004). O oceano é uma riquíssima fonte para descoberta de produtos naturais, pois apresenta uma biodiversidade muito superior a do ambiente terrestre (Já e Zi-rong, 2004). Desse modo, torna-se oportuno e interessante que a busca de novos produtos ativos incorpore habitats inexplorados como o ambiente marinho. O desenvolvimento de novas técnicas e equipamentos tem possibilitado a coleta de amostras marinhas e em conseqüência mais de 5000 novos compostos já foram isolados. Esponjas, celenterados e micro-organismos são as maiores fontes de busca de moléculas bioativas, seguido de algas, equinodermos, moluscos e briozoários (Já e Zi-rong, 2004; Sharp *et al.*, 2007).

Um ambiente dinâmico com qualidade é requisito para manutenção das características essenciais do ecossistema ou de determinado meio e deve ser entendido como um processo dinâmico no amplo contexto da relação entre os vários seres que o compõem. Alterações deste equilíbrio dinâmico podem gerar um desequilíbrio ecológico e entre os fatores causais desta situação encontram-se desastres naturais e as ações provocadas pelo homem, como desmatamento florestal, a pesca e caça desordenadas, agricultura e pecuária, poluição do ar e das águas, urbanização e crescimento demográfico da população humana. O crescimento urbano e populacional desordenado e a execução de obras costeiras sem adequada avaliação são responsáveis pela geração de uma série de impactos ambientais que alteram a qualidade ecológica e sanitária dos ambientes aquáticos.

O município de Balneário Camboriú (SC) é um dos principais pólos turísticos litorâneos do Brasil. Tem apresentado uma das maiores taxas de crescimento econômico e populacional e, como conseqüência, uma série de impactos vem alterando a qualidade ambiental e sanitária dos ambientes aquáticos locais (Rorig *et al.*, 2011). Um dos mais recentes e alarmantes fenômenos verificados no local teve início em dezembro de 2003 com a mortalidade das florações e subseqüentes arribadas de briozoários associados com diatomáceas epibênticas. A arribada é formada pelos briozoários *Membraniporopsis tubigera* (Osburn) e *Electra bellula* (Hincks), que são organismos arborescentes, facilmente removidos do substrato por ondas e correntes (Gordon *et al.*, 2006; Ramalho e Diehl, 2007), associados com as diatomáceas epibênticas *Amphitetras antediluviana* Ehrenberg e *Biddulphia biddulphiana* (Smith) Boyer. Essas arribadas persistem até os dias de hoje, tendo se intensificado a partir de 2005, causando mau cheiro e problemas estéticos e obrigando a sua retirada quase diária da praia pelos serviços municipais. Segundo a empresa responsável pela limpeza da praia (ENGEPPASA), em janeiro de 2007 foram recolhidas mais de 100 toneladas de material em apenas 24 horas (Rorig *et al.*, 2011).

Estudos indicam que as diatomáceas podem servir como fonte para a produção de biodiesel (Usdoe, 2010). Além disso, possuem alta taxa de lipídeos (ácidos graxos poli-insaturados, cerca de 30 % de massa seca), polissacarídeos que apresentam atividade antibacteriana e antifúngica (Borowitzka, 1999), esteróis como 24-metilenocolesterol, brassicasterol e epibrassicasterol (Giner e Wikfors, 2011) e a toxina amnésica ácido domóico, uma das moléculas mais estudada em diatomáceas com produção restrita a algumas espécies do gênero *Pseudo-nitzschia* (Congestri *et al.*, 2007).

Briozoários são conhecidos como musgos marinhos e encontram-se tanto em ambientes de água doce, quanto água salgada, sendo descritas mais de 8000 espécies na literatura. Esses invertebrados têm sido considerados como componentes chave dos ambientes marinhos, por hospedarem comunidades inteiras de micro-organismos e pequenos invertebrados em sua estrutura colonial (Sharp *et al.*, 2007). Entre os

metabólitos produzidos pelas diversas classes de briozoários, bem como suas respectivas atividades biológicas, destacam-se aqueles descritos na tabela abaixo (tabela 1) (Nair, 1993; Já e Zi-rong, 2004; Sharp *et al.*, 2007;).

Tabela 1. Exemplos de metabólitos produzidos por briozoários e suas atividades biológicas.

Metabólitos	Atividade
Nitrofenóis (fidolopina, 1,2-desmetilfidolopina e álcool 3-nitro-4-didroxibenzila)	Não descrita
Íon 2-hidroxietil-dimetilsulfonio	Causa dermatite alérgica em pescadores, podendo ocorrer em casos agudos de vesiculação e inchaço das pernas e braços.
2,5,6-tribromo- <i>N</i> -metilgramina e 2,5,6-tribromo- <i>N</i> -metilindol-3-carbaldeído	Inibição da divisão celular.
G, convolutamidas A–F, convolutaminas A–H, convolutamidinas A–E, convolutindol A e volutamidas A–E	Apresentam citotoxicidade em linhagens celulares de câncer humano; convolutamina H e convolutindol A apresentam atividade nematocida para larvas de <i>Haemonchus contortus</i> , parasita que contamina ovelhas e ruminantes.
Amataspiramidas A–F	Amataspiramidas A e E apresentam atividade citotóxica em linhagens de células cancerígenas e atividade antimicrobiana para <i>Bacillus subtilis</i> contra o fungo <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .
Alternamidas A–D	Alternamidas A e C exibem atividade antibacteriana contra bactérias Gram positivas, incluindo <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>Enterococcus faecium</i> .
Quinonas	Perfragilina A e B, citotóxicas em linhagens de células cancerígenas.
<i>cis</i> - e <i>trans</i> -citral, citronelol, nerol e geraniol	Não descrita.

) flustramines A–E , flustraminóis A e B, flustrabromina, flustramidas A e B, 6-bromo-Mb-metill-Mb-formiltriptamina, 7-bromo-4-(2-etoxietil)quinolona), dihidroflustramina C e seu N-óxido, isoflustramine D e flustrarina B	Flustramina E exibe atividade contra <i>B. subtilis</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Botrytis cinera</i> , enquanto flustramina E é ativa contra <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Serratia marcescens</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
chartelinas A–C; chartelamidas A e B, and metoxideclorochartelina A, securines A e B, securamines A–G	Não descrita.
Briostatinas 1 –20	Briostatina 1 exibe elevada citotoxicidade em células linfocíticas P388 e de melanoma B16.
Tambajinas A-D	As tambajinas A e B apresentam atividade contra <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>Vibrio anguillarum</i> , enquanto as tambajinas C e D são ativas contra <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>V. anguillarum</i> , e <i>Candida albicans</i> .
Eutiroideonas A–C, Pterocelinas A e B	Pterocelinas apresentam atividade antibacteriana para <i>B. subtilis</i> e antifúngica para <i>T. mentagrophytes</i> .
β-carbolinas	1-vinil-8-hidroxi-beta-carbolina- ativa contra células tumorais NCI 60, 1-etil-beta-carbolina ativo contra <i>B. subtilis</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>C. albicans</i> e <i>Cladysporum resinae</i> , harmano, 6-hidroxiharmano e pavetina – ativos contra <i>E. coli</i> e atividade viral para <i>Herpes simplex</i> tipo I.
Esteróis	3b,5a,6b-triidroxisteróis
Pentaporinas A-C	Atividade anti-helmíntica para <i>Trichinella spiralis</i> .
1,8-diidroxiantraquinona	Não descrita.
Briolantratiofeno	Não descrita.
Ceramida-1-sulfato	Inibe a enzima topoisomerase I.

Como pode-se observar, diatomáceas e briozoários são produtores de um grande número de substâncias que apresentam diversidade estrutural e variadas atividades biológicas. Estas características tornaram estes organismos marinhos alvos

interessantes na busca de moléculas que possuam mecanismo de ação diferenciado aos dos fármacos amplamente utilizados no tratamento de patologias para as quais diminuíram sua eficácia com o passar do tempo, ou na busca de moléculas bioativas para patologias existentes, mas para as quais não há tratamento farmacológico eficaz.

Durante as últimas décadas a incidência de infecções causadas por leveduras sofreu um grande aumento. O gênero *Candida* é o principal e o maior causador de infecções fúngicas leveduriformes, nesse caso denominadas candidíases (Cardoso *et al.*, 2004). O gênero *Candida* pertence ao Reino *Fungi*, grupo *Eumycota*, filo *Euteromycota*, classe *Blastomycetes* e faz parte da família *Criptococcaceae*. O fluconazol é o composto triazólico mais conhecido e é uma alternativa terapêutica habitual no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas específicas, mas que tem apresentado limitação contra fungos filamentosos e resistência natural e/ou adquirida em certas espécies de *Candida* (Fica, 2004). Entre as espécies de *Candida*, a resistência aos antifúngicos tem sido um problema crescente, pois muitas das espécies não-*albicans* mais comumente isoladas são menos susceptíveis aos derivados azólicos, o que dificulta o tratamento da candidíase e de outras infecções causadas por leveduras. (Sojakova *et al.*, 2004; Tortorano *et al.*, 2006). *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos e também apresenta casos de resistência adquirida a azólicos em pacientes que foram expostos prolongadamente a estes medicamentos (Gondim *et al.*, 2009). A *C. albicans* é um habitante normal do trato gastrointestinal e regiões mucocutâneas, incluindo boca e vagina (Serracarbassa, 2003). A resistência primária de leveduras a derivados azóis, especialmente ao fluconazol, é um fenômeno que vem emergindo, sendo bem conhecido nas espécies *Candida krusei* e *C. glabrata* (Alves *et al.*, 1997).

A partir da metade do século XX, cresceram significativamente os relatos de infecções por *Candida albicans* e espécies não-*albicans*. De comensal a importante agente de infecções, o gênero *Candida* se converteu em sério problema de saúde pública. Tal transformação deve-se em grande parte ao próprio progresso da medicina,

que ampliou largamente os procedimentos invasivos, violadores das barreiras de proteção natural, que desenvolveu e intensificou o uso de antibióticos de amplo espectro, alteradores da flora normal do organismo humano e que oferece hoje amplas condições para prolongar a vida de pessoas muito debilitadas e suscetíveis a microorganismos oportunistas (Valle *et al.*, 2010).

Existem, aproximadamente, 20 espécies de *Candida* reconhecidamente patogênicas, sendo que a *C. albicans* é a espécie mais frequentemente descrita em casos de infecções hospitalares, bem como em casuísticas cosmopolitas. As espécies mais prevalentes no Brasil e no mundo estão citadas a seguir em ordem decrescente: *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr* e *C. rugosa* (Rodrigues *et al.*, 2011).

O uso prolongado de cateteres e a aplicação de nutrição parenteral são fatores de risco relacionados à transmissão de *C. parapsilosis*. Esta espécie é encontrada frequentemente na pele apresenta alta incidência em recém-nascidos internados em unidades de terapia intensiva. Pacientes neutropênicos, portadores de neoplasias e doenças hematológicas sofrem alta prevalência de casos de candidemia e infecção sistêmica causada por *C. tropicalis*. A espécie *C. glabrata* tem sido frequentemente relatada como causa de infecção hospitalar e é apontada como emergente causa de sepse neonatal e infecção em pacientes idosos. Fungemia por *C. krusei* esta sendo associada a alta mortalidade de pacientes neutropênicos e tornando-se emergente pacientes com neoplasias hematológicas malignas (Valle *et al.*, 2010).

Frente as duas problemáticas abordadas anteriormente, que são a necessidade de obtenção de novas moléculas, capazes de combater o desenvolvimento de infecções oportunistas, e a utilização de um material biológico de grande biomassa que, vem sendo tratado como lixo e onerando cofres públicos com limpeza urbana, os objetivos deste trabalho são a utilização das arribadas de briozoários associados com diatomáceas epibênticas como matéria-prima para obtenção de extratos através da utilização de diferentes processos extrativos, realização de *screening* químico,

determinação de perfil cromatográfico e desenvolvimento de um estudo preliminar de avaliação da atividade antifúngica.

Este trabalho faz parte do projeto intitulado “Florações de diatomáceas epibênticas associadas a briozoários na enseada de Camboriú - SC: origem, fatores causais, características químicas biomassa e ecofisiologia das microalgas envolvidas”, contemplado ao professor Dr. Leonardo Rubi Rörig (UFSC) pelo Edital Universal 2011.

2. Objetivos Específicos

-Obtenção de extrato a partir das arribadas de briozoários (*Membraniporopsis tubigera* (Osburn) e *Electra bellula* (Hincks)) associados com diatomáceas epibênticas (*Amphitetras antediluviana* Ehrenberg e *Biddulphia biddulphiana*) através da extração por fluido supercrítico com dióxido de carbono.

-Obtenção de extrato metanólico através da extração por maceração em banho de ultrassom.

-Realização de *screening* químico para alcalóides, flavonóides, taninos, saponinas e quinonas a partir do extrato metanólico e determinação do teor de compostos fenólicos totais por espectrofotometria.

-Obtenção do perfil cromatográfico dos extratos através de cromatografia em camada delgada, utilizando diferentes sistemas eluentes.

-Realização de ensaio preliminar de atividade antifúngica dos extratos obtidos pelos diferentes métodos extrativos frente a cinco espécies de leveduras oportunistas do gênero *Candida*.

3. Materiais e Métodos

3.1. Material Biológico

Florações de diatomáceas epibênticas (*Amphitetras antediluviana* Ehrenberg e *Biddulphia biddulphiana*) associadas a briozoários (*Membraniporopsis tubigera* (Osburn) e *Electra bellula* (Hincks)), (Figura 1), foram coletadas na enseada de Camboriú em Balneário Camboriú, Estado de Santa Catarina (Brasil), em 2011, e identificadas pela equipe do professor Dr. Leonardo Rubi Rörig (Universidade Federal de Santa Catarina – SC/Brasil). O material é imediatamente levado ao laboratório, lavado e liofilizado.



Figura 1: Material marinho utilizado para a obtenção dos diferentes extratos.

3.2. Obtenção dos extratos

3.2.1 Extração por fluido supercrítico

A extração por fluido supercrítico foi realizada em um Equipamento piloto automatizado produzido por Cassel e colaboradores (2007), utilizando-se dióxido de carbono como solvente. O material biológico foi acondicionado no vaso de extração (50 g de peso seco) e a extração foi conduzida à temperatura constante de 40 °C e pressão de 90 bar.

3.2.2. Extração por maceração

O material biológico, previamente utilizado na extração por fluido supercrítico, foi submetido à extração sequencial por maceração em banho de ultrassom. Para tanto, cerca de 40 g material foram extraídos 4 vezes com 100 ml de metanol, em banho de

ultrassom, durante 10 minutos. Em seguida, o material foi filtrado com auxílio de uma bomba de pressão negativa e os filtrados foram reunidos e levados à secura em evaporador rotatório.

3.3. *Screening* químico

O extrato obtido por maceração em metanol (EM) foi submetido a *screening* químico para presença de alcalóides, flavonóides, saponinas, taninos e quinonas, conforme descrito por Harborne (1998) e Costa (2002).

3.3.1 Presença de Alcalóides

Quantidade suficiente do extrato EM seco foi transferido para um tubo de ensaio pequeno, retomado com solução de ácido clorídrico (HCl) 10% e levemente aquecido. Após, uma pequena alíquota da solução ácida foi transferida para dois vidros de relógio e foram adicionados uma gota do reagente de Meyer, e 1 gota do reagente de Dragendorf, individualmente. A formação de precipitado indica a presença de alcalóide.

3.3.2 Presença de flavonóides, saponinas, taninos e quinonas

Quantidade suficiente do extrato EM seco foi transferida para um tubo de ensaio pequeno, sendo este retomado com água destilada e levemente aquecido. Após aquecimento a solução foi filtrada e dividida em quatro porções que foram utilizadas para determinar a presença de flavonóides, saponinas, taninos e quinonas.

3.3.2.1 Flavonóides

A solução aquosa foi transferida para um funil de separação e extraída quatro vezes com butanol. As fases butanólicas foram transferidas para uma cápsula de porcelana e evaporadas até a secura. Após, o resíduo foi retomado com metanol, transferido para tubo de ensaio pequeno e acidificado com HCl concentrado. Em seguida foi adicionada uma pequena quantidade de magnésio em pó. A solução foi brevemente agitada e mantida em repouso alguns minutos. A formação de cor amarelada a roxo indica presença de flavonóides.

3.3.2.2. Saponinas

Para presença de saponinas, a solução aquosa foi transferida para tubo de ensaio e submetida à agitação. A formação de espuma indica a presença de saponinas.

3.3.2.3. Taninos

Para determinar a presença de taninos, a solução aquosa foi vertida sobre uma solução de gelatina a 1%, agitada e mantida em repouso por alguns minutos. A formação de precipitado é indicativa da presença de taninos.

3.3.2.4 Quinonas

À solução aquosa foi adicionada 1 gota da solução de hidróxido de potássio (KOH) 10%. O desenvolvimento de coloração indica presença de quinonas.

3.4 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

Para a determinação do teor de compostos fenólicos totais foi utilizado o método colorimétrico proposto por Singleton e Rossi (1965), com algumas modificações. A técnica consiste na reação de oxidação-redução dos compostos fenólicos presentes na amostra frente ao reagente Folin-Ciocalteu, que é formado por uma solução de íons poliméricos complexos formados a partir dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, levando ao desenvolvimento de coloração azul nas soluções. Para tanto 100, 200 e 400 µl de uma solução estoque 10mg/ml, obtida do extrato metanólico seco (EM), foram submetidos a reação com 5 ml de reagente de Folin-Ciocalteu 0,2 N e a reação foi neutralizada com volumes variáveis de solução saturada de carbonato de sódio (7,5%), necessário para completar o volume final de reação em 10 ml. Decorridos 60 minutos de incubação, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorvância das soluções foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 765 nm. A quantificação foi baseada em uma curva padrão de quercetina, preparada em metanol, nas seguintes concentrações 0; 0,65; 1,30; 1,95; 3,25 e 6,5 µg/ml. Os resultados foram expressos como equivalentes de quercetina (QE / g: miligramas de quercetina por grama de extrato seco), utilizando para o cálculo a seguinte equação: $C = c V/m$, onde: C é o conteúdo total de fenólicos presente na amostra (mg de quercetina por grama de

extrato seco); c é a concentração de quercetina estabelecida através da curva padrão (mg/ml); V é o volume final da reação (ml); e m é a massa de extrato utilizado na leitura de absorvância (g) (Miliauskas *et al.*, 2004).

3.5 Perfil químico dos extratos

Os extratos obtidos do material biológico por fluido supercrítico (EFS) e por maceração com metanol em banho de ultrassom (EM) foram submetidos a cromatografia em camada delgada (CCD) para avaliação de seus perfis químicos. Os extratos foram retomados em metanol e utilizou-se cromatoplasas revestidas com gel de sílica GF₂₅₄ com os seguintes sistemas eluentes: (a) diclorometano (100); (b) diclorometano:metanol (99:1, v/v), (c) hexano:diclorometano (1:1, v/v); e (d) acetato de etila:metanol:água destilada (100:13,5:10, v/v/v). Após secagem a temperatura ambiente, as cromatoplasas foram observadas sob luz ultravioleta (254 e 365 nm) e aspergidas com reagente cromogênico anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento (sistemas eluentes (a), (b) e (c)) (Harborne, 1998), e com reagente Natural (sistema eluente (d)) (Brasseur e Angenot, 1986)

3.6. Atividade Antifúngica

A determinação do teste de susceptibilidade antifúngica aos extratos EFS e EM foi realizado frente a 5 tipos de leveduras oportunistas do gênero *Candida*. Inicialmente foi realizado um screening para verificar quais espécies seriam sensíveis aos extratos. As leveduras testadas foram *Candida albicans* (CAL02), *C. krusei* (CK03), *C. parapsilosis* (CP04; RL), *C. glabrata* (CG10), *C. tropicalis* (CT05). Inóculos de todas as leveduras isoladas foram preparados de acordo com Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI, 2008) utilizando-se solução a 1% de dimetilsulfóxido (DMSO - Merck, Darmstadt, Germany) para solubilizar as amostras. O *screening* foi realizado pelo método de microdiluição em meio Sabouraud com cloranfenicol. Fluconazol foi utilizado como controle negativo da inibição de crescimento em concentração de 8 µg/ml.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição de acordo com o documento M27-A3 (CLSI 2008), com RPMI-MOPS

(RPMI 1640 médio contendo L-glutamina, sem bicarbonato de sódio - Sigma-Aldrich Co, St Louis, USA - tampão pH 7.0 com 0.165 mol/L MOPS tampão –Sigma). As concentrações dos extratos testados foram entre 1.95 e 500 µg/ml e alíquotas de 100 µL foram inoculadas em placa de fundo plano de microtitulação de 96 poços. CIM foi definida como a menor concentração das amostras em que o micro-organismo testado não demonstrou crescimento visível (fungistático). As leveduras averiguadas nesta fase foram *C. albicans* (CAL02; CAL17; ATCC24433; ATCC10231; ATCC18804) e *C. parapsilosis* (3D03; 3D02; RL07; RL20; CP06) e todos os experimentos foram realizados em triplicata.

A avaliação da atividade fungicida também foi avaliada. Alíquotas de CIM e do controle positivo (10 µl) foram transferidas para placas contendo Sabouraud-dextrose agar (Difco) e incubadas a 32 °C durante 48 horas. Decorridos o tempo de incubação, a observação do crescimento de microorganismos indica atividade fungistática, enquanto ausência de crescimento significa atividade fungicida.

As leveduras clínicas utilizadas tanto para o procedimento de *screening* como de CIM foram identificadas pelo sistema automatizado Vitek Yeast Biochemical Card® (BioMerieux Vitek,. Hazelwood, Mo.) .

4. Resultados e Discussão

O extrato obtido a partir das arribadas de briozoários *Membraniporopsis tubigera* (Osburn) e *Electra bellula* (Hincks) associados com diatomáceas epibênticas *Amphitetras antediluviana* Ehrenberg e *Biddulphia biddulphiana* através da extração por fluido supercrítico com dióxido de carbono teve rendimento muito baixo, de modo que alguns ensaios não puderam ser realizados a partir deste extrato. Esse resultado indica que a amostra analisada apresenta baixos teores de compostos lipofílicos de baixo peso molecular, grupo de substâncias obtidas nas condições de temperatura e pressão utilizadas neste trabalho.

O extrato metanólico obtido através da extração por maceração em banho de ultrassom teve rendimento de 2,6% aproximadamente, gerando quantidade suficiente de amostra para que todos os ensaios previstos fossem realizados. Foi realizado *screening* químico para flavonóides, alcalóides, taninos, saponinas e quinonas nas frações aquosas, obtidas a partir do extrato metanólico (EM).

A reação para detecção de alcalóides com reagentes gerais apresentou resultado negativo, visto que a solução permaneceu límpida, não havendo formação de precipitado com a adição dos reagentes Mayer e Dragendorf. Alcalóides formam sais complexos com compostos de mercúrio, ouro, platina e outros metais. Esses sais são usualmente obtidos na forma de precipitados a partir da reação com diferentes reagentes, como reagente Mayer (iodeto de potássio e cloreto de mercúrio) Dragendorf (iodeto de potássio e subnitrito de bismuto) Wagner ou Bouchardat (solução de iodo e iodeto de potássio, Bertrand (solução de ácido sílico-tungstico) e Hager (solução saturada de ácido pícrico). Na presença desses reagentes, os alcalóides formam precipitados amorfos ou cristalinos, de coloração variável, do branco ao marrom-alaranjado (Henriques *et al.*, 2007). Os resultados obtidos demonstraram a não formação de precipitados, indicando ausência de alcalóides.

Embora fosse esperado encontrar alcalóides na floração, visto o relato de sua presença em briozoários, sua ausência talvez possa ser justificada pela proporção de cada organismo que a compõem. A arribada utilizada para a obtenção dos extratos é composta por quatro organismos pertencentes a filos e gêneros diferentes em proporções desconhecidas até o momento, portanto é possível que a proporção de briozoários seja ínfima perante as diatomáceas, acarretando em um extrato com baixa concentração de alcalóides. Além disso, deve-se ressaltar que a técnica utilizada não apresenta sensibilidade para baixas concentrações, sendo indicado a utilização de técnicas mais refinadas para comprovar ausência destes compostos.

Os ensaios para saponinas, taninos e quinonas apresentaram resultados negativos, visto a não formação de espuma, ausência de turvação e ausência de coloração, respectivamente. Não há dados na literatura que relatem a presença deste tipo de compostos nas espécies presentes na arribada.

Todas as placas, eluídas nos diferentes sistemas eluentes (a) diclorometano (100); (b) diclorometano:metanol (99:1, v/v), (c) hexano:diclorometano (1:1, v/v) e (d) acetato de etila:metanol:água destilada (100:13,5:10, v/v/v), foram observadas sob luz UV em 254 e 365 nm antes da aspensão do agente revelador. O perfil cromatográfico do ESC nos sistemas eluentes (a), (b) e (c) demonstrou a presença de uma mancha de coloração azul fluorescente, quando observado sob luz UV 365 nm. Após aspensão do reagente cromogênico anisaldeído, seguido de aquecimento observou-se o aparecimento de três manchas com coloração marrom nas cromatoplas submetidas aos eluente (a) e (b), enquanto no eluente (c) foi observada uma única mancha no ponto de aplicação. As manchas apresentaram pequenas diferenças de R_f entre os sistemas (a) e (b), sendo o segundo mais polar, conseqüentemente resultando em R_f maiores. O anisaldeído é um reagente universal para detecção de uma ampla gama de produtos naturais e sintéticos, que produz manchas de coloração variada conforme o tipo de substância, temperatura de tempo de aquecimento. Em nosso resultado todas as manchas apresentaram a mesma coloração.

O EM foi submetido a eluição no sistema cromatográfico (d) acetato de etila:metanol:água destilada (100:13,5:10, v/v/v), seguido de aspensão com reagente Natural e observação sob luz UV. Foram observadas manchas de coloração vermelho-fluorescente sob comprimento de onda de 365 nm, antes e após a aspensão do reativo. Na literatura encontra-se uma ampla gama de sistemas cromatográficos que podem ser utilizados na detecção de flavonóides. De modo geral os sistemas apresentam alta polaridade, pois possuem água em sua composição, e a detecção das manchas mostra-se com coloração variada conforme o tipo de estrutura química das substâncias presentes. De modo geral, flavonas que possuem OH na posição 4' mostram cor verde fluorescente, e flavonóis com OH em C-3, aparecem na cor castanho-esverdeada. Tons amarelo e laranja, respectivamente, sugerem a presença de hidroxilas nas posições 3' e 4' em flavonas e flavonóis (Brasseur e Angenot, 1986). Nossos resultados demonstraram que o EM não possui flavonóides, pois nenhuma mancha característica desta classe de compostos foi visualizada. Este dado corrobora o dado preliminar no *screening* químico no qual não houve desenvolvimento de coloração frente à reação com magnésio em meio ácido. Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja biossíntese não ocorre na espécie humana (LOPES *et al.*, 2000). É um grande grupo da classe dos polifenóis e está presente em diversas espécies do reino vegetal. Os flavonóides ocorrem como agliconas, glicosídeos e derivados metilados (Tapas *et al.*, 2008) e dividem-se em flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas, diidroflavonóis e chalconas (Cook e Samman, 1996). Entre os fármacos existentes, há um número enorme de compostos contendo esqueleto relacionado com flavonóides (Kinoshita *et al.*, 2005). Embora seja um grupo fortemente presente em plantas, os flavonóides não foram descritos até o momento para o ambiente marinho.

Os resultados obtidos através do método de Folin-Ciocalteu para a quantificação de compostos fenólicos presentes no extrato metanólico estão apresentados na tabela abaixo (tabela 2). Os valores correspondem a uma média de duplicatas obtidas com base na curva padrão de quercetina e estão expressos em equivalente de miligramas de quercetina por grama de extrato seco (EQ/g). A curva

padrão ($y = 0,1481x - 0,0379$) mostrou-se linear na faixa de concentração empregada apresentando coeficiente de determinação $R^2 = 0,9986$.

Tabela 2: Teor de compostos fenólicos totais expressos em equivalente de miligramas de quercetina por grama de extrato seco.

Volume amostra (μ l)	Absorbância amostra	Concentração na amostra (μ g/ml)	Teor de compostos fenólicos em quercetina (EQ/g)
200	0,298	2,268	11,34
400	0,555	4,003	10,01

Duas alíquotas da amostra (200 e 400 μ l) foram submetidas a reação com Folin-Ciocalteu. Durante inspeção visual, observou-se a formação de coloração azulada na solução em tonalidade crescente, indicando maior concentração de compostos fenólicos na alíquota de maior volume. Os dados de absorbância refletiram o observado, nos quais os valores obtidos, em termos de absorbância e concentração de compostos fenólicos em (μ g/ml), foram quase duplicados.

Os polifenóis apresentam uma grande diversidade estrutural, possuindo pelo menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (Carvalho *et al.*, 2007). São amplamente distribuídos no reino vegetal, podendo estar presente em amplas concentrações em determinados gêneros e espécies (Harborne, 1998), porém raramente encontrados em bactérias, fungos e algas (Carvalho *et al.*, 2007). Podem ser classificados segundo seu esqueleto principal, ou conforme sua ocorrência no reino vegetal, como derivados de ácidos benzóicos e de ácidos cinâmicos, cumarinas, flavonóides, e derivados de polimerização (taninos e ligninas). Através do método de Folin-Ciocalteu foi demonstrado a presença de compostos fenólicos no EM, porém outros procedimentos são necessários para tentar determinar quais compostos estão presentes, pois esta técnica permite somente determinar uma estimativa do teor de polifenóis, visto que diferentes compostos fenólicos apresentam diferentes respostas de reação (Singleton e Rossi, 1965). A resposta molar deste método é aproximadamente proporcional ao número de grupamentos hidroxila presentes na amostra, mas a capacidade redutora é aumentada

quando duas hidroxilas fenólicas encontram-se em orientação *orto* ou *para* na molécula (Frankel *et al.*, 1995).

Nas últimas décadas, houve um crescente aumento na utilização de extratos fitoterápicos como auxiliar no tratamento de infecções orais devido a suas propriedades antimicrobianas e antiinflamatórias (Molina *et al.*, 2008). Na presente trabalho, o extrato metanólico obtido da arribada apresentou importante atividade fungistática para as cepas de *C. albicans* avaliadas.

Das 6 cepas de *Candida* testadas, a leitura do *screening* em 24 horas mostrou atividade fungistática para ambos os extratos testados (EFS e EM) contra as cepas *C. albicans* e *C. parapsilosis*, demonstrado pelo pouco crescimento em comparação ao controle positivo. Após 48 horas foi realizada nova leitura, onde pode ser constatada a precipitação dos extratos, impedindo que pudesse ser feita comparação visual com os controles. Estes resultados conduziram a execução do ensaio para Concentração Inibitória Mínima (CIM), para verificar qual a mínima concentração do extrato é capaz de inibir cada uma das duas espécies sensíveis no *screening*.

Para a execução do CIM optou-se pelo uso apenas do extrato por maceração, pois a quantidade de extrato obtido por fluido supercrítico não era suficiente. Foram testadas 5 cepas de *C. albicans* (CAL 02, CAL 17, ATCC 24433, ATCC 10231) e 5 cepas de *C. parapsilosis* (3D 02, 3D 03, RL 07, RL 20, CP 06). Após incubação a 32 °C, a leitura em 24 horas mostrou que o extrato teve efeito sobre 4 cepas, diminuindo seu crescimento em relação ao controle positivo para ATCC18804; CAL04; ATCC24433 e ATCC10231, conforme representado na tabela 3. Esta redução de crescimento demonstra que o extrato metanólico obtido da arribada apresentou efeito fungistático para cepas de *C. albicans*, sendo que a CIM foi de, no mínimo, 125 µg/ml para 50% das cepas avaliadas. Na cepa BD 02 houve crescimento maior da levedura em relação ao controle positivo, que pode caracterizar um efeito paradoxal (não inibe crescimento em concentrações muito altas). Os resultados mostram que o extrato tem ação seletiva contra *Candida albicans*. A ausência de resposta frente a *Candida parapsilosis* elimina

a possibilidade de avaliar-se a ação do extrato como antibiofilme, visto que dentre as espécies estudadas, esta apresenta maior capacidade formadora de biofilmes (Kuhn, 2004) especialmente presentes em cateteres de uso hospitalar (Wong, 2000) e representam fonte importante de contaminação. *C. parapsilosis* é cada vez mais responsável por surtos de infecções hospitalares, e as mãos dos profissionais de saúde pode ser a fonte predominante de contaminação ambiental (Lupetti *et al*, 2002).

Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima 50 e 90 para as 10 cepas testadas.

Espécies	Cepas	CIM	CIM 50	CIM 90
<i>Candida albicans</i>	CAL 02	62,5		
	CAL 17	>500		
	ATCC 24433	62,4	125	500
	ATCC 10231	500		
	ATCC 18804	125		
<i>Candida parapsilosis</i>	3D 02	>500		
	3D 03	>500		
	RL 07	>500	>500	>500
	RL 20	>500		
	CP 06	>500		

O desenho esquemático representado na figura 2 apresenta o perfil das colônias formadas pelas cepas de *C. albicans* (cepa 1 e cepa 3) e cepas *C. parapsilosis* (cepa 2). As cepas de *C. parapsilosis* não foram inibidas nas concentrações testadas apresentando crescimento muito semelhante ao controle positivo, como pode ser observado no esquema da cepa 2. Das 5 cepas de *C. albicans* testadas, 3 apresentaram perfil semelhante ao das cepas 1 e 3 ilustradas na figura 2.

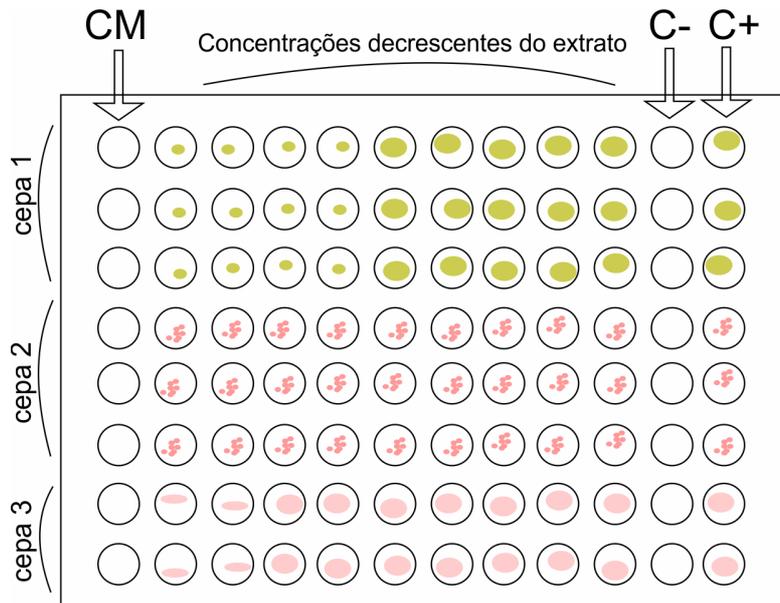


Figura 2: Desenho esquemático de uma placa de 96 poços representando o perfil de crescimento das cepas quando comparado com CM (apenas meio de cultura), C⁻ (controle negativo = cepa + meio de cultura + agente antifúngico padrão) e C⁺ (controle positivo = meio de cultura + cepa).

Por tratar-se de uma associação de briozoários e diatomáceas, não há nenhum dado na literatura que avalie a atividade antifúngica para um extrato semelhante ao estudado no presente trabalho. De acordo com ensaios realizados por outros pesquisadores para outras espécies de briozoários e algas, já foi relatada atividade antifúngica em extratos isolados. Não é possível atribuir aos compostos fenólicos dosados em quercetina a atividade fungistática encontrada. São necessários mais dados químicos para que se possa iniciar uma discussão relacionando a estrutura química dos componentes com a atividade do extrato. Seria interessante verificar a presença de polissacarídeos e esteróis que possam ser provenientes das diatomáceas, já que em outros trabalhos foram descritas atividades relacionadas a estes compostos (Borowitzka, 1999; Giner e Wikfors, 2011; Kim e Van Ta, 2011). A busca de novas substâncias com atividade farmacológica, a partir de fontes naturais têm mostrado dados interessantes frente a leveduras do gênero *Candida*. Inúmeros estudos vêm sendo realizados (Alves, 2000; Hammer *et al.*, 2000; Navas *et al.*, 2006; Carreto, 2007; Menezes *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2009; Lubian *et al.*, 2010) mostrando a grande demanda por novas fontes de obtenção de compostos com atividade antifúngica,

especialmente a partir de extratos naturais. Almeida e colaboradores (2011) fizeram uma revisão do potencial farmacológico de espécies da alga marinha do gênero *Gracilaria* e encontraram atividade contra *Candida albicans* do extrato metanólico de *G. debilis*, *G. domingensis* e *G. sjoestedii*. Em estudo com duas espécies de algas e nove espécies de esponjas coletadas na costa da Índia, extratos metanólicos das algas *Sigmatocia carnosa* e *Chrotella australiensis* apresentaram fraca atividade e boa atividade, respectivamente, frente a cepas clínicas de *Candida albicans* (Rodrigues *et al.*, 2004). Avaliando a CIM de extratos obtidos das algas *Padina pavonica*, *Rhodomela confervoides* e *Ulva lactuca*, pesquisadores demonstraram atividade frente a *Candida albicans* (Saidani *et al.*, 2012). Extratos da alga vermelha, *Laurencia papillosa*, também mostraram significativa atividade antifúngica contra *Candida albicans* (Alarif *et al.*, 2011). Khaled e colaboradores (2012) investigaram atividade antifúngica e antioxidante de extratos de *Padina pavonica* e *Sargassum vulgare* frente *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*. O extrato da alga *Padina pavonica* mostrou atividade significativa contra *C. glabrata* e *C. krusei*. Algas obtidas da praia Riacho Doce, Alagoas (Brasil) foram avaliadas quanto a atividade antifúngica utilizando-se diferentes extratos frente a fungos dermatófitos *Trichophyton rubrum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *M. gypseum* e leveduras *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. guilliermondi* and *C. parapsilosis*. Os extratos mais apolares, principalmente o etanólico mostraram a melhor taxa de inibição para o crescimento de fungos (Guedes *et al.*, 2012). Conforme demonstrado, pode-se verificar que o ambiente marinho é uma fonte potencial para busca de novos compostos capazes de inibir o crescimento de leveduras oportunistas. Os ensaios *in vitro* têm revelado que extratos obtidos de diferentes espécies apresentam atividade antifúngica potencial, no entanto ensaios de toxicidade e experimentos *in vivo* devem ser realizados antes que se possa projetar uso clínico destas substâncias.

5. Conclusões

Os métodos de extração utilizados, extração por fluido supercrítico e extração por maceração em banho de ultrassom foram adequados para extração de produtos do material biológico composto pela associação de briozoários (*Membraniporopsis tubigera* (Osburn), *Electra bellula* (Hincks)) e diatomáceas (*Amphitetras antediluviana* Ehrenberg e *Biddulphia biddulphiana* (Smith)).

O *screening* químico realizado para presença de alcalóides, flavonóides, saponinas, taninos e quinonas apresentou indicativos de ausências destas classes de substâncias no extrato metanólico, pois todas as reações mostraram resultados negativos.

Os diferentes sistemas cromatográficos utilizados para a análise dos extratos obtidos pelos métodos de extração empregados, permitiram a visualização de manchas em ambos extratos. O extrato obtido por fluido supercrítico mostrou a presença de uma mancha de coloração azul fluorescente, sob visualização de luz ultravioleta, e três manchas de coloração marrom, após aspensão do revelador. O extrato metanólico foi submetido a sistema cromatográfico específico para determinação de flavonóides. Foram observadas manchas de coloração vermelha antes e depois da aspensão do agente revelador, porém esta coloração não é comum para flavonóides, indicando a presença de produtos diferentes.

Foi possível determinar a presença de compostos fenólicos no extrato metanólico através do método espectrofotométrico aplicado. O teor de compostos fenólicos totais obtidos foi de 10,68 mg de quercetina/grama de extrato seco.

O extrato metanólico a obtido através da extração por maceração em banho de ultrassom apresentou atividade fungistática seletiva frente às cepas de *Candida albicans* com CIM 50 de 125 µg/ml, no entanto, não apresentou atividade frente as

outras espécies *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, indicando que não pode ser utilizado como antibiofilme.

Perspectivas:

- Obtenção de maior quantidade de amostra do material marinho para realização de outros ensaios que complementem a o *screening* químico, verificando principalmente a presença de esteróis e polissacarídeos;
- Determinar qual ou quais são os compostos fenólicos presentes no material;
- Testar atividade do extrato frente a fungos filamentosos.

Referências

- ALARIF, W.M.; AL-LIHAIBI, S.S.; ABDEL-LATEFF, A.; AYYAD, S.E. New antifungal cholestane and aldehyde derivatives from the red alga *Laurencia papillosa*. **Natural Product Communications**. v. 6, p.1821-1824, 2011.
- ALMEIDA, C.L.F.; FALCÃO, H.S.; LIMA, G.R.M.; MONTENEGRO, C.A.; LIRA, N.S.; FILHO, P.F.A.; RODRIGUES, L.C.; SOUZA, M.F.V.; FILHO, J.M.B.; BATISTA, L.M. Bioactivities from Marine Algae of the Genus *Gracilaria*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 4550-4573, 2011.
- ALVES, SH, LOPES, J. O; COSTA, J.M.; KLOCK, C. Development of secondary resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* isolated from a patient with AIDS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.39, p.359-362, 1997.
- ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.; SMÂNIA Jr .A.; ZANI, C.L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, p.367-373, 2000.
- BOROWITZKA, M.A.. Pharmaceuticals and agrochemicals from microalgae. In: Cohen, Z. [Ed.] **Chemicals from Microalgae**. London: Taylor And Francis, p.313-352, 1999.
- BRASSEUR, T.; ANGENOT, L.. Le mélange diphénylborate d'aminoéthanol – PEG 400: Un intéressant réactif de révélation des flavonoïdes. **Journal of Chromatography**, v.351, p. 351-355, 1986.
- CARDOSO, B. C. **Efeito de antifúngicos em suspensões de biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis***. (Dissertação de Mestrado em Biotecnologia – Engenharia de Bioprocessos). Escola de Engenharia e Universidade do Minho, Portugal. 2004.
- CARRETO, C. F. P. **Atividade antimicrobiana de *Mentha piperita* L. sobre leveduras do gênero *Candida*** (Dissertação de Mestrado).Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2007.
- CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos, simples e heterosídicos. IN: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/Editora UFSC, 2007. p.765-792.
- CASSEL, E.; VARGAS, R.M.F.; BEDINOT, C. Unidad piloto de extracción supercrítica automatizada. IN: CASSEL, E.; VARGAS, R.M.F. **Aplicaciones Industriales de los Taninos Vegetales**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. v.1, p. 95–102.

CONGESTRI, R.; POLIZZANO, S.; ALBERTANO, P. Toxic Pseudo-nitzschia Populations from the Middle Tyrrhenian Sea. In: Evangelista, V.; Barsanti, L.; Gualtieri, P.; Frassanito, A.M.; Passarelli, V. [Eds.]. **Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection**. Dordrecht: Springer. p. 197-210, 2007.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources – review. **The Journal of Nutrition Biochemistry**. v. 7, n. 1, p. 66-76, 1996.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 6.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. 3v.

FICA, C.A. Tratamiento de infecciones fúngicas sistêmicas primeira parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. **Revista chilena de infectología**. v.21, p.:26-38, 2004

FRANKEL, E. N; WATERHOUSE, A. L; TEISSEDE, P.L. Principal phytochemicals in selected California wines and threirs antioxidante activity in inhibiting oxidation of humam low-density lipoproteins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 43, p. 890-894, 1995.

GINER, J.L.; WIKFORS, G.H. “Dinoflagellate Sterols” in marine diatoms. **Phytochemistry**, v.72, p.1896–1901, 2011.

GONDIM, B.A.; BRITO, D.D.; BRITO, C.S.; DOLINGER, E.J.O.; ABDALLAHS, V.O.S.; FILHO, P.P.G. Fatores de risco para colonização e sepse por *Candida albicans* e *Candida* não albicans em neonatos críticos. **Revista Arquivos de Ciências da Saúde**, v.16, n.3, p.105-109, 2009.

GORDON, D.P.; RAMALHO, R.V.; TAYLOR, P.D. An unreported invasive bryozoan that can affect livelihoods – *Membraniporopsis tubigera* in New Zealand and Brazil. **Bulletin of Marine Science**, v.78(2), p. 331-442, 2006.

GUEDES, E.A.C.; ARAÚJO, M.A.S.; SOUZA, A.K.P.; SOUZA, L.I.O.; BARROS, L.D.; MARANHÃO, F.C.A.; SANT’ANA, A.E.G. Antifungal Activities of Different Extracts of Marine Macroalgae Against Dermatophytes and *Candida* Species. **Mycopathologia**, 2012.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ tube formation by *Candida albicans*. **Medical Mycology**;v.38, n.5, p.355-62, 2000.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis**. London: Chapman & Hall. Third edition, 1998.

HENRIQUE, A. T.; LIMBERGER, R. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. H R. Alcalóides:generalidades e aspectos básicos. IN: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao**

Medicamento. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/UFSC, 2007. p.765-792

JHA, R. K.; ZI-RONG, X. Biomedical Compounds from Marine organisms. **Marine Drugs**, v.2, p. 123-146, 2004.

KHALED, N.; HIBA, M; ASMA, C. Antioxidant and Antifungal activities of *Padina pavonica* and *Sargassum vulgare* from the Lebanese Mediterranean Coast. **Advances in Environmental Biology**, v. 6, n.1, p. 42-48, 2012.

KIM, S.K.; VAN TA, Q. Potential beneficial effects of marine algal sterols on human health. **Advances in food and nutrition research**, v. 64, p.191- 198, 2011.

KINOSHITA, T.; LEPP, Z.; CHUMAN, H. Construction of a novel database for flavonoids. **The Journal of Medical Investigation**, v.52, p.291-292, 2005.

KUHN, D.M.; MUKHERJEE, P.K.; CHANDRA, J.; GHANNOUM, M.A.; CLARK, T.A.; JAHHEH, R.A.; EARNOCK, D.W.; PUJOL, C.; SOLL, D.R. *Candida parapsilosis* Characterization in an Outbreak Setting. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, 2004.

LUBIAN, C.T.; TEIXEIRA, J.M.; LUND, R.G.; NASCENTE, P.S.; DEL PINO, F.A.B. Atividade antifúngica do extrato aquoso de *Arctium minus* (Hill) Bernh. (Asteraceae) sobre espécies orais de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.12, n.2, p.157-162, 2010.

LUPETTI, A.; TAVANTI, A.; DAVINI, P.; GHELARDI, E.; CORSINI, V.; MERUSI, I.; *et al.* Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**. v.40, p.2363–9, 2002.

MENEZES, T. O. A.; ALVES, A.C.B.A.; VIEIRA, J.M.S.; MENEZES, S.A.F.; ALVES, B.P.; MENDONÇA, L.C.V. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região Amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**. v.38, n.3, p.184-91, 2009.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v.85, p. 231-237, 2004.

MOLINA, F.P; MAJEWSKI, M.; PERRELA, F. A.; OLIVEIRA, L. D.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A.O.C. Própolis, sálvia, calêndula e mamona – atividade antifúngica de extratos naturais sobre cepas de *Candida albicans*. **Ciência odontológica brasileira**, v.11, n.2, p 86-93, 2008.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

- NAIR, P.S.; RHADHAKRISHNAN. Antibacterial activity of the bryozoan *Electra bellula* (Hincks). **Indian Journal of Medical Research**, v. 97, p.85-86, 1993.
- NAVAS, E.A.F.A; CARRETTO, C.F.P.; PARADILLA, T.C.; OLIVEIRA, L.D.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C. Efeitos do chá de tomilho sobre a aderência *in vitro* de *Streptococcus mutans* ao esmalte dentário e *Candida albicans* à resina acrílica **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 36, n. 3, p. 281-286, 2007.
- RAMALHO, L.V.; DIEHL, F.L. Primeiro registro do briozoário *Membranioporopsis tubigera* (Osburn, 1940) (Cheilostomatida) em Balneário Camboriú, SC, Brasil. **Anais do XII Congresso Latino-americano de Ciências do Mar**, Florianópolis, p.1-3, 2007.
- ROCHA, R.M.; D'HONDT, J. L.. **Coleção Biodiversidade do Estado de São Paulo: Invertebrados Marinhos**. São Paulo: Programa Biota/FAPESP, Vol.3,1999. <http://www.biota.org.br/pdf/v3cap44.pdf>. Acesso em 09/06/2012.
- RODRIGUES, D.; MEZZARI, A.; MENEGHELLO, A.F. Candidúria: Revisão atual. **Revista Brasileira em promoção da Saúde**, v. 24, n.2, p.142-150, 2011.
- RODRIGUES, E.; TILVI, S.C.G.; NAIK. Antimicrobial activity of marine organisms collected off the coast of South East Índia. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 309, p.121– 127, 2004.
- RODRIGUES, M. M.; SANTOS, S. S. F.; CLARO, C. A. A.; SCHERMA, A. P. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica do *Allium sativum* sobre cepas de *Candida albicans* isoladas de cavidade bucal. **Periodontia**, v.19, n.2, p.124-132, 2009.
- RÖRIG, L.R.; PEZZUTO, P.R.; FILHO, J.P.; POSER, G.L.; TAMANAHA, M.S.; OTTONELLI, M. **Florações de diatomáceas epibênticas associadas a briozoários na enseada de Camboriú - SC: origem, fatores causais, características químicas da biomassa e ecofisiologia das microalgas envolvidas**. 2011
- SAIDANI, K.; BEDJOU, F.; BENABDESSELAM, F.; TOUATI, N. Antifungal activity of methanolic extracts of four Algerian marine algae species. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 39, p. 9496-9500, 2012.
- SERRACARBASSA, P. D.; DOTTO, P.. *Endoftalmite por Candida albicans*. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.66, p.701-7, 2003.
- SHARP, J.H.; WINSON, M. K.; PORTER, J.S. Bryozoan metabolites: an ecological perspective. **Natural Product Reports**, v.24, p. 659-673, 2007.
- SINGLETON, V.L; ROSSI, J.A.J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-5,1965.

SOJAKOVA, M.; LIPTAJOVA, D.; BOROVSKY, M.; SUBIK, J. Fluconazole and itraconazole susceptibility of vaginal yeast isolates from Slovakia. **Mycopathologia**, v.157, p.163-169, 2004.

TAPAS, A. R; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v..7, n.3, p.1089-1099, 2008.

TORTORANO, A.M.; KIBBLER, C.; PEMAN, J.; BERNHARDT, H.; KLINGSPOR, L.; GRILLOF, R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.27: 359-366, 2006.

USDOE. 2010. **National Algal Biofuels Technology Roadmap**. U.S. Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Biomass Program. 124p.

VALLE, G. C; RENDE, J. C.; OKURA, M. H. Estudo da Incidência do Gênero *Candida* em Hospital Público Universitário. **News Lab**, 10 ed, p. 202-222, 2010.

WONG, P.N.; MAK, S.K.; LO, K.Y.; TONG, G.M.; WONG, A.K. A retrospective study of seven cases of *Candida parapsilosis* peritonitis in CAPD patients: the therapeutic implications. **Peritoneal Dialysis International**, v. 20, p. 76–79, 2000.