

Ana Maria Pereira Barreto Amorim

Estudo de antioxidantes, potencial bioativo e composição química de *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora*, *Sargassum cymosum* (Ochrophyta) e *Codium isthmocladum* (Chlorophyta)

Study of antioxidants, bioactive potential and chemical composition of *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora*, *Sargassum cymosum* (Ochrophyta) and *Codium isthmocladum* (Chlorophyta)

São Paulo

2018



Ana Maria Pereira Barreto Amorim

Versão corrigida

O original encontra-se disponível no IB-USP

Estudo de antioxidantes, potencial bioativo e composição química de *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora*, *Sargassum cymosum* (Ochrophyta) e *Codium isthmocladum* (Chlorophyta)

Study of antioxidants, bioactive potential and chemical composition of *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora*, *Sargassum cymosum* (Ochrophyta) and *Codium isthmocladum* (Chlorophyta)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências Biológicas, na Área de Botânica.

Orientadora: Profa. Dra. Fungyi Chow

São Paulo

2018

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP,  
com os dados fornecidos pelo autor no formulário:  
<http://www.ib.usp.br/biblioteca/ficha-catalografica/ficha.php>

Amorim, Ana Maria Pereira Barreto  
Estudo de antioxidantes, potencial bioativo e  
composição química de Chnoospora minima, Dictyopteris  
plagiogramma, Padina gymnospora, Sargassum cymosum  
(Ochrophyta) e Codium isthmocladum (Chlorophyta) / Ana  
Maria Pereira Barreto Amorim; orientadora Fungyi Chow. -  
São Paulo, 2018.

141 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da  
Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica.

1. Atividades biológicas. 2. Antioxidante. 3.  
Prospecção. 4. Algas pardas. 5. Alga verde. I. Chow,  
Fungyi, orient. II. Título.

Bibliotecária responsável pela estrutura da catalogação da publicação:  
Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

### Comissão Julgadora:

---

Profa. Dra. Leticia Veras Costa Lotufo

---

Profa. Dra. Paula Christine Jimenez

---

Profa. Dra. Fungyi Chow  
Orientadora

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Maria Helena e José Antonio.

Ó mar, o teu rugido é um eco incerto  
Da criadora voz, de que surgiste:  
Seja, disse; e tu foste, e contra as rochas  
As vagas compeliste.  
E à noite, quando o céu é puro e limpo,  
Teu chão tinges de azul, — tuas ondas correm  
Por sobre estrelas mil; turvam-se os olhos  
Entre dois céus brilhantes.

(Gonçalves Dias)

## Agradecimentos

---

Aos meus pais, Maria Helena e José Antonio, e aos meus irmãos, Carlos Manuel e Maria Clara, por todo amor e inspiração. Aos meus avós e aos meus tios, pelo incentivo

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fungyi Chow, pelo apoio, confiança, disponibilidade e ensinamentos.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cláudia Maria Furlan, do Laboratório de Fitoquímica (IB/USP) pela colaboração e pela ajuda na realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Letícia Costa-Lotufo do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais Marinhos (ICB/USP) pela parceria na realização do ensaio de citotoxicidade.

Aos técnicos Aline, Mourisa, Rosário e William, do Departamento de Botânica (IB/USP), e à técnica Helory, do Departamento de Farmacologia (ICB/USP), por toda atenção e auxílio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida (processo nº 133009/2016-5), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro por meio do projeto Biota-FAPESP (processo 2013/50731-1).

Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica, especialmente à Priscila e ao Wilton, que estiveram sempre dispostos a ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Algas Marinhas “Édison José de Paula” pelo companheirismo e pelo café da tarde.

À Vanessa, pelo auxílio nos ensaios, pelas discussões sobre fenólicos e pelas risadas!

À Jana e ao Fábio, que além de todo conhecimento e apoio científico, me deram um abrigo, e viraram minha família em São Paulo.

Ao André pelo incentivo, carinho e paciência. Muito obrigada por estar ao meu lado!

Aos meus amores felinos, Jack, Nico e Jacques Cousteau, pela companhia nos momentos de escrita.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

## Resumo

---

As macroalgas marinhas constituem uma importante fonte de produtos naturais, devido à sua composição química, rica em substâncias fenólicas, terpenos e polissacarídeos sulfatados, apresentando potencial biotecnológico como fonte de substâncias com atividade antioxidante, antiviral, citotóxica e antibacteriana. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial de prospecção de macroalgas do litoral do Espírito Santo (ES), mediante estudos dos potenciais antioxidante e bioativo de extratos brutos de quatro espécies de algas pardas (*Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*) e de uma espécie de alga verde (*Codium isthmocladum*). A caracterização inicial dos extratos acetato de etila e metanólico das algas pardas, demonstrou a presença de constituintes com características distintas, indicando que pertencem à diferentes classes fenólicas. Os extratos metanólicos e aquosos das cinco espécies apresentaram os maiores rendimentos, sendo utilizados para análise do potencial antioxidante e bioativo. O extrato metanólico de *P. gymnospora* apresentou o maior potencial antioxidante e o maior teor de substâncias fenólicas totais pelo ensaio Folin-Ciocalteu, indicando o potencial dessa espécie como ingrediente funcional e na busca de substâncias antioxidantes naturais. As espécies analisadas apresentaram potencial bioativo (antiviral e citotóxica), sendo que os extratos aquosos foram mais ativos, quando comparados aos metanólicos. O maior potencial antiviral foi encontrado nos extratos aquosos de *P. gymnospora*, *S. cymosum* e *C. isthmocladum*, e o maior potencial citotóxico nos extratos aquosos de *D. plagiogramma* e *C. isthmocladum*. Tanto o potencial antiviral, como citotóxico podem estar relacionados à presença de substâncias fenólicas e polissacarídeos sulfatados nos extratos. Os resultados obtidos demonstram que as espécies estudadas, principalmente *D. plagiogramma*, *P. gymnospora*, *S. cymosum* e *C. isthmocladum*, apresentam potencial para prospecção de produtos naturais.

## **Abstract**

---

Marine macroalgae are an important source of natural products, due to their chemical composition, rich in phenolic substances, terpenes and sulphated polysaccharides, presenting biotechnological potential as a source of substances with antioxidant, antiviral, cytotoxic and antibacterial activity. In this sense, the objective of the present study was to evaluate the potential of macroalgae prospecting on the coast of Espírito Santo (ES), through studies of the antioxidant and bioactive potentials of crude extracts of four species of brown seaweeds (*Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* and *Sargassum cymosum*) and one species of green seaweed (*Codium isthmocladum*). The initial characterization of the ethyl acetate and methanolic extracts of the brown seaweeds, showed the presence of constituents with distinct characteristics, indicating that they belong to the different phenolic classes. The methanolic and aqueous extracts of the five species presented the highest yields, being used for analysis of the antioxidant and bioactive potential. The methanolic extract of *P. gymnospora* presented the highest antioxidant potential and the highest content of total phenolic substances by the Folin-Ciocalteu assay, indicating the potential of this species as a functional ingredient and the search for natural antioxidant substances. The analyzed species presented bioactive potential (antiviral and cytotoxic), and the aqueous extracts were more active when compared to methanolic. The highest antiviral potential was found in aqueous extracts of *P. gymnospora*, *S. cymosum* and *C. isthmocladum*, and the highest cytotoxic potential in aqueous extracts of *D. plagiogramma* and *C. isthmocladum*. Both antiviral and cytotoxic potential may be related to the presence of phenolic substances and sulfated polysaccharides in the extracts. The results showed that the studied species, especially *D. plagiogramma*, *P. gymnospora*, *S. cymosum* and *C. isthmocladum*, present potential for the prospection of natural products.

## Lista de Figuras

---

Figura 1: Esquema com as principais rotas do metabolismo primário (caixas em cinza) e do metabolismo secundário (caixas em branco), indicando a síntese de classes químicas prevalecentes. Baseado em Dewick (2009).....	17
Figura 2: Espécies de algas pardas coletadas no litoral sul do Espírito Santo (ES), Brasil: A) <i>Chnoospora minima</i> ; B) <i>Dictyopteris plagiogramma</i> ; C) <i>Padina gymnospora</i> ; D) <i>Sargassum cymosum</i> ; E) <i>Codium isthmocladum</i> (Fotos: Fungyi Chow, 2016).....	32
Figura 3: Esquema geral do processo de obtenção dos extratos orgânicos e do extrato aquoso. Hx – hexânico; DCM – díclorometano; AcEtO – acetato de etila; MeOH – metanólico.....	33
Figura 4: Perfil espectrofotométrico de absorção dos extratos metanólico e aquoso de (A) <i>Chnoospora minima</i> , (B) <i>Dictyopteris plagiogramma</i> , (C) <i>Padina gymnospora</i> e (D) <i>Sargassum cymosum</i> , representado pela média das absorbâncias ( $n = 3$ ) nas regiões do espectro UV-vis (200-700 nm).....	42
Figura 5: Área sob a curva (média ± DP; $n = 3$ ) do perfil espectrofotométrico de absorção nas regiões (A) $\lambda = 200\text{-}239$ nm da banda A e (B) $\lambda = 240\text{-}279$ nm da banda B dos extratos metanólico e aquoso de <i>Chnoospora minima</i> , <i>Dictyopteris plagiogramma</i> , <i>Padina gymnospora</i> e <i>Sargassum cymosum</i> . Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste <i>post-hoc</i> de Newmann-Keuls ( $p < 0,05$ ).....	43
Figura 6: Teor de substâncias fenólicas totais (média ± DP; $n = 3$ ), expresso como porcentagem, equivalentes ao floroglucinol, em relação à massa seca dos extratos metanólico e aquoso de <i>Chnoopora minima</i> , <i>Dictyopteris plagiogramma</i> , <i>Padina gymnospora</i> e <i>Sargassum cymosum</i> , quantificado pelo método do Folin-Ciocalteu. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste <i>post-hoc</i> de Newmann-Keuls ( $p < 0,05$ ).....	44
Figura 7: Teor de substâncias fenólicas totais (média ± DP; $n = 3$ ), expresso como a porcentagem da massa de substâncias fenólicas, equivalentes ao floroglucinol, pela massa seca dos extratos acetato de etila e metanólico de <i>Chnoospora minima</i> , <i>Dictyopteris plagiogramma</i> , <i>Padina gymnospora</i> e <i>Sargassum cymosum</i> , analisados por CLAE-DAD. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste <i>post-hoc</i> de Newmann-Keuls ( $p < 0,05$ ). *Extratos de <i>D. plagiogramma</i> apenas com uma repetição, portanto não foi considerada na análise estatística.....	45
Figura 8: Espectros de absorção UV do padrão floroglucinol e dos constituintes fenólicos majoritários (com área relativa $>2\%$ ), selecionados até o tempo de retenção de 25,088 minutos, detectados por CLAE-DAD ( $\lambda = 270$ nm) nos extratos acetato de etila e metanólico de <i>Chnoospora minima</i> , <i>Dictyopteris plagiogramma</i> , <i>Padina gymnospora</i> e <i>Sargassum cymosum</i> . Os números correspondem à identificação dos constituintes apresentados na Tabela 4.....	47
Figura 9: Espectros de absorção UV dos constituintes fenólicos majoritários (com área relativa $>2\%$ ), selecionados a partir do tempo de retenção de 25,723 minutos, detectados por CLAE-DAD ( $\lambda = 270$ nm) nos extratos acetato de etila e metanólico de <i>Chnoospora minima</i> , <i>Dictyopteris plagiogramma</i> , <i>Padina gymnospora</i> e <i>Sargassum cymosum</i> . Os números correspondem à identificação dos constituintes apresentados na Tabela 4.....	48

- Figura 10: Dendrograma obtido pelo método de ligação de Ward para os extratos acetato de etila (AcEtO) e metanólico (MeOH) de *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*, agrupados de acordo com os constituintes majoritários detectados por CLAE-DAD.....51
- Figura 11: Atividade antioxidante expressa em porcentagem (%AOX) e equivalente de ácido gálico ( $\mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ) para o ensaio de captura do radical ABTS (média ± DP;  $n = 5$ ), em diferentes concentrações dos extratos brutos metanólico e aquoso das espécies A) *Chnoospora minima*, B) *Padina gymnospora* e C) *Sargassum cymosum*. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste *post hoc* de Newmann Keuls ( $p < 0,05$ ).....66
- Figura 12: Atividade antioxidante expressa em porcentagem (%AOX) e equivalente de ácido gálico ( $\mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ) para o ensaio de captura do radical DPPH (média ± DP;  $n = 5$ ), em diferentes concentrações dos extratos brutos metanólico e aquoso das espécies A) *Padina gymnospora* e B) *Sargassum cymosum*. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste *post hoc* de Newmann Keuls ( $p < 0,05$ ).....67
- Figura 13: Atividade antioxidante expressa em porcentagem (%AOX) e equivalente de ácido gálico ( $\mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ) para o ensaio FRAP (média ± DP;  $n = 5$ ), em diferentes concentrações dos extratos brutos metanólico e aquoso das espécies A) *Padina gymnospora* e B) *Sargassum cymosum*. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste *post hoc* de Newmann Keuls ( $p < 0,05$ ).....68
- Figura 14: Atividade antioxidante expressa em porcentagem (%AOX) e equivalente de ácido gálico ( $\mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ) para o ensaio quelante de metais (média ± DP;  $n = 5$ ), em diferentes concentrações dos extratos aquoso da espécie *Sargassum cymosum*. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste *post hoc* de Newmann Keuls ( $p < 0,05$ ).....68
- Figura 15: Teor de substâncias fenólica totais, expresso em porcentagem (%AOX) e equivalente de ácido gálico ( $\mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ), pelo ensaio Folin-Ciocalteu (média ± DP;  $n = 5$ ), em diferentes concentrações dos extratos metanólico e aquoso de A) *Padina gymnospora* e B) *Sargassum cymosum*. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste *post hoc* de Newmann Keuls ( $p < 0,05$ ).....69
- Figura 16: Comparação do potencial antioxidante pelos ensaios de A) ABTS; B) DPPH; C) FRAP e D) do teor de substâncias fenólicas totais pelo método do Folin-Ciocalteu representado como equivalente de ácido gálico ( $\text{mg EAG.g EB}^{-1}$ ; média ± DP;  $n = 5$ ), entre os extratos metanólicos e aquosos e entre as espécies *Chnoospora minima*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste *post hoc* de Newmann Keuls ( $p < 0,05$ ).....70
- Figura 17: Comparação do potencial antioxidante pelos ensaios de A) ABTS; B) DPPH; C) FRAP e D) do teor de substâncias fenólicas totais pelo método do Folin-Ciocalteu representado como  $\text{EC}_{50}$  ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; média ± DP;  $n = 5$ ), entre os extratos metanólicos e aquosos e entre as espécies *Chnoospora minima*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste *post hoc* de Newmann Keuls ( $p < 0,05$ ).....72

Figura 18: Porcentagem de inibição (média ± DP; $n = 3$ ) da transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana (TR-HIV) em diferentes concentrações dos extratos metanólicos e aquosos de A) <i>Chnoospora minima</i> , B) <i>Dictyopteris plagiogramma</i> , C) <i>Padina gymnospora</i> e D) <i>Sargassum cymosum</i> . Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste <i>post hoc</i> de Newmann-Keuls ( $p < 0,05$ ).....	87
Figura 19: Comparação do potencial antiviral, representado como $IC_{50}$ (média ± DP; $n = 3$ ), entre os extratos metanólicos e aquosos e as espécies <i>Chnoospora minima</i> , <i>Dictyopteris plagiogramma</i> , <i>Padina gymnospora</i> e <i>Sargassum cymosum</i> . Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste <i>post hoc</i> de Newmann Keuls ( $p < 0,05$ ).....	88
Figura 20: Porcentagem de inibição (média ± erro-padrão; $n = 2$ ) do crescimento das linhagens celulares A) HCT-116 e B) MCF-7 pelos extratos metanólicos e aquosos de <i>Chnoospora minima</i> , <i>Dictyopteris plagiogramma</i> , <i>Padina gymnospora</i> e <i>Sargassum cymosum</i> , nas concentrações de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .....	89
Figura 21: Teores percentuais (média ± DP; $n = 3$ ) de A) carboidratos totais, B) grau de sulfatação, C) substâncias fenólicas totais e D) proteínas solúveis totais (PST), dos extratos metanólicos e aquosos de <i>Chnoospora minima</i> , <i>Dictyopteris plagiogramma</i> , <i>Padina gymnospora</i> e <i>Sargassum cymosum</i> . Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste <i>post hoc</i> de Newmann-Keuls ( $p < 0,05$ ).....	90
Figura 22: Perfil espectrofotométrico de absorção dos extratos metanólico e aquoso de <i>Codium isthmocladum</i> , representado pela (A) média das absorbâncias ( $n = 3$ ) nas regiões do espectro ultravioleta e visível (200 a 700 nm) e (B) área sob a curva (média ± DP; $n = 3$ ) nas regiões $\lambda = 200\text{-}239$ nm e $\lambda = 240\text{-}279$ nm. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste <i>post-hoc</i> de Newmann-Keuls ( $p < 0,05$ ).....	102
Figura 23: Potencial antioxidante (média ± DP; $n = 5$ ), representado como porcentagem da atividade antioxidante (%AOX) e como equivalente de ácido gálico (mg EAG.g EB $^{-1}$ ) entre os extratos metanólico e aquoso de <i>Codium isthmocladum</i> na concentração de 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , para os ensaios A) ABTS, B) DPPH, C) FRAP e D) Quelante. *Diferenças significativas entre extrato metanólico e aquoso pelo teste- <i>t</i> para amostras independentes ( $p < 0,05$ ). **Não apresentou potencial antioxidante e não foi realizada análise estatística.....	102
Figura 24: Porcentagem de inibição da transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana (TR-HIV) (média ± DP; $n = 3$ ) pelos extratos metanólico e aquoso de <i>Codium isthmocladum</i> nas concentrações 60, 120, 180, 240 e 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste <i>post-hoc</i> de Newmann-Keuls ( $p < 0,05$ ).....	103
Figura 25: Porcentagem de inibição (média ± erro padrão; $n = 2$ ) do crescimento das linhagens celulares A) MCF-7 e B) HCT-116 pelos extratos metanólicos e aquosos de <i>Codium isthmocladum</i> , nas concentrações de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .....	104
Figura 26: Teores percentuais (média ± DP; $n = 3$ ) de A) carboidratos totais, B) grau de sulfatação, C) teor de substâncias fenólicas totais e D) conteúdo de proteínas solúveis totais (PST) dos extratos brutos metanólico e aquoso de <i>Codium isthmocladum</i> . *Diferenças significativas entre extrato metanólico e aquoso pelo teste- <i>t</i> para amostras independentes ( $p < 0,05$ ). **Não detectado.....	105
Figura 27: <i>Chnoospora minima</i> . A) Hábito da planta; B) Corte transversal do talo. Fotos: Fábio Nauer.....	122

Figura 28: <i>Dictyopteris plagiogramma</i> . A) Hábito da planta; B) Ápice do talo com nervuras central e secundárias; C) Corte transversal do talo; D) Detalhe do corte transversal do talo mostrando duas camadas de células; E) Corte transversal do talo; F) Estruturas reprodutivas. Fotos: Fábio Nauer.....	123
Figura 29: <i>Padina gymnospora</i> . A) Hábito da planta; B) Ápice do talo mostrando zonas concêntricas; C) Detalhe do ápice do talo mostrando zona de pelos; D) Corte transversal da porção basal do talo com 8 camadas de células. Fotos: Fábio Nauer.....	124
Figura 30: <i>Sargassum cymosum</i> . A) Hábito da planta; B) Detalhe de um eixo mostrando os folíolos e os receptáculos (setas); C) Folíolo mostrando os criptostomas organizados em duas fileiras; D) Folíolo em corte transversal; E) Corte transversal do folíolo mostrando uma camada de células corticais pigmentadas e células medulares incolores. Fotos: Fábio Nauer.....	125
Figura 31: <i>Codium isthmocladum</i> . A) Hábito da planta; B) Ápice do talo com ramificação dicotômica; C) Detalhe do ápice do talo, evidenciando dicotomia; D) Filamentos medulares, eutrículos densamente dispostos; E) Utrículos; F) Detalhe do utrículo reprodutivo, evidenciando gametângio ovóide e pedunculado. Fotos: Fábio Nauer.....	128
Figura 32: Espectros de absorção UV dos constituintes fenólicos até o tempo de retenção de 8,528 minutos, detectados por CLAE-DAD ( $\lambda = 270$ nm) nos extratos acetato de etila e metanólico de <i>Chnoospora minima</i> , <i>Dictyopteris plagiogramma</i> , <i>Padina gymnospora</i> e <i>Sargassum cymosum</i> . Os números 1-25 correspondem à identificação dos constituintes apresentados na Tabela 10.....	133
Figura 33: Espectros de absorção UV dos constituintes fenólicos entre os tempos de retenção de 8,542 a 26,493 minutos, detectados por CLAE-DAD ( $\lambda = 270$ nm) nos extratos acetato de etila e metanólico de <i>Chnoospora minima</i> , <i>Dictyopteris plagiogramma</i> , <i>Padina gymnospora</i> e <i>Sargassum cymosum</i> . Os números 26-70 correspondem à identificação dos constituintes apresentados na Tabela 10.....	134
Figura 34: Espectros de absorção UV dos constituintes fenólicos entre os tempos de retenção de 26,563 a 32,128 minutos, detectados por CLAE-DAD ( $\lambda = 270$ nm) nos extratos acetato de etila e metanólico de <i>Chnoospora minima</i> , <i>Dictyopteris plagiogramma</i> , <i>Padina gymnospora</i> e <i>Sargassum cymosum</i> . Os números 71-109 correspondem à identificação dos constituintes apresentados na Tabela 10.....	135

## Lista de Tabelas

---

Tabela 1: Espécies de algas pardas (Ochrophyta) citadas para o litoral do Espírito Santo (ES), Brasil.....	26
Tabela 2: Espécies de algas verde (Chlorophyta) citadas para o litoral do Espírito Santo (ES), Brasil.....	27
Tabela 3: Rendimento (média ± DP; $n = 5$ ) dos extratos brutos hexânico, diclorometânicos, acetato de etila, metanólico e aquoso em relação à massa seca inicial para extração das algas <i>Chnoospora minima</i> , <i>Dictyopteris plagiogramma</i> , <i>Padina gymnospora</i> e <i>Sargassum cymosum</i> . Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste <i>post-hoc</i> de Newmann-Keuls ( $p < 0,05$ ).....	41
Tabela 4: Porcentagem dos constituintes fenólicos majoritários (média ± DP; $n = 3$ ), em relação ao teor de substâncias fenólicas totais, dos extratos acetato de etila (AcEtO) e metanólico (MeOH) de <i>Chnoospora minima</i> , <i>Dictyopteris plagiogramma</i> , <i>Padina gymnospora</i> e <i>Sargassum cymosum</i> , analisados por CLAE-DAD ( $\lambda = 270$ nm).....	49
Tabela 5: Sumário das condições e parâmetros das respectivas curvas padrões para os diferentes ensaios de antioxidantes, especificando faixa de concentração do padrão ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), equação da reta ( $y = ax + b$ ), coeficiente de regressão ( $R^2$ ) e fator de conversão (FC) do padrão em relação ao ácido gálico.....	61
Tabela 6: Atividade antioxidante em porcentagem (média±DP; $n = 5$ ) dos extratos metanólicos e aquosos de <i>Chnoospora minima</i> , <i>Padina gymnospora</i> e <i>Sargassum cymosum</i> nos ensaios ABTS, DPPH, Folin-Ciocalteu, FRAP e quelante de metais na concentração de $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .....	64
Tabela 7: Classificação do potencial antioxidant total dos extratos metanólicos e aquosos das espécies <i>Chnoospora minima</i> , <i>Padina. gymnospora</i> e <i>Sargassum cymosum</i> .....	72
Tabela 8: Atividades biológicas testadas para extratos ou fração de espécies do gênero <i>Codium</i> .....	97
Tabela 9: Rendimento (média ± DP; $n = 5$ ) dos extratos brutos hexânico, diclorometânicos, acetato de etila, metanólico e aquoso em relação à massa seca de <i>Codium isthmocladum</i> . Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste <i>post-hoc</i> de Newmann-Keuls ( $p < 0,05$ ).....	101
Tabela 10: Porcentagem dos constituintes fenólicos (média ± DP; $n = 3$ ) dos extratos acetato de etila (AcEtO) e metanólico (MeOH) de <i>Chnoospora minima</i> , <i>Dictyopteris plagiogramma</i> , <i>Padina gymnospora</i> e <i>Sargassum cymosum</i> , analisados por CLAE-DAD ( $\lambda = 270$ nm).....	138
Tabela 11: Extratos de espécies dos gêneros <i>Chnoospora</i> , <i>Dictyopteris</i> , <i>Padina</i> e <i>Sargassum</i> que apresentam atividade antibacteriana.....	140

## **Lista de abreviaturas e siglas**

---

<b>ABTS</b>	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
<b>AIDS</b>	Síndrome de imunodeficiência adquirida (do inglês, <i>Acquired ImmunoDeficiency Syndrome</i> )
<b>AcEtO</b>	Acetato de etila
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>Anti-DIG-POD</b>	Anti-digoxigenina-peroxidase
<b>BHA</b>	Butil-hidroxianisol
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>DAD</b>	Detector de arranjo de aiodos
<b>DEPC</b>	Dietil pirocarbonato
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DIG</b>	Digoxigenina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DP</b>	Desvio-padrão
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
<b>EAG</b>	Equivalente de ácido gálico
<b>EB</b>	Extrato bruto
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentração que induz metade da atividade máxima
<b>Foscarnet</b>	Fosfonoformato de sódio tribásico hexahidratado
<b>FRAP</b>	Potencial redutor do íon ferro (do inglês, <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> )

<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana (do inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>Hx</b>	Hexânico
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração que induz metade da atividade inibitória
<b>LB</b>	Meio de cultura Luria Bertani
<b>MeOH</b>	Metanólico
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil tetrazolium
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Carbonato de sódio
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>R<sup>2</sup></b>	Coeficiente de regressão
<b>TPTZ</b>	Tripidil hidrazina
<b>TR</b>	Tempo de retenção
<b>TR-HIV</b>	Enzima transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana
<b>HSV</b>	Herpes simplex vírus
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>vis</b>	Visível

# Sumário

---

<b>Introdução Geral.....</b>	16
<b>Material e Métodos.....</b>	31
<b>Capítulo I.</b> Caracterização química dos extratos de <i>Chnoospora minima</i> , <i>Dictyopteris plagiogramma</i> , <i>Padina gymnospora</i> e <i>Sargassum cymosum</i> (Ochrophyta).....	36
<b>Capítulo II.</b> Potencial antioxidante dos extratos metanólicos e aquosos de <i>Chnoospora minima</i> , <i>Padina gymnospora</i> e <i>Sargassum cymosum</i> (Ochrophyta).....	56
<b>Capítulo III.</b> Potencial bioativo dos extratos metanólico e aquoso de <i>Chnoospora minima</i> , <i>Dictyopteris plagiogramma</i> , <i>Padina gymnospora</i> e <i>Sargassum cymosum</i> (Ochrophyta).....	77
<b>Capítulo IV.</b> Potencial antioxidante e bioativo de <i>Codium isthmocladum</i> (Chlorophyta).....	94
<b>Considerações Finais.....</b>	109
<b>Referências.....</b>	111
<b>Apêndices.....</b>	122

# Introdução Geral

---

## 1 PRODUTOS NATURAIS DE MACROALGAS

As macroalgas são divididas em três grandes grupos: algas vermelhas (Filo Rhodophyta), algas pardas (Filo Ochrophyta – Classe Phaeophyceae) e algas verdes (Filo Chlorophyta). A maioria de seus representantes habita o ecossistema marinho e constitui parte fundamental desse ambiente, destacando-se principalmente seu papel na cadeia alimentar e como produtor primário, sevindo de local de refúgio, recrutamento e berçário, fonte de matéria orgânica para bactérias heterotróficas e indicadores de alterações ambientais (Yoneshigue-Valentin et al. 2006).

Tradicionalmente, são utilizadas na alimentação, sobretudo em países asiáticos, e, atualmente, têm sido exploradas como alimentos funcionais, devido ao seu teor de fibras, vitaminas e minerais (MacArtain et al. 2007). Industrialmente, são utilizadas, principalmente, como fonte de ágar, carragenanas e alginato, polissacarídeos presentes na parede celular de algumas macroalgas (Hu et al. 2011). Além disso, são fonte de produtos naturais que apresentam atividades biológicas, as quais podem ser aplicadas na indústria química, farmacêutica e cosmética (Kolanjinathan et al. 2014).

Produtos naturais são substâncias produzidas por organismos, as quais são provenientes dos metabolismos primário ou secundário (Fig. 1). Contudo, a maioria dos produtos naturais com potencial biotecnológico são oriundos do metabolismo secundário (Clardy e Walsh 2004), e alguns trabalhos referem-se aos produtos naturais como sinônimo de metabólito secundário (Amsler e Fairhead 2006, Leal et al 2013).

O metabolismo primário (Fig. 1) é o conjunto de reações envolvidas diretamente nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução do organismo, como a fotossíntese, ciclo das pentoses, glicólise e ciclo de Krebs. Os metabólitos primários, substâncias originadas nessas reações, apresentam ampla distribuição na natureza, como os aminoácidos, proteínas, lipídeos e carboidratos. O metabolismo secundário (Fig. 1) origina substâncias que atuam como mediadores de interações ecológicas (Smit 2004), metabólitos que ocorrem em grupos específicos de organismos, por isso são também denominados como metabólitos especiais, e apresentam importância ecológica e evolutiva, sendo estudados como marcadores taxonômicos, filogenéticos e biogeográficos. Além disso, são o principal alvo de estudos que envolvem o isolamento e obtenção de novas moléculas com atividade antioxidante e biológica (Maschek e Baker 2008; Teixeira 2013).

As principais rotas secundárias que ocorrem em organismos fotossintetizantes são do ácido chiquímico, do acetato-malonato, do ácido mevalônico (MEV) e do metileritritol fosfato (MEP), as quais apresentam como precursores substâncias provenientes do metabolismo primário (Clardy e Walsh 2004, Dewick 2009). A partir dessas rotas são originadas as três principais classes de metabólitos secundários: terpenos, substâncias fenólicas e substâncias nitrogenadas (Dewick 2009).

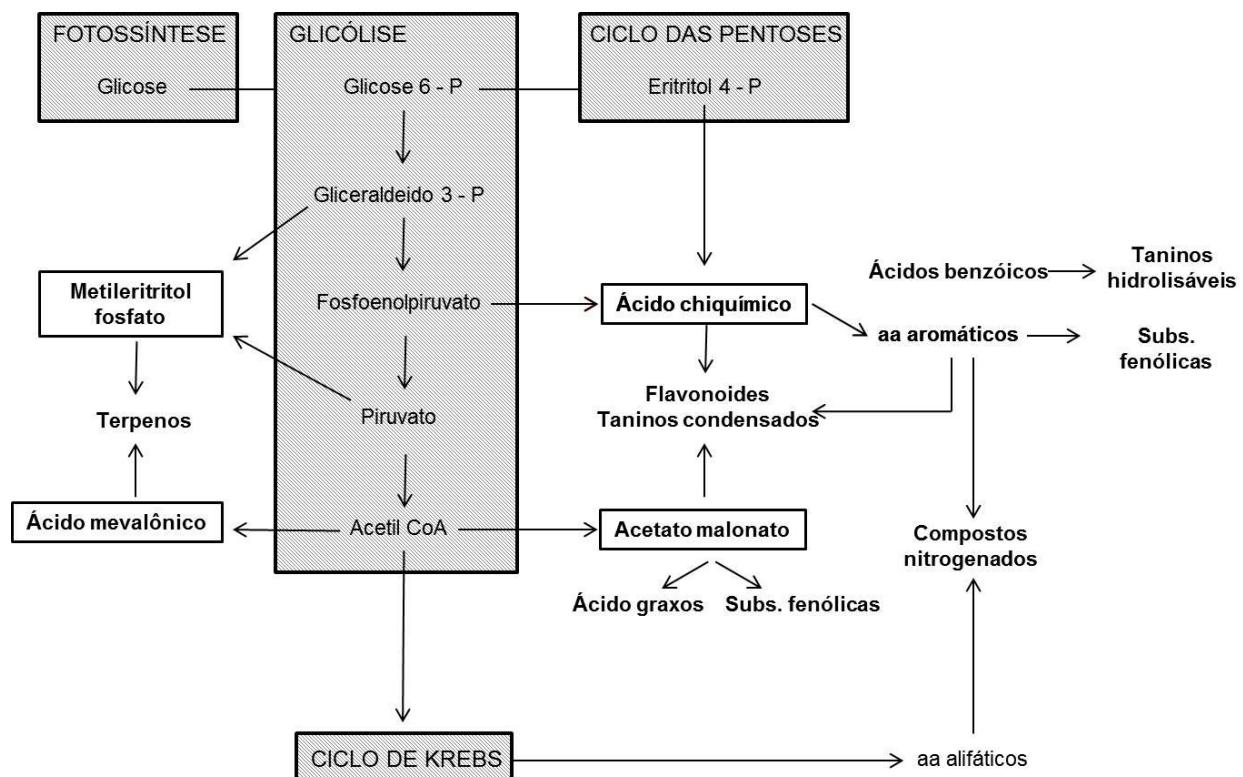


Figura 1: Esquema com as principais rotas do metabolismo primário (caixas em cinza) e do metabolismo secundário (caixas em branco), indicando a síntese de classes químicas prevalecentes. Baseado em Dewick (2009).

Os oceanos constituem uma importante fonte de produtos naturais (Hu et al. 2011; Blunt et al. 2014). Cerca de 20.000 compostos foram descobertos em organismos marinhos e quase 3.000 são provenientes de macroalgas (Maschek e Baker 2008; Hu et al. 2011).

As algas vermelhas possuem cerca de 1500 metabólitos secundários relatados, principalmente substâncias halogenadas. As substâncias halogenadas apresentam pelo menos um átomo de halogênio, sendo o bromo o mais frequente em algas. Essas substâncias pertencem a diferentes classes químicas, como acetogeninas, terpenos e substâncias fenólicas (Carvalho e Roque 2000). Em algas vermelhas, as substâncias halogenadas representam 70% dos metabólitos secundários. Em contrapartida, apenas 11% e 4% das substâncias de algas verdes e pardas, respectivamente, são halogenadas (Young et al. 2015).

Em algas pardas foram encontrados cerca de 1140 metabólitos secundários, dos quais a maioria faz parte das classes dos terpenos e das substâncias fenólicas (Maschek e Baker 2008; Blunt et al. 2014). Os terpenos de algas pardas são representados principalmente pela fucoxantina, carotenoide (terpeno de 40 carbonos) típico do grupo, e pelos diterpenos (20 carbonos), substâncias típicas do gênero *Dictyota* J.V. Lamouroux. Já as substâncias fenólicas de algas pardas são principalmente florotaninos, polifenóis derivados do floroglucinol (1,3,5-tri-hidroxibenzeno) e que representam de 10% a 20% o peso seco dessas algas (Ragan e Glombitza 1986).

Nas algas verdes são conhecidos aproximadamente 300 metabólitos secundários, principalmente da classe dos terpenos (Maschek e Baker 2008). Os produtos naturais de algas verdes são representados principalmente por sesquiterpenos (15 carbonos) e diterpenos (20 carbonos), e quase metade dessas substâncias são encontradas na Ordem Bryopsidales. No entanto, existem poucos estudos sobre produtos naturais de algas verdes.

As acetogeninas são substâncias derivadas de ácidos graxos e biossintetizadas pela via do acetato malonato (Alali et al. 1999, Young et al. 1999). São formadas por unidades repetidas de acetato ( $C_2$ ) e anel  $\gamma$ -lactônico terminal, além disso podem apresentar anéis tetrahidofuranos (THF) ou tetrahidropiranos (THP), e grupos funcionais halogenados (Alali et al. 1999, Wanke et al. 2015, Young et al. 2015). A maioria das acetogeninas encontradas em algas vermelhas são cíclicas e apresentam 15 carbonos (C15), sendo derivadas de ácidos graxos.

Os terpenos são biossintetizados a partir da acetilcoenzima A (acetil-CoA) e de outros intermediários glicolíticos, por meio de duas rotas metabólicas: do MEV e do MEP (Fig. 1). Os terpenos são formados por unidades de cinco carbonos (chamadas de isopreno) e são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno (Taiz & Zeiger 2006). Os carotenoides, pigmentos presentes em todos os organismos fotossintetizantes, possuem oito unidades de isopreno (40 carbonos), sendo classificados como tetraterpenos.

As substâncias fenólicas apresentam um grupo fenol (um anel aromático ligado a uma hidroxila), e são formados por duas rotas metabólicas: do ácido chiquímico e do acetato malonato (Taiz e Zeiger 2006) (Fig. 1). Os florotaninos, encontrados em algas pardas, são policetídeos aromáticos, biossintetizados pela via do acetato malonato (Koivikko et al. 2007).

Dentre esta vasta diversidade de produtos naturais de macroalgas, vários estudos descrevem o potencial antioxidant e a sua ampla atividade biológica em extratos e isolados de diferentes espécies, justificando o crescente investimento no conhecimento da potencialidade destas algas como fontes de novos produtos naturais.

A seguir, serão abordados aspectos sobre atividade antioxidant e atividade biológica de algas pardas e algas verdes, visto que representam o foco deste estudo.

## 2 POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Fatores como luz, calor, radiação e ataque químico ou biológico, podem fornecer energia para o rompimento de ligações químicas de polímeros. Isso leva à geração de espécies reativas e de novas espécies reativas (Paoli 2008), responsáveis pela propagação do processo, causando estresse e dano oxidativo, que é a degradação de moléculas orgânicas pela produção excessiva de espécies reativas ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (Ferreira & Matsubara 1997). As espécies reativas em baixos níveis participam de diversos processos metabólicos, porém em altas concentrações, por exemplo, sob condições de estresse, frequentemente resultam em dano oxidativo. As espécies reativas correspondem a moléculas altamente instáveis e capazes de oxidar moléculas orgânicas (Ferreira & Matsubara 1997). Muitas vezes são radicais livres com elétrons desemparelhados em sua camada de valência.

A oxidação de moléculas orgânicas, em especial a oxidação lipídica, é o principal mecanismo de redução do tempo de prateleira de alimentos, medicamentos e cosméticos, pois alteram a cor, o odor e o sabor desses produtos (Degáspari e Waszcynskyj 2004; Chorilli et al. 2007). Além disso, a oxidação lipídica pode alterar a qualidade nutricional de alimentos e levar à formação de moléculas potencialmente tóxicas (Ramalho e Jorge 2006).

O principal mecanismo de oxidação lipídica é auto-oxidação. Na presença de luz e calor, um hidrogênio é retirado de moléculas de ácidos graxos, gerando radicais livres. Esses radicais reagem com o oxigênio atmosférico e formam novos radicais livres, os quais propagam a reação de oxidação. Por fim, dois radicais se combinam, formando produtos estáveis.

Para retardar ou evitar a oxidação lipídica, substâncias antioxidantes podem ser empregadas nos produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos (Ramalho e Jorge 2006; Chorilli et al. 2007). Segundo Sies (1993), as substâncias antioxidantes são capazes de atrasar ou inibir taxas de oxidação, e com isso inibem espécies reativas e radicais livres.

As substâncias antioxidantes empregadas industrialmente podem ser divididas em dois grupos: os antioxidantes primários, que interrompem a propagação das reações de oxidação, ao ceder um próton e estabilizar os radicais livres; e os antioxidantes secundários, que reduzem o processo de iniciação da oxidação lipídica. Os antioxidantes secundários apresentam diferentes mecanismos de atuação, como por exemplo, a quelação de metais, pois os metais de transição são capazes de catalisar reações de oxidação (Gordon 1990).

Independente do mecanismo de ação, os antioxidantes utilizados em alimentos, medicamentos e cosméticos não devem causar efeitos fisiológicos negativos, não podem alterar

características do produto (cor, sabor, odor, etc) e devem ser eficazes em baixas concentrações (0,001 – 0,01%) (Ramalho e Jorge 2006).

Os antioxidantes empregados nas indústrias podem ter origem sintética ou natural. Os antioxidantes sintéticos mais utilizados são o butil-hidroxianisol (BHA), o butil-hidroxitolueno (BHT), o propil galato (PG) e o terc-butilhidroquinona (TBHQ). No entanto, essas substâncias são pouco estáveis a altas temperaturas, e podem causar efeitos carcinogênicos e alterações enzimáticas em animais (Andreó e Jorge 2006; Rocha et al. 2007). Por esses motivos, pesquisas têm sido realizadas com o intuito de encontrar fontes de antioxidantes naturais (Soares 2002). Nesse sentido, as macroalgas têm-se mostrado uma fonte promissora (Rocha et al. 2007).

Em macroalgas, assim como em outros organismos aeróbios, são encontradas espécies reativas, produzidas durante os processos de respiração celular e fotossíntese. Nas células, essas espécies reativas podem oxidar moléculas orgânicas, como lipídeos, proteínas, carboidratos e DNA, e por esse motivo, estão associadas ao envelhecimento celular (Ferreira e Matsubara 1997). Para combater os efeitos das espécies reativas, os organismos desenvolveram mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. O mecanismo antioxidante enzimático inclui a superóxido dismutase, a peroxidase, a catalase e a glutationa redutase, já o mecanismo não enzimático inclui substâncias como o ácido ascórbico, carotenoides, substâncias fenólicas e tocoferóis (Mallick e Mohn 2000).

Fatores externos também podem estimular a produção de espécies reativas (Mallick e Mohn 2000). Como o ambiente aquático está sujeito à variação de nutrientes, luminosidade, radiação, concentração de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, temperatura e salinidade, as macroalgas estão propensas a sofrer com o estresse oxidativo (Stengel et al. 2011). Desse modo, para garantir sua sobrevivência, as macroalgas desenvolveram mecanismos eficientes de resposta ao estresse, apresentando uma alta capacidade antioxidante (Rocha et al. 2007; Cofrades et al. 2010).

Zubia et al. (2007) analisaram substâncias fenólicas totais e avaliaram a atividade antioxidante de 48 espécies de macroalgas (17 Chlorophyta; 8 Ochrophyta; 23 Rhodophyta) pelo método de captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Os autores verificaram que todas as espécies testadas apresentaram atividade antioxidante, e as mais ativas foram a alga parda, *Lobophora variegata* (J.V. Lamouroux) Womersley ex E.C. Oliveira, e a alga verde *Avrainvillea longicaulis* (Kützing) G. Murray & Boodle, com atividades comparáveis à antioxidantes comerciais. *Lobophora variegata* apresentou também a maior concentração de substâncias fenólicas totais entre todas as espécies estudadas, sugerindo que a atividade antioxidante encontrada nessa alga pode estar relacionada às substâncias fenólicas. De acordo com Rocha et al.

(2007), a alta atividade antioxidante encontrada em algas pardas está relacionada a substâncias fenólicas.

Shibata et al. (2008) testaram a atividade antioxidante de florotaninos isolados de três espécies de algas pardas, *Eisenia bicyclis* (Kjellman) Setchell, *Ecklonia cava* Kjellman e *Ecklonia kurome* Okamura, pelos métodos de captura do ânion superóxido e de captura do radical DPPH. Os florotaninos florofucoxantina A, dieckol e 8,8'-bieckol apresentaram alta atividade antioxidante, superior ao ácido ascórbico e ao  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), em ambos os métodos.

Clorofila e carotenoides também são compostos relacionados à atividade antioxidante em macroalgas. Em algas pardas, Yan et al. (1999) atribuíram a alta atividade de redução do radical DPPH, encontrada na alga parda *Hijikia fusiformis* (Harvey) Okamura, à fucoxantina. Le Tuitour et al. (1998), ao estudarem cinco algas pardas, também observaram que a fucoxantina apresentou atividade antioxidante. Além disso, nesse mesmo estudo, verificaram que a clorofila  $a$  possui sinergia com o  $\alpha$ -tocoferol na conservação do ácido linoleico, um ácido graxo insaturado, alvo de espécies reativas.

Raymundo et al. (2004) avaliaram o potencial antioxidante de quatro espécies de algas verdes, coletadas no litoral de Santa Catarina, Brasil, e encontraram alta atividade antioxidante para extratos metanólicos de *Chaetomorpha antenina* (Bory) Kützing e *Ulva intestinalis* Linnaeus, na inibição da peroxidação lipídica, e relacionam essa atividade à clorofila  $a$  e carotenoides. Cho et al. (2011) identificaram no extrato metanólico de *Ulva prolifera* O.F. Müller, o feoforbídeo  $a$ , produto de degradação da clorofila, e relacionaram a alta atividade antioxidante encontrada à essa substância.

Estudos também têm relatado o potencial de polissacarídeos sulfatados de macroalgas como fonte de antioxidantes. Costa et al. (2011) verificaram que a fração de polissacarídeos de algas pardas, do gênero *Dictyota* J.V. Lamouroux e *Sargassum filipendula* C. Agardh, e da alga verde, *Caulerpa sertularioides* (S.G. Gmelin) M. Howe, apresentaram alta atividade antioxidante. Rupérez et al. (2002) relataram que em *Fucus vesiculosus* Linnaeus, a fração de polissacarídeos contendo heterofucanas apresentou boa atividade de redução do íon ferro.

### **3 POTENCIAL ANTIBACTERIANO E ANTIVIRAL**

O uso indiscriminado de medicamentos nos últimos anos levou à crescente resistência de agentes patogênicos. A resistência antimicrobiana é relacionada à capacidade desenvolvida por microrganismos (por exemplo, bactérias, vírus, fungos) de crescerem na presença de medicamentos antimicrobianos, já a resistência à antibióticos está relacionada especificamente às

bactérias (WHO 2017). De acordo com dados da OMS (Organização Mundial da Saúde) para 22 países, *Escherichia coli*, é uma das bactérias mais comumente resistente a antibióticos (WHO 2017). Essa bactéria é encontrada normalmente na flora intestinal de animais, mas também é uma das principais causas de infecções alimentares e doenças do trato urinário.

Outro importante agente patogênico que tem apresentado resistencia à antimicrobianos é o Vírus da Imunodeficiênci Humana (HIV, *Human Immunodeficiency Virus*), causador da Síndrome da Imunodeficiênci Adquirida (AIDS, *Acquired Immunodeficiency Syndrome*). De acordo com a UNAIDS (2016), nos últimos anos houve aumento do acesso a tratamentos antirretrovirais e uma redução das mortes relacionadas a AIDS. No entanto, as altas taxas de mutação do vírus, relacionadas a falta de acesso regular de pacientes a serviços de atenção à saúde, têm aumentado gradualmente a resistência do HIV à antirretrovirais (Gupta et al. 2012), prejudicando o progresso global no tratamento e prevenção da AIDS.

Diante deste cenário, a resistência a antimicrobianos é uma ameaça crescente à saúde pública e estudos têm procurado novas fontes de substâncias para o tratamento de doenças bacterianas e virais (Karaman et al. 2003).

Em algas pardas, a atividade antibacteriana é relacionada às substâncias fenólicas, especialmente aos florotaninos (Maschek e Baker 2008). Extrato metanólico de *Sargassum wightii* Greville ex J. Agardh mostrou alta atividade contra *E. coli* e *Aeromonas hydrophila* (gram-negativo) e os autores sugerem que essa atividade está relacionada à presença de substâncias fenólicas no extrato (Vijayabaskar e Shiyamala 2011).

Eom et al. (2008) verificaram que o extrato metanólico de *Ecklonia stolonifera* Okamura mostrou atividade contra uma cepa de *Staphylococcus aureus* (gram-positivo) resistente ao antibiótico meticilina (MRSA, *Methicillin Resistant Staphylococcus*). Lee et al. (2008) isolaram a partir do extrato metanólico da mesma espécie o florotanino, dieckol, e demonstraram que essa substância possui atividade contra a bactéria MRSA, apresentando concentração inibitória mínima de  $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Os florotaninos também apresentam atividade antiviral e atuam em diferentes fases da infecção, podendo inibir a adsorção, a transcriptase reversa e a transcrição (De Clercq 2000). Ahn et al. (2004) isolaram da macroalga *E. cava* quatro derivados do floroglucinol, dos quais o bieckol e o dieckol inibiram a transcriptase reversa do HIV. Essas substâncias apresentaram capacidade de inibição comparável a nevirapina, um fármaco usado no tratamento da AIDS.

Polissacarídeos sulfatados de macroalgas também possuem atividade antiviral, atuando principalmente como bloqueadores da adsorção do vírus na célula hospedeira (De Clercq 2000). Polissacarídeos sulfatados de algas verdes do gênero *Codium* Stackhouse apresentam atividade

contra o vírus herpes simplex (HSV, *Herpes Simplex Virus*), atuando principalmente na inibição da adsorção e da penetração na célula hospedeira, mas também podem atuar em fases após a penetração viral (Lee et al. 2004; Ohta et al. 2009).

Como antirretrovirais, polissacarídeos sulfatados podem atuar como inibidores competitivos, impedindo a ligação entre a enzima transcriptase reversa e o iniciador (*primer*) da transcrição reversa (Sosa et al. 1991; Viennois et al. 2013).

Segundo Ahmadi et al. (2015) os polissacarídeos de algas pardas como alginato e fucanas, presentes na parede celular, e a laminarina, polissacarídeo de reserva, apresentam atividade antiviral. No entanto, segundo Damonte et al. (2004), testes *in vitro* têm demonstrado que esses compostos são efetivos quando administrados simultaneamente ou imediatamente após a infecção viral.

Compostos com potencial antiviral devem apresentar baixa citotoxicidade contra células de mamíferos para não afetarem as células do hospedeiro (De Clercq 2000). Ponce et al. (2003) relataram que galactofucanas (fucanas ricas em galactose) de *Adenocystis utricularis* (Bory) Skottsberg (Phaeophyceae), apresentaram atividade antiviral contra os vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2) e não demonstraram citotoxicidade contra células da linhagem *Vero*.

#### **4 POTENCIAL CITOTÓXICO**

Tumor ou neoplasia se refere ao crescimento anormal de células. Os tumores benignos são localizados e não se espalham para outras partes do corpo, já os tumores malignos (câncer) têm a capacidade de se espalhar para outras regiões além do local de origem (metástase). Câncer é um termo genérico para um grupo de doenças que podem afetar diferentes partes do corpo. De acordo com dados da OMS (WHO 2014), o câncer é uma das principais causas de morte no mundo, em 2012 ocorreram 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de óbitos causados por câncer. No Brasil, estima-se que para o ano de 2018 ocorram cerca de 420 mil novos casos (INCA 2017).

O tratamento de câncer é normalmente realizado por cirurgia, radioterapia ou quimioterapia. No tratamento por quimioterapia são aplicadas substâncias que atuam inibindo o crescimento celular. Para a busca de novas fontes de substâncias com potencial anticâncer são empregados ensaios *in vitro* e *in vivo* que visam avaliar a atividade citotóxica de extratos e substâncias isoladas frente a linhagens de células tumorais. Em algas pardas e algas verdes, as principais substâncias que apresentam citotoxicidade frente às linhagens de células tumorais são polissacarídeos sulfatados.

Ye et al. (2008) avaliaram a atividade das frações purificadas de polissacarídeos sulfatados da espécie *Sargassum pallidum* (Turner) C. Agardh na inibição do crescimento das linhagens celulares Hep G2 (câncer de pulmão), A549 (adenocarcinoma de pulmão) e MGC-803 (câncer gástrico). As frações que apresentaram as maiores têm o maior teor de sulfato e as menores massas moleculares.

Estudos têm demonstrado o potencial anticâncer de fucoidan, um grupo de polissacarídeos sulfatados ricos em L-fucose presente na parede celular de diversas algas pardas (Atashrazm et al. 2015). Por exemplo, fucoidan isolado de *Sargassum polycystum* C. Agardh apresentou IC<sub>50</sub> de 50 µg.mL<sup>-1</sup> na inibição do crescimento da linhagem celular MCF-7 (câncer de mama), analisada pelo ensaio *in vitro* do MTT (Palanisamy et al. 2017). Nesse estudo os autores também analisaram a morfologia das células tratadas com fucoidan e observaram características de células apoptóticas. De acordo com Atashrazm et al. (2015), fucoidan extraído de diferentes espécies de algas pardas pode promover a morte celular por apoptose, apresentar efeito imunomodulatório, inibir a angiogênese tumoral (formação de novos vasos sanguíneos pelos quais as células tumorais recebem oxigênio e nutrientes) e diminuir a metástase.

Polissacarídeos de algas verdes também apresentam potencial anticâncer, induzindo a morte celular por apoptose. Wang et al. (2014) demonstraram que um polissacarídeo sulfatado isolado da macroalga verde, *U. intestinalis* apresentou atividade citotóxica ao induzir a apoptose em células de hepatoma humano (HepG2).

## 5 LOCAL DE ESTUDO

A costa do Espírito Santo possui extensão de 411 km, o que corresponde a 5% da costa brasileira (Incaper 2010). Essa região apresenta grande abundância e diversidade de macroalgas marinhas, representando uma zona de transição entre as regiões ficogeográficas brasileiras tropical (oeste do Ceará até sul da Bahia) e temperada quente (norte do Rio de Janeiro até sul do Rio Grande do Sul) (Oliveira Filho 1977; Horta et al. 2001).

A alta diversidade encontrada nesse estado pode estar relacionada à variedade de substratos consolidados e à presença de pontos de afloramento de águas frias (Horta et al. 2001; Guimarães 2003). Segundo Guimarães (2003), na costa do Espírito Santo ocorrem afloramentos da Água Central do Atlântico Sul (ACAS) por períodos curtos e esporádicos, o que possibilita a presença de espécies estenotérmicas (que não toleram grandes variações térmicas) e euritérmicas (que toleram grandes variações térmicas). Além disso, o afloramento de águas frias aumenta a disponibilidade de nutrientes.

Levantamentos de macroalgas do Espírito Santo encontraram 262 espécies de Rhodophyta (Guimarães 2003), 54 espécies de Ochrophyta (Crispino 2000) e 79 de Chlorophyta (Barata 2004).

Barbosa et al. (2008) encontraram na Praia de Jacaraípe, 34 espécies de Rhodophyta, 4 de Ochrophyta e 12 de Chlorophyta. As espécies de algas pardas mais representativas foram *Padina gymnospora* (Kützing) Sonder e *Dictyopteris delicatula* J.V Lamouroux. Dentre as espécies de algas verdes as mais representativas foram *Cladophora montagneana* Kützing, *Cladophora ordinata* (Børgesen) C. Hoek, *Cladophora vagabunda* Linnaeus (Hoek) e *Ulva lactuca* Linnaeus.

Sá (2011), em praias dos municípios de Serra, Vila Velha e Vitória (ES), encontrou 54 espécies de Rhodophyta, 12 de Ochrophyta e 17 de Chlorophyta. Entre as algas pardas, *Sargassum* spp. foi o táxon com maior percentual de cobertura, e entre algas verdes foi *Ulva* spp.

Carvalho (2013), em estudo sobre o impacto da urbanização sobre comunidades de macroalgas no Espírito Santo, identificou 75 espécies de Rhodophyta, 20 de Ochrophyta e 30 de Chlorophyta. Ao comparar áreas urbanizadas e não urbanizadas, o maior número de espécies de Ochrophyta foi encontrado em praias não urbanizadas. Entre algas pardas, as espécies *Colpomenia sinuosa* (Mertens ex Roth) Derbès & Solier e *P. gymnospora* apresentaram os maiores valores de abundância média. *D. delicatula*, apesar de não ter apresentado alta abundância, ocorreu em praias urbanizadas e não urbanizadas, e foi registrada para sete dos nove locais analisados. Dentre as Chlorophyta, o maior número de espécies ocorreu em praias urbanizadas, sendo *U. lactuca* foi a espécie o mais abundante nesse tipo de local. Já *Codium intertextum* Collins & Hervey foi predominante em áreas não urbanizadas.

As espécies de algas pardas e algas verde citadas para o litoral do Espírito Santo (Barata 2004; Barbosa et al. 2008; Sá 2011; Carvalho 2013) estão reunidas na Tabela 1 e na Tabela 2, respectivamente.

Tabela 1: Espécies de algas pardas (Ochrophyta) citadas para o litoral do Espírito Santo (ES), Brasil.

Espécies	Observações	Referências
<i>Bachelotia antillarum</i>		Carvalho (2013)
<i>Canistrocarpus cervicornis</i>		Carvalho (2013)
<i>Chnoospora minima</i>		Sá (2011)
<i>Colpomenia sinuosa</i>	Espécie abundante em praias urbanizadas e não urbanizadas	Sá (2011); Carvalho (2013)
<i>Dictyopteris delicatula</i>		Barbosa et al. (2008); Sá (2011); Carvalho (2013)
<i>Dictyota crenulata</i>		Carvalho (2013)
<i>Dictyota mertensii</i>		Sá (2011)
<i>Feldmania irregularis</i>		Sá (2011); Carvalho (2013)
<i>Hincksi mitchelliae</i>		Sá (2011); Carvalho (2013)
<i>Hincksi onslowensis</i>		Carvalho (2013)
<i>Levringia brasiliensis</i>		Sá (2011)
<i>Lobophora variegata</i>		Carvalho (2013)
<i>Padina gymnospora</i>	Abundante em praias não urbanizadas	Barbosa et al. (2008); Sá (2011); Carvalho (2013)
<i>Sargassum cymosum</i>	Gênero abundante em costões rochosos	Sá (2011); Carvalho (2013)
<i>Sargassum filipendula</i>	Gênero abundante em costões rochosos	Sá (2011)
<i>Sargassum furcatum</i>		Carvalho (2013)
<i>Sargassum polyceratum</i>		Carvalho (2013)
<i>Sargassum rigidulum</i>		Carvalho (2013)
<i>Sargassum stenophyllum</i>		Barbosa et al. (2008); Carvalho (2013)
<i>Sargassum vulgare</i>	Gênero abundante em costões rochosos	Sá (2011); Carvalho (2013)
<i>Sphacelaria tribuloides</i>		Carvalho (2013)
<i>Stynopodium zonale</i>		Carvalho (2013)
<i>Zonaria tournefortii</i>		Sá (2011); Carvalho (2013)

Tabela 2: Espécies de algas verdes (Chlorophyta) citadas para o litoral do Espírito Santo (ES), Brasil.

Espécies	Observações	Referências
<i>Acetabularia</i> cff. <i>pusilla</i>		Barata (2004)
<i>Anadyomene stellata</i>		Barata (2004); Barbosa et al. (2008); Sá (2011); Carvalho (2013)
<i>Avrainvillea longicaulis</i>		Barata (2004)
<i>Boodleopsis pusilla</i>		Barata (2004)
<i>Boodleopsis vaucherioidea</i>		Sá (2011)
<i>Bryopsis hypnoides</i>		Barata (2004)
<i>Bryopsis pennata</i>		Barata (2004); Carvalho (2013)
<i>Bryopsis plumosa</i>		Barata (2004); Carvalho (2013)
<i>Caulerpa cupressoides</i>	Foram encontradas 3 variedades e 2 formas; gênero representativo em matacões sobrepostos	Barata (2004); Barbosa et al. (2008); Sá (2011); Carvalho (2013)
<i>Caulerpa fastigiata</i>		Barata (2004); Sá (2011); Carvalho (2013)
<i>Caulerpa lanuginosa</i>		Barata (2004); Carvalho (2013)
<i>Caulerpa mexicana</i>		Barata (2004); Barbosa et al. (2008)
<i>Caulerpa prolifera</i>		Barata (2004); Barbosa et al. (2008); Carvalho (2013)
<i>Caulerpa pusilla</i>		Barata (2004)
<i>Caulerpa racemosa</i>	Abundante em áreas não urbanizadas; gênero representativo em matacões sobrepostos	Barata (2004); Sá (2011); Carvalho (2013)
<i>Caulerpa scalpelliformis</i>	Gênero representativo em matacões sobrepostos, ocorreu nas duas épocas do ano	Barata (2004); Sá (2011); Carvalho (2013)
<i>Caulerpa sertularioides</i>		Barata (2004); Carvalho (2013)
<i>Caulerpa taxifolia</i>		Barata (2004)
<i>Caulerpa verticillata</i>		Barata (2004); Carvalho (2013)
<i>Caulerpa webbiana</i>		Barata (2004); Carvalho (2013)
<i>Chaetomorpha aerea</i>		Barata (2004)
<i>Chaetomorpha antennina</i>		Barata (2004); Sá (2011); Carvalho (2013)
<i>Chaetomorpha brachygona</i>		Barata (2004)
<i>Chaetomorpha clavata</i>		Barata (2004)
<i>Chaetomorpha linum</i>		Barbosa et al. (2008)
<i>Chaetomorpha nodosa</i>		Barata (2004)
<i>Chaetomorpha spiralis</i>		Barata (2004)
<i>Chamaedoris penicilum</i>		Barata (2004)
<i>Cladophora albida</i>		Barata (2004)
<i>Cladophora brasiliiana</i>		Sá (2011)
<i>Cladophora catenata</i>		Barata (2004)
<i>Cladophora coelothrix</i>		Barata (2004)
<i>Cladophora corallicola</i>		Barata (2004)
<i>Cladophora dalmática</i>		Barata (2004)
<i>Cladophora montagneana</i>		Barata (2004); Barbosa et al. (2008)
<i>Cladophora ordinata</i>	Espécie filamentosa mais frequente no verão	Barata (2004); Barbosa et al. (2008)
<i>Cladophora prolifera</i>		Barata (2004); Sá (2011); Carvalho (2013)

(continua)

Tabela 2: Espécies de algas verdes (Chlorophyta) citadas para o litoral do Espírito Santo (ES), Brasil.

(continuação)

<i>Cladophora rupestris</i>		Barata (2004); Carvalho (2013)
<i>Cladophora vagabunda</i>	Encontrada na maioria dos pontos de coleta	Barata (2004); Sá (2011); Carvalho (2013)
<i>Cladophoropsis membranacea</i>		Barata (2004); Carvalho (2013)
<i>Codium decorticatum</i>		Barata (2004); Carvalho (2013)
<i>Codium intertextum</i>	Segunda espécie de Chlorophyta mais abundante, predominando em áreas não urbanizadas.	Barata (2004); Sá (2011); Carvalho (2013)
<i>Codium isthmocladum</i>		Barata (2004); Carvalho (2013)
<i>Codium repens</i>		Barata (2004)
<i>Codium spongiosum</i>		Barata (2004)
<i>Codium taylori</i>		Barata (2004); Carvalho (2013)
<i>Derbesia</i> sp.		Barata (2004)
<i>Dictyosphaeria versluysii</i>		Barata (2004); Carvalho (2013)
<i>Halimeda cuneata</i>		Barata (2004); Sá (2011); Carvalho (2013)
<i>Halimeda gracilis</i>	Coletada no infralitoral a uma profundidade de 17 metros.	Barata (2004)
<i>Phyllocladion anastomosans</i>		Barata (2004)
<i>Protomonostroma</i> sp.		Barata (2004)
<i>Rhizoclonium africanum</i>		Barata (2004)
<i>Rhizoclonium riparium</i>		Barata (2004)
<i>Siphonocladus tropicus</i>		Barata (2004)
<i>Udotea cyathiformis</i>		Barata (2004)
<i>Udotea fibrosa</i>		Barata (2004)
<i>Udotea flabellum</i>		Barata (2004); Carvalho (2013)
<i>Ulva chaetomorphoides</i>	Identificada como <i>Enteromorpha chaetomorphoides</i>	Barata (2004)
<i>Ulva clathrata</i>	Identificada como <i>Enteromorpha clathrata</i>	Barata (2004)
<i>Ulva compressa</i>		Barbosa et al. (2008)
<i>Ulva fasciata</i>	Espécie abundante na região estudada; gênero foi predominante em áreas urbanizadas; espécie foliácea mais frequente no verão e no inverno	Barata (2004); Barbosa et al. (2008); Sá (2011); Carvalho (2013)
<i>Ulva flexuosa</i>	Identificada como <i>Enteromorpha flexuosa</i> e <i>E. paradoxa</i> ; espécie abundante, sendo encontrada em praticamente todas as coletas	Barata (2004); Sá (2011); Carvalho (2013)
<i>Ulva lactuca</i>	Gênero foi predominante em áreas urbanizadas; espécie abundante em áreas urbanizadas e não urbanizadas; ocorreu em 61,5% das amostras	Barata (2004); Sá (2011); Carvalho (2013)
<i>Ulva linza</i>	<i>Enteromorpha linza</i>	Barata (2004)
<i>Ulva prolifera</i>	Identificada como <i>Enteromorpha prolifera</i>	Barata (2004)
<i>Ulva rigida</i>	Gênero foi predominante em áreas urbanizadas	Barata (2004); Sá (2011); Carvalho (2013)
<i>Valonia aegagropila</i>		Barata (2004); Carvalho (2013)
<i>Valonia macrophysa</i>		Barata (2004)
<i>Valonia utricularis</i>		Barata (2004)

## 6 JUSTIFICATIVA

Existe uma demanda no setor industrial e farmacêutico por produtos naturais que apresentem atividades biológicas. Os antioxidantes sintéticos convencionalmente utilizados nas indústrias para conservação de alimentos, medicamentos e cosméticos podem causar, em longo prazo, efeitos adversos ao consumidor. Por esse motivo torna-se importante a busca por fontes naturais de substâncias antioxidantes. Por sua vez, a pesquisa por novas substâncias com atividades antibacteriana e antiviral é importante, pois nos últimos anos houve um uso indiscriminado de medicamentos, o que levou à resistência de agentes patogênicos. Além disso, os diferentes tipos de câncer são uma das principais causas de morte no mundo, e têm se buscado novas fontes de substâncias com atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais.

Nesse contexto, as macroalgas marinhas constituem uma importante fonte de produtos naturais, devido à sua composição química, rica em substâncias fenólicas, terpenos e polissacarídeos sulfatados, apresentando potencial como fonte de substâncias com atividade antioxidante, antibacteriana, antiviral e citotóxica.

A costa do Espírito Santo apresenta grande diversidade de espécies de macroalgas, pela variedade de substratos consolidados e pelo afloramento de águas frias. Assim, esse é um local interessante para a prospecção de produtos naturais de macroalgas.

Alguns estudos vêm sendo conduzidos no Laboratório de Algas Marinhas Édison José de Paula do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP) a fim de avaliar o potencial antioxidante e a bioatividade, e caracterizar, identificar e isolar substâncias de macroalgas verdes, vermelhas e pardas. E tanto as espécies de algas e o local escolhido apresentam um grande potencial para esse fim.

## 7 OBJETIVOS

### 7.1 Objetivos gerais

Avaliar o potencial de prospecção de macroalgas do litoral do Espírito Santo (ES), mediante estudos dos potenciais antioxidante e bioativo de extratos brutos de quatro espécies de algas pardas e de uma espécie de alga verde (*Codium isthmocladum*).

### 7.2 Objetivos específicos

- Selecionar e coletar espécies de macroalgas que ocorram em abundância no local de estudo e possam apresentar potencial de aplicação biotecnológico;

- Caracterizar a composição química majoritária de extratos das espécies de algas pardas a fim de relacioná-la com o potencial antioxidante e bioativo;
- Analisar o potencial de exploração dos extratos metanólicos e aquosos das espécies de macroalgas selecionadas mediante a avaliação da capacidade antioxidante;
- Determinar o potencial bioativo das espécies selecionadas por meio da análise da atividade antibacteriana, antiviral e citotóxica de extratos metanólicos e aquosos.

# Material e Métodos

---

## 1 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

As coletas do material biológico foram realizadas no litoral sul do Espírito Santo (ES), Brasil, entre os dias 08 e 10 de março de 2016. Os locais de coleta foram definidos de acordo com a acessibilidade e abundância de espécies. As espécies de estudo foram selecionadas conforme a praticidade de coleta, abundância e identidade taxonômica. Inicialmente, para o presente estudo seriam coletadas apenas algas pardas, no entanto, devido a alta abundância de exemplares de *Codium isthmocladum* Vickers, essa espécie também foi incluída. Assim, foram coletadas quatro espécies de algas pardas, *Chnoospora minima* (Hering) Papenfuss (Ordem Ectocarpales; Fig. 1A); *Dictyopteris plagiogramma* (Montagne) Vickers (Ordem Dictyotales; Fig. 1B); *P. gymnospora* (Ordem Dictyotales; Fig. 1C); e *Sargassum cymosum* C. Agardh (Ordem Fucales; Fig. 1D), e uma espécie de alga verde, *C. isthmocladum* (Ordem Bryopsidales; Fig. 1E).

A espécie *C. minima* foi coletada na Praia da Cruz ( $21^{\circ} 02,116' S$ ;  $40^{\circ} 48,812' O$ ), localizada no município de Marataízes, e na Praia de Parati ( $20^{\circ} 48,456' S$ ;  $40^{\circ} 36,575' O$ ), localizada no município de Anchieta. A espécie *D. plagiogramma* foi coletada no costão rochoso entre as Praias de Itaoca e Itaipava ( $21^{\circ} 00,439' S$ ;  $40^{\circ} 48,563' O$ ), localizadas no município de Itapemirim. As espécies *P. gymnospora*, *S. cymosum* e *C. isthmocladum* foram coletadas na Praia Marataízes ( $21^{\circ} 02,620' S$ ;  $40^{\circ} 49,453' O$ ), localizada no município de Marataízes.

A coleta do material biológico foi realizada na região entre-marés, atentando para indivíduos sadios. As algas foram triadas e limpas de macroepífitos, lavadas com água doce e secas parcialmente ao ar e protegidas do sol. Posteriormente foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas até o laboratório, onde foram secas em estufa com circulação de ar a  $40^{\circ}C$ . O material seco foi triturado em moinho de facas e submetido ao procedimento de extração. Alguns exemplares frescos foram empregados na preparação de exsicatas ( $n = 5$ ), os quais foram utilizados para identificação taxonômica em colaboração com o Dr. Fábio Nauer. Alguns exemplares de *C. isthmocladum* foram secos em sílica ( $n = 3$ ) para identificação molecular, realizada pelo técnico William da Silva Oliveira.

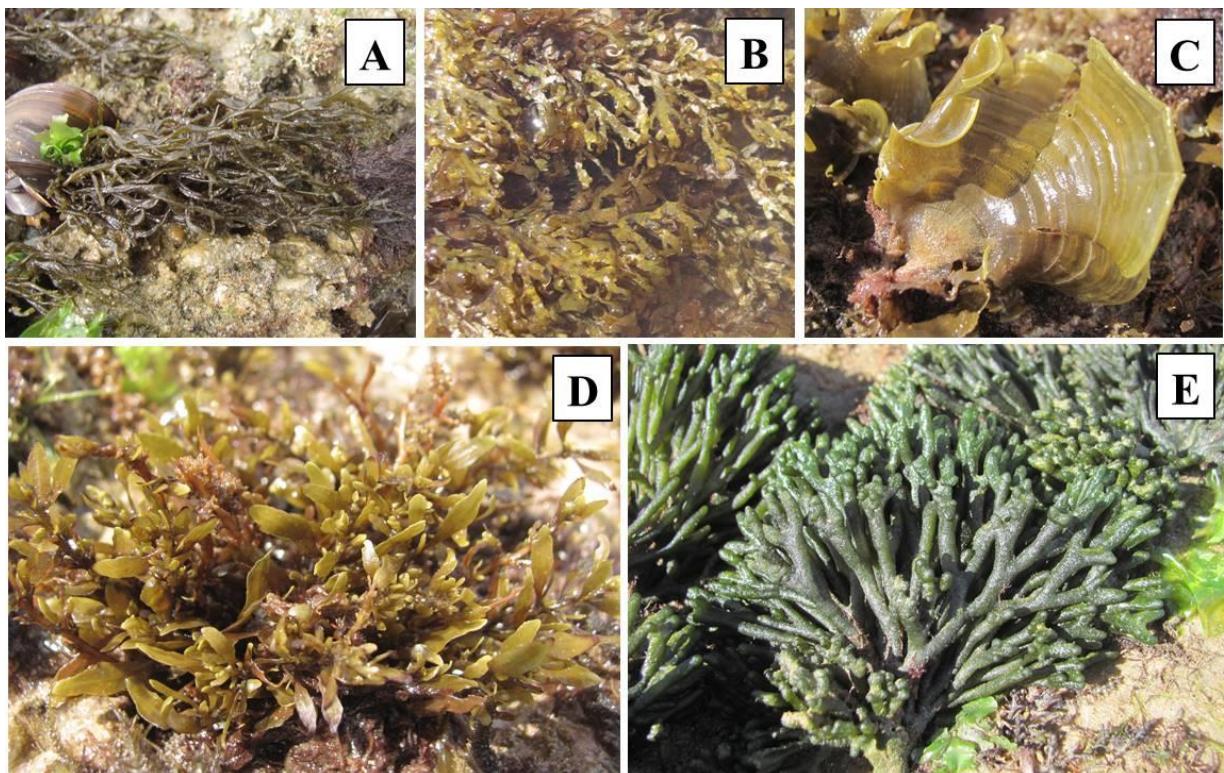


Figura 2: Espécies de algas pardas coletadas no litoral sul do Espírito Santo (ES), Brasil: A) *Chnoospora minima*; B) *Dictyopteris plagiogramma*; C) *Padina gymnospora*; D) *Sargassum cymosum*; E) *Codium isthmocladum* (Fotos: Fungyi Chow, 2016).

## 2 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA

Para identificação do material foram consideradas características morfológicas externas e internas, analisadas em microscópio estereoscópico e microscópio óptico. A identificação foi baseada em Nunes e Paula (2004) para *C. minima*, Nunes e Paula (2006) para *D. plagiogramma*, Ugadim (1973a), Allender e Kraft (1983) e Nunes e Paula (2000) para *P. gymnospora*, Paula (1988) para *S. cymosum* e, Ugadim (1973b) e Oliveira-Carvalho et al. (2010) para *C. isthmocladum*. A descrição morfológica das espécies identificadas encontra-se no Apêndice A.

Para identificação molecular de *C. isthmocladum* foi amplificada a região Exon 1 do gene *rbcL*, utilizando os iniciadores 12-34F e 799-778R, de acordo com Verbruggen et al. (2007). Os procedimentos de extração de DNA, amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), purificação do produto da PCR e sequenciamento, assim como as sequências obtidas, encontram-se no Apêndice B.

Após a identificação das espécies foram confeccionadas exsicatas, as quais foram depositadas no herbário do IB-USP e receberam os seguintes números: SPF 58244 e SPF 58246 (*C. minima*), SPF 58245 (*D. plagiogramma*), SPF 58243 (*P. gymnospora*), SPF 58248 (*S. cymosum*) e SPF 58247 (*C. isthmocladum*).

### **3 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO E DELINEAMENTO GERAL**

As amostras secas e trituradas foram divididas aleatoriamente em cinco sub-amostras ( $n = 5$ ) e extraídas seriadamente por maceração simples em hexano (Hx; Synth®, Brasil), diclorometano (DCM; Synth®, Brasil), acetato de etila (AcOEt; Synth®, Brasil), metanol (MeOH; Synth®, Brasil) e água quente ( $80^{\circ}\text{C}$ ) (Fig. 3). Para a maceração com os solventes orgânicos ocorreram duas trocas de solvente a cada 24 h (três extrações), na proporção de 1 g de massa seca para 2 mL de solvente. Para a maceração com água, o solvente foi trocado duas vezes a cada 5 h (três extrações), na proporção de 1 g de massa seca para 4 mL de água. Os extratos de cada sub-amostra, resultantes das três extrações, foram reunidos como uma única amostra, mantendo sempre a individualidade de cada sub-amostra. Os extratos orgânicos foram filtrados, concentrados em banho-maria ( $40^{\circ}\text{C}$ ) e liofilizados. Os extratos aquosos foram filtrados e liofilizados. Após a secagem, foi calculado o rendimento dos extratos em relação à massa seca de alga.

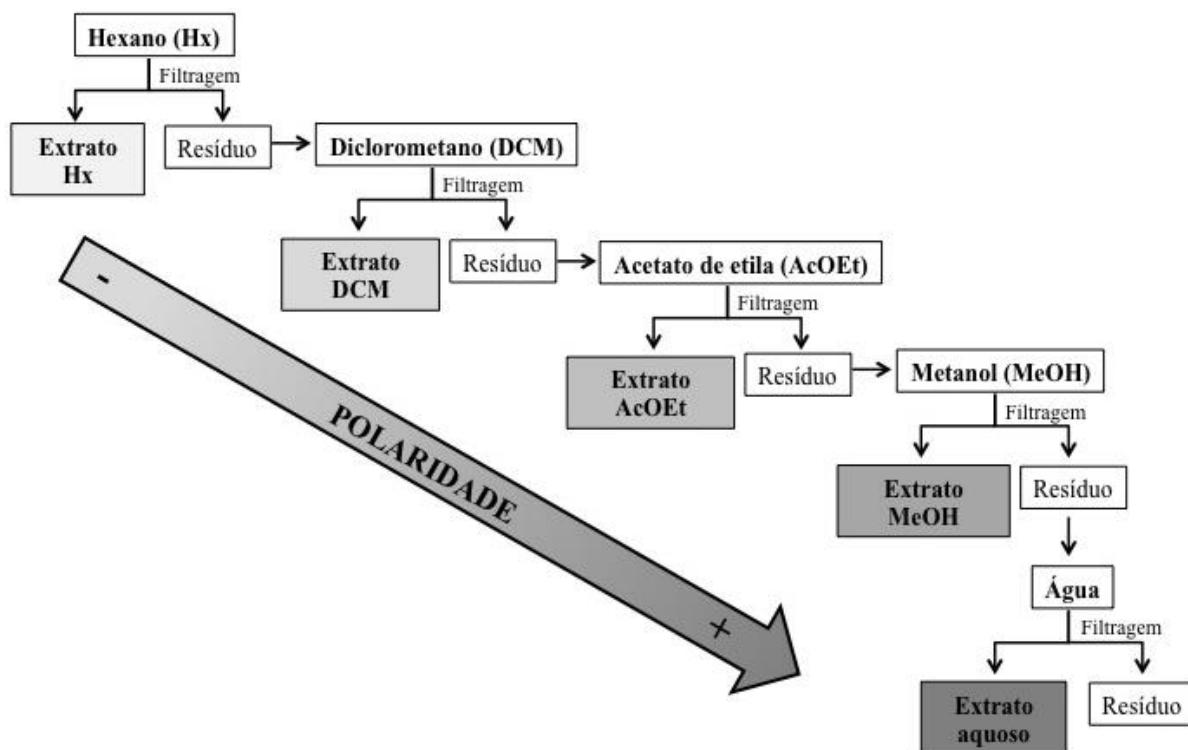


Figura 3: Esquema geral do processo de obtenção dos extratos orgânicos e do extrato aquoso. Hx – hexânico; DCM – diclorometano; AcEtO – acetato de etila; MeOH – metanólico.

Os extratos brutos, dependendo do rendimento e da espécie estudada, foram utilizados para as análises de caracterização química, potencial antioxidante e potencial bioativo (antibacteriano, antiviral e citotóxico). Os métodos empregados em cada análise estão descritos nos *Capítulos I a IV*.

Os métodos empregados para caracterização química dos extratos brutos de algas pardas estão detalhados no *Capítulo I*. Para os extratos metanólicos e aquosos foi realizada varredura UV-vis (200 a 700 nm) em espectrofotômetro (Epoch<sup>TM</sup> 2, BioTek<sup>®</sup>, EUA). Os extratos acetato de etila e metanólico dessas espécies foram analisados em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodo (CLAE-DAD) para quantificação de substâncias fenólicas. Esses métodos foram realizados em colaboração com Profa. Dra Cláudia Maria Furlan do Laboratório de Fitoquímica (IB-USP).

Os extratos metanólico e aquoso das algas pardas, *C. minima*, *P. gymnospora* e *S. cymosum*, e da alga verde, *C. isthmocladum*, foram analisados quanto ao potencial antioxidante por meio de cinco ensaios colorimétricos, descritos nos *Capítulo II* (algas pardas) e *Capítulo IV* (*C. isthmocladum*). Foram realizados os seguintes ensaios: captura do radical ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), de acordo com Torres et al. (2017) adaptado de Rufino et al. (2007) e Yang et al. (2011); captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), segundo Pires et al. (2017a) modificado de Brand-Williams et al. (1995); potencial redutor do reagente Folin-Ciocalteu Pires et al. (2017b) adaptado de Singleton e Rossi (1965) e Waterman e Mole (1994); potencial redutor do íon ferro (FRAP), de acordo com Urrea-Victoria et al. (2016) adaptado de Brito et al. (2006); e atividade quelante de metal Harb et al. (2016) modificado de Min et al. (2011).

Os extratos metanólico e aquoso das quatro espécies de algas pardas e de *C. isthmocladum* foram analisados quanto ao potencial antibacteriano, antiviral e **citotóxico**, por meio dos ensaios de inibição do crescimento bacteriano, inibição da enzima transcriptase reversa do HIV-1 (TR-HIV) e inibição do crescimento celular pelo método do MTT, respectivamente, detalhados nos *Capítulo III* (algas pardas) e *Capítulo IV* (*C. isthmocladum*). O ensaio de inibição do crescimento bacteriano foi realizado segundo Sedano-Partida et al. (in press) adaptado de Carneiro et al. (2011), em colaboração com a Profa Dra Cláudia Maria Furlan. A capacidade de inibição da enzima TR-HIV foi analisada por meio de método colorimétrico com o kit de teste da TR-HIV (Roche<sup>®</sup>, Alemanha), com base no trabalho de Woradulayapinij et al. (2005). A inibição do crescimento celular pelo método do MTT foi realizada de acordo com Mosmann (1983), em colaboração com a Profa Dra Letícia Costa-Lotufo do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais Marinhos (LAFARMAR) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP).

Para relacionar o potencial bioativo com a composição química dos extratos, foram realizados ensaios para a quantificação de carboidratos solúveis totais (Dubois et al. 1951; Karsten et al. 2002; Masuko et al. 2005), grau de sulfatação (Torres (2017) adaptado de Dodgson e Price

(1962) e Yoshimura (2006)), substâncias fenólicas totais (Pires et al. 2017b) e proteínas solúveis totais Harb (2016) adaptado de Bradford (1976), descritos nos *Capítulo III* (algas pardas) e *Capítulo IV* (*C. isthmocladum*).

# Capítulo I

---

## Caracterização química de extratos de *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum* (Phaeophyceae, Ochrophyta)

### Resumo

Algumas pardas são caracterizadas pela grande quantidade de substâncias fenólicas, as quais são relacionadas às atividades antioxidantes e biológicas encontradas em extratos desse grupo. No entanto, ainda são poucos os estudos sobre a composição química desses extratos. Nesse sentido, o objetivo do presente capítulo foi realizar uma caracterização inicial, e quantificar a composição fenólica de extratos brutos de quatro espécies de algas pardas, *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*. Extratos metanólicos e aquosos foram analisados no seu espectro de absorção UV-vis em espectrofotômetro e foram utilizados para quantificação de substâncias fenólicas totais pelo ensaio Folin-Ciocalteu. Os extratos acetato de etila e metanólico foram analisados em CLAE-DAD, para caracterização e quantificação de substâncias fenólicas. Pelo perfil espectral foram observadas duas bandas de absorção, nas regiões entre 200-239 nm (banda A) e entre 240-279 nm (banda B). A banda B está relacionada à presença de substâncias fenólicas, e os valores da área sob a curva, dos diferentes extratos nessa região, apresentaram tendência semelhante aos resultados do ensaio Folin-Ciocalteu, sendo observado maior teor de substâncias fenólicas no extrato metanólico de *P.gymnospora*. De acordo com os dados obtidos por CLAE-DAD, *D. plagiogramma* apresentou o maior teor de substâncias fenólicas. Considerando as quatro espécies, foram detectados 109 constituintes, caracterizados como substâncias fenólicas, segundo seu espectro de absorção UV. Desses, foram selecionados 64 constituintes majoritários (área relativa  $\geq 2\%$ ), os quais foram utilizados para análise de agrupamento, sendo possível observar a formação de dois grupos, caracterizados pelo tipo de extrato. Concluindo, o perfil espectral UV-vis pode ser utilizado como uma ferramenta para prospecção de substâncias em extratos brutos. O método para análise dos extratos em CLAE-DAD foi eficiente para a separação das substâncias fenólicas, e a partir desses dados, foi possível observar que a composição fenólica variou principalmente entre o tipo de extrato.

Palavras-chave: Algumas pardas, CLAE, extrato bruto, espectrofotômetro, substâncias fenólicas

**Abstract**

Brown seaweeds are characterized by the large amount of phenolic compounds, which are related to the antioxidant and biological activities found in extracts of this group. However, there are still few studies on the chemical composition of these extracts. The objective of this study was to perform an initial phenolics characterization and quantification of crude extracts from four species of brown algae, *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* and *Sargassum cymosum*. The spectra of UV-Vis absorption of methanolic and aqueous extracts were analyzed by spectrophotometer and then used for quantification of total phenolic compounds by Folin-Ciocalteu assay. The ethyl acetate and methanolic extracts were analyzed in HPLC-DAD for the characterization and quantification of phenolic compounds. The spectral profile showed two absorption bands, in the regions between 200-239 nm (band A) and between 240-279 nm (band B). The band B is related to the presence of phenolic compounds, and the values of area under the curve, for different extracts in this region, showed similar trend to results of the Folin-Ciocalteu assay, with a higher content of phenolic compounds in the methanolic extract of *P. gymnospora*. According to HPLC-DAD data, *D. plagiogramma* presented the highest content of phenolic compounds. Considering the four species, 109 constituents were detected, characterized as phenolic compounds, according to their UV absorption spectrum. From these, 64 major constituents (relative area  $\geq 2\%$ ) were selected, which were used for cluster analysis, and it was possible to observe the formation of two groups, characterized by the type of extract. In conclusion, the UV-vis spectral profile can be used as a tool for prospecting substances in crude extracts. The method for analyzing the extracts by HPLC-DAD was efficient for the separation of the phenolic compounds, and from these data, it was possible to observe that the phenolic composition varied mainly between the type of extract.

Keywords: Brown seaweeds, crude extract, phenolic compounds, HPLC, spectrophotometer

## 1 INTRODUÇÃO

As algas pardas apresentam cerca de 1140 metabólitos secundários conhecidos, dos quais a maior parte são substâncias fenólicas, principalmente da classe dos florotaninos (Maschek e Baker 2008; Blunt et al. 2014), que representam de 10% a 20% o peso seco dessas algas (Ragan e Glombitza 1986). Os florotaninos, polifenóis derivados do floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenzeno), são policetídeos aromáticos biossintetizados pela via do ácido malônico, e armazenados em organelas denominadas de fisoides (Koivikko et al. 2007). A classe dos florotaninos é a mais estudada em algas pardas, mas também é reportada a presença de ácidos fenólicos (Farvin e Jacobsen 2013; Abirami e Kowsalya 2017) e flavonoides (Yoshie-Stark et al. 2003; Abirami e Kowsalya 2017).

As substâncias fenólicas apresentam característica polar e a sua extração a partir de material vegetal é normalmente realizada com acetona, acetato de etila, etanol, metanol ou água, ou com a combinação desses solventes (Koivikko et al. 2005; Dai e Mumper 2010; López et al. 2011; Martínez e Castañeda 2013). O rendimento dos extratos aumenta com a polaridade do solvente, e para algas pardas é reportado maior rendimento em extratos aquosos (Koivikko et al. 2005; López et al. 2011; Wang et al. 2012; Farvin e Jacobsen 2013).

Extratos que apresentam substâncias fenólicas possuem pelo menos uma banda de absorção máxima, na região entre 240-280 nm. O floroglucinol, monômero dos florotaninos, apresenta pico de absorção máxima em 270 nm (Koivikko et al. 2005). Por apresentarem absorção na região do ultravioleta (UV), as substâncias fenólicas são relacionadas a fotoproteção contra a radiação UV em algas pardas (Schmitz et al. 2018).

As substâncias fenólicas, especialmente os florotaninos, também são relacionadas ao potencial bioativo de algas pardas. Diversos estudos demonstram que extratos de algas pardas apresentam alta atividade antioxidante (Zubia et al. 2007; Cofrades et al. 2010), antiviral (Ahn et al. 2004) e antibacteriana (Eom et al. 2008; Vijayabaskar e Shiyamala 2011), no entanto, ainda existem poucos estudos sobre a composição química desses extratos (Agregán et al. 2017).

Nesse sentido, o objetivo do presente capítulo foi realizar uma caracterização inicial e quantificar a composição fenólica de extratos brutos de quatro espécies de algas pardas, *C. minima*, *D. plagiogramma*, *P. gymnospora* e *S. cymosum*, coletadas no litoral sul do estado de Espírito Santo (ES), Brasil.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta do material biológico e procedimento de extração

As coletas do material biológico foram realizadas em março de 2016 na região sul do litoral do Espírito Santo (ES), Brasil. As espécies foram escolhidas segundo a sua abundância no local e praticidade para triagem e limpeza, possibilitando a logística de trabalho. Os procedimentos de coleta e preparo do material biológico estão descritos na seção *Material e Métodos*, item 1 *COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO*.

As algas foram secas em estufa e trituradas, e divididas em cinco subamostras ( $n = 5$ ), sendo consideradas neste estudo como ‘repetições’. Posteriormente seguiu-se com o procedimento de extração por maceração simples e seriada com cinco solventes em polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e água quente a 80 °C), como descrito na seção *Material e Métodos*, item 3 *PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO E DELINEAMENTO GERAL*. Para cada solvente, os extratos brutos foram secos e pesados, e a massa obtida foi utilizada para determinar o rendimento em relação à massa seca de alga.

### 2.2 Espectro de absorção UV-vis

Os extratos metanólicos e aquosos das quatro espécies estudadas ( $n = 3$ ), solubilizados em DMSO 10% para uma concentração de 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , foram analisados no seu espectro de absorção nas regiões do espectro ultravioleta (UV; 240 a 400 nm) e do espectro visível (vis; 400 a 700 nm) em espectrofotômetro UV-vis (Epoch™ 2-BioTek®, EUA). A leitura foi conduzida em microplaca de 96 poços com volume de 200  $\mu\text{L}$ . As bandas de máxima absorção foram identificadas (banda A: 200-239 nm e banda B: 240-279 nm) e logo calculada a área sob a curva pelo método do trapézio, para comparação quantitativa entre as espécies.

### 2.3 Quantificação de substâncias fenólicas totais (Folin-Ciocalteu)

A concentração das substâncias fenólicas totais foi quantificada mediante o ensaio de redução do reagente Folin-Ciocalteu, seguindo o protocolo de Pires et al. (2017). O reagente Folin-Ciocalteu é uma mistura dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico, os quais ao serem reduzidos por substâncias fenólicas em meio básico formam um complexo de coloração azulada.

Para a realização do ensaio, os extratos metanólicos e aquosos foram solubilizados em DMSO 10% para uma concentração estoque de 5  $\text{mg.mL}^{-1}$  e quantificados para uma concentração final de 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de extrato. Como controle negativo foi utilizado DMSO 10%. Para a

construção de curva-padrão foi utilizada solução de floroglucinol (Sigma-Aldrich®, Brasil) em concentrações de 20 a 60 µg.mL<sup>-1</sup> ( $y = 0,0418x + 0,029$ ;  $R^2 = 0,99006$ ).

O ensaio foi conduzido em microplacas de 96 poços com volume final de 300 µL. A mistura da reação foi preparada com 200 µL de água ultrapura, 20 µL da amostra ou de floroglucinol ou de DMSO 10%, 20 µL do reagente Folin-Ciocalteu 2 N (Sigma-Aldrich®, Brasil), e por último, 60 µL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10%. As amostras foram incubadas por 30 min em temperatura ambiente e protegidas da luz. As absorbâncias foram medidas em 760 nm em espectrofotômetro UV-vis (Epoch™ 2-BioTek®, EUA). O resultado foi expresso como a porcentagem da massa de substâncias fenólicas, equivalentes ao floroglucinol, em relação à massa de extrato seco.

## 2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência

A análise de identificação de substâncias fenólicas foi realizada com os extratos acetato de etila e metanólico das quatro espécies, solubilizados em DMSO para uma concentração final de 10 mg.mL<sup>-1</sup> ( $n = 3$ ). Esses extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodo (CLAE-DAD; LC1260 – Agilent Technologies, Inc, EUA), utilizando coluna de fase reversa Zorbax C18 (150 x 4,6 mm, 3,5 µm). A fase móvel consistiu em gradiente de ácido acético 0,1% (A) e acetonitrila (B), com a seguinte programação: 90% A (0 – 10 min), 75% A (10 – 20 min), com fluxo de 0,5 mL/min, 75% A (21 min) e 0% A (40 min), com fluxo de 1,0 mL/min. Temperatura da coluna ajustada em 40 °C e volume de injeção de 3 µL. Os cromatogramas foram processados em  $\lambda = 270$  nm.

A quantificação de substâncias fenólicas totais foi realizada com curva padrão de floroglucinol em concentrações de 2,5 a 1000 µg.mL<sup>-1</sup> ( $y = 2188,2x - 2,5425$ ;  $R^2 = 0,9984$ ), analisada em CLAE-DAD nas mesmas condições descritas anteriormente. Para a quantificação de substâncias fenólicas totais foram considerados todos os constituintes detectados em cada extrato. O resultado foi expresso como a porcentagem da massa de substâncias fenólicas, equivalentes ao floroglucinol, em relação à massa de extrato seco.

Posteriormente foram selecionados os constituintes que apresentaram área relativa  $\geq 2\%$ , definida de acordo com a seguinte fórmula: Área relativa = (Área/ $\sum$ Área) x 100. Os constituintes com área relativa  $\geq 2\%$  foram considerados como constituintes fenólicos majoritários, os quais foram selecionados para apresentação dos tempos de retenção (TR), banda máxima de absorção no UV e espectros de absorção no UV. Os dados do teor de substâncias fenólicas de cada constituinte majoritário, detectados nos extratos de acetato de etila e metanólico, foram submetidos à análise de agrupamento pelo Método de Ward, que utiliza como função de semelhança a distância

Euclidiana quadrática. Os dados em porcentagem foram transformados em arcoseno arcoseno $\sqrt{(x/100)}$ , em que  $x$ , representa os dados em porcentagem a serem transformados.

## 2.5 Análise estatística

Os dados de rendimento e teor de substâncias fenólicas, expressos em porcentagem, foram transformados em arcoseno $\sqrt{(x/100)}$ . Os dados da área sob a curva do espectro de absorção espectrofotométrica foram transformados em logaritmo. Os dados transformados foram analisados quanto à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade (teste de Bartlett), e posteriormente submetidos à análise de variância (ANOVA) unifatorial ou bifatorial dependendo do caso ( $p < 0,05$ ). O teste *post-hoc* de Newmann-Keuls foi utilizado para determinar diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as espécies e extratos.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Rendimento dos extratos

O rendimento para as quatro espécies (Tabela 3), foi maior para o extrato aquoso, seguido pelo extrato metanólico. Em *D. plagiogramma* não houve diferença significativa entre o rendimento dos extratos metanólico e diclorometânico.

Tabela 3: Percentual do rendimento (média  $\pm$  DP;  $n = 5$ ) dos extratos brutos hexânico, diclorometânico, acetato de etila, metanólico e aquoso em relação à massa seca inicial para extração das algas *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste *post-hoc* de Newmann-Keuls ( $p < 0,05$ ).

	<i>C. minima</i>	<i>D. plagiogramma</i>	<i>P. gymnospora</i>	<i>S. cymosum</i>
Massa inicial de alga para extração (massa seca)	7,5 g	1,5 g	15 g	20 g
Hexânico	0,43 $\pm$ 0,15 <sup>d</sup>	0,51 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>	0,30 $\pm$ 0,03 <sup>d</sup>	0,20 $\pm$ 0,01 <sup>D</sup>
Diclorometânico	1,01 $\pm$ 0,14 <sup>c</sup>	2,68 $\pm$ 0,18 <sup>B</sup>	0,23 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup>	0,34 $\pm$ 0,08 <sup>C</sup>
Acetato de etila	0,62 $\pm$ 0,08 <sup>d</sup>	0,49 $\pm$ 0,16 <sup>c</sup>	1,28 $\pm$ 0,18 <sup>e</sup>	0,22 $\pm$ 0,03 <sup>D</sup>
Metanólico	4,26 $\pm$ 0,57 <sup>b</sup>	2,35 $\pm$ 0,18 <sup>B</sup>	2,96 $\pm$ 0,32 <sup>b</sup>	5,04 $\pm$ 0,22 <sup>B</sup>
Aquoso	21,60 $\pm$ 1,61 <sup>a</sup>	6,34 $\pm$ 0,60 <sup>A</sup>	12,10 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup>	16,95 $\pm$ 0,87 <sup>A</sup>

### 3.2 Espectro de absorção UV-vis

Os extratos metanólico e aquoso das quatro espécies apresentaram perfil de absorção espectral semelhante (Fig. 4). Os extratos apresentaram pico de absorção máximo em 229 nm.

Foram evidenciadas duas regiões de absorção, em 200-239 nm (banda A) e em 240-279 nm (banda B).

O valor de área sob a curva da banda A, em *D. plagiogramma* e *P. gymnospora*, foi maior no extrato metanólico em relação ao extrato aquoso (Fig. 5A). Em *C. minima* e *S. cymosum* não houve diferença significativa entre os extratos para a mesma região espectral (Fig. 5A). Comparando os extratos metanólicos, *P. gymnospora* apresentou maior valor de área da banda A, e entre os extratos aquosos, tanto *C. minima*, como *S. cymosum* apresentaram as maiores áreas.

Para a banda B, em *C. minima* e *S. cymosum*, o extrato aquoso apresentou maior área em relação ao extrato metanólico, já em *P. gymnospora*, foi o extrato metanólico que apresentou a maior área (Fig. 5B). Para *D. plagiogramma* não houve diferença significativa entre os extratos (Fig. 5B). Entre os extratos metanólicos, *P. gymnospora* apresentou maior valor de área para a banda B, e entre os extratos aquosos, *C. minima* e *S. cymosum* apresentaram as maiores áreas.

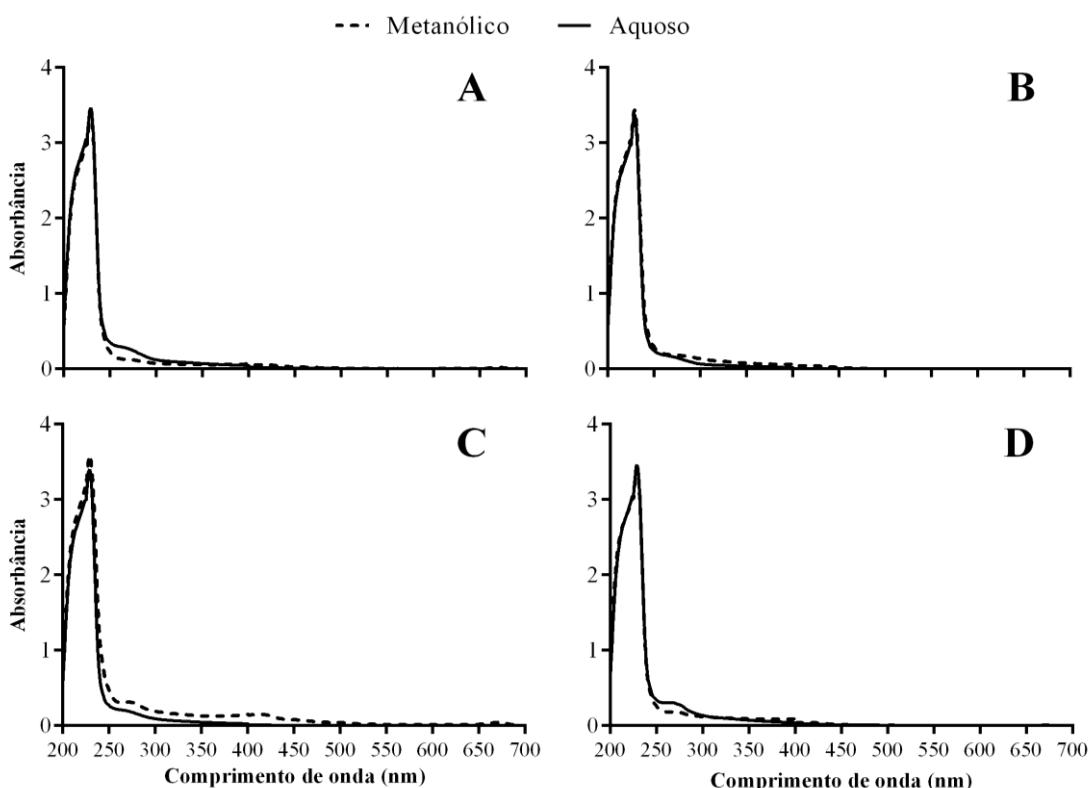


Figura 4: Perfil espectrofotométrico de absorção dos extratos metanólico e aquoso de (A) *Chnoospora minima*, (B) *Dictyopteris plagiogramma*, (C) *Padina gymnospora* e (D) *Sargassum cymosum*, representado pela média das absorbâncias ( $n = 3$ ) nas regiões do espectro UV-vis (200-700 nm).

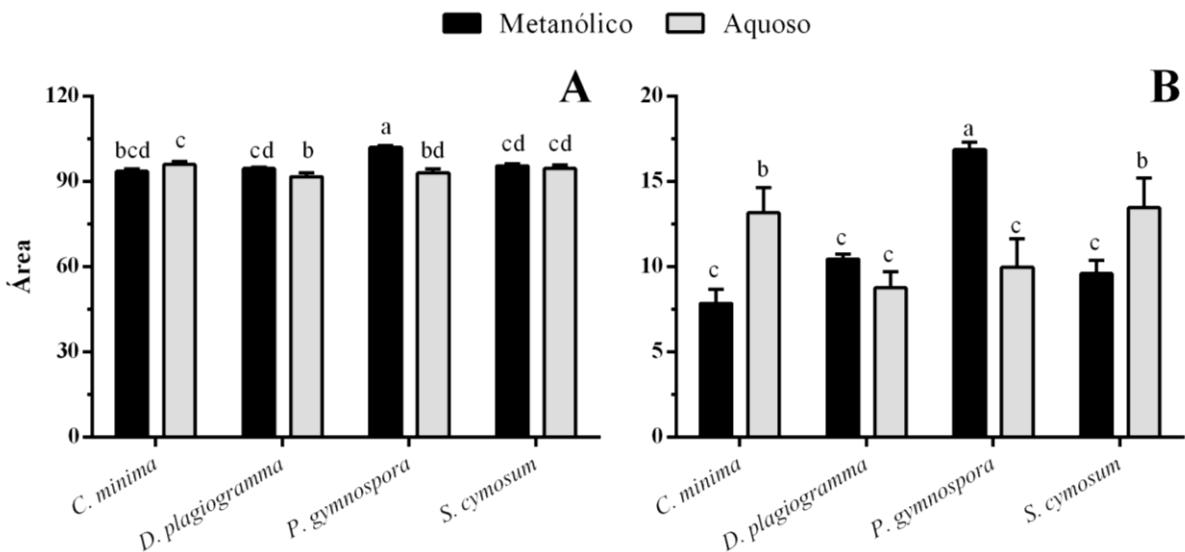


Figura 5: Área sob a curva (média ± DP;  $n = 3$ ) do perfil espectrofotométrico de absorção nas regiões (A)  $\lambda = 200\text{-}239 \text{ nm}$  da banda A e (B)  $\lambda = 240\text{-}279 \text{ nm}$  da banda B dos extratos metanólico e aquoso de *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste *post-hoc* de Newmann-Keuls ( $p < 0,05$ ).

### 3.3 Quantificação de substâncias fenólicas totais (Folin-Ciocalteu)

Para as espécies *C. minima* e *S. cymosum* o extrato aquoso ( $5,19 \pm 0,63\%$  e  $16,07 \pm 1,17\%$ , respectivamente) apresentou maior teor de substâncias fenólicas, quando comparado ao extrato metanólico ( $3,71 \pm 0,80\%$  e  $13,53 \pm 1,05\%$ , respectivamente; Fig. 6). Para *D. plagiogramma* não houve diferença significativa no teor de substâncias fenólicas entre os extratos metanólico ( $4,64 \pm 0,54\%$ ) e aquoso ( $5,08 \pm 0,48\%$ ). Em *P. gymnospora* o extrato metanólico apresentou o maior teor de substâncias fenólicas,  $48,5 \pm 1,50\%$ , enquanto que o extrato aquoso apresentou  $9,95 \pm 0,57\%$ .

Entre os extratos metanólicos, *P. gymnospora* apresentou o maior teor de substâncias fenólicas (Fig. 6), sendo inclusive o extrato e a espécie com maior percentual de fenólicos ( $48,5 \pm 1,50\%$ ); já entre os extratos aquosos, *S. cymosum* apresentou o maior teor, quando comparado com as outras espécies.

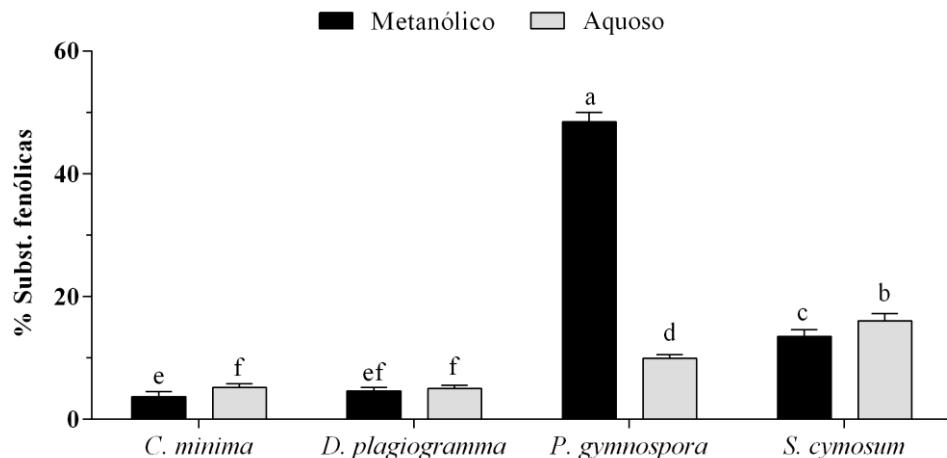


Figura 6: Teor de substâncias fenólicas totais (média ± DP;  $n = 3$ ), expresso como porcentagem, equivalentes ao floroglucinol, em relação à massa seca dos extratos metanólico e aquoso de *Chnoopora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*, quantificado pelo método do Folin-Ciocalteu. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste *post-hoc* de Newmann-Keuls ( $p < 0,05$ ).

### 3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A quantificação de substâncias fenólicas por CLAE-DAD foi realizada nos extratos acetato de etila e metanólico de *C. minima*, *D. plagiogramma*, *P. gymnospora* e *S. cymosum*. A análise dos cromatogramas apresentou um total de 109 constituintes detectados a 270 nm como substâncias fenólicas, segundo seu espectro de absorção UV. A partir de todos os constituintes detectados, foram estimadas as porcentagens de fenólicos totais para cada extrato e espécie (Fig. 7).

Em *C. minima*, o extrato acetato de etila apresentou maior teor de substâncias fenólicas ( $4,73 \pm 0,68\%$ ) em relação ao extrato metanólico ( $1,45 \pm 0,21\%$ ) (Fig. 7). Para *P. gymnospora* não houve diferença significativa entre os extratos acetato de etila e metanólico no teor de substâncias fenólicas ( $3,89 \pm 0,65\%$  e  $4,37 \pm 0,18\%$ , respectivamente). O extrato metanólico de *S. cymosum* apresentou maior teor de substâncias fenólicas ( $5,70 \pm 1,07\%$ ) do que o extrato acetato de etila ( $2,42 \pm 0,19\%$ ) (Fig. 7). Apenas uma repetição dos extratos acetato de etila e metanólico de *D. plagiogramma* foi analisada, devido à falta de massa disponível. Por esse motivo, o teor de substâncias fenólicas desses extratos não foi considerado na análise estatística. No entanto, nota-se que o extrato acetato de etila dessa espécie apresentou alto teor de fenólicos (10,53%). Excluindo os extratos de *D. plagiogramma*, entre os extratos acetato de etila, *C. minima* e *P. gymnospora* apresentaram maior teor de substâncias fenólicas, e entre os extratos metanólicos foram *P. gymnospora* e *S. cymosum*.

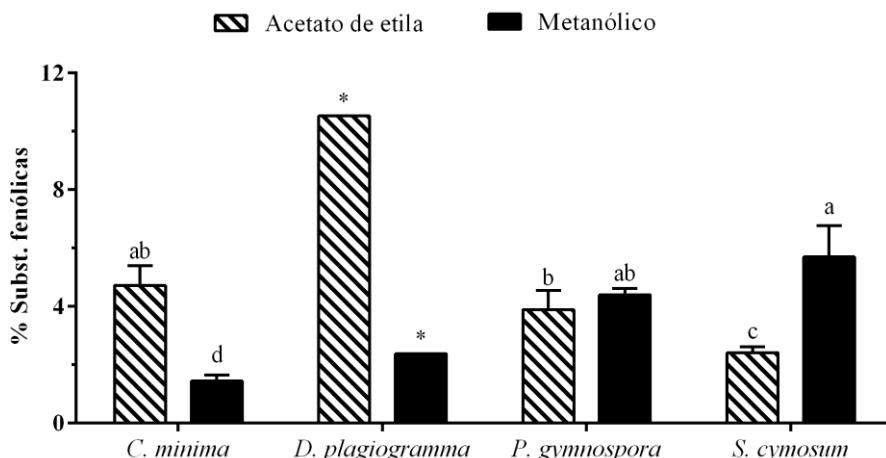


Figura 7: Teor de substâncias fenólicas totais (média ± DP;  $n = 3$ ), expresso como a porcentagem da massa de substâncias fenólicas, equivalentes ao floroglucinol, pela massa seca dos extratos acetato de etila e metanólico de *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*, analisados por CLAE-DAD. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste *post-hoc* de Newmann-Keuls ( $p < 0,05$ ). \*Extratos de *D. plagiogramma* apenas com uma repetição, portanto não foi considerada na análise estatística.

As figuras com os espectros de absorção no UV, e a tabela com o tempo de retenção (TR), absorção máxima no UV e quantificação de todos os 109 constituintes detectados, encontram-se no Apêndice C. A partir dos dados de área relativa dos 109 constituintes fenólicos, foram selecionados 62 constituintes fenólicos majoritários, ou seja, que apresentaram área relativa superior à 2%. Nas Figura 8 e Figura 9 são apresentados espectros de absorção no UV dos constituintes fenólicos majoritários. Na Tabela 4 são apresentados o TR, absorção UV e teor de substâncias fenólicas de cada um dos constituintes fenólicos majoritários. Em ambas as figuras e na tabela, foi mantida a numeração original dos constituintes fenólicos, apresentada no Apêndice C.

O padrão floroglucinol foi detectado em 5,279 min e apresentou pico de absorção máxima em 266 nm (Fig. 8; Tabela 4). Os constituintes fenólicos dos extratos acetato de etila e metanólico das quatro espécies estudadas apresentaram ao menos uma banda de absorção entre 240-290 nm (Fig. 8 e Fig. 9). A partir do tempo de retenção de 25,723 min (constituintes #66-#108) foram encontrados alguns constituintes que também apresentam bandas de absorção máxima entre 300-396 nm (Fig. 7), os quais somente foram detectados nos extratos acetato de etila (Tabela 4). Nos extratos acetato de etila foram encontrados constituintes até aproximadamente 30 min, no entanto nos extratos metanólicos, os constituintes foram encontrados até aproximadamente 24 min (exceto pelo constituinte #106 em *P. gymnospora*).

Para as quatro espécies, o extrato acetato de etila apresentou maior variedade de constituintes quando comparado ao extrato metanólico, nesses extratos foram detectados, respectivamente, 41 e 24 constituintes fenólicos majoritários (Tabela 4). Dentre os extratos acetato

de etila, foi observado em *D. plagiogramma* maior variedade de constituintes (18 constituintes majoritários) em comparação às outras espécies, já dentre o extrato metanólico, em *P. gymnospora* foi observada maior diversidade (12 constituintes majoritários).

No extrato acetato de etila, os constituintes encontrados em maior quantidade foram o #107 em *C. minima* ( $2,416 \pm 0,331\%$ ), o #63 em *D. plagiogramma* (1,303%), o 106 em *P. gymnospora* ( $2,610 \pm 0,790\%$ ) e o #96 em *S. cymosum* ( $0,792 \pm 0,362\%$ ). No extrato metanólico, os constituintes encontrados em maior quantidade foram o #12 em *C. minima* ( $0,620 \pm 0,081\%$ ) e em *P. gymnospora* ( $1,241 \pm 0,143\%$ ), o #2 em *D. plagiogramma* (0,631%) e o #3 em *S. cymosum* ( $4,006 \pm 0,818\%$ ) (Tabela 2). O constituinte #3 representou cerca de 70% do teor de substâncias fenólicas do extrato metanólico de *S. cymosum*.

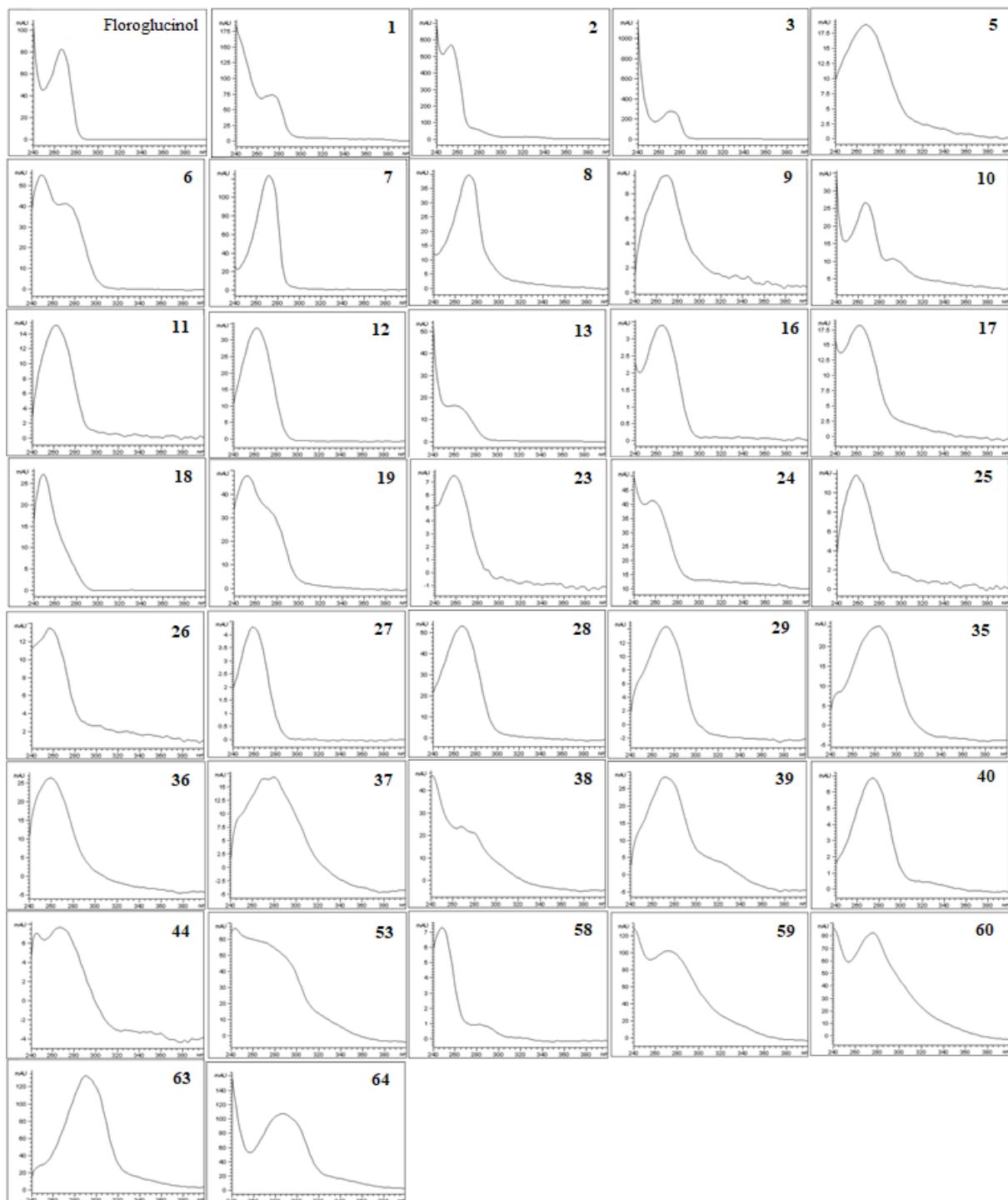


Figura 8: Espectros de absorção UV do padrão floroglucinol e dos constituintes fenólicos majoritários (com área relativa >2%), selecionados até o tempo de retenção de 25,088 minutos, detectados por CLAE-DAD ( $\lambda = 270$  nm) nos extratos acetato de etila e metanólico de *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*. Os números correspondem à identificação dos constituintes apresentados na Tabela 4.

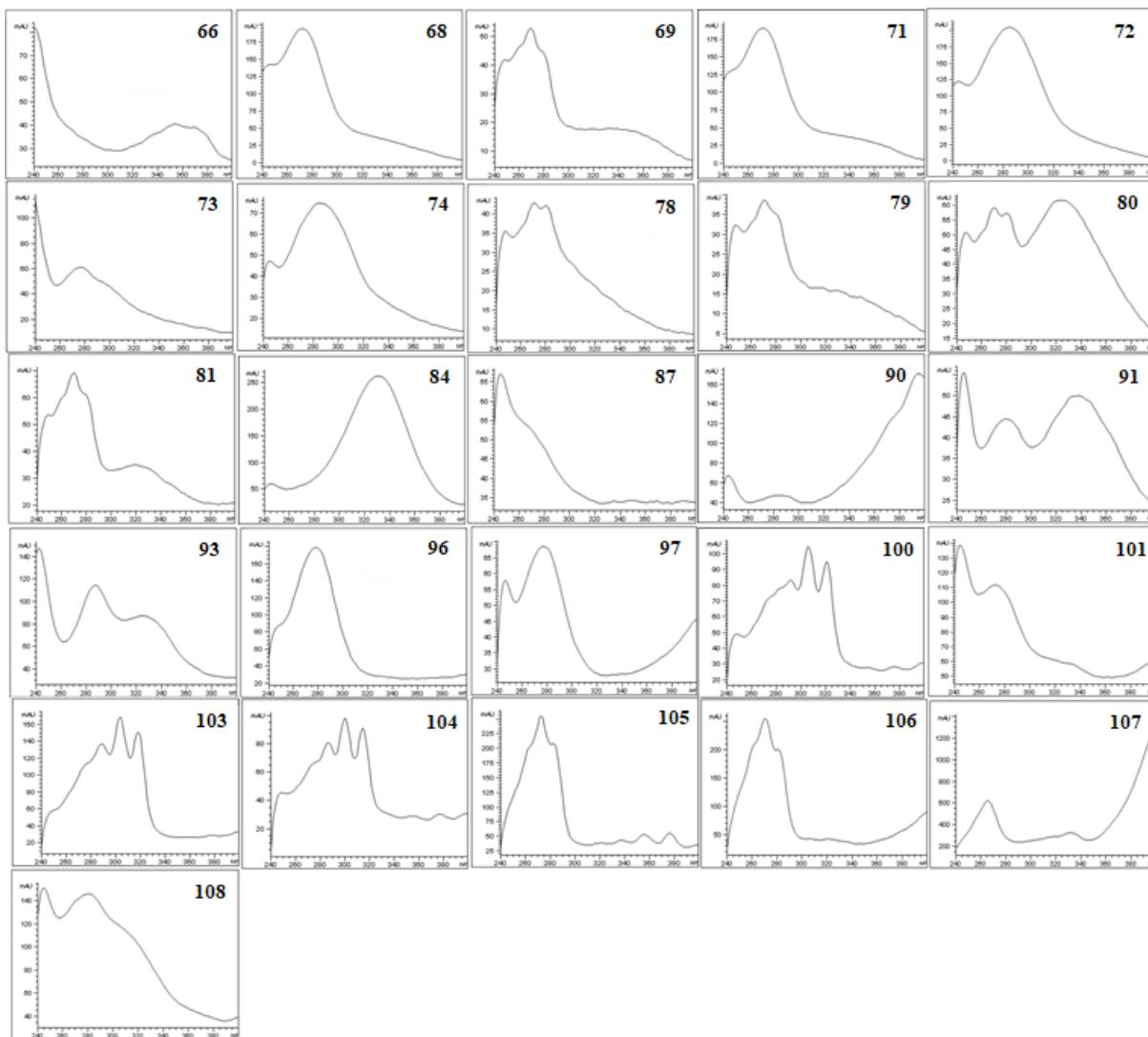


Figura 9: Espectros de absorção UV dos constituintes fenólicos majoritários (com área relativa >2%), selecionados a partir do tempo de retenção de 25,723 minutos, detectados por CLAE-DAD ( $\lambda = 270$  nm) nos extratos acetato de etila e metanólico de *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*. Os números correspondem à identificação dos constituintes apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Porcentagem dos constituintes fenólicos majoritários (média ± DP;  $n = 3$ ) dos extratos acetato de etila (AcEtO) e metanólico (MeOH) de *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*, analisados por CLAE-DAD ( $\lambda = 270$  nm).

Constituinte	TR	UV (nm)	<i>C. minima</i>		<i>D. plagiogramma</i>		<i>P. gymnospora</i>		<i>S. cymosum</i>	
			AcEtO	MeOH	AcEtO	MeOH	AcEtO	MeOH	AcEtO	MeOH
<b>Floroglucinol</b>	<b>5,279</b>	<b>266</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
1	2,529	272	-	-	-	-	-	0,470±0,144	-	-
2	2,883	254	-	-	-	0,631*	-	0,456**	-	-
3	2,976	272	-	-	-	-	-	-	-	4,006±0,818
5	3,746	268	-	-	-	0,355*	-	0,244±0,166	-	-
6	4,064	250; 274	-	0,199±0,010	-	-	-	-	-	-
7	4,104	272	-	-	-	-	-	-	-	1,275±0,390
8	4,296	272	-	-	-	-	-	0,468±0,263	-	-
9	5,137	266	-	-	-	-	-	-	-	0,115±0,007
10	5,179	268; 294	-	-	-	-	0,163±0,091	0,401±0,090	-	-
11	5,769	262	0,193±0,028	-	-	-	-	-	-	0,145±0,016
12	5,813	262	-	0,620±0,081	-	-	-	-	1,241±0,143	-
13	5,922	264	-	-	-	0,478*	-	-	-	-
16	6,626	266	-	-	-	0,138*	-	-	-	-
17	6,888	264	-	-	-	0,056*	-	0,117±0,019	-	-
18	7,449	250	-	-	-	0,055*	-	-	-	-
19	7,513	254; 270	-	0,048±0,008	-	-	-	0,245±0,047	-	-
23	8,217	258	-	0,041±0,005	-	-	-	-	-	-
24	8,509	256	0,308±0,009	-	-	-	-	-	-	-
25	8,525	258	-	0,578±0,088	-	-	-	0,587**	-	-
26	8,542	256	-	-	-	0,077*	-	-	-	-
27	8,802	258	-	-	-	-	-	0,124±0,007	-	-
28	9,360	268	-	-	0,279*	0,415*	-	0,414±0,050	-	-
29	10,878	272	-	-	0,233*	-	-	-	-	-
35	16,041	284	-	-	0,662*	-	-	-	-	-
36	18,721	260	-	-	0,305*	-	-	-	-	-
37	19,398	270; 280	-	-	0,216*	-	-	-	-	-
38	20,246	242; 280	-	-	0,524*	-	-	-	-	-
39	20,761	272	-	-	0,660*	-	-	-	-	-
40	20,879	274	-	-	-	0,112*	-	-	-	-
44	23,024	244; 268	-	0,045±0,001	-	-	-	-	-	-
53	23,676	242	-	-	0,233*	-	-	-	-	(continua)

TR: tempo de retenção médio em minutos; UV: pico máximo de absorção no espectro ultravioleta (200-400 nm); \*Para os extratos de *D. plagiogramma* foi analisada apenas uma réplica; \*\*Constituinte presente em apenas uma das réplicas.

Tabela 4: Porcentagem dos constituintes fenólicos majoritários (média ± DP;  $n = 3$ ) dos extratos acetato de etila (AcEtO) e metanólico (MeOH) de *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*, analisados por CLAE-DAD ( $\lambda = 270$  nm).

(continuação)

Constituinte	TR	UV (nm)	<i>C. minima</i>		<i>D. plagiogramma</i>		<i>P. gymnospora</i>		<i>S. cymosum</i>	
			AcEtO	MeOH	AcEtO	MeOH	AcEtO	MeOH	AcEtO	MeOH
58	24,141	248; 282				0,067*				
59	24,477	240; 272			0,252*					
60	24,561	240; 276			0,235*					
63	25,083	290	0,374±0,071		1,303*				0,252±0,075	
64	25,088	288					0,120±0,070			
66	25,723	242; 354							0,067±0,019	
68	26,184	248; 272			0,595*					
69	26,210	246; 270; 350	0,199±0,075						0,233**	
71	26,563	272			0,821*					
72	26,623	244; 286			0,501*					
73	26,634	276					0,122±0,050			
74	26,640	246; 284	0,147±0,053						0,071±0,002*	
78	27,214	246; 270; 280							0,054±0,002	
79	27,318	246; 270							0,061**	
80	27,414	246; 270; 280; 320							0,094**	
81	27,458	246; 270; 320							0,195±0,018	
84	27,715	246; 332	0,108±0,032		0,265*		0,077**		0,163±0,087	
87	28,053	246	0,146±0,006							
90	28,362	244; 284; 396							0,050±0,017	
91	28,515	246; 280; 338							0,091±0,034	
93	28,825	242; 288; 322	0,199±0,036		0,426*					
96	29,817	278							0,792±0,362	
97	29,820	246; 276	0,226±0,042							
100	30,695	248; 292; 306; 320					0,127**			
101	30,884	244; 272			0,327*					
103	31,286	290; 304; 318					0,415**			
104	31,393	250; 286; 300; 314					0,152**			
105	31,686	272; 356; 378					0,834**			
106	31,827	270					2,610±0,790	0,229**		
107	31,823	266	2,416±0,331							
108	31,909	244; 280			0,216*					

TR: tempo de retenção médio em minutos; UV: pico máximo de absorção no espectro ultravioleta (200-400 nm); \*Para os extratos de *D. plagiogramma* foi analisada apenas uma réplica; \*\*Constituinte presente em apenas uma das réplicas.

Os dados de quantificação dos constituintes majoritários identificados na Tabela 4 de cada extrato e espécie foram utilizados para análise de agrupamento (Fig. 10). Considerando o *cluster* mais interno, com distância menor a 0,6, pode-se observar a formação de dois grupos, caracterizados pelo tipo de extrato: um primeiro grupo reunindo os extratos metanólicos de *C. minima*, *D. plagiogramma* e *P. gymnospora* e um segundo grupo com os extratos acetato de etila de *C. minima*, *D. plagiogramma* e *S. cymosum*. Hierarquias externas, com distâncias maiores que 0,6, foram possíveis de identificar agrupando um ramo para o extrato metanólico de *S. cymosum* e outro ramo para o extrato acetato de etila de *P. gymnospora*.

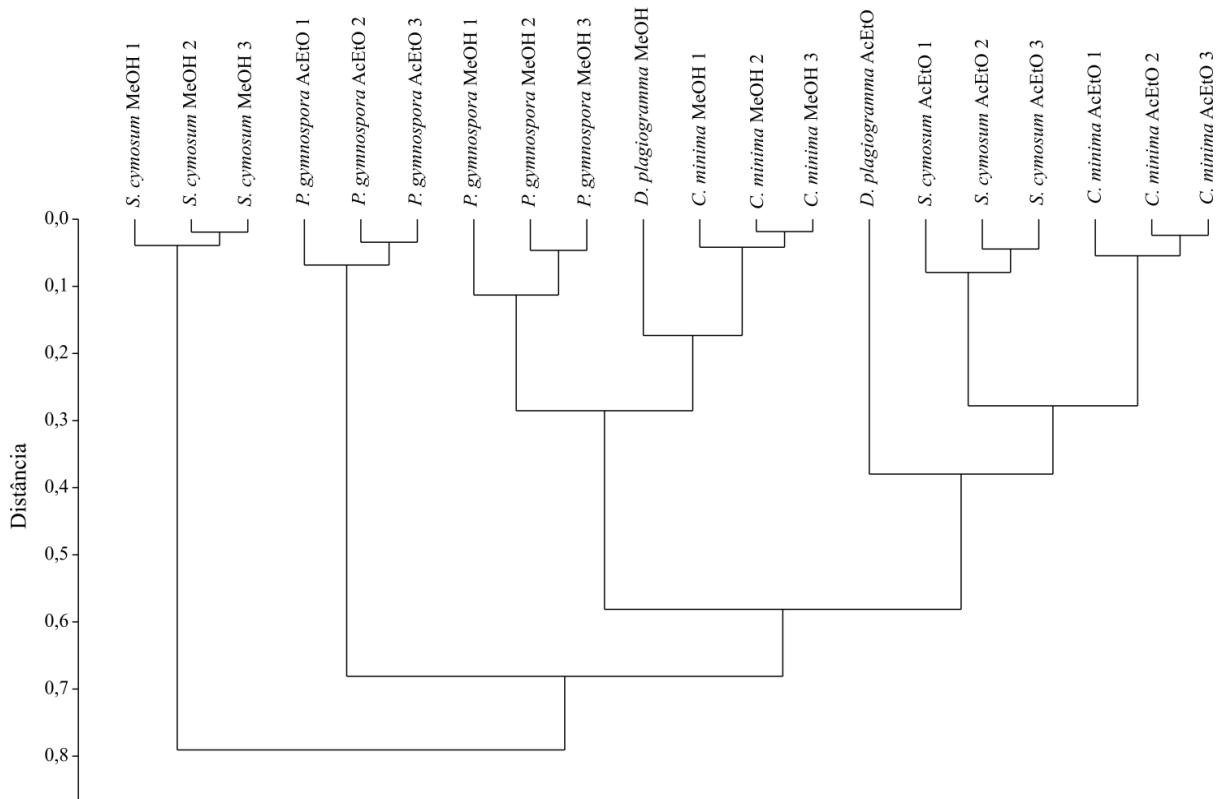


Figura 10: Dendrograma obtido pelo método de ligação de Ward para os extratos acetato de etila (AcEtO) e metanólico (MeOH) de *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*, agrupados de acordo com os constituintes majoritários detectados por CLAE-DAD.

## 4 DISCUSSÃO

A maceração com diferentes solventes é o procedimento mais usado para obtenção de extratos vegetais, pela facilidade, eficiência, aplicabilidade e baixo custo (Dai e Mumper 2010). O rendimento da extração depende da polaridade do solvente, tempo e temperatura de extração, proporção amostra/solvente, e características físicas e químicas da amostra. Algas pardas são caracterizadas por apresentar substâncias fenólicas, especialmente florotaninos (Koivikko et al.

2005). Essas substâncias são extraídas com solventes polares ou de polaridade intermediária, sendo geralmente utilizado água, metanol, etanol, acetato de etila ou acetona (Koivikko et al. 2005; Dai e Mumper 2010; López et al. 2011; Martínez e Castañeda 2013). Por existir uma ampla variedade de substâncias fenólicas é recomendada a extração com múltiplos solventes (Dai e Mumper 2010; Altemimi et al. 2017).

Pigmentos e lipídeos podem ser extraídos com acetato de etila e metanol, diminuindo a concentração de substâncias fenólicas nesses extratos. Para remoção de pigmentos e lipídeos, e obtenção de extratos ricos em substâncias fenólicas, uma das técnicas recomendadas por (Dai e Mumper 2010), é a extração seriada utilizando solventes apolares. Por esse motivo, foi adotado procedimento de extração com solventes em polaridade crescente, utilizando hexano e diclorometano para a remoção de pigmentos e lipídios.

Posteriormente, os solventes acetato de etila, metanol e água foram utilizados para extração das substâncias fenólicas. A extração com cada solvente foi realizada três vezes, para aumentar a eficiência e o rendimento de extração. Entre os extratos, o aquoso, seguido pelo metanólico, apresentaram os maiores rendimentos. Na alga parda *Stylocaulon scoparium* (Linnaeus) Kützing, o extrato aquoso também apresentou maior rendimento do que o metanólico, 16,6% (López et al. 2011), próximo ao encontrado para o extrato aquoso de *S. cymosum*. Com aumento da polaridade do solvente há aumento do rendimento de extração, sendo que em algas pardas os extratos aquosos apresentam os maiores rendimentos (Koivikko et al. 2005; López et al. 2011; Wang et al. 2012; Farvin e Jacobsen 2013), indicando a presença de grande quantidade de substâncias altamente polares. De acordo com Farvin e Jacobsen (2013), em água também podem ser extraídas substâncias fenólicas ligadas a carboidratos e proteínas.

Com os extratos metanólicos e aquosos foi realizado o perfil espectral nos comprimentos de onda UV-vis como uma análise exploratória, já que o padrão de absorção dos extratos pode indicar qualitativa e quantitativamente a presença de algumas classes de substâncias (Torres 2012; Tomazzoli et al. 2015; Schmitz et al. 2018). O resultado do espectro de absorção UV-vis dos extratos metanólicos e aquosos das quatro espécies apresentou padrão semelhante ao encontrado por Salgado et al. (2007) para extrato de *P. gymnospora*. Além disso, os resultados demonstram que o procedimento de extração adotado permitiu a efetiva remoção de pigmentos, já que as absorbâncias no espectro visível (400-700 nm) foram próximas a zero.

O espectro UV foi dividido em duas bandas de absorção, a banda A (200-239) e a banda B (240-279). A banda A apresentou os maiores valores de área sob a curva, o que sugere alta concentração de substâncias com absorbância nesses comprimentos de onda. Essa banda pode estar relacionada a acetogeninas, que apresentam absorbância entre 205-225 nm (Zhao et al. 1996;

Alali et al. 1998; Liu et al. 1999). Além disso, a banda A pode estar relacionada a substâncias que apresentam o fragmento de  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada (absorbância em 219 nm) em sua estrutura, como as próprias acetogeninas (Liu et al. 1999) ou lactonas sesquiterpenoides (Chadwick et al. 2013).

A banda B está relacionada à presença de substâncias fenólicas, que absorvem entre 240-280 nm. Os valores da área sob a curva dessa banda podem indicar de forma indireta o teor de substâncias fenólicas, que variou de acordo com a espécie e o extrato. No extrato aquoso, as substâncias fenólicas podem estar associadas a polissacarídeos, mas de acordo com Salgado et al. (2007), isso não interfere na absorbância de substâncias fenólicas.

O espectro de absorção na faixa entre 280-350 nm, associada à análise de agrupamento, foi utilizada por Tomazzoli et al. (2015) como ferramenta para análise do perfil fenólico em amostras de própolis. Para algas pardas, Schmitz et al. (2018) utilizaram o perfil de extratos em espectrofotômetro, nas regiões do UV-vis, para o estudo de substâncias fotoprotetoras em diferentes espécies que ocorrem na costa brasileira. Os autores relacionam a faixa de absorção entre 240-280 nm aos florotaninos, principais substâncias fotoprotetoras contra radiação UV em algas pardas.

No presente estudo, o método Folin-Ciocalteu, amplamente utilizado na quantificação de substâncias fenólicas totais, apresentou, para os extratos metanólicos e aquosos das quatro espécies analisadas, tendência semelhante aos valores de área da banda B. Isso indica uma relação entre as absorbâncias em 240-280 nm e a quantificação de substâncias fenólicas, sugerindo que o perfil espectral no UV, mais especificamente entre 240-280 nm, pode ser utilizado como uma ferramenta para detectar a presença de substâncias fenólicas em extratos de algas pardas.

A análise de substâncias fenólicas em CLAE foi realizada para o extrato metanólico e também para o extrato acetato de etila, já que esse último solvente é comumente utilizado em procedimentos de extração de florotaninos (Martínez e Castañeda 2013). Além disso, como citado anteriormente, em diferentes solventes são extraídas substâncias fenólicas com características distintas. Em metanol são extraídas substâncias fenólicas de baixo peso molecular (Dai e Mumper 2010) e em acetato de etila podem estar presentes também substâncias com maior peso molecular (Zhao et al. 2016).

O procedimento realizado em CLAE permitiu a separação de substâncias fenólicas desses extratos, as quais foram detectadas em 270 nm, já que o anel benzênico, estrutura característica dessa classe de substância, apresenta absorbância próxima à esse comprimento de onda (Solovchenko e Merzlyak 2008). Todos os constituintes analisados nos extratos acetato de etila e

metanólico, apresentaram pelo menos uma banda de absorção máxima, entre 240-290 nm, indicando que as identidades desses componentes correspondem a substâncias fenólicas.

A composição variou entre os extratos e as espécies, sendo que apenas um constituinte (#84) foi comum às quatro espécies analisadas. No entanto, pela análise de agrupamento, foi observada a formação de dois grupos, de acordo com o tipo de extrato. No primeiro grupo encontram-se os extratos metanólicos de *C. minima*, *D. plagiogramma* e *P. gymnospora*. Já no segundo grupo estão os extratos acetato de etila de *C. minima*, *D. plagiogramma* e *S. cymosum*.

De modo geral, os extratos metanólicos apresentaram menor diversidade de constituintes, os quais foram detectados em menor TR e apresentaram uma banda de absorção máxima, entre 240-290 nm. Como essa faixa de absorção é característica de anel benzênico, a presença de apenas uma banda de absorção máxima nesses comprimentos de onda pode indicar a presença de florotaninos e ácidos fenólicos. Em *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchel foram detectados diferentes florotaninos de baixo peso molecular, como por exemplo, o eckol e o dioxinodehydroeckol, formados por três unidades de floroglucinol, e o dieckol, formado por seis unidades de floroglucinol (Li et al. 2017). Em outra espécie do gênero, *Sargassum virgatum* C. Agardh, foram detectados ácido fenólicos, como por exemplo o ácido vanílico (Ghareib 2010).

Os extratos acetato de etila apresentaram maior variedade de constituintes, os quais foram detectados em TR mais altos. Nesses extratos também foram detectados constituintes com uma outra banda de absorção entre 300-396 nm, que pode estar relacionada à presença de flavonoides. Os flavonoides apresentam duas bandas de absorção, a banda I, entre 350-385 nm, e a banda II entre 240-280 nm. Em algas pardas foram detectados alguns flavonoides, como morina em espécies de *Padina* Adanson e em *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt (Yoshie-Stark et al. 2003), e apigenina em *P. gymnospora* (Abirami e Kowsalya 2017).

O único padrão comercial de florotaninos é o floroglucinol, que não foi detectado em nenhum dos extratos analisados. De acordo com (Audibert et al. 2010), o floroglucinol não acumula nos tecidos, pois logo é polimerizado, formando os florotaninos.

O extrato acetato de etila de *D. plagiogramma* apresentou o maior teor e variedade de substâncias fenólicas, no entanto, cada constituinte foi encontrado em baixa concentração. O constituinte encontrado em maior concentração entre extratos acetato de etila, foi o #106 de *P. gymnospora*., exclusivo dos extratos dessa espécie.

Entre os extratos metanólicos, *P. gymnospora* e *S. cymosum* apresentaram maior teor de substâncias fenólicas totais. Em *S. cymosum* foram observados apenas quatro constituintes majoritários, no entanto, o constituinte #3 foi encontrado em alta concentração, apresentando maior quantidade entre todos os constituintes analisados.

Para estudos futuros que visem o isolamento de substâncias fenólicas, sugere-se focar nos extratos que apresentaram constituintes em alta concentração, como o extrato acetato de etila de *P. gymnospora* e o extrato metanólico de *S. cymosum*. Isso está de acordo com a conclusão do estudo de Schmitz et al. (2018), que sugerem a identificação e isolamento de substâncias de *P. gymnospora* e *Sargassum spp.*, espécies com maior disponibilidade na costa brasileira.

Para espécies dos gêneros *Padina* e *Sargassum* foram encontrados estudos sobre a composição fenólica de extratos, no entanto, sobre a identificação de florotaninos, foram encontradas poucas informações para *Sargassum*. Até o presente momento, não foram encontrados estudos sobre identificação de substâncias fenólicas de *Chnoospora* J. Agardh e *Dictyopteris* J. V. Lamouroux. Considerando esse cenário e os resultados obtidos, sugere-se realizar também mais estudos sobre os constituintes dos extratos dessas espécies.

O presente estudo teve como objetivo uma caracterização inicial dos extratos de *C. minima*, *D. plagiogramma*, *P. gymnospora* e *S. cymosum*, e os resultados demonstram que esses extratos apresentam constituintes com características distintas, indicando que pertencem à diferentes classes fenólicas. Além da quantidade total, a composição de substâncias fenólicas nos extratos pode afetar as atividades biológicas, assim a caracterização química é importante para entender os mecanismos de ação e prospectar substâncias com potencial bioativo.

## 5 CONCLUSÃO

O procedimento de extração utilizado permitiu a seleção de substâncias fenólicas e a remoção de pigmentos nos extratos metanólico e aquoso.

A análise preliminar mediante o perfil de absorção espectral UV-vis pode servir de ferramenta para selecionar espécies e extratos candidatos de prospecção e estudos mais aprofundados, além de ser uma metodologia rápida e barata.

O método para análise dos extratos acetato de etila e metanólico em CLAE-DAD foi eficiente para a separação das substâncias fenólicas. A partir dos dados de CLAE-DAD, foi possível observar que a composição fenólica variou principalmente entre os tipos de extrato.

## **Capítulo II**

---

### **Potencial antioxidante dos extratos metanólicos e aquosos de *Chnoospora minima*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum* (Ochrophyta, Phaeophyceae)**

#### **Resumo**

Algas pardas, de modo geral, são reportadas por apresentar alta atividade antioxidante, devido à composição rica em substâncias fenólicas. Desse modo, apresentam potencial como alimentos e ingredientes funcionais, que podem propiciar benefícios à saúde, e como fonte de substâncias naturais, a serem utilizadas na conservação de produtos alimentícios. A partir disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante de extratos metanólicos e aquosos de três espécies de algas pardas (*Chnoospora minima*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*) por meio de cinco ensaios *in vitro*, a fim de contribuir na prospecção de alimentos e ingredientes funcionais, e na busca de substâncias antioxidantes naturais. Os ensaios ABTS, DPPH, FRAP e quelante foram utilizados para análise da atividade antioxidante, e o ensaio Folin-Ciocalteu para quantificação de substâncias fenólicas totais. Além disso, o ensaio Folin-Ciocalteu também pode ser utilizado na avaliação do potencial antioxidante, já que substâncias com capacidade de transferir elétrons podem interferir nas reações. Os extratos de *P. gymnospora* e *S. cymosum* apresentaram potencial antioxidante para os cinco ensaios, já *C. minima* apresentou potencial antioxidante no ensaio ABTS. Comparando os tipos de extratos, para *C. minima* e *S. cymosum*, os extratos aquosos apresentaram maior atividade antioxidante, já para *P. gymnospora*, o extrato metanólico apresentou maior atividade. A análise da atividade antioxidante nos cinco ensaios, indicou que o principal mecanismo de ação dos extratos é pela transferência de elétrons. Para avaliar de maneira conjunta os resultados dos ensaios, foi calculado um índice da capacidade antioxidante total, classificando o potencial dos extratos em ordem decrescente. A partir desse índice foi verificado que o extrato metanólico de *P. gymnospora* apresentou o maior potencial antioxidante e maior teor de substâncias fenólicas, indicando o potencial dessa espécie na busca de substâncias antioxidantes naturais, e como candidata a estudos sobre alimentos e ingredientes funcionais.

**Palavras-chave:** Algas pardas, antioxidante, ensaios *in vitro*, extratos brutos, prospecção

**Abstract**

Brown seaweeds, in general, are reported to have high antioxidant activity, due to the composition rich in phenolic compounds. In this way, they present potential as functional foods and ingredients, which can provide health benefits, and as a source of natural substances, to be used in the preservation of food products. The objective of this study was to evaluate the antioxidant potential of methanolic and aqueous extracts of three species of brown algae (*Chnoospora minima*, *Padina gymnospora* and *Sargassum cymosum*) by five *in vitro* assays, in order to contribute to screening of functional foods ingredients, and to the search for natural antioxidants. The ABTS, DPPH, FRAP and chelating assays were used for analysis of antioxidant activity, and the Folin-Ciocalteu assay for quantification of total phenolic compounds. In addition, the Folin-Ciocalteu assay can also be used in the evaluation of the antioxidant potential, since substances capable of transferring electrons can interfere with the reactions. The extracts of *P. gymnospora* and *S. cymosum* showed antioxidant potential for the five assays, since *C. minima* presented antioxidant potential in the ABTS assay. Comparing the types of extracts, for *C. minima* and *S. cymosum*, the aqueous extracts presented higher antioxidant activity, whereas for *P. gymnospora*, the methanolic extract presented greater activity. The analysis of antioxidant activity in the five assays indicated that the main mechanism of action of the extracts is the transfer of electrons. In order to jointly evaluate the results of the assays, a total antioxidant capacity index was calculated, classifying the extracts potential in descending order. It was verified, by this index, that the methanolic extract of *P. gymnospora* had the highest antioxidant potential and content of phenolic compounds, indicating the potential of this species in the search for natural antioxidant substances, and as a candidate for studies on food and functional ingredients.

Keywords: Antioxidant, brown seaweeds, crude extract, *in vitro* assays, screening

## 1 INTRODUÇÃO

Antioxidantes são definidos como substâncias capazes de inibir ou retardar a degradação de moléculas orgânicas, causada por espécies reativas (Sies 1993), as quais são altamente instáveis e produzidas por reações de oxido-redução (Ferreira & Matsubara 1997). Nos organismos, as espécies reativas do oxigênio (EROs) são produzidas normalmente pelo metabolismo celular, no entanto, em excesso podem causar danos a constituintes celulares, e estão relacionadas ao envelhecimento celular, apoptose e ao surgimento de diversas perturbações celulares e metabólicas. Para combater as EROS, os organismos apresentam diferentes mecanismos antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos (Mallick & Mohn 2000). O mecanismo antioxidante enzimático inclui a superóxido dismutase, a peroxidase, a catalase e a glutationa redutase, já o mecanismo não enzimático inclui substâncias como o ácido ascórbico, carotenoides, substâncias fenólicas e tocoferóis.

Em condições fisiológicas normais existe um balanço entre as EROS e os mecanismos antioxidantes. No entanto, fatores exógenos podem levar ao estresse oxidativo e causar a degradação do DNA e de outras biomoléculas pela produção excessiva de espécies reativas ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (Ferreira & Matsubara 1997).

As macroalgas, no ambiente aquático, são submetidas à variação de nutrientes, luminosidade, concentração de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, temperatura e salinidade e estão propensas a sofrer com o estresse oxidativo (Stengel et al. 2011), e para garantir sua sobrevivência, apresentam mecanismos de resposta ao estresse, com alta capacidade antioxidante (Rocha et al. 2007; Cofrades et al. 2010). De modo geral, as algas pardas apresentam alta atividade antioxidante, devido à presença de substâncias fenólicas, especialmente florotaninos (Rocha et al. 2007). Estudos de Zubia et al. (2007) e Cofrades et al. (2010) relacionam a atividade antioxidante em extratos de algas pardas à alta quantidade de substâncias fenólicas encontrada, apresentando potencial como alimentos funcionais e na conservação de produtos alimentícios.

De acordo com LeBlanc et al. (2018), alimentos funcionais são aqueles que, além das propriedades nutricionais, apresentam efeito comprovado na promoção da saúde e/ou prevenção de doenças, e os ingredientes específicos presentes nesses alimentos, responsáveis pelo seu efeito benéfico, são denominados de nutracêuticos. Nesse sentido, o consumo de alimentos ricos em substâncias antioxidantes, como substâncias fenólicas, está relacionado com a redução da incidência de diferentes tipos de câncer, doenças cardíacas, doenças respiratórias crônicas (Van Duyn e Pivonka 2000).

Além dos efeitos terapêuticos, substâncias antioxidantes podem ser utilizadas como ingredientes na conservação de produtos alimentícios, já que a oxidação de moléculas orgânicas por espécies reativas é um dos principais mecanismos de redução do tempo de prateleira de alimentos (Degáspari e Waszczynskyj 2004). As substâncias antioxidantes sintéticas normalmente utilizadas na conservação de produtos alimentícios, como o BHA e o BHT, podem apresentar efeitos carcinogênicos e alterações enzimáticas em animais (Andreó e Jorge 2006; Rocha et al. 2007). Por esses motivos, pesquisas têm sido realizadas com o intuito de encontrar fontes de antioxidantes naturais (Soares 2002).

O estudo do potencial antioxidant in vitro de extratos de algas pardas pode contribuir na prospecção de novos alimentos funcionais e de substâncias antioxidantes de fontes naturais. As substâncias antioxidantes apresentam diferentes mecanismos de ação, por esse motivo é recomendado o uso de diferentes ensaios in vitro para análise mais completa do potencial antioxidant de extratos (Frankel e Meyer 2000).

Diante desse cenário, o objetivo do presente capítulo é avaliar o potencial antioxidant de extratos metanólicos e aquosos de três espécies de algas pardas, por meio de cinco ensaios diferentes, a fim de prospectar fontes de alimentos funcionais e substâncias antioxidantes naturais.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta do material biológico e procedimento de extração

Os procedimentos de coleta e preparo do material biológico estão descritos na seção *Material e Métodos*, item 1 *COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO*. As algas secas e trituradas foram divididas em cinco subamostras ( $n = 5$ ) e extraídas por maceração simples e seriada com cinco solventes em polaridade crescente, segundo descrito na seção *Material e Métodos*, item 3 *PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO E DELINEAMENTO GERAL*. Apenas os extratos brutos metanólicos e aquosos foram utilizados para análise do potencial antioxidant.

### 2.2 Potencial antioxidant

Para analisar o potencial antioxidant dos extratos metanólicos e aquosos de *C. minima*, *P. gymnospora* e *S. cymosum* foram realizados cinco ensaios colorimétricos ( $n = 5$ ): captura do radical ABTS; captura do radical DPPH; FRAP; atividade quelante de metal; e quantificação de substâncias fenólicas totais com reagente Folin-Ciocalteu. Os ensaios foram conduzidos em microplacas de 96 poços com volume final de 300 µL e as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro UV-vis (Epoch™ 2-BioTek®, EUA).

Os extratos foram dissolvidos em DMSO 10% para uma concentração estoque de 15 mg.mL<sup>-1</sup>. Foi realizado um teste preliminar para os cinco ensaios na concentração final de até 400 µg.mL<sup>-1</sup>, para, posteriormente, selecionar outras concentrações de extrato, a serem avaliadas quanto a dose-dependência e estimar o EC<sub>50</sub> (concentração efetiva na qual o extrato atinge 50% do efeito avaliado após um tempo específico de exposição). Para os extratos que apresentaram atividade antioxidante maior do que 40% no teste preliminar, os ensaios foram conduzidos em cinco concentrações até a concentração máxima de 1000 µg.mL<sup>-1</sup>, variando de acordo com a espécie e o extrato.

Para os ensaios antioxidantes foram preparados brancos de amostra, substituindo o volume da solução reativa de cada ensaio por DMSO 10%, uma vez que a coloração da amostra pode interferir na absorbância da reação. Os valores de absorbância dos brancos de amostras foram descontados dos valores de absorbância das respectivas amostras após a reação de cada ensaio.

Como controle negativo para os ensaios, o volume de amostra foi substituído por DMSO 10%. Para a preparação de curvas padrão foram utilizados ácido gálico, BHA, floroglucinol, quercetina e Trolox (Sigma-Aldrich®, Brasil) (Tabela 1).

Os resultados dos ensaios antioxidantes foram expressos em equivalente de ácido gálico (EAG) em relação à massa de extrato bruto (EB) (mg EAG.g EB<sup>-1</sup>). Para os outros padrões foi calculado um fator de conversão, baseado na curva de ácido gálico (Tabela 5). Os resultados também foram expressos em porcentagem de atividade antioxidante e como EC<sub>50</sub>.

A porcentagem de atividade antioxidante (%AOX) para os ensaios de captura do radical ABTS, captura do radical DPPH e quelante de metal foi determinada conforme a seguinte fórmula:

$$\% \text{AOX} = [(Abs_{CN} - Abs_A) / Abs_{CN}] \times 100$$

em que: Abs<sub>CN</sub> – absorbância do controle negativo; Abs<sub>A</sub> – absorbância da amostra.

A %AOX pelos ensaios FRAP e Folin-Ciocalteu foi determinada considerando como 100% da atividade antioxidante o valor da absorbância obtido na máxima concentração da curva de ácido gálico (1,25 µg.mL<sup>-1</sup>).

O EC<sub>50</sub> foi determinado a partir dos valores de porcentagem das cinco concentrações avaliadas, com o programa GraphPad Prism® 6, utilizando modelo de ajuste sigmoidal (Chen et al. 2013).

Tabela 5: Sumário dos parâmetros das respectivas curvas padrões para os diferentes ensaios de antioxidantes, especificando faixa de concentração do padrão ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), equação da reta ( $y = ax + b$ ), coeficiente de regressão ( $R^2$ ) e fator de conversão (FC) do padrão em relação ao ácido gálico.

	Ácido gálico	BHA	Floroglucinol	Quercetina	Trolox
ABTS	$0,025 - 1,250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = -2,0387x + 0,8685$ $R^2 = 0,9995$ -	$1 - 5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = -0,3809x + 0,7820$ $R^2 = 0,9825$ $FC = 5,35$	$0,25 - 1,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = -1,1984x + 0,7040$ $R^2 = 0,9830$ $FC = 1,70$	$1 - 5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = -0,4555x + 0,7600$ $R^2 = 0,9955$ $FC = 4,48$	$1 - 5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = -0,3942x + 0,7735$ $R^2 = 0,9979$ $FC = 5,17$
DPPH	$0,5 - 3,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = -1,134x + 0,8557$ $R^2 = 0,9867$ -	$2 - 12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = -0,1583x + 0,5890$ $R^2 = 0,9209$ $FC = 7,16$	$20 - 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = -0,0199x + 0,7122$ $R^2 = 0,9954$ $FC = 56,98$	$2 - 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = -0,2582x + 0,6224$ $R^2 = 0,9493$ $FC = 4,39$	$2 - 10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = -0,1794 + 0,7936$ $R^2 = 0,9987$ $FC = 6,32$
Folin-Ciocalteu	$2 - 20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = 0,2550x + 0,0194$ $R^2 = 0,9967$ -	$15 - 90 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = 0,033x + 0,0474$ $R^2 = 0,9708$ $FC = 7,73$	$20-60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = 0,0418x + 0,029$ $R^2 = 0,9901$ $FC = 6,10$	$2 - 20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = 0,2067x + 0,0434$ $R^2 = 0,9985$ $FC = 1,23$	$20 - 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = 0,0377x + 0,0579$ $R^2 = 0,9872$ $FC = 6,76$
FRAP	$0,5 - 4,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = 1,5794x - 0,0175$ $R^2 = 0,9987$ -	$1,5 - 7,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = 0,7936x + 0,0008$ $R^2 = 0,9990$ $FC = 1,99$	$20 - 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = 0,0409x - 0,0198$ $R^2 = 0,9803$ $FC = 38,62$	$0,5 - 3,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = 1,4075x - 0,0193$ $R^2 = 0,9987$ $FC = 1,12$	$1,5 - 7,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = 0,6844x - 0,0108$ $R^2 = 0,9983$ $FC = 2,31$
Quelante	$1 - 8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = -0,3804x + 1,0519$ $R^2 = 0,9929$ -			$4 - 20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ $y = -0,1171x + 0,7729$ $R^2 = 0,9961$ $FC = 3,25$	

Para transformar um valor de EAG em equivalente de BHA, floroglucinol, quercetina ou Trolox deve-se multiplicar esse valor pelo fator de conversão (FC). Para transformar um valor de equivalente de BHA, quercetina ou Trolox em EAG deve-se dividir esse valor pelo FC.

### **2.2.1 Captura do radical ABTS**

O ensaio de captura do radical ABTS foi realizado de acordo com Torres et al. (2017) adaptado de Rufino et al. (2007) e Yang et al. (2011). Esse método se baseia no decaimento da coloração do radical ABTS (verde) na presença de agentes antioxidantes.

Para a preparação da solução reativa de ABTS foi adicionado 17,6 µL de solução de persulfato de potássio 140 mM (Sigma-Aldrich®, Brasil) em 1 mL de solução de ABTS 7,46 mM (Sigma-Aldrich®, Brasil). A solução reativa foi mantida no escuro por no mínimo 16 h, posteriormente, foi diluída em metanol (1:60 v/v) para alcançar absorbância entre 0,7 e 1 em 734 nm. A reação foi obtida ao adicionar 20 µL da amostra ou dos padrões ou de DMSO 10% (para o controle negativo) à 280 µL da solução reativa e incubada por 10 min em temperatura ambiente e protegida da luz. As absorbâncias foram analisadas no comprimento de onda de 734 nm.

### **2.2.2 Captura do radical DPPH**

O ensaio de captura do radical DPPH foi realizado segundo Pires et al. (2017) modificado de Brand-Williams et al. (1995). Esse método se baseia na capacidade da amostra em reduzir o radical DPPH, levando ao decréscimo da absorbância em 515/517 nm. O radical DPPH, que possui coloração violeta, na presença de agentes antioxidantes, recebe um átomo de hidrogênio, adquirindo coloração amarelada.

O radical DPPH (Sigma-Aldrich®, Brasil) foi dissolvido em metanol, com auxílio de agitador magnético, para obtenção de solução de 32 µg.mL<sup>-1</sup> (absorbância entre 0,7 e 1 em 517 nm). Para a mistura de reação foram adicionados 20 µL da amostra ou dos padrões ou de DMSO 10% (para o controle negativo) à 280 µL de solução de DPPH. As microplacas foram incubadas por 30 min a temperatura ambiente e protegidas da luz. A leitura das absorbâncias foi realizada em 517 nm.

### **2.2.3 Potencial redutor do íon ferro (FRAP)**

O método do potencial redutor do íon ferro (FRAP, do inglês, *Ferric Reducing Antioxidant Power*) seguiu protocolo adaptado por Urrea-Victoria et al. (2016) de (Brito et al. (2006). Em meio ácido e na presença de substâncias antioxidantes, o complexo tripidil hidrazina férrica (Fe<sup>3+</sup>-TPTZ) se reduz, formando Fe<sup>2+</sup>, que apresenta coloração azul (Benzie & Strain 1996).

A solução do reagente FRAP foi preparada com 25 mL de tampão acetato 0,3 M (pH 3,6), 2,5 mL de solução de TPTZ 10 mM (Sigma-Aldrich®, Brasil) em HCl 40 mM (Synth®, Brasil) e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico 20 mM (Synth®, Brasil). Para a reação foram misturados 15 µL de água ultrapura, 265 µL de reagente FRAP e 20 µL da amostra ou dos padrões

ou de DMSO 10% (para o controle negativo). As microplacas foram incubadas por 30 min a 37°C e protegidas da luz. A leitura das absorbâncias foi realizada em 595 nm.

#### **2.2.4 Atividade quelante de metal**

O ensaio de atividade quelante de metal foi realizado segundo Harb et al. (2016) modificado de (Min et al. 2011). Esse método se baseia no decaimento da coloração do complexo ferrozina Fe<sup>2+</sup> (rosa) ao ser inibido por substância com atividade quelante de metal.

A reação foi obtida misturando 250 µL de solução de acetato de amônio 10% (Sigma-Aldrich®, Brasil), 15 µL de solução de sulfato de amônio ferroso 1 mM (Sigma-Aldrich®, Brasil) e 20 µL da amostra ou dos padrões ou de DMSO 10% (para o controle negativo). Após 5 min foi adicionado 15 µL de solução de ferrozine 6,1 mM (Sigma-Aldrich®, Brasil). As microplacas com a reação foram incubadas por 10 min a temperatura ambiente, com agitação de 100 rpm e protegidas da luz. As absorbâncias foram analisadas em 562 nm.

#### **2.2.5 Quantificação de substâncias fenólicas totais (Folin-Ciocalteu)**

A quantificação de substâncias fenólicas com reagente Folin-Ciocalteu foi realizado de acordo com o *Capítulo I*, item 2 *MATERIAL E MÉTODOS*, subitem 2.3 *Quantificação de substâncias fenólicas totais (Folin-Ciocalteu)*. Esse ensaio é amplamente utilizado para a quantificação de substâncias fenólicas, mas também pode ser utilizado para avaliar o potencial antioxidante de extratos, pois outras substâncias com capacidade de transferir elétrons podem interferir nas reações (Singleton et al. 1999).

### **2.3 Classificação do potencial antioxidante total**

Para cada extrato foi determinado um índice de capacidade antioxidante total, de acordo com Seeram et al. (2008). Com esse índice foi possível classificar o potencial antioxidante dos extratos das três espécies analisadas, considerando, de maneira conjunta, o resultado dos cinco ensaios. Para cada ensaio, o valor da atividade antioxidante, representada em equivalente padrão, foi considerado como a pontuação do extrato. Ao extrato com a maior pontuação foi atribuído o número de índice 100 e o número índice dos outros extratos foi determinado da seguinte forma: Índice = (pontuação do extrato / maior pontuação)x100.

O índice total de cada extrato foi determinado pela média do valor do índice dos cinco ensaios, e foi utilizado para classificar o potencial antioxidante dos extratos em ordem decrescente.

## 2.4 Análise estatística

Os dados foram analisados quanto à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade (teste de Bartlett), e posteriormente submetidos à ANOVA unifatorial ou bifatorial, segundo o caso. O teste *post-hoc* de Newmann-Keuls foi utilizado para determinar diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Para comparar a porcentagem da atividade antioxidante e os valores de equivalente padrão por volume ( $\mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ) entre as concentrações de um mesmo extrato foi utilizada ANOVA unifatorial. Para analisar o potencial antioxidante, expresso em equivalente padrão por massa de extrato ( $\text{mg EAG.g EB}^{-1}$ ) ou  $\text{EC}_{50}$ , entre as três espécies e os tipos de extrato foi utilizada ANOVA bifatorial.

## 3 RESULTADOS

O resultado do teste preliminar da atividade antioxidante dos extratos metanólicos e aquosos de *C. minima*, *P. gymnospora* e *S. cymosum* encontra-se na Tabela 6. Todos os extratos analisados mostraram reação nos diferentes ensaios antioxidantes. Para *C. minima*, a reatividade do extrato aquoso, nos cinco ensaios antioxidantes, foi maior ou igual que o extrato metanólico. Situação contrária foi verificada para *P. gymnospora*, na qual o extrato metanólico apresentou maior atividade que o extrato aquoso. Para *S. cymosum*, a atividade antioxidante foi semelhante para ambos os extratos nos ensaios ABTS, DPPH e Folin-Ciocalteu, porém o extrato aquoso foi maior que o extrato metanólico nos ensaios FRAP e quelante (Tabela 6).

Tabela 6: Atividade antioxidante em porcentagem (média±DP;  $n = 5$ ) dos extratos metanólicos e aquosos de *Chnoospora minima*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum* nos ensaios ABTS, DPPH, Folin-Ciocalteu, FRAP e quelante de metais na concentração de 400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

	<i>C. minima</i>		<i>P. gymnospora</i>		<i>S. cymosum</i>	
	Metanólico	Aquoso	Metanólico	Aquoso	Metanólico	Aquoso
ABTS	83,76±12,36	93,10±1,96	99,80±0,07*	86,22±7,72*	92,61±3,46*	99,81±0,26*
DPPH	16,24±3,30	21,89±10,40	91,34±6,75	30,97±4,45	57,31±1,82	49,10±3,52
Folin-Ciocalteu	17,04±1,63	19,32±1,45	198,63±10,65	33,68±2,36	49,78±1,82	52,22±1,86
FRAP	27,10±8,07	39,00±1,66	74,54±3,65	48,53±2,43	49,35±2,70	89,26±2,61
Quelante	10,91±2,84	28,29±9,66	25,45±4,3%	29,81±2,77	13,71±5,77	42,20±6,82

\*Extratos metanólicos e aquosos de *P. gymnospora* e *S. cymosum*, para o ensaio ABTS, foram testados em 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

No ensaio de captura do radical ABTS os extratos metanólicos e aquosos de *C. minima*, *P. gymnospora* e *S. cymosum* foram testados em cinco diferentes concentrações (Fig. 11). Para as três espécies o aumento da concentração de extrato metanólico e aquoso propiciou aumento da atividade antioxidante de forma linear ( $R^2 > 0,94$ ). Para *C. minima* (Fig. 11A), na máxima concentração testada ( $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), obteve-se atividades de  $64,94 \pm 10,65\%$  para o extrato metanólico (equivalente a  $0,96 \pm 0,14 \mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ) e de  $86,98 \pm 5,59\%$  para o extrato aquoso (equivalente a  $1,25 \pm 0,07 \mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ). Para *P. gymnospora* (Fig. 11B) a máxima concentração de extrato metanólico ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) atingiu atividade de  $85,34 \pm 10,70\%$  ( $1,21 \pm 0,15 \mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ), e a de extrato aquoso ( $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) atingiu atividade de  $63,21 \pm 7,44\%$  (equivalente a  $0,90 \pm 0,10 \mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ). Em *S. cymosum* (Fig. 11C), a máxima concentração testada ( $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) apresentou atividade de  $66,94 \pm 8,67\%$  para o extrato metanólico ( $0,92 \pm 0,13 \mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ) e de  $73,56 \pm 5,15\%$  para o extrato aquoso ( $1,02 \pm 0,08 \mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ).

O ensaio de captura do radical DPPH foi realizado em diferentes concentrações de extrato metanólico e aquoso para *P. gymnospora* e *S. cymosum* (Fig. 12). Com o aumento da concentração de extrato, houve aumento da atividade antioxidante de forma linear ( $R^2 > 0,95$ ). Em *P. gymnospora* (Fig. 12A), na máxima concentração de extrato metanólico ( $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) apresentou atividade de  $78,31 \pm 15,60\%$  (equivalente a  $1,94 \pm 0,42 \mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ) e na de extrato aquoso ( $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) apresentou atividade de  $46,13 \pm 5,58\%$  (equivalente a  $1,08 \pm 0,15 \mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ). Em *S. cymosum* (Fig. 12B), a máxima concentração testada ( $800 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) apresentou atividade de  $55,67 \pm 4,46\%$  para o extrato metanólico ( $1,33 \pm 0,12 \mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ) e de  $42,67 \pm 8,24\%$  para o extrato aquoso ( $0,99 \pm 0,22 \mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ).

O ensaio FRAP apresentou relação linear ( $R^2 > 0,95$ ) entre o aumento da atividade antioxidante e o aumento da concentração de extrato para *P. gymnospora* e *S. cymosum* (Fig. 13). Em *P. gymnospora* (Fig. 13A) as máximas concentrações de extrato metanólico ( $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e extrato aquoso ( $800 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) apresentaram atividade de  $74,79 \pm 8,49\%$  (equivalente a  $2,18 \pm 0,34 \mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ) e  $74,95 \pm 2,12\%$  (equivalente a  $2,22 \pm 0,06 \mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ), respectivamente. Para *S. cymosum* (Fig. 13B) a máxima concentração de extrato metanólico ( $800 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) apresentou atividade de  $67,73 \pm 0,79\%$  (equivalente a  $1,99 \pm 0,06 \mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ) e a de extrato aquoso ( $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) apresentou atividade de  $77,09 \pm 1,01\%$  (equivalente a  $2,26 \pm 0,07 \mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ).

Para a atividade quelante de metal (Fig. 14), com o aumento da concentração de extrato aquoso de *S. cymosum* houve aumento da atividade antioxidante de forma linear ( $R^2 = 0,9568$ ). A máxima concentração testada para esse extrato ( $800 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) atingiu atividade de  $84,22 \pm 3,28\%$  (equivalente a  $7,74 \pm 0,31 \mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ).

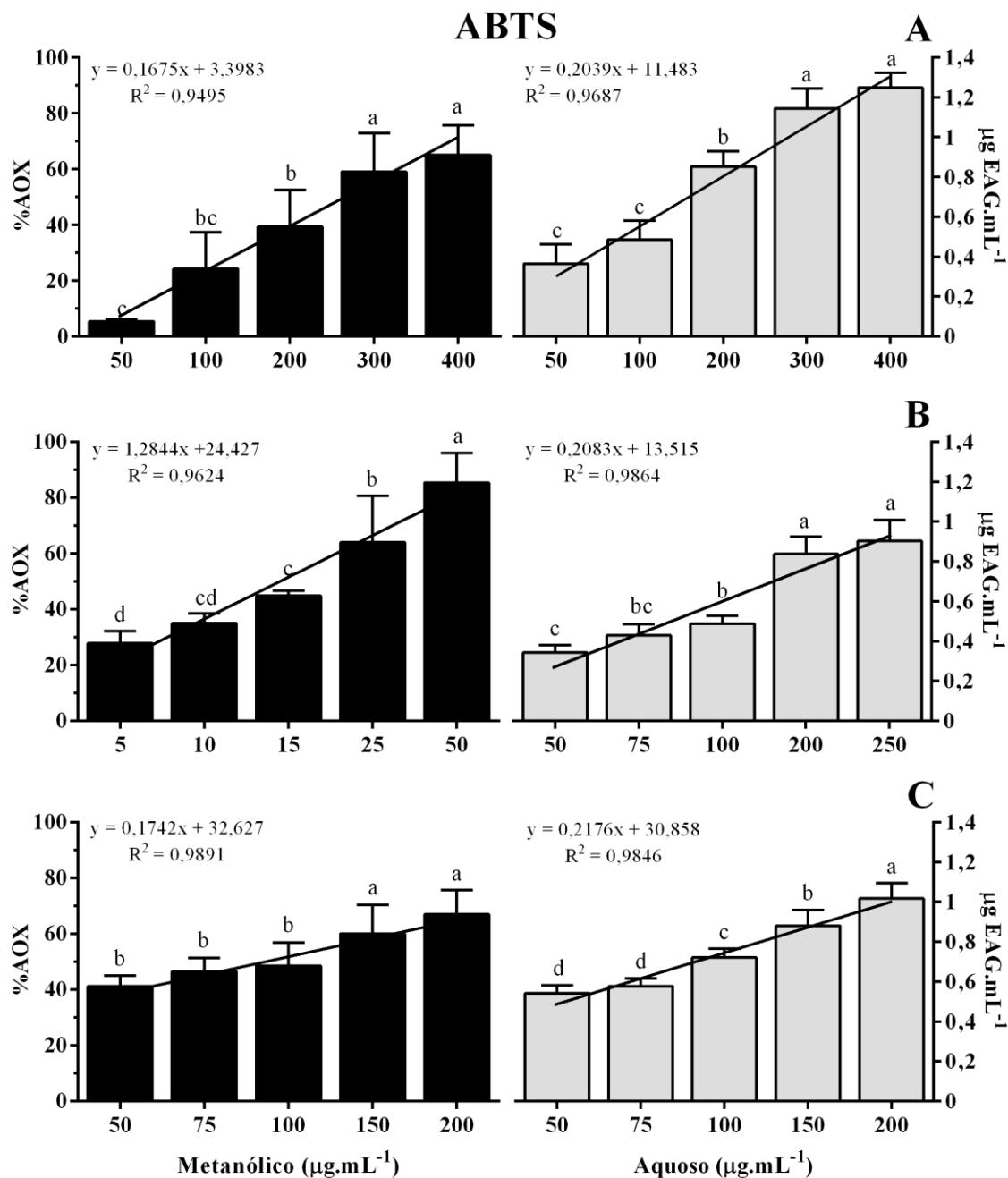


Figura 11: Atividade antioxidante expressa em porcentagem (%AOX) e equivalente de ácido gálico ( $\mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ) para o ensaio de captura do radical ABTS (média  $\pm$  DP;  $n = 5$ ), em diferentes concentrações dos extratos brutos metanólico e aquoso das espécies A) *Chnoospora minima*, B) *Padina gymnospora* e C) *Sargassum cymosum*. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste *post hoc* de Newmann Keuls ( $p < 0,05$ ).

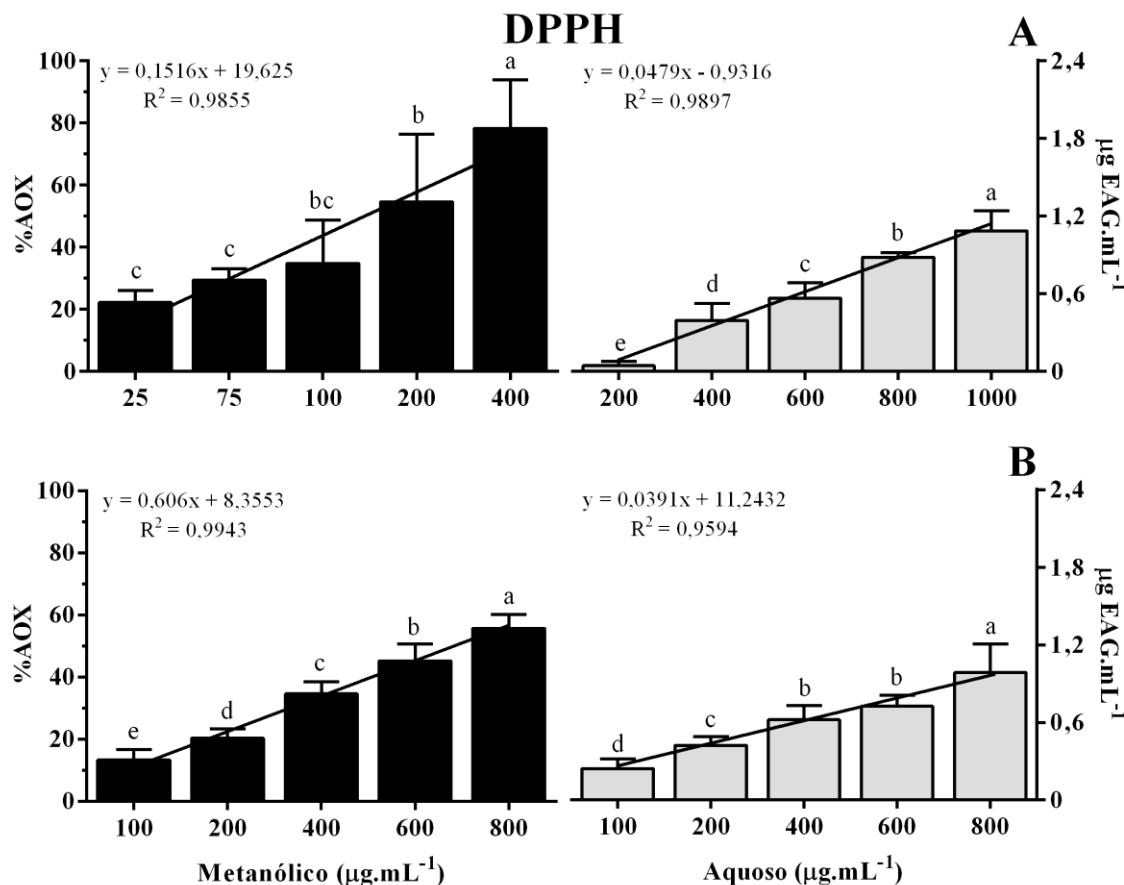


Figura 12: Atividade antioxidante expressa em porcentagem (%AOX) e equivalente de ácido gálico ( $\mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ) para o ensaio de captura do radical DPPH (média  $\pm$  DP;  $n = 5$ ), em diferentes concentrações dos extratos brutos metanólico e aquoso das espécies A) *Padina gymnospora* e B) *Sargassum cymosum*. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste *post hoc* de Newmann Keuls ( $p < 0,05$ ).

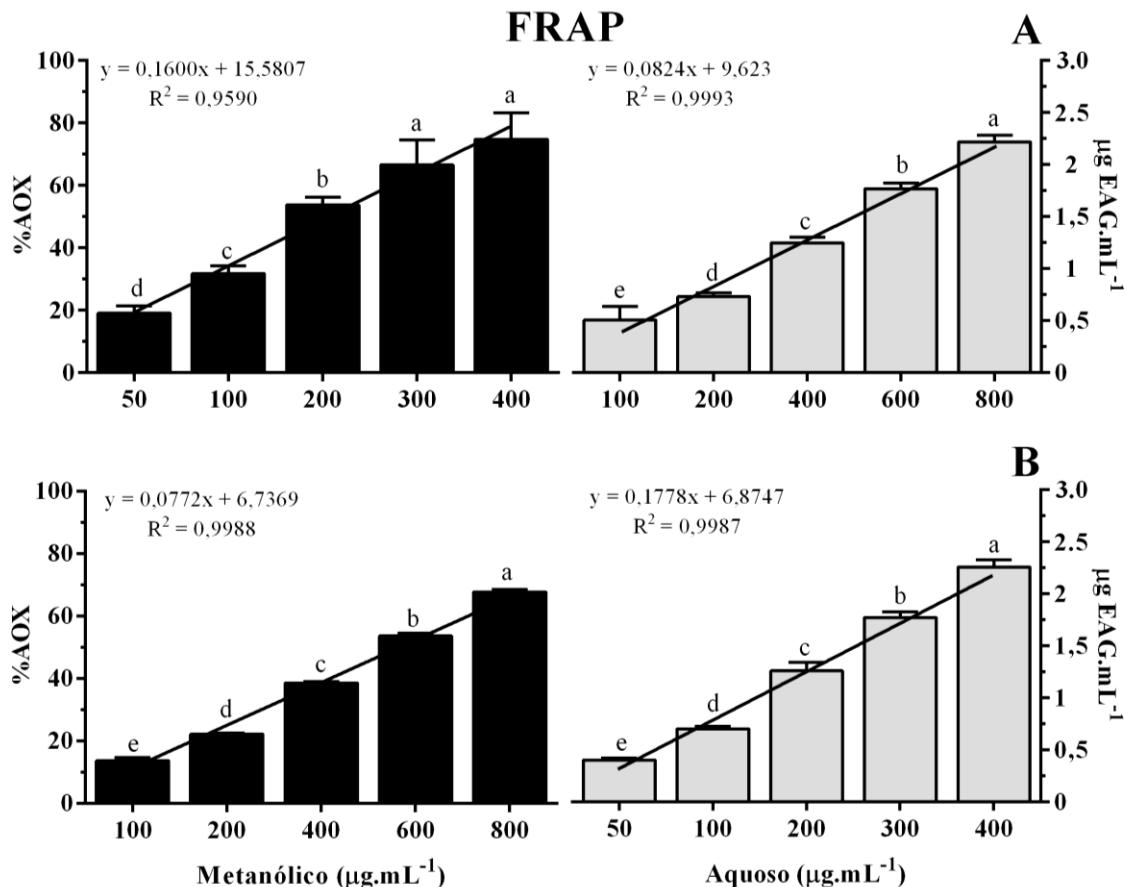


Figura 13: Atividade antioxidante expressa em porcentagem (%AOX) e equivalente de ácido gálico ( $\mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ) para o ensaio FRAP (média  $\pm$  DP;  $n = 5$ ), em diferentes concentrações dos extratos brutos metanólico e aquoso das espécies A) *Padina gymnospora* e B) *Sargassum cymosum*. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste *post hoc* de Newmann Keuls ( $p < 0,05$ ).

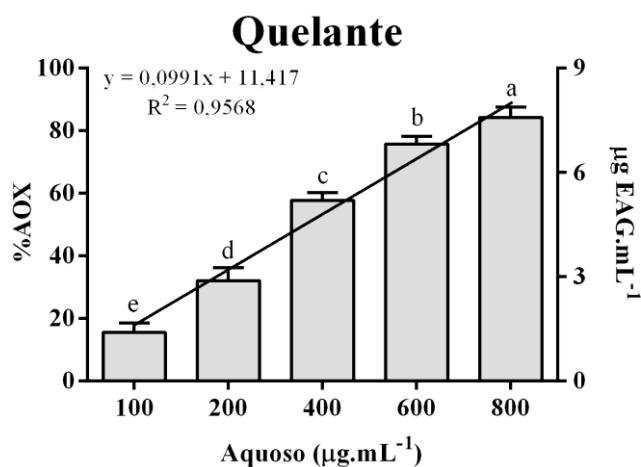


Figura 14: Atividade antioxidante expressa em porcentagem (%AOX) e equivalente de ácido gálico ( $\mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ) para o ensaio quelante de metais (média  $\pm$  DP;  $n = 5$ ), em diferentes concentrações dos extratos aquoso da espécie *Sargassum cymosum*. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste *post hoc* de Newmann Keuls ( $p < 0,05$ ).

Para o ensaio Folin-Ciocalteu (Fig. 15), o aumento da concentração de extrato metanólico e aquoso de *P. gymnospora* e *S. cymosum* levou ao aumento do teor de substâncias fenólicas totais ( $R^2 > 0,98$ ). Para *P. gymnospora* (Fig. 15A), a máxima concentração de extrato metanólico ( $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) apresentou atividade de  $96,43 \pm 10,89\%$  (equivalente a  $19,92 \pm 2,28 \mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ) e a de extrato aquoso ( $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) apresentou atividade de  $61,90 \pm 2,54\%$  (equivalente a  $12,70 \pm 0,53 \mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ). Em *S. cymosum* (Fig. 15B), os extratos metanólico e aquoso, na máxima concentração ( $800 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), apresentaram atividade de  $75,18 \pm 4,87\%$  ( $14,57 \pm 2,21 \mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ) e  $80,24 \pm 2,96\%$  ( $16,53 \pm 0,62 \mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ), respectivamente.

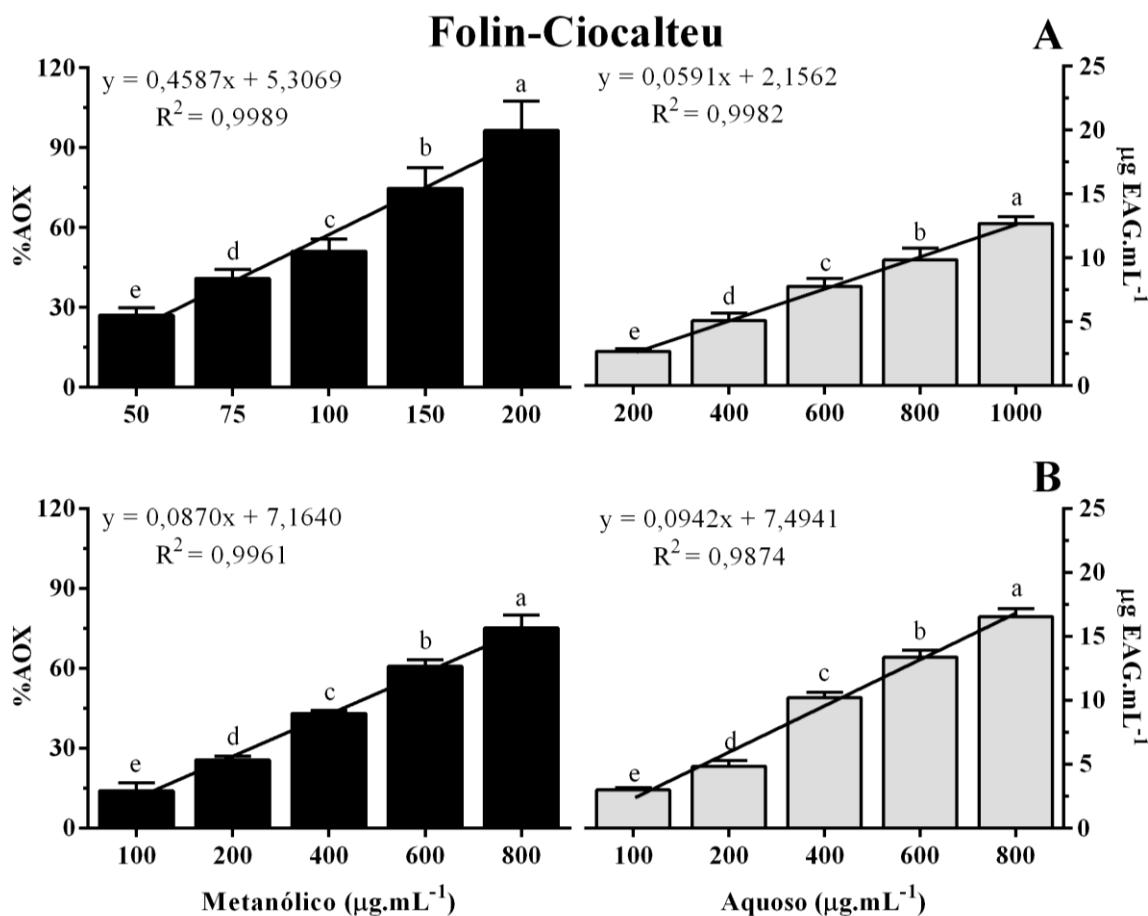


Figura 15: Teor de substâncias fenólicas totais, expresso em porcentagem (%AOX) e equivalente de ácido gálico ( $\mu\text{g EAG.mL}^{-1}$ ), pelo ensaio Folin-Ciocalteu (média  $\pm$  DP;  $n = 5$ ), em diferentes concentrações dos extratos metanólico e aquoso de A) *Padina gymnospora* e B) *Sargassum cymosum*. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste *post hoc* de Newmann Keuls ( $p < 0,05$ ).

Para comparar o potencial antioxidante entre os extratos e as espécies foram utilizados os valores de EAG (Fig. 16) e EC<sub>50</sub> (Fig. 17).

Para os valores de atividade antioxidante em mg EAG.g EB<sup>-1</sup> (Fig. 16), *C. minima* apresentou potencial antioxidante apenas para o ensaio ABTS (Fig. 6A) e não houve diferença

significativa entre o extrato metanólico ( $0,25 \pm 0,04$  mg EAG.g EB $^{-1}$ ) e o extrato aquoso ( $0,29 \pm 0,06$  mg EAG.g EB $^{-1}$ ). Em *P. gymnospora* o extrato metanólico apresentou maior potencial antioxidante nos ensaios ABTS ( $24,28 \pm 3,01$  mg EAG.g EB $^{-1}$ ; Fig. 16A), DPPH ( $4,84 \pm 1,04$  mg EAG.g EB $^{-1}$ ; Fig. 16B), Folin-Ciocalteu ( $99,61 \pm 11,39$  mg EAG.g EB $^{-1}$ ; Fig. 16C) e FRAP ( $6,45 \pm 1,01$  mg EAG.g EB $^{-1}$ ; Fig. 16D) do que o extrato aquoso. Para *S. cymosum* não foram observadas diferenças significativas entre o potencial antioxidante dos extratos metanólico e aquoso para os ensaios ABTS (Fig. 16A), DPPH (Fig. 16B) e Folin-Ciocalteu (Fig. 16D); no entanto, para o ensaio FRAP (Fig. 16C), o extrato aquoso ( $5,65 \pm 0,18$  mg EAG.g EB $^{-1}$ ) apresentou maior potencial antioxidante do que o extrato metanólico ( $2,49 \pm 0,07$  mg EAG.g EB $^{-1}$ ). Para o ensaio quelante de íon Fe $^{2+}$  apenas o extrato aquoso de *S. cymosum* apresentou potencial antioxidante, com atividade de  $9,67 \pm 0,38$  mg EAG.g EB $^{-1}$ .

Entre os extratos das três espécies estudadas, o extrato metanólico de *P. gymnospora* apresentou os maiores valores de atividade antioxidante para os ensaios ABTS, DPPH, FRAP e Folin-Ciocalteu (Fig. 16).

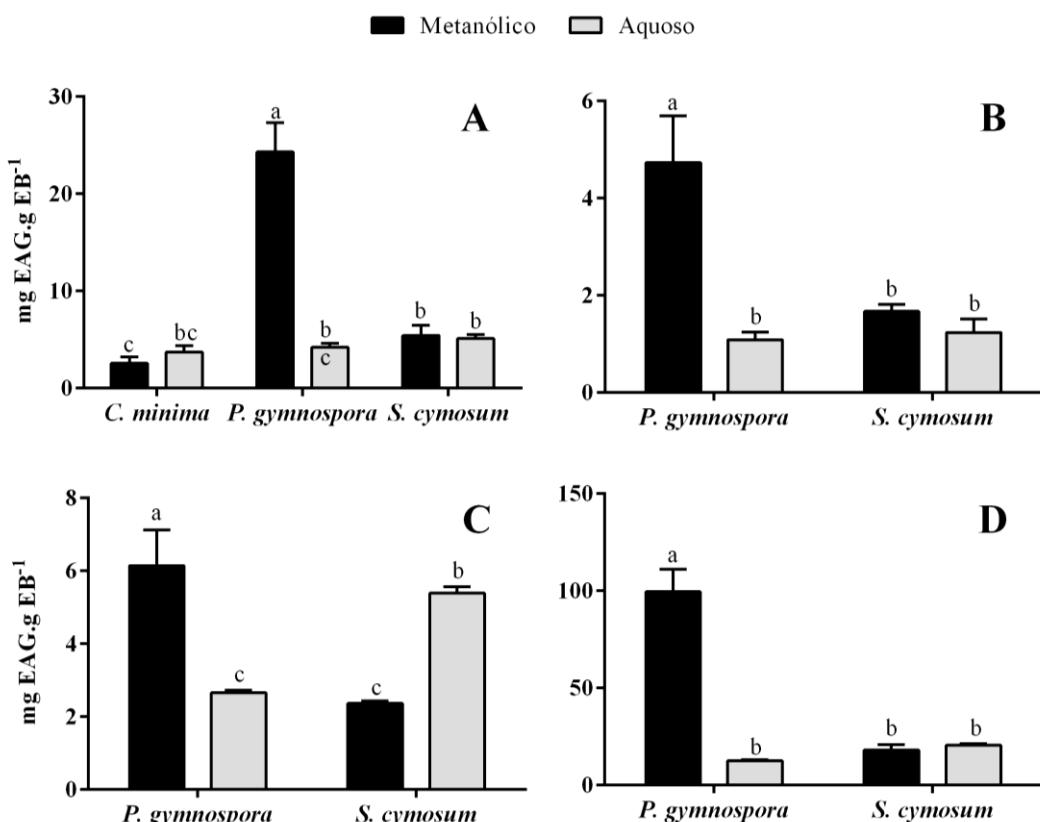


Figura 16: Comparação do potencial antioxidante pelos ensaios de A) ABTS; B) DPPH; C) FRAP e D) do teor de substâncias fenólicas totais pelo método do Folin-Ciocalteu representado como equivalente de ácido gálico (mg EAG.g EB $^{-1}$ ; média  $\pm$  DP;  $n = 5$ ), entre os extratos metanólicos e aquosos e entre as espécies *Chnoospora minima*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste *post hoc* de Newmann Keuls ( $p < 0,05$ ).

Os valores de EC<sub>50</sub> estão apresentados na Figura 17, devendo ressaltar que valores menores de EC<sub>50</sub> representam maior atividade antioxidante. Em *C. minima*, no ensaio ABTS (Fig. 7A), o extrato aquoso ( $175,24 \pm 22,54 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) apresentou maior potencial antioxidante do que o extrato metanólico ( $226,77 \pm 69,46 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Para *P. gymnospora*, o extrato metanólico apresentou maior potencial antioxidante do que o extrato aquoso para os ensaios ABTS ( $17,92 \pm 2,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; Fig. 17A), DPPH ( $208,48 \pm 123,31 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; Fig. 17B), Folin-Ciocalteu ( $97,00 \pm 10,45 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; Fig. 17C) e FRAP ( $303,70 \pm 43,87 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; Fig. 17D). Em *S. cymosum*, os extratos metanólico e aquoso não apresentaram diferenças significativas no ensaio ABTS (Fig. 17A). Para a mesma espécie, o extrato metanólico apresentou maior potencial antioxidante para os ensaios DPPH ( $624,46 \pm 78,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; Fig. 17B), o extrato aquoso apresentou maior potencial para Folin-Ciocalteu ( $415,49 \pm 24,38 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; Fig. 17C) e FRAP ( $347,91 \pm 5,30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; Fig. 17D).

Comparando os valores de EC<sub>50</sub> dos extratos das três espécies estudadas (Fig. 17), o extrato metanólico de *P. gymnospora* apresentou o maior potencial antioxidante para os ensaios ABTS, DPPH, FRAP e Folin-Ciocalteu. Para o ensaio quelante de metal apenas o extrato aquoso de *S. cymosum* apresentou potencial antioxidante ( $326,23 \pm 24,33 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

O padrão ácido gálico apresentou EC<sub>50</sub> de  $0,79 \pm 0,02 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $1,24 \pm 0,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $1,62 \pm 0,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $5,55 \pm 0,22 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $10,26 \pm 0,94 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , para os ensaios ABTS, DPPH, FRAP, quelante e Folin, respectivamente.

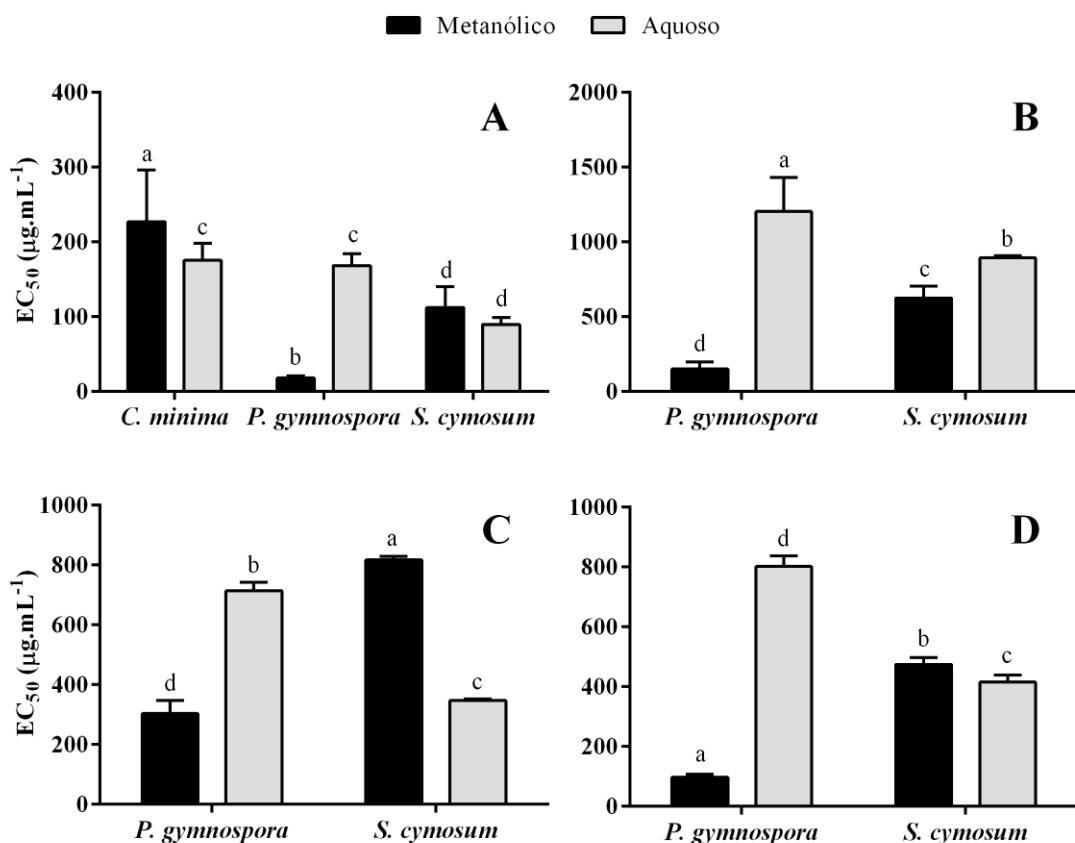


Figura 17: Comparação do potencial antioxidante pelos ensaios de A) ABTS; B) DPPH; C) FRAP e D) do teor de substâncias fenólicas totais pelo método do Folin-Ciocalteu representado como EC<sub>50</sub> ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; média  $\pm$  DP;  $n = 5$ ), entre os extratos metanólicos e aquosos e entre as espécies *Chnoospora minima*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste *post hoc* de Newmann Keuls ( $p < 0,05$ ).

A classificação do potencial antioxidante total dos extratos metanólicos e aquosos das três espécies, considerando os cinco ensaios antioxidantes, encontra-se na Tabela 7. O maior potencial antioxidante foi observado para o extrato metanólico de *P. gymnospora*. Já o extrato metanólico de *C. minima* apresentou o menor potencial antioxidante.

Tabela 7: Classificação do potencial antioxidante total dos extratos metanólicos e aquosos das espécies *Chnoospora minima*, *Padina. gymnospora* e *Sargassum cymosum*.

Espécie	Extrato	Índice ABTS	Índice DPPH	Índice Folin-Ciocalteu	Índice FRAP	Índice Quelante	Média	Ranking
<i>C. minima</i>	MeOH	12,86	30,96	6,73	3,45	16,39	14,08	6
<i>C. minima</i>	Aquoso	12,09	19,83	7,93	2,90	64,62	21,48	5
<i>P. gymnospora</i>	MeOH	100,00	100,00	100,00	100,00	59,58	91,92	1
<i>P. gymnospora</i>	Aquoso	17,23	22,28	12,75	43,00	61,09	31,27	3
<i>S. cymosum</i>	MeOH	22,26	34,41	18,28	38,56	16,00	25,90	4
<i>S. cymosum</i>	Aquoso	20,94	25,46	20,75	87,67	100,00	50,96	2

## 4 DISCUSSÃO

A avaliação do potencial antioxidante de extratos de algas é uma importante ferramenta para prospectar novas fontes de substâncias antioxidantes naturais.

O teste preliminar, realizado em uma única concentração ( $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), foi importante para selecionar as cinco concentrações mais apropriadas para testar a atividade antioxidante dos extratos em cada ensaio, e assim avaliar o potencial antioxidante de cada espécie e extrato.

Todos os extratos das espécies estudadas apresentaram atividade antioxidante em diferentes graus de ação. Sumariamente e comparando a resposta dos diferentes extratos nos cinco ensaios realizados, o potencial antioxidante seguiu a seguinte ordem: *P. gymnospora* metanólico > *S. cymosum* aquoso > *S. cymosum* metanólico > *P. gymnospora* aquoso > *C. minima* aquoso > *C. minima* metanólico.

O uso de diferentes ensaios é recomendado para uma análise mais completa do potencial antioxidante de extratos, já que as substâncias apresentam diferentes mecanismos de ação antioxidante (Frankel e Meyer 2000). As substâncias antioxidantes podem apresentar mecanismos de ação primário ou secundário (Gordon 1990). No mecanismo primário há inibição dos radicais livres pela doação de hidrogênio ou pela transferência de um elétron, interrompendo reações de oxidação. Já o mecanismo secundário reduz o processo de iniciação da oxidação e formação de radicais livres. Dessa forma, este estudo utilizou-se de cinco ensaios antioxidantes, os quais avaliam diferentes mecanismos de ação. Além disso, apresentam sistemas de reação com diferentes condições, as quais podem afetar a reatividade das substâncias presentes nos extratos brutos. Por exemplo, os ensaios ABTS, DPPH, FRAP e Folin-Ciocalteu avaliam o mecanismo de ação antioxidante primário, e o ensaio quelante do íon  $\text{Fe}^{2+}$  envolve o mecanismo antioxidante secundário, já que metais de transição são capazes de catalisar reações de formação de radicais livres. De forma complementar, os ensaios ABTS, FRAP e Folin-Ciocalteu envolvem reações de transferência de elétrons e por esse motivo podem estar correlacionados. Entre esses ensaios foi observada a mesma tendência na espécie *P. gymnospora*, em que o extrato metanólico apresentou a maior atividade para os três ensaios.

O ensaio Folin-Ciocalteu, além de analisar a capacidade do extrato em transferir elétrons, é amplamente utilizado para quantificar a concentração de substâncias fenólicas totais. Desse modo, alguns trabalhos utilizam a comparação entre esse e outros ensaios para relacionar a atividade antioxidante com o teor de substâncias fenólicas totais.

O ensaio DPPH se baseia nos mecanismos de transferência de elétrons e transferência de átomos de hidrogênio, e é o ensaio mais comum para avaliar o potencial antioxidante. Estudos

citam correlação entre os ensaios Folin-Ciocalteu e DPPH, pois o grupo -OH de substâncias fenólicas é capaz de transferir um elétron e também de doar hidrogênio (Fernando et al. 2016; Abirami e Kowsalya 2017). Para *P. gymnospora*, foi observada a mesma tendência entre esses ensaios. O extrato metanólico, que apresentou maior atividade para o ensaio Folin-Ciocalteu, apresentou maior atividade para o ensaio DPPH. Essa tendência também foi observada por Zubia et al. (2007), para a alga parda *L. variegata*, que, entre as 48 espécies de macroalgas analisada, apresentou a maior atividade pelo ensaio DPPH e também o maior teor de substâncias fenólicas totais pelo ensaio Folin-Ciocalteu.

Em trabalho de Murugan e Iyer (2013), o extrato metanólico de *P. gymnospora* apresentou maior atividade no ensaio DPPH do que o extrato aquoso, entretanto, para o ensaio Folin-Ciocalteu o resultado foi inverso. No entanto, de acordo com os autores, no ensaio Folin-Ciocalteu, outras substâncias, como açúcares redutores podem ter contribuído para a maior atividade do extrato aquoso.

Para o ensaio quelante do íon  $\text{Fe}^{2+}$ , apenas o extrato aquoso de *S. cymosum* apresentou potencial antioxidante. Sugere-se que a atividade quelante pode estar relacionada ao teor de substâncias fenólicas (Balanquit e Fuentes 2015), no entanto, para o ensaio Folin-Ciocalteu não houve diferença significativa entre os extratos metanólico e aquoso de *S. cymosum*. Estudos que analisaram o potencial antioxidante de extratos aquosos de algas pardas relataram baixa correlação entre atividade quelante e substâncias fenólicas, sugerindo que esse mecanismo antioxidante está relacionado à presença de polissacarídeos sulfatados (Wang et al. 2008, 2009; Praveen e Chakraborty 2013). Por outro lado, de acordo com Wang et al. (2016), a atividade antioxidante de polissacarídeos também pode estar relacionada ao complexo formado com substâncias fenólicas, em especial, ácidos fenólicos. No presente trabalho, o padrão floroglucinol, monômero dos florotaninos, não apresentou atividade quelante de metal, indicando que essa classe de substâncias fenólicas pode apresentar baixa reatividade nesse ensaio. Já o ácido gálico (ácido fenólico) e a queracetina (flavonoide) apresentaram alta atividade quelante de metal.

Nos extratos analisados, substâncias fenólicas, em especial os florotaninos, podem ser os responsáveis por esse mecanismo de ação antioxidante. No entanto, por se tratarem de extratos brutos, outras substâncias como acetogeninas, açúcares redutores e polissacarídeos sulfatados podem contribuir para a atividade antioxidante.

De modo geral, a reatividade foi maior para os ensaios ABTS, Folin-Ciocalteu e FRAP, em comparação com DPPH e quelante de íon  $\text{Fe}^{2+}$ , indicando que a transferência de elétrons pode ser o principal mecanismo de ação antioxidante das substâncias presentes nos extratos analisados.

A menor reatividade observada no ensaio DPPH, não significa necessariamente que os extratos apresentaram baixa atividade antioxidante para esse ensaio. O extrato etanólico das algas pardas *Padina concrecens* Thivy e *Cystoseira osmundacea* (Turner) C. Agardh mostraram alta atividade antioxidante (Tenorio-Rodriguez et al. 2017), com EC<sub>50</sub> de 50 µg.mL<sup>-1</sup> e 69 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, no entanto, as outras espécies analisadas apresentaram EC<sub>50</sub> superior a 400 µg.mL<sup>-1</sup>. Zubia et al. (2007), encontraram maior atividade para extrato diclorometano:metanol (1:1) de *L. variegata* (EC<sub>50</sub> de 320 µg.mL<sup>-1</sup>), já as outras 47 espécies analisadas apresentaram EC<sub>50</sub> superior a 1000 µg.mL<sup>-1</sup>. Bianco et al. (2015), também encontrou EC<sub>50</sub> superior a 1000 µg.mL<sup>-1</sup> para extratos metanólicos de 14 espécies de macroalgas, incluindo *P. gymnospora* e *Sargassum vulgare* C. Agardh. Os resultados demonstram que o extrato metanólico de *P. gymnospora* detes estudo apresentou alta atividade antioxidante para esse ensaio, quando comparado com outros estudos sobre extratos de macroalgas, apresentando potencial como fonte de substâncias antioxidantes.

O extrato metanólico de *P. gymnospora* também apresentou alto teor de substâncias fenólicas, quando comparado a outros estudos com macroalgas. Extratos metanólicos de espécies de macroalgas utilizadas na alimentação apresentaram teor de substâncias fenólicas que variou entre 37,66 a 151,33 mg EAG.g EB<sup>-1</sup> (Cox et al. 2010). De acordo com Machu et al. (2015), o teor de substâncias fenólicas de nove produtos alimentícios de macroalgas variou entre 8,0 e 192,6 mg EAG.g<sup>-1</sup>. Isso demonstra o potencial do extrato metanólico de *P. gymnospora*, e dos extratos metanólico e aquoso de *S. cymosum* como fonte de substâncias fenólicas, uma vez que apresentaram valores de 99,61 mg EAG.g EB<sup>-1</sup>, 75,18 mg EAG.g EB<sup>-1</sup> e 80,24 mg EAG.g EB<sup>-1</sup>, respectivamente.

## 5 CONCLUSÃO

As espécies apresentaram reatividade diferente nos cinco ensaios analisados, demonstrando a necessidade da utilização de mais de um ensaio para uma análise completa do potencial antioxidante de extratos de macroalgas. A análise conjunta da atividade antioxidante nos cinco ensaios, indicou que o principal mecanismo de ação dos extratos é pela transferência de elétrons.

Os extratos de *P. gymnospora* e *S. cymosum* apresentaram potencial antioxidante. O extrato metanólico de *P. gymnospora* apresentou, de modo geral, o maior potencial antioxidante, e o maior teor de substâncias fenólicas totais, indicando o potencial dessa espécie como fonte de substâncias antioxidantes naturais, que podem ser utilizadas na conservação de produtos

alimentícios. Além disso, *P. gymospora* pode apresentar potencial como alimento ou ingrediente funcional, sendo necessário, para tanto, mais estudos sobre a composição e segurança alimentar dessa espécie.

## **Capítulo III**

---

### **Potencial bioativo dos extratos metanólico e aquoso de *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum* (Ochrophyta, Phaeophyceae)**

#### **Resumo**

Extratos polares de algas pardas são ricos em substâncias fenólicas e polissacarídeos sulfatados, substâncias relacionadas às atividades biológicas reportadas para esse grupo. Para prospecção de extratos com potencial bioativo, este estudo avaliou a atividade antiviral, citotóxica e antibacteriana dos extratos metanólicos e aquosos de quatro espécies de algas pardas (*Chnoospora. minima*, *Dictyopteris. plagiogramma*, *Padina. gymnospora* e *Sargassum. cymosum*). Foram realizados os ensaios *in vitro* de inibição da TR-HIV, inibição do crescimento celular pelo método do MTT e inibição do crescimento bacteriano. Para relacionar a atividade biológica à presença de alguns metabólitos, foram quantificados nos extratos, carboidratos solúveis totais, grau de sulfatação, substâncias fenólicas totais e proteínas solúveis totais. Os extratos analisados, exceto o metanólico de *D. plagiogramma* apresentaram potencial antiviral. Comparando o tipo de extrato para cada uma das quatro espécies, os extratos aquosos apresentaram maior atividade antiviral. Entre as espécies as espécies, os extratos *P. gymnospora* e de *S. cymosum* apresentaram as maiores atividades de inibição da TR-HIV. O extrato aquoso de *D. plagiogramma* apresentou maior atividade citotóxica, apresentando inibição do crescimento da linhagem HCT-116 superior a 90% em 5 µg.mL<sup>-1</sup>. O teor de substâncias fenólicas e polissacarídeos sulfatados aparenta ser peça chave nas atividades biológicas antiviral e citotóxica, indicando potencial bioativo dos extratos de *C. minima*, *D. plagiogramma*, *P. gymnospora* e *S. cymosum*. Os extratos dessas espécies podem ser melhor estudados para a elaboração de produtos com fins terapêuticos. Nenhum dos extratos apresentou atividade antibacteriana, para inibição do crescimento de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis*.

Palavras-chave: Algas pardas, antiviral, citotoxicidade, extratos brutos, TR-HIV

**Abstract**

Polar extracts of brown seaweeds are rich in phenolic compounds and sulfated polysaccharides, substances related to the biological activities. For studying the prospection of extracts with bioactive potential, we evaluated the antiviral, cytotoxic and antibacterial activity of the methanolic and aqueous extracts of four species of brown algae (*Chnoospora. minima*, *Dictyopteris. plagiogramma*, *Padina. gymnospora* e *Sargassum. cymosum*). *In vitro* assays for inhibition of RT-HIV, inhibition of cell growth by the MTT method and inhibition of bacterial growth were performed. To relate the biological activity to the presence of some metabolites, the extracts were quantified on total soluble carbohydrates, degree of sulfation, total phenolic substances and total soluble proteins. The analyzed extracts, except the methanolic of *D. plagiogramma* presented antiviral potential. Comparing the type of extract for each species, the aqueous extracts presented higher antiviral activity. Among the species, the extracts *P. gymnospora* and *S. cymosum* showed the highest activities of inhibition of TR-HIV. The aqueous extract of *D. plagiogramma* presented a higher cytotoxic activity, presenting inhibition of the HCT-116 lineage above 90% in 5 µg.mL<sup>-1</sup>. The content of phenolic compounds and sulfated polysaccharides appears to be a key element in the antiviral and cytotoxic biological activities, indicating the bioactive potential of the extracts of *C. minima*, *D. plagiogramma*, *P. gymnospora* and *S. cymosum*. The extracts of these species can be better studied for the elaboration of products for therapeutic purposes. None of the extracts showed antibacterial activity, for inhibition of growth of *E. coli*, *P. aeruginosa* and *B. subtilis*.

Keywords: Antiviral, brown seaweeds, crude extracts, cytotoxicity, RT-HIV

## 1 INTRODUÇÃO

Extratos de macroalgas constituem uma promissora fonte de substâncias com potencial antimicrobiano, antiviral, antifúngico, antiparasitário, inseticida, citotóxico, antitumoral, anti-inflamatório, entre outros (Smit 2004). As algas pardas apresentam extratos ricos em substâncias fenólicas e polissacarídeos sulfatados, substâncias relacionadas ao potencial bioativo desse grupo (Eom et al. 2008; Lee et al. 2008; Vijayabaskar e Shiyamala 2011; Ahmadi et al. 2015).

As substâncias fenólicas de macroalgas são representadas principalmente pela classe dos florotaninos. Estudos com extratos e isolados de algas pardas têm verificado que os florotaninos apresentam potencial como substâncias antibacterianas (Eom et al. 2008; Lee et al. 2008; Vijayabaskar e Shiyamala 2011). Além disso, os florotaninos também apresentam atividade antiviral, atuando em diferentes fases da infecção viral, podendo inibir a adsorção, a transcriptase reversa e a transcrição (De Clercq 2000; Ahn et al. 2004).

Em extratos de macroalgas os polissacarídeos sulfatados são relacionados à atividade antiviral e citotóxica. Segundo Ahmadi et al. (2015) os polissacarídeos de algas pardas como alginato e fucanas, presentes na parede celular, e a laminarina, polissacarídeo de reserva, apresentam atividade antiviral. Como antivirais, os polissacarídeos sulfatados atuam principalmente como bloqueadores da adsorção do vírus na célula hospedeira (De Clercq 2000).

O polissacarídeo fucoidan, extraído de diferentes espécies de algas pardas apresenta potencial citotóxico, podendo promover a morte celular por apoptose (Atashrazm et al. 2015).

Os florotaninos são substâncias polares, extraídas normalmente em acetona, acetato de etila, metanol ou água. Os polissacarídeos são substâncias polianiônicas, solúveis em água, apresentando rendimento de extração diretamente proporcional ao aumento de temperatura (Whistler 1973). Desse modo, extratos polares de algas pardas podem apresentar potencial como fonte de substâncias com atividades biológicas.

Nesse sentido, o objetivo do presente estudo é avaliar a atividade antiviral, citotóxica e antibacteriana dos extratos metanólicos e aquosos de quatro espécies de algas pardas, a fim de prospectar extratos com potencial bioativo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta do material biológico e procedimento de extração

As coletas foram realizadas na região entre-marés, no litoral do Espírito Santo (ES), Brasil, em março de 2016. Os procedimentos de coleta e preparo do material biológico estão descritos na seção *Material e Métodos*, item 1 *COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO*.

O material seco e triturado foi dividido aleatoriamente em cinco subamostras ( $n = 5$ ), extraídas por maceração simples e seriada com cinco solventes em polaridade crescente, segundo detalhado na seção *Material e Métodos*, item 3 *PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO E DELINEAMENTO GERAL*. Os extratos brutos metanólicos e aquosos foram utilizados para análise do potencial antiviral, citotóxico e antibacteriano.

### 2.2 Inibição da enzima transcriptase reversa do HIV-1

O potencial antiviral dos extratos metanólicos e aquosos de *C. minima*, *D. plagiogramma*, *P. gymnospora* e *S. cymosum* foi analisado pela capacidade de inibição da enzima transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (TR-HIV). Para tanto, foi realizado um método colorimétrico com o kit de teste *Reverse Transcriptase Assay, colorimetric* (Roche®, Alemanha).

Os extratos foram solubilizados para uma concentração estoque de  $3 \text{ mg.mL}^{-1}$  ( $n = 3$ ) em DMSO 10% preparado com água ultrapura tratada com dietil pirocarbonato (DEPC). Os extratos foram analisados em cinco concentrações finais que variaram de  $20$  a  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Como controle negativo foi utilizado DMSO 10% em água DEPC, e como controle positivo foi utilizada solução padrão de Foscarnet (Sigma-Aldrich®, Brasil). A solução de Foscarnet foi preparada em DMSO 10% na concentração estoque de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A partir dessa solução foi construída curva padrão nas concentrações  $0$ ;  $0,0625$ ;  $0,125$ ;  $0,25$ ;  $0,5$  e  $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $R^2 = 0,9527$ ).

O ensaio foi conduzido em microplacas de 96 poços e o preparo da reação seguiu indicação do fabricante. Para tanto, em microtubos de  $200 \mu\text{L}$  foram misturados  $20 \mu\text{L}$  de amostra ou padrão ou controle negativo;  $20 \mu\text{L}$  de solução contendo molde/iniciador poli(A)+oligo(dT)<sub>15</sub> e nucleotídeos marcados com biotina e digoxigenina (DIG);  $19,5 \mu\text{L}$  de tampão de lise; e  $0,5 \mu\text{L}$  de enzima TR-HIV. A reação foi incubada por 1 h a  $37^\circ\text{C}$ .

Posteriormente, a mistura da reação foi transferida para microplaca de 96 poços tratada com estreptavidina, uma proteína tetramérica que possui forte afinidade pela biotina. A mistura de reação foi incubada por 1 h a  $37^\circ\text{C}$ , ocorrendo a ligação das moléculas de RNA/DNA nos poços da microplaca. Após o período de incubação, a microplaca foi lavada cinco vezes com  $200 \mu\text{L}$  de

tampão de lavagem. Depois da retirada completa do tampão de lavagem, foi adicionado em cada poço 200 µL de solução contendo tampão de incubação e anticorpo anti-DIG-POD, o qual se liga fortemente à DIG presente nos nucleotídeos marcados da molécula de RNA/DNA.

A microplaca foi colocada em incubação por 1 h a 37 °C e após esse período foi lavada cinco vezes com 200 µL de tampão de lavagem. O tampão foi retirado completamente e, em cada poço, foi adicionado 200 µL de solução de ABTS dissolvido em tampão substrato (tampão de perborato de sódio e ácido cítrico/fosfato). A enzima peroxidase (POD; ligada ao anticorpo) catalisa a quebra do substrato, liberando radical hidroxila (OH<sup>•</sup>), que reage com o ABTS (coloração verde clara), formando o radical ABTS<sup>+</sup>, que apresenta coloração verde intensa. A microplaca foi incubada por 30 min a 25 °C e em seguida, a leitura das absorbâncias foi realizada em 405 nm e 490 nm em espectrofotômetro UV-vis (Epoch<sup>TM</sup> 2-BioTek<sup>®</sup>, EUA). Se os extratos forem ativos não ocorre a síntese da molécula de RNA/DNA, e em consequência não há a formação do radical ABTS<sup>+</sup> e nem o aparecimento da coloração verde intensa, dessa forma, quanto menor for a absorbância, maior a atividade de inibição da TR-HIV.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição (Woradulayapinij et al. 2005):

$$\% \text{ inibição da TR-HIV} = \frac{(Abs_{405-CN} - Abs_{490-CN}) - (Abs_{405-A} - Abs_{490-A})}{(Abs_{405-CN} - Abs_{490-CN})} \times 100$$

em que: Abs<sub>405-CN</sub> – absorbância do controle negativo em 405 nm; Abs<sub>490-CN</sub> – absorbância do controle negativo em 490 nm; Abs<sub>405-A</sub> – absorbância da amostra em 405 nm; Abs<sub>490-A</sub> – absorbância em 490 nm.

Com o percentual de inibição das cinco concentrações foi determinado o IC<sub>50</sub> (concentração de inibição de 50% da atividade da TR-HIV) das amostras e do Foscarnet, com o programa GraphPad Prism<sup>®</sup> v. 6.01, utilizando modelo de ajuste sigmoidal (curva dose-resposta).

### **2.3 Inibição do crescimento celular pelo método do MTT**

O potencial citotóxico dos extratos metanólicos e aquosos de *C. minima*, *D. plagiogramma*, *P. gymnospora* e *S. cymosum* foi analisado pela capacidade de inibição do crescimento celular, utilizando o método do MTT (brometo de (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil tetrazolium), segundo Mosmann (1983). Esse ensaio foi realizado em colaboração com a Profa Dra Letícia Costa-Lotufo do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais Marinhos (LAFARMAR) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP).

O método é baseado na capacidade das enzimas mitocondriais em clivarem o anel tetrazólio do MTT, formando cristais de formazan, que apresentam cor azul e, pode ser mensurada em espectrofotômetro. O número de células viáveis é diretamente proporcional ao nível de cristais de formazan e, portanto, a atividade citotóxica é indiretamente proporcional à absorbância.

Os extratos metanólicos e aquosos foram solubilizados em DMSO para uma concentração estoque de 10 mg.mL<sup>-1</sup> e o ensaio foi realizado em duas concentrações finais, 5 µg.mL<sup>-1</sup> e 50 µg.mL<sup>-1</sup> ( $n = 2$ ). Como controle negativo foi utilizado DMSO e como controle positivo foi utilizada solução de doxorrubicina (Sigma-Aldrich®, Brasil) 10 mM. Os procedimentos foram realizados com material estéril, em cabine de segurança biológica classe II.

As linhagens celulares testadas foram de carcinoma de cólon retal (HCT-116) e adenocarcinoma de mama (MCF-7). Para realização do ensaio, foram adicionados em microplaca de 96 poços, 200 µL de suspensão de célula em concentração de  $5 \times 10^4$  células.mL<sup>-1</sup>. Também foi preparado um branco com apenas 200 µL de meio de cultivo. A microplaca foi incubada durante 24 h a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> para as células aderirem completamente no fundo de cada poço. Posteriormente, foi adicionado 1 µL de cada amostra ou padrão ou controle negativo, em duplicata, e as microplacas foram incubadas por 72 h a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, o sobrenadante foi substituído por meio de cultura contendo MTT (500 µg.mL<sup>-1</sup>). Três horas depois, o sobrenadante foi removido, e após secagem da placa, o precipitado contendo azul de formazan de MTT foi dissolvido em 150 µL de DMSO. A absorbância foi medida a 570 nm em espectrofotômetro.

A porcentagem de inibição do crescimento celular, que está relacionada citotoxicidade dos extratos frente às linhagens celulares testadas, foi determinada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição do crescimento celular} = \frac{\text{Abs}_{\text{CN}} - \text{Abs}_{\text{A}}}{\text{Abs}_{\text{CN}}} \times 100$$

em que: Abs<sub>CN</sub> – absorbância do controle negativo; Abs<sub>A</sub> – absorbância da amostra.

## 2.4 Inibição do crescimento bacteriano

A análise do potencial de inibição do crescimento bacteriano foi realizado por método turbidimétrico segundo Sedano-Partida et al. (in press) adaptado de Carneiro et al. (2011), em colaboração com a Profa Dra Cláudia Furlan do Laboratório de Fitoquímica deste instituto. Foram utilizadas as bactérias *E. coli* (cepa MG1655; gram-negativa), *Pseudomonas aeruginosa* (cepa PA14; gram-negativa) e *Bacillus subtilis* (cepa PY79; gram-positiva). Os procedimentos foram realizados com matérias estéreis, em cabine de segurança biológica classe II.

Para a realização do ensaio, a bactéria a ser testada foi semeada em placa de Petri contendo meio de cultura Luria Bertani (LB) sólido, e mantida a 35 °C por 24h. Uma colônia foi selecionada e adicionada em um tubo de centrífuga contendo 20 mL de meio LB líquido (pré-inóculo). O tubo com o pré-inóculo foi mantido por 24 h a 35 °C e com agitação de 120 rpm. Após esse período, cerca de 1 mL do pré-inóculo foi diluído em 20 mL de meio LB líquido, até obter absorbância entre 0,08 e 0,1 em 595 nm (diluição de aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL na escala de

McFarland). Para tanto, foi utilizada microplaca de 96 poços com volume final de 200 µL, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-vis (Epoch™ 2-BioTek®, EUA). Como controle negativo de crescimento foi utilizado o meio de cultura sem bactéria.

Os extratos metanólico e aquoso foram solubilizados em DMSO 4% para uma concentração estoque de 20 mg.mL<sup>-1</sup> ( $n = 5$ ) e os ensaios foram conduzidos em cinco concentrações entre 100 e 2000 µg.mL<sup>-1</sup>.

Como controle negativo foi utilizado DMSO 4%, e como controle positivo foi utilizada solução padrão de gentamicina. A solução de gentamicina (Sigma-Aldrich®, Brasil) foi preparada em DMSO 4% para uma concentração final de 100 µg.mL<sup>-1</sup>. A partir dessa concentração foi realizada diluição seriada da solução em proporção de 1:2, para a construção de curva padrão com nove pontos. Para cada bactéria testada foi obtida uma curva padrão, utilizando linha de tendência logarítmica. Para *E. coli* a equação da curva foi  $y = 17,952\ln(x) + 8,1704$  ( $R^2 = 0,91046$ ), para *P. aeruginosa*,  $y = 21,048\ln(x) + 12,765$  ( $R^2 = 0,90066$ ) e para *B. subtilis*,  $y = 7,3993\ln(x) + 9,1$  ( $R^2 = 0,89134$ ).

Para a reação de inibição do crescimento bacteriano, foram adicionados em microplaca de 96 poços, 180 µL de meio LB com bactéria e 20 µL de amostra ou padrão ou controle negativo. A microplaca foi incubada por 24 h a 35 °C, com agitação de 120 rpm. Após o tempo de incubação foi realizada a leitura das absorbâncias (595 nm) em espectrofotômetro UV-vis (Epoch™ 2-BioTek®, EUA).

Foi preparado um branco amostra com 180 µL de meio LB líquido sem bactéria e 20 µL de amostra. Os valores de absorbância dos brancos amostra, em 595 nm, foram descontados dos valores de absorbância das respectivas amostras após o tempo de incubação da reação. Com os valores das absorbâncias (descontado o valor do branco) foi determinada a porcentagem de inibição do crescimento bacteriano, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição do crescimento bacteriano} = \frac{\text{Abs}_{\text{CN}} - \text{Abs}_{\text{A}}}{\text{Abs}_{\text{CN}}} \times 100$$

em que: Abs<sub>CN</sub> – absorbância do controle negativo; Abs<sub>A</sub> – absorbância da amostra.

## 2.5 Composição química

A fim de correlacionar a atividade biológica à presença de alguns metabólitos, foram quantificados nos extratos metanólicos e aquosos, o teor de carboidratos solúveis totais, o grau de sulfatação, o teor de substâncias fenólicas totais e o teor de proteínas solúveis totais. Esses ensaios foram conduzidos em microplacas de 96 poços e a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro UV-vis (Epoch™ 2-BioTek®, EUA).

### **2.5.1 Quantificação de carboidratos solúveis totais**

Para a quantificação de carboidratos totais foi realizado método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico baseado em Dubois et al. (1951), Karsten et al. (2002) e Masuko et al. (2005). Nesse método, a reação dos carboidratos com o ácido sulfúrico produz derivados furfurais, que ao reagirem com o fenol desenvolvem coloração amarela, detectável em 490 nm.

Os extratos metanólicos e aquosos foram solubilizados em DMSO 10% para uma concentração estoque de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A quantificação de carboidratos totais foi realizada para uma concentração final de  $200 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  de extrato. Como controle negativo foi utilizado DMSO 10%. Para a construção de curva-padrão foi utilizada solução de fucose em concentrações de 15 a  $360 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $y = 0,0190x - 0,0257$ ;  $R^2 = 0,9961$ ).

Em microplaca de 96 poços foram misturados  $50 \mu\text{L}$  de amostra ou DMSO 10% ou fucose,  $150 \mu\text{L}$  de ácido sulfúrico 98% e  $30 \mu\text{L}$  de fenol 5%. A microplaca foi incubada em banho-maria por 5 min a  $90^\circ\text{C}$ . Após esfriar, a leitura das absorbâncias foi realizada em 490 nm. Devido ao fato de a amostra também possuir absorbância em 490 nm, foi preparado um branco amostra com  $50 \mu\text{L}$  de amostra,  $150 \mu\text{L}$  de ácido sulfúrico e  $30 \mu\text{L}$  de água ultrapura, cuja absorbância foi descontada dos valores de absorbância das respectivas amostras após a reação. O resultado foi expresso como porcentagem de carboidratos solúveis totais equivalentes à fucose em relação à massa de extrato.

### **2.5.2 Grau de sulfatação**

O teor de enxofre esterificado dos extratos aquosos foi quantificado pelo método turbidimétrico de cloreto de bário-gelatina, de acordo com Torres (2017) adaptado de Dodgson e Price (1962) e Yoshimura (2006). Este procedimento foi escolhido como método para estimar o grau de sulfatação da amostra que poderia estar vinculada ao teor de polissacarídeos.

A análise do teor de enxofre foi realizada nos extratos metanólicos e aquosos, digeridos em ácido clorídrico (HCl) 0,5 N para concentração inicial de  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  ( $n = 3$ ). Uma parte dos extratos foi hidrolisada, para tanto, os extratos aquosos secos foram solubilizados em HCl 0,5 N e colocados em banho seco a  $100^\circ\text{C}$  por 2 h (amostras hidrolisadas). Enquanto isso, outra parte dos extratos aquosos secos foi solubilizada em água ultrapura, sem aquecer, e logo antes da análise foi adicionado HCl (amostras não hidrolisadas). Todas as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 3 min. O resíduo foi descartado e o sobrenadante utilizado para análise.

O reagente turbidimétrico foi preparado com 50 mg de gelatina de origem animal em pó misturada com 10 mL de água ultrapura fervente. Nessa mistura foram adicionados 500 mg de

cloreto de bário, 500 mg de cloreto de sódio e 20 mL de água ultrapura. O volume final do reagente foi ajustado para 50 mL.

Em microplacas de 96 poços foram adicionados 50 µL do reagente turbidimétrico, 125 µL de água ultrapura e 25 µL da amostra hidrolisada ou não hidrolisada. A microplaca foi colocada em agitação por 5 min a 200 rpm. Após repouso de 15 min foi realizada a leitura das absorbâncias em 405 nm. Como controle negativo foi utilizado HCl 0,5 N. Para a construção de curva-padrão foi utilizada solução de sulfato de sódio em concentrações de 62,5 a 1250 µg.mL<sup>-1</sup> ( $y = 0,0038x + 0,1085$ ;  $R^2 = 0,9723$ ).

A partir da equação da reta da solução de sulfato de sódio foi determinada a porcentagem de enxofre das amostras hidrolisadas e não hidrolisadas. Para obter a porcentagem de enxofre esterificado (TS), a porcentagem obtida para a amostra não hidrolisada (N) foi descontada da porcentagem da amostra hidrolisada (H): TS (%) = H (%) – N (%).

### **2.5.3 Quantificação de substâncias fenólicas totais (Folin-Ciocalteu)**

O teor de substâncias fenólicas totais foi quantificado, mediante ensaio com reagente Folin-Ciocalteu, para concentração final de 200 µg.mL<sup>-1</sup> de extrato, de acordo com procedimento descrito no *Capítulo I*, item 2 *MATERIAL E MÉTODOS*, subitem 2.3 *Quantificação de substâncias fenólicas totais (Folin-Ciocalteu)*. Para a construção de curva-padrão foi utilizada solução de floroglucinol (Sigma-Aldrich®, Brasil) em concentrações de 20 a 60 µg.mL<sup>-1</sup> ( $y = 0,0418x + 0,0290$ ;  $R^2 = 0,9901$ ). A equação da reta foi utilizada para determinar o teor de substâncias fenólicas totais equivalentes ao floroglucinol pela massa de extrato, que foi convertido em porcentagem.

### **2.5.4 Quantificação de proteínas solúveis totais**

O teor de proteínas solúveis totais foi quantificado segundo método de Bradford (1976) com modificações descritas em Harb (2016). Os extratos foram solubilizados em DMSO 10% para uma concentração estoque de 4,6 mg.mL<sup>-1</sup>. Uma alíquota de 60 µL de cada extrato foi adicionada a 900 µL de solução para ensaio proteico Coomassie Brilliant Blue G-250 25% (Bio-Rad Laboratories, Inc, EUA) e a 40 µL de água ultrapura. A concentração de proteínas foi determinada pela leitura da absorbância em 595 nm, utilizando microplaca de 96 poços com volume final de 400 µL. Foi realizada curva padrão de albumina sérica bovina (BSA; Sigma-Aldrich®, Brasil) com concentrações de 2 a 16 µg.mL<sup>-1</sup> ( $y = 0,0552x + 0,0274$ ;  $R^2 = 0,9970$ ). A equação da reta foi utilizada para calcular o teor de proteínas equivalentes à BSA pela massa de extrato bruto, que foi convertido em porcentagem.

## 2.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa Statistica® v. 10 e os gráficos foram construídos com o GraphPad Prism® v. 6.01. Antes de serem submetidos à análise estatística, os valores em porcentagem foram transformados em arcoseno $\sqrt{x/100}$ . Os dados foram analisados quanto à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade (teste de Bartlett), e posteriormente submetidos a ANOVA unifatorial ou bifatorial segundo o caso. O teste *post-hoc* de Newmann-Keuls foi utilizado para determinar diferenças significativas com intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

Para comparar a porcentagem da atividade de inibição da TR-HIV entre as concentrações de um mesmo extrato, e o grau de sulfatação para o extrato aquoso, foi utilizada ANOVA unifatorial. Para analisar o potencial antiviral, expresso como IC<sub>50</sub>, e os teores carboidratos, substâncias fenólicas e proteínas, entre as espécies e o tipo de extrato foi utilizada ANOVA bifatorial.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Inibição da enzima transcriptase reversa do HIV-1

O potencial antiviral dos extratos metanólicos e aquosos das quatro espécies de algas pardas foi analisado em cinco concentrações (Fig. 18). Em *C. minima* (Fig. 18A), para o extrato metanólico, o aumento da concentração (60 a 300 µg.mL<sup>-1</sup>) propiciou o aumento da porcentagem de inibição da TR-HIV de forma linear ( $R^2 = 0,9791$ ), atingindo atividade de  $65,32 \pm 3,79\%$  na máxima concentração testada. Já para o extrato aquoso não foi observada diferença significativa entre as concentrações (60 a 300 µg.mL<sup>-1</sup>), e na máxima concentração testada a atividade foi de  $59,19 \pm 7,84\%$ . Para *D. plagiogramma* (Fig. 18B), o extrato metanólico apresentou baixa atividade antiviral (< 20%) em todas as concentrações testadas. Já no extrato aquoso, com aumento da concentração (40 a 200 µg.mL<sup>-1</sup>), houve aumento da porcentagem de inibição da TR-HIV de forma linear ( $R^2 = 0,9300$ ), atingindo atividade de  $69,76 \pm 1,24\%$  na máxima concentração testada. Em *P. gymnospora* (Fig. 18C), com aumento da concentração dos extratos metanólico e aquoso (40 a 200 µg.mL<sup>-1</sup>) observou-se o aumento linear ( $R^2 > 0,96$ ) da porcentagem de inibição da TR-HIV, com tendência similar e atingindo na máxima concentração testada atividades de  $81,63 \pm 2,50\%$  e  $86,61 \pm 3,53\%$ , respectivamente. Para *S. cymosum* (Fig. 18D), com o aumento da concentração do extrato metanólico (40 a 200 µg.mL<sup>-1</sup>) e aquoso (20 a 100 µg.mL<sup>-1</sup>) houve aumento da porcentagem de inibição da TR-HIV de forma linear ( $R^2 > 0,91$ ). O extrato metanólico atingiu atividade de  $72,55 \pm 4,46\%$  e o aquoso de  $88,11 \pm 0,54\%$ , nas máximas concentrações testadas.

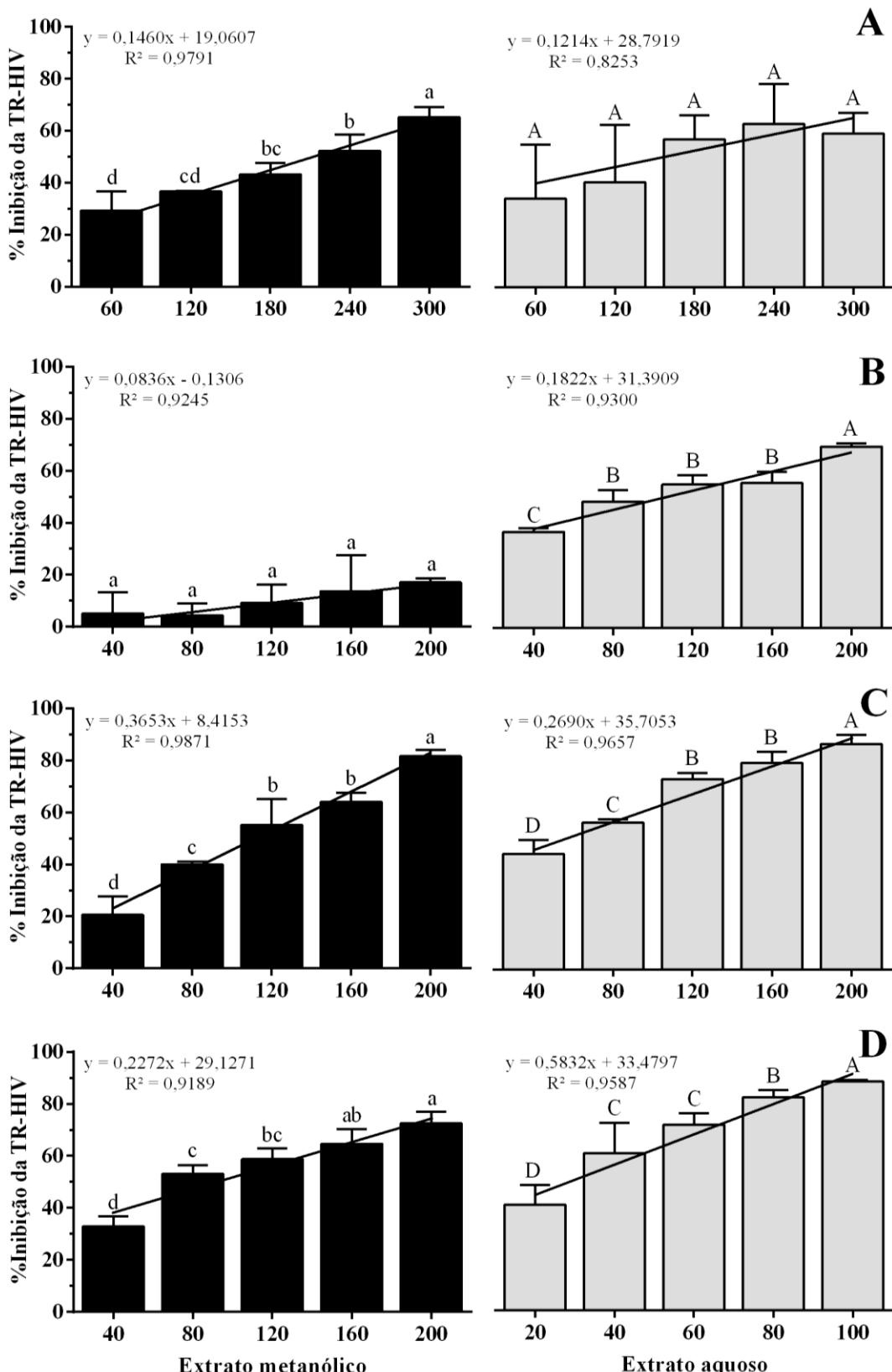


Figura 18: Porcentagem de inibição (média ± DP;  $n = 3$ ) da transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana (TR-HIV) em diferentes concentrações dos extratos metanólicos e aquosos de A) *Chnoospora minima*, B) *Dictyopteris plagiogramma*, C) *Padina gymnospora* e D) *Sargassum cymosum*. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste *post hoc* de Newmann-Keuls ( $p < 0,05$ ).

Os valores de IC<sub>50</sub> foram utilizados para comparar o potencial antiviral entre as espécies e o tipo de extrato (Fig. 19). Vale lembrar que valores menores de IC<sub>50</sub> correspondem a uma maior capacidade de inibir a enzima TR-HIV. Comparando o tipo de extrato para cada uma das quatro espécies, separadamente, os extratos aquosos apresentaram maior potencial antiviral do que os extratos metanólicos. Comparando entre as espécies, os extratos metanólicos e aquosos de *P. gymnospora* ( $109,12 \pm 11,13\%$  e  $56,4 \pm 13,28 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente) e de *S. cymosum* ( $78,26 \pm 7,38\%$  e  $30,8 \pm 6,32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente) apresentaram os maiores potenciais antivirais.

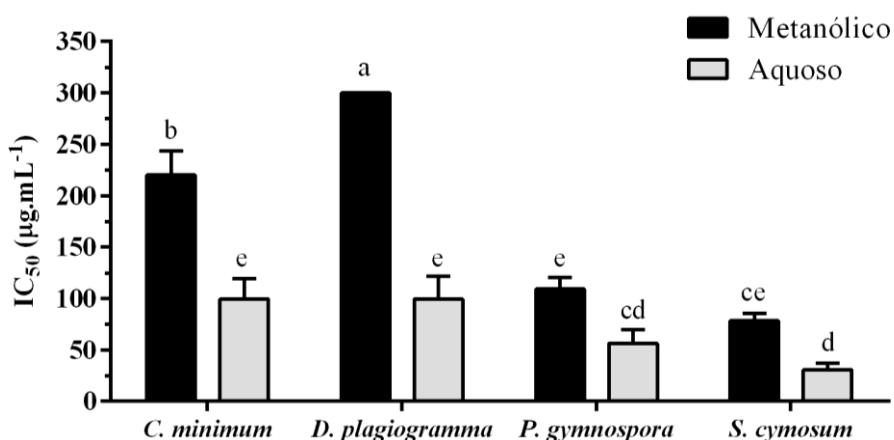


Figura 19: Comparaçāo do potencial antiviral, representado como IC<sub>50</sub> (média ± DP; n = 3), entre os extratos metanólicos e aquosos e as espécies *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste post hoc de Newmann Keuls (p < 0,05).

### 3.2 Inibição do crescimento celular

Analizando a porcentagem de inibição do crescimento da linhagem celular HCT-116 (Fig. 20A), os extratos metanólicos de *C. minima* e de *D. plagiogramma* apresentaram potencial de aproximadamente 50% na concentração de 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O extrato aquoso de *D. plagiogramma* apresentou maior atividade citotóxica nas duas concentrações testadas, 5 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , acima de 90%. Já o extrato aquoso de *C. minima* e os extratos metanólicos e aquosos de *P. gymnospora* e *S. cymosum* apresentaram atividade de inibição menor do que 40% nas duas concentrações testadas. Para a linhagem celular MCF-7 (Fig. 20B) os extratos metanólicos e aquosos das quatro espécies de algas pardas analisadas apresentaram atividade de inibição do crescimento celular menor do que 40% nas duas concentrações testadas.

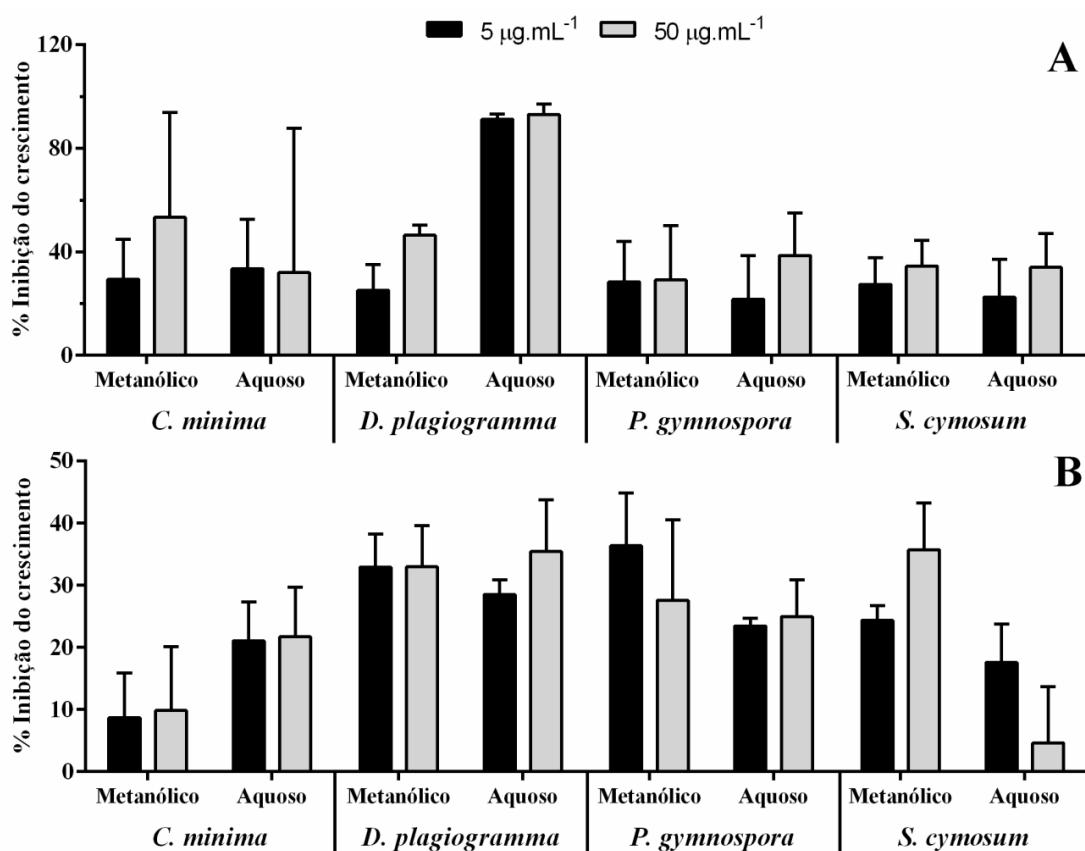


Figura 20: Porcentagem de inibição (média ± erro-padrão;  $n = 2$ ) do crescimento das linhagens celulares A) HCT-116 e B) MCF-7 pelos extratos metanólicos e aquosos de *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*, nas concentrações de  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

### 3.3 Inibição do crescimento bacteriano

Os extratos metanólicos e aquosos de *C. minima*, *D. plagiogramma*, *P. gymnospora* e *S. cymosum* não apresentaram atividade de inibição do crescimento de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis* em nenhuma das concentrações testadas ( $100$  a  $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

### 3.4 Composição química

O teor de carboidratos solúveis totais (Fig. 21A) para as quatro espécies analisadas, foi maior no extrato aquoso. Para os extratos metanólicos e aquosos, o teor de carboidratos foi maior em *D. plagiogramma* ( $20,10 \pm 6,39\%$  e  $40,01 \pm 8,15\%$ , respectivamente). Nos extratos metanólicos não foram detectados teores de enxofre esterificado. O grau de sulfatação (Fig. 21B) entre os extratos aquosos foi maior para *S. cymosum* ( $20,53 \pm 1,00\%$ ), já para as outras espécies analisadas o grau de sulfatação foi menor que 4%. Para o teor de substâncias fenólicas totais (Fig. 21C) em *C. minima* e *D. plagiogramma* não foram observadas diferenças significativas entre os extratos metanólico e aquoso, tendo valores menores do que 6%. Em *P. gymnospora* o extrato

metanólico apresentou o maior teor de substâncias fenólicas ( $48,47 \pm 1,50\%$ ), enquanto que no extrato aquoso o teor foi de  $9,95 \pm 0,57\%$  (Fig. 21C). Já em *S. cymosum* foi o extrato aquoso que apresentou o maior teor de substâncias fenólicas ( $16,07 \pm 1,17\%$ ), quando comparado ao extrato metanólico ( $13,53 \pm 1,05\%$ ). Entre os extratos metanólicos, o maior teor de substâncias fenólicas foi encontrado em *P. gymnospora*, e entre os extratos aquosos foi encontrado em *S. cymosum*. Tanto os extratos metanólicos como os extratos aquosos das quatro espécies apresentaram baixo teor de proteínas solúveis totais (< 3%; Fig. 21D).

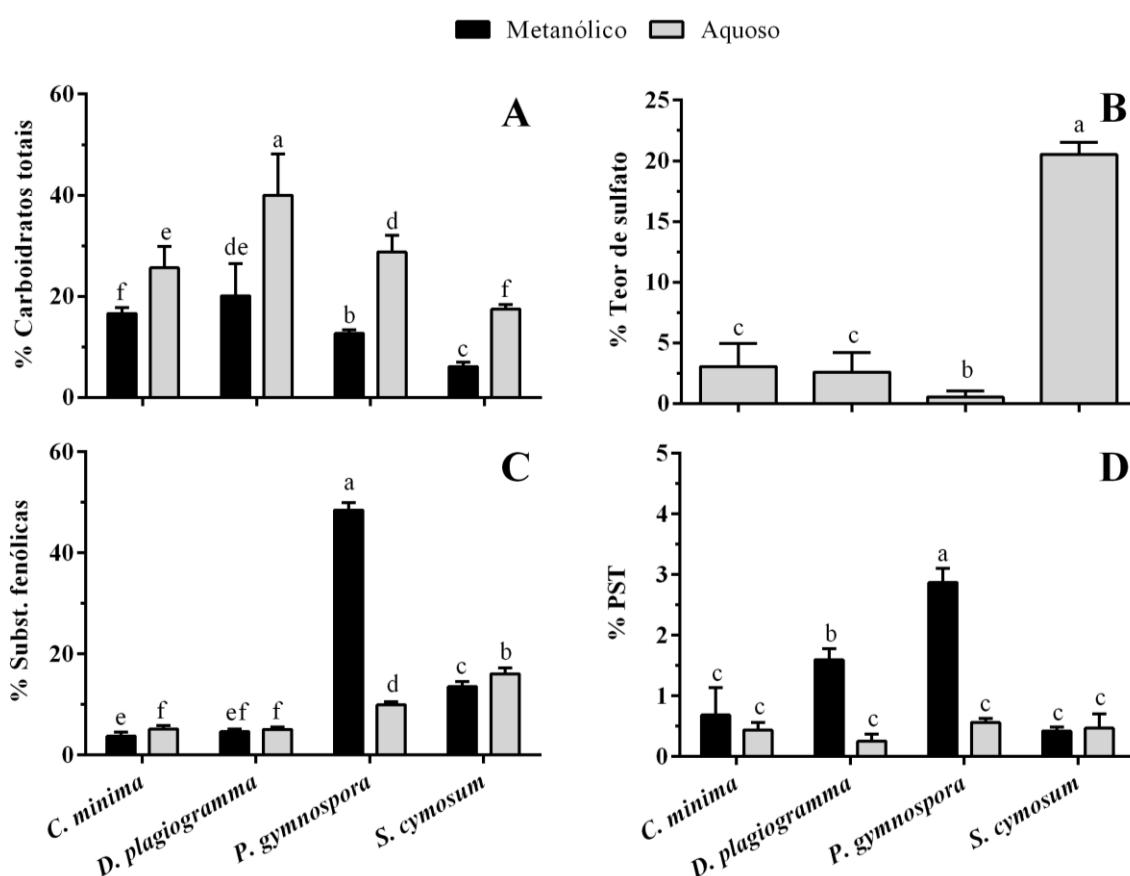


Figura 21: Teores percentuais (média ± DP;  $n = 3$ ) de A) carboidratos totais, B) grau de sulfatação, C) substâncias fenólicas totais e D) proteínas solúveis totais (PST), dos extratos metanólicos e aquosos de *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste *post hoc* de Newmann-Keuls ( $p < 0,05$ ).

#### 4 DISCUSSÃO

Os extratos analisados, exceto o extrato metanólico de *D. plagiogramma*, apresentaram potencial antiviral. A atividade antiviral de algas pardas é relacionada a substâncias fenólicas, especialmente à classe dos florotaninos, e a polissacarídeos sulfatados. Os florotaninos, principais metabólitos secundários encontrados nesse grupo de algas (Ahn et al. 2004; Leal et al. 2013)

apresentam natureza polar e podem estar presentes nos extratos metanólicos e aquosos. Os polissacarídeos são substâncias polianiónicas, apresentando solubilidade em água diretamente proporcional à temperatura, e não são solúveis em metanol (Whistler 1973).

O potencial antiviral de *C. minima*, *D. plagiogramma*, *P. gymnospora* e *S. cymosum* foi maior nos extratos aquosos, quando comparados aos extratos metanólicos. Para extratos aquosos de macroalgas, a atividade antiviral é associada, principalmente à presença dos polissacarídeos sulfatados (Queiroz et al. 2008; Wang et al. 2008; Kremb et al. 2014; Thuy et al. 2015; Dinesh et al. 2016; Zaid et al. 2016). O maior teor de carboidratos totais e o grau de sulfatação encontrados, pode indicar que a atividade antiviral dos extratos aquosos das espécies analisadas está relacionada a polissacarídeos sulfatados.

Comparando a atividade de inibição da TR-HIV entre as espécies de algas pardas, o maior potencial antiviral foi encontrado para os extratos metanólicos e aquosos de *P. gymnospora* e *S. cymosum*. Em comparação com as outras espécies analisadas, os extratos metanólicos e aquosos de *P. gymnospora* e *S. cymosum* apresentaram os menores teores de carboidratos, em contrapartida, apresentaram os maiores teores de substâncias fenólicas, que podem estar contribuindo para a atividade antiviral desses extratos.

Apesar do baixo teor de carboidratos totais, no extrato aquoso de *S. cymosum* foi encontrado o maior grau de sulfatação. Estudos indicam que quanto maior o grau de sulfatação, maior a atividade biológica de polissacarídeos (Witvrouw e De Clercq 1997; Ghosh et al. 2009; Dinesh et al. 2016). Dinesh et al. (2016) ao avaliar o potencial antiviral de frações de fucoidan (polissacarídeos ricos em fucose) da alga *Sargassum swartzii* C. Agardh, observaram que quanto maior o grau de sulfatação, maior o potencial anti-HIV. Além disso, encontraram grau de sulfatação entre 19 e 24%, teores próximos ao encontrado para o extrato aquoso de *S. cymosum* (20,53%). Esses dados indicam que para o extrato aquoso de *S. cymosum*, que apresentou o maior potencial antiviral entre os extratos das quatro espécies, tanto substâncias fenólicas, como polissacarídeos sulfatados podem estar contribuindo para a atividade de inibição da TR-HIV.

Em relação ao potencial citotóxico, o extrato aquoso de *D. plagiogramma* apresentou a maior atividade de inibição do crescimento da linhagem HCT-116. Em algas pardas, polissacarídeos sulfatados são relacionados à atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais. Frações de polissacarídeos de *Dictyopteris membranaceae* Batters (= *Dictyopteris polypodioides* (A.P. De Candolle) J. V. Lamouroux) apresentaram atividade citotóxica, inibindo o crescimento da linhagem celular HepG2 (carcinoma hepatocelular), com IC<sub>50</sub> entre 58,9 e 98,7 µg.mL<sup>-1</sup> (Matloub et al. 2015).

Os extratos metanólico de *C. minima* e *D. plagiogramma* também apresentaram potencial citotóxico, inibindo o crescimento da linhagem HCT-116 em aproximadamente 50% na concentração de 50 µg.mL<sup>-1</sup>. Esse resultado está de acordo com Kim et al. 2014, que observaram para o extrato etanólico de outra espécie de *Dictyopteris*, *Dictyopteris undulata* Holmes, atividade de inibição do crescimento celular da linhagem SW480 (cancer de cólon retal) com IC<sub>50</sub> = 40 µg.mL<sup>-1</sup>, além disso os autores verificaram que esse extrato induz a apoptose (Kim et al. 2014).

O extrato aquoso de *C. minima* e os extratos de *P. gymnospora* e *S. cymosum* apresentaram baixa atividade de inibição do crescimento da linhagem HCT-116. Para a linhagem MCF-7, os extratos das quatro espécies apresentaram baixa atividade de inibição nas concentrações testadas. As concentrações utilizadas no ensaio de inibição do crescimento celular podem ter sido baixas para avaliar o potencial citotóxico dos extratos metanólicos e aquosos das espécies de algas pardas selecionadas. Segundo Cos et al. (2006), extratos com atividades biológicas promissoras devem apresentar valor de IC<sub>50</sub> abaixo de 100 µg.mL<sup>-1</sup>, no entanto a máxima concentração testada foi 50 µg.mL<sup>-1</sup>. Estudos que avaliam atividade citotóxica de extratos de algas pardas utilizam concentrações maiores do que as que testamos, como por exemplo em Costa et al. (2011), a fração de polissacarídeo de *Sargassum filipendulla* C. Agardh apresentou atividade promissora frente a linhagem HeLa, com inibição de 61% na concentração de 100 µg.mL<sup>-1</sup>. Dessa forma, sugere-se avaliar o potencial citotóxico dos extratos de *C. minima*, *D. plagiogramma*, *P. gymnospora* e *S. cymosum* em concentrações maiores do que 50 µg.mL<sup>-1</sup>, exceto para a inibição de HCT-116 pelo extrato aquoso de *D. plagiogramma*, que sugere-se analisar concentrações inferiores a 5 µg.mL<sup>-1</sup>.

Os extratos metanólicos e aquosos de *C. minima*, *D. plagiogramma*, *P. gymnospora* e *S. cymosum* analisados neste estudo não apresentaram atividade de inibição do crescimento de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis* em nenhuma das concentrações testadas. No entanto, estudos científicos relatam que extratos de diferentes polaridades de espécies dos gêneros *Chnoospora*, *Dictyopteris*, *Padina* e *Sargassum* possuem potencial antibacteriano contra diferentes espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Lara-Isassi et al. 1996, 1999; Manivannan et al. 2011; Vijayabaskar e Shiyamala 2011; Vijayabaskar et al. 2012; El Shoubaky e Salem 2014; Jaswir et al. 2014; Zeid et al. 2014; Jang e Lee 2015; Thanigaivel et al. 2015; Baliano et al. 2016; El Shafay et al. 2016; Tabela 11 – Apêndice D). O potencial antibacteriano de extratos pode variar de acordo com o solvente utilizado, que seleciona diferentes substâncias, e de acordo com a bactéria a ser testada, que pode ser mais ou menos sensível a determinadas substâncias.

## 5 CONCLUSÕES

Os extratos analisados, exceto o extrato metanólico de *D. plagiogramma*, apresentaram potencial antiviral.

A maior atividade de inibição da TR-HIV do extrato aquoso de *S. cymosum* pode estar relacionada à presença de substâncias fenólicas e polissacarídeos sulfatados.

A elevada atividade de inibição do crescimento de HCT-116 do extrato aquoso de *D. plagiogramma* pode estar relacionada à presença de polissacarídeos sulfatados.

Aparentemente, a presença de substâncias fenólicas e polissacarídeos sulfatados é peça chave nas atividades biológicas antiviral e citotóxica, indicando potencial dos extratos de *C. minima*, *D. plagiogramma*, *P. gymnospora* e *S. cymosum*, podendo ser melhor estudadas como futuras candidatas a componentes funcionais para a elaboração de produtos com fins terapêuticos.

## **Capítulo IV**

---

### **Potencial antioxidante e bioativo de *Codium isthmocladum* (Bryopsidales, Chlorophyta)**

#### **Resumo**

Estudos demonstram o potencial bioativo de espécies de *Codium*, no entanto, para a costa brasileira existem poucos trabalhos sobre potencial de extratos e substâncias de espécies desse gênero. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial antioxidante, antiviral, citotóxico e antibacteriano dos extratos metanólico e aquoso de *Codium isthmocladum* coletado no litoral sul do Espírito Santo, Brasil, a fim de contribuir para o conhecimento sobre a espécie. Os extratos foram analisados no seu espectro de absorção UV-vis em espectrofotômetro para uma análise exploratória da presença de algumas classes de substâncias. O potencial antioxidante foi analisado pelos ensaios ABTS, DPPH, FRAP e quelante. Os potenciais antiviral, citotóxico e antibacteriano foram analisados pelos ensaios de inibição da enzima TR-HIV, inibição do crescimento celular (linhagens HCT-116 e MCF-7) pelo método do MTT e inibição do crescimento bacteriano (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis*), respectivamente. Para relacionar a atividade biológica à presença de alguns metabólitos, foram quantificados nos extratos, carboidratos solúveis totais, grau de sulfatação, substâncias fenólicas totais (Folin-Ciocalteu) e proteínas solúveis totais. Entre os tipos de extrato, o metanólico apresentou maior atividade antioxidante para os ensaios ABTS, DPPH e FRAP, já para o ensaio Quelante não foram observadas diferenças significativas. Exceto para o ensaio ABTS, os extratos apresentaram baixa atividade antioxidante,  $\leq 20\%$  na concentração de  $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . O extrato aquoso apresentou maior potencial antiviral ( $\text{IC}_{50} < 60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e citotóxico, ações provavelmente relacionadas à polissacáideos sulfatados. Os extratos metanólico e aquoso apresentaram maior potencial na inibição do crescimento de HCT-116, com atividades de 56% e  $> 90\%$ , respectivamente, na concentração  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Nenhum dos extratos apresentou potencial antibacteriano. Os resultados *in vitro* do potencial antiviral e citotóxico, sugerem maior investimento de pesquisa a fim de identificar as substâncias presentes nos extratos, responsáveis pelas atividades biológicas, além de elucidar seus mecanismos de ação.

Palavras-chave: Alga verde, antiviral, citotoxicidade, extrato bruto, TR-HIV

**Abstract**

Studies demonstrate the bioactive potential of *Codium* species, however, for the Brazilian coast there are few studies on the potential of extracts and substances of species of this genus. The objective of the present study was to evaluate the antioxidant, antiviral, cytotoxic and antibacterial potential of the methanolic and aqueous extracts of *Codium isthmocladum* harvested in the South coast of Espírito Santo, Brazil, in order to contribute to the knowledge about the species. The extracts were analyzed in their UV-vis absorption spectrophotometer for an exploratory analysis of the presence of some classes of substances. The antioxidant potential was analyzed by the ABTS, DPPH, FRAP and chelating assays. Antiviral, cytotoxic and antibacterial potentials were analyzed by TR-HIV enzyme inhibition assays, cell growth inhibition (MCF-7 and HCT-116 strains) by the MTT method, and inhibition of bacterial growth (*E. coli*, *P. aeruginosa* and *B. subtilis*), respectively. In order to relate the biological activity to the presence of some metabolites, total carbohydrates, degree of sulfation, total phenolic substances (Folin-Ciocalteu) and total soluble proteins were quantified in extracts. Among the extract types, methanolic presented higher antioxidant activity for the ABTS, DPPH and FRAP assays, but for the Chelating assay no significant differences were observed. Except for the ABTS assay, the extracts presented low antioxidant activity,  $\leq 20\%$  at the concentration of  $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . The aqueous extract had higher antiviral ( $\text{IC } 50 < 60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) and cytotoxic potential, actions probably related to sulfated polysaccharides. The methanolic and aqueous extracts presented a higher potential in the inhibition of HCT-116 growth, with activities of 56% and  $> 90\%$ , respectively, in the  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  concentration. None of the extracts presented antibacterial potential. The *in vitro* results of the antiviral and cytotoxic potential suggest a greater investment of research in order to identify the substances present in the extracts, responsible for the biological activities, besides elucidating their mechanisms of action.

Keywords: Antiviral, cytotoxicity, crude extract, green algae, RT-HIV

## 1 INTRODUÇÃO

As macroalgas são um grupo diverso e heterogêneo, incluindo organismos que não compartilham um ancestral comum (Barsanti e Gualtieri 2014). São organismos sésseis, principalmente marinhos, que ocorrem em diferentes habitats, muitas vezes em condições ambientais extremas e variáveis. Essas características são um indicativo de grande diversidade química, já que a produção de metabólitos secundários constitui uma importante estratégia ecológica, produto de processos adaptativos, atraindo para as macroalgas o interesse na busca de substâncias com potencial bioativo (Maschek e Baker 2008).

Estudos demonstram que extratos e substâncias isoladas de macroalgas apresentam atividades antioxidante, antimicrobiana, antiviral e citotóxica (Smit 2004). No entanto, comparado a outros organismos marinhos, o conhecimento sobre substâncias bioativas de macroalgas, especialmente de algas verdes (*Chlorophyta*), ainda é escasso (Hu et al. 2011).

As substâncias bioativas encontradas em extratos de algas verdes são representadas principalmente por terpenos e polissacarídeos sulfatados, sendo que a maioria dessas substâncias é reportada para a Ordem Bryopsidales (Maschek e Baker 2008).

*Codium* Stackhouse (Codiaceae) é o gênero dessa ordem com o maior número de espécies, cerca de 145 (Oliveira-Carvalho et al. 2012; AlgaeBase 2018). Estudos demonstram que espécies do gênero *Codium* apresentam principalmente potencial anticoagulante e antiviral (Hudson et al. 1998; Santos et al. 1999; Soares et al. 2012; Wang et al. 2014a). A Tabela 8 apresenta relação de alguns estudos sobre atividades biológicas testadas para espécies desse gênero. Além disso, em alguns países, espécies de *Codium* apresentam uso tradicional na alimentação e no tratamento de doenças, como verminoses, edemas e doenças do sistema urinário (Anggadiredja 2009; Ohta et al. 2009; Moon et al. 2018; Pereira 2018).

Para o Brasil foi registrada a ocorrência de oito espécies desse gênero: *Codium decorticatum* (Woodward) M. Howe; *C. intertextum*; *Codium isthmocladum* Vickers; *Codium profundum* P. C. Silva & Chacana; *Codium pernambucensis* Oliveira-Carvalho & S. M. B. Pereira; *Codium repens* P. Crouan & H. Crouan; *Codium spongiosum* Harvey; *Codium taylorii* P. C. Silva (Oliveira-Carvalho et al. 2012).

Existem poucos trabalhos sobre potencial antioxidant e bioativo de extratos e substâncias de espécies de *Codium* da costa brasileira (Santos et al. 1999; Raymundo et al. 2004; Torres et al. 2005; Lhullier et al. 2006; Costa et al. 2010; Soares et al. 2012; Martins et al. 2013). Alguns exemplos relatam extratos de *C. decorticatum* com atividade de inibição do vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) (Santos et al. 1999; Soares et al. 2012) e atividade de inibição do crescimento de

diferentes linhagens de células tumorais (Torres et al. 2005). De acordo com Costa et al. (2010), polissacarídeos sulfatados de *C. isthmocladum* apresentaram atividade anticoagulante.

A costa do Espírito Santo é uma região com grande abundância e diversidade de espécies de macroalgas. Nessa região foi relatada a ocorrência de seis espécies de *Codium*: *C. decorticatum*, *C. intertextum*, *C. isthmocladum*, *C. repens*, *C. spongiosum* e *C. taylorii*.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial antioxidant, antiviral, citotóxico e antibacteriano dos extratos metanólico e aquoso de *C. isthmocladum* coletado no litoral do Espírito Santo, Brasil.

Tabela 8: Atividades biológicas testadas para extratos ou fração de espécies de *Codium*.

Espécies	Extrato/fração	Atividade testada	Referências
<i>C. adhaerens</i> ; <i>C. fragile</i>	Metanólico	Antiviral (Anti-HIV)	Ahn et al. (2002)
<i>C. spongiosum</i> ; <i>Codium</i> sp.	Diclorometânico; metanol:água (1:1)	Antimicrobiano	Batista et al. (2014)
<i>C. tomentosum</i>	Etanólico	Anti-oxidativo; genotóxico e antigenotóxico	Celikler et al. (2009)
<i>C. fragile</i> , <i>C. vermilara</i>	Extrato aquoso dializado	Anticoagulante	Ciancia et al. (2007)
<i>C. isthmocladum</i>	Fração de polissacarídeos sulfatados	Antioxidante, antiproliferativo e anticoagulante	Costa et al. (2010)
<i>C. fragile</i>	Metanólico	Antitumoral	Dilshara et al. (2016)
<i>C. adhaerens</i> ; <i>C. divaricatum</i> , <i>C. fragile</i> , <i>C. latum</i>	Polissacarídeos sulfatados	Anticoagulante	Hayakawa et al. (2000)
<i>C. fragile</i>	Extrato metanólico	Antiviral	Hudson et al. (1998)
<i>C. fragile</i>	Proteoglicanas e polissacarídeos sulfatados	Anticoagulante	Jurd et al. (1995)
<i>C. fragile</i>	Clerosterol	Citotóxico	Kim et al. (2013)
<i>C. fragile</i>	Extrato enzimático	Antiviral	Kulshreshtha et al. (2015)
<i>C. decorticatum</i>	Acetona, metanol, clorofórmio, acetato de etila, hexano, água, éter etílico	Antifúngico	Lavanya e Veerappan (2012)
<i>Codium adhaerens</i> , <i>C. fragile</i> , <i>C. latum</i>	Polissacarídeos sulfatados	Antiviral (anti-herpético)	Lee et al. (2004)
<i>C. fragile</i>	Galactanas sulfatadas	Imunoestimulante	Lee et al. (2010) (continua)

Tabela 8: Atividades biológicas testadas para extratos ou fração de espécies do gênero *Codium*.  
(continuação)

Espécies	Extrato/fração	Atividade testada	Referências
<i>C. divaricatum</i>	Frações de polissacarídeos sulfatados	Anticoagulante	Li et al. (2015)
<i>C. decorticatum;</i> <i>C. isthmocladum</i>	Etanólico	Citotóxico ( <i>Artemia salina</i> )	Lhullier et al. (2006)
<i>C. decorticatum;</i> <i>C. taylorii</i>	Diclorometano:metanol (1:1)	Antioxidante	Martins et al. (2013)
<i>C. fragile</i>	Aquoso	Osteoartrite	Moon et al. (2018)
<i>C. fragile</i>	Galactanas sulfatadas	Antiviral e citotoxicidade	Ohta et al. (2009)
<i>C. adhaerens,</i> <i>C. tomentosum,</i> <i>C. vermiculata</i>	Diclorometânico e metanólico	Antioxidante, citotóxica e citoprotetora	Pinteus et al. (2017)
<i>C. decorticatum</i>	Extratos etéreos e metanólicos	Atividade antioxidante	Raymundo et al. (2004)
<i>C. decorticatum</i>	Extratos hexânicos, diclorometânico e etanólico	Atividade antibacteriana e antifúngica	Ríos et al. (2009)
<i>C. decorticatum</i>	Extrato aquoso (frio)	Antiviral (anti-herpético)	Santos et al. (1999)
<i>C. dwarkense</i>	Frações e polissacarídeos sulfatados purificados	Anticoagulante	Siddhanta et al. (1999)
<i>C. decorticatum</i>	Frações de glicoproteínas	Anticâncer	Senthilkumar e Jayanthi (2016)
<i>C. decorticatum;</i> <i>C. spongiosum</i>	Extrato diclorometano:metanol (1:1)	Antiviral (anti-herpético)	Soares et al. (2012)
<i>C. decorticatum</i>	Extratos éter de petróleo, clorofórmio e metanólico	Antibacteriano	Sunilson et al. (2009)
<i>C. fragile</i>	Fração de polissacarídeos sulfatados	Imunomodulatória e citotoxicidade	Surayot e You (2017)
<i>C. fragile</i>	Extrato aquoso bruto e frações de polissacarídeos sulfatados	Anticâncer e imunomodulatória	Tabarsa et al. (2013)
<i>C. decorticatum</i>	Extratos diclorometânicos, acetônico, metanólico e aquoso	Citotoxicidade	Torres et al. (2005)
<i>C. tomentosum</i>	Extrato aquoso	Antioxidante	Valentão et al. (2010)

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta do material biológico e procedimento de extração

As coletas de *C. isthmocladum* foram realizadas na região entre-marés, no litoral do Espírito Santo (ES), Brasil, em março de 2016, na Praia Marataízes ( $21^{\circ} 02,620' S$ ;  $40^{\circ} 49,453' O$ ), localizada no município de Marataízes. Os procedimentos de coleta e preparo do material biológico estão descritos na seção *Material e Métodos*, item *1 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO*.

O material seco e triturado foi dividido aleatoriamente em cinco subamostras ( $n = 5$ ), as quais foram submetidas ao procedimento de extração. A extração foi realizada a partir de 15 g de

biomassa seca por maceração simples e seriada com cinco solventes em polaridade crescente, em proporção 1:5 (m/v): hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e água (80 °C). O procedimento de extração está detalhado na seção *Material e Métodos*, item 3 *PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO E DELINEAMENTO GERAL*.

Todos os extratos brutos foram concentrados, liofilizados e pesados, e a massa final obtida foi utilizada para determinar o rendimento. Apenas os extratos brutos metanólicos e aquosos foram utilizados para análise do potencial antioxidante, antiviral, citotóxico e antibacteriano devido ao seu maior rendimento.

## 2.2 Espectro de absorção UV-vis

Os extratos metanólicos e aquosos ( $n = 3$ ) foram solubilizados em DMSO 10% para uma concentração de  $200 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ , para análise do espectro de absorção nas regiões UV-vis, de acordo com o *Capítulo I*, item 2 *MATERIAL E MÉTODOS*, subitem 2.2 *Espectro de absorção UV-vis*.

## 2.3 Potencial antioxidante

O potencial antioxidante dos extratos metanólico e aquoso de *C. isthmocladum* ( $n = 5$ ), na concentração de  $400 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ , foi analisado por meio de quatro ensaios colorimétricos (ABTS, DPPH, FRAP e Quelante de metal), de acordo com os procedimentos detalhados no *Capítulo II*, item 2 *MATERIAL E MÉTODOS*, subitem 2.2 *Potencial antioxidante*.

## 2.4 Inibição da enzima transcriptase reversa do HIV-1

O potencial antiviral dos extratos metanólicos e aquosos de *C. isthmocladum* ( $n = 3$ ) foi analisado em cinco concentrações finais entre  $60$  a  $300 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os procedimentos detalhados desse ensaio estão descritos no *Capítulo III*, item 2 *MATERIAL E MÉTODOS*, subitem 2.2 *Inibição da enzima transcriptase reversa do HIV-1*.

## 2.5 Inibição do crescimento celular pelo método do MTT

O potencial citotóxico dos extratos metanólico e aquoso de *C. isthmocladum*, analisado pela capacidade de inibição do crescimento das linhagens celulares HCT-116 e MCF-7, foi realizado para as concentrações finais de  $5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $50 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $n = 2$ ). Os procedimentos desse ensaio estão detalhados no *CAPÍTULO III*, item 2 *MATERIAL E MÉTODOS*, subitem 2.3 *Inibição do crescimento celular pelo método do MTT*. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição do crescimento celular, que está relacionada a citotoxicidade dos extratos frente às linhagens celulares testadas.

## 2.6 Inibição do crescimento bacteriano

A análise do potencial antibacteriano dos extratos metanólico e aquoso de *C. isthmocladum* foi realizada em cinco concentrações, entre 100 e 2000 µg.mL<sup>-1</sup>. Os procedimentos desse ensaio estão detalhados no *CAPÍTULO III*, item 2 *MATERIAL E MÉTODOS*, subitem 2.4 *Inibição do crescimento bacteriano*.

## 2.7 Composição química

A fim de correlacionar as atividades biológicas à presença de alguns metabólitos foram quantificados o teor de carboidratos solúveis totais, o grau de sulfatação, o teor de substâncias fenólicas totais e o teor de proteínas solúveis totais nos extratos metanólico e aquoso ( $n = 3$ ).

O teor de carboidratos solúveis totais foi quantificado para concentração final de 200 µg.mL<sup>-1</sup>. Os procedimentos detalhados desse ensaio estão descritos no *CAPÍTULO III*, item 2.5 *Composição química*, subitem 2.5.1 *Quantificação de carboidratos solúveis totais*.

A quantificação do teor de enxofre esterificado, que está relacionado ao grau de sulfatação, foi realizada para uma concentração final de 1250 µg.mL<sup>-1</sup>. Os procedimentos desse ensaio estão detalhados no *CAPÍTULO III* – item 2.5 *Composição química*, subitem 2.5.2 *Grau de sulfatação*.

A quantificação de substâncias fenólicas totais com o reagente Folin-Ciocalteu foi realizada para uma concentração final de 300 µg.mL<sup>-1</sup>. Os procedimentos foram realizados de acordo com o *Capítulo I*, item 2 *MATERIAL E MÉTODOS*, subitem 2.3 *Quantificação de substâncias fenólicas totais (Folin-Ciocalteu)*.

O teor de proteínas solúveis totais dos extratos foi quantificado para uma concentração final de 460 µg.mL<sup>-1</sup>. A mistura da reação seguiu procedimento descrito no *Capítulo III*, item 2 *MATERIAL E MÉTODOS*, subitens 2.5. *Composição química* – 2.5.4 *Quantificação de proteínas solúveis totais*.

## 2.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa Statistica® v. 10 e os gráficos foram construídos com o GraphPad Prism® v. 6.01.

Antes de serem submetidos a análise estatística, os valores em porcentagem foram transformados em arcosenov $\sqrt{(x/100)}$ . Os dados foram analisados quanto à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade (teste de Bartlett). Para comparar o rendimento entre os extratos foi utilizada ANOVA unifatorial. Para comparar a atividade de inibição da TR-HIV entre as concentrações dos extratos metanólico e aquoso foi utilizada ANOVA bifatorial. Posteriormente o teste de Newmann-Keuls foi utilizado para determinar diferenças significativas.

Para comparar a atividade antioxidante e os teores de carboidratos, enxofre, substâncias fenólicas e proteínas entre os extratos metanólico e aquoso de *C. isthmocladum* foi utilizado o teste-*t* para amostras independentes. Todas as análises foram realizadas com intervalo de confiança de 95% de significância ( $p < 0,05$ ).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Rendimento dos extratos

O procedimento de extração foi realizado com 15 g de massa seca de alga de *C. isthmocladum* ( $n = 5$ ), tendo rendimentos apresentados na Tabela 9. Entre os extratos, o aquoso apresentou o maior rendimento ( $31,38 \pm 1,74\%$ ), seguido pelo metanólico ( $11,53 \pm 0,49\%$ ).

Tabela 9: Rendimento (média ± DP;  $n = 5$ ) dos extratos brutos hexânico, diclorometânico, acetato de etila, metanólico e aquoso em relação à massa seca de *Codium isthmocladum*. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste *post-hoc* de Newmann-Keuls ( $p < 0,05$ ).

Extrato	Rendimento (%)
Hexânico	$1,77 \pm 0,46$
Diclorometânico	$0,64 \pm 0,08$
Acetato de etila	$0,57 \pm 0,01$
Metanólico	$11,53 \pm 0,49$
Aquoso	$31,38 \pm 1,74$

#### 3.2 Espectro de absorção UV-vis

Os extratos metanólico e aquoso apresentaram perfis de absorção espectral semelhante (Fig. 22A). Os extratos apresentaram banda de absorção máxima em 229 nm, podendo ser identificada uma faixa de banda de absorção em 200-239 nm (Fig. 22B). Além disso, a faixa entre 240-279 nm também foi analisada. As bandas máximas de absorção apresentaram diferença significativa entre os extratos (Fig. 22B), tendo o extrato metabólico a maior magnitude de área.

#### 3.3 Potencial antioxidante

Para *C. isthmocladum* o extrato metanólico apresentou atividade antioxidante maior do que o extrato aquoso nos ensaios ABTS (Fig. 23A), DPPH (Fig. 23B) e FRAP (Fig. 23C). No ensaio DPPH, o extrato aquoso não apresentou atividade antioxidante. No ensaio quelante de metal não houve diferença significativa da atividade antioxidante entre os extratos (Fig. 23D).

De modo geral, os extratos apresentaram baixo potencial antioxidante ( $\geq 20\%$ ) na concentração de  $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de extrato algáceo bruto, exceto para o extrato metanólico no ensaio ABTS que apresentou atividade de  $45,95 \pm 8,42\%$ , representando  $1,98 \pm 0,39 \text{ mg EAG.g EB}^{-1}$ .

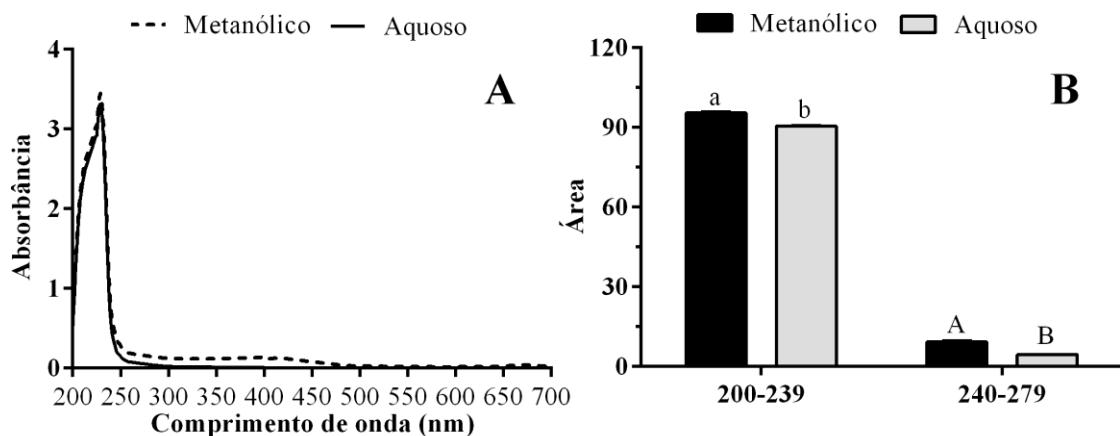


Figura 22: Perfil espectrofotométrico de absorção dos extratos metanólico e aquoso de *Codium isthmocladum*, representado pela (A) média das absorbâncias ( $n = 3$ ) nas regiões do espectro ultravioleta e visível (200 a 700 nm) e (B) área sob a curva (média  $\pm$  DP;  $n = 3$ ) nas regiões  $\lambda = 200\text{-}239$  nm e  $\lambda = 240\text{-}279$  nm. Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste *post-hoc* de Newmann-Keuls ( $p < 0,05$ ).

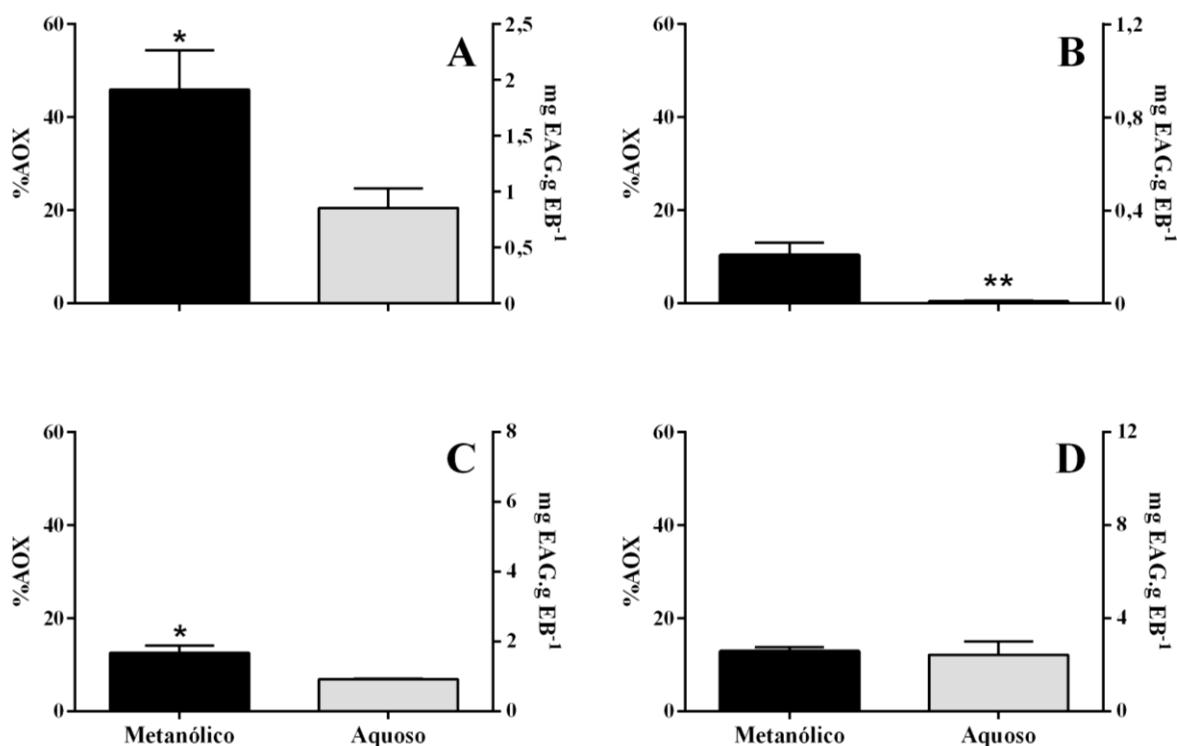


Figura 23: Potencial antioxidante (média  $\pm$  DP;  $n = 5$ ), representado como porcentagem da atividade antioxidante (%AOX) e como equivalente de ácido gálico (mg EAG.g EB<sup>-1</sup>) entre os extratos metanólico e aquoso de *Codium isthmocladum* na concentração de 400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , para os ensaios A) ABTS, B) DPPH, C) FRAP e D) Quelante. \*Diferenças significativas entre extrato metanólico e aquoso pelo teste-t para amostras independentes ( $p < 0,05$ ). \*\*Não apresentou potencial antioxidante e não foi realizada análise estatística.

### 3.4 Inibição da enzima transcriptase reversa do HIV-1

Não foi observada diferença significativa entre o potencial antiviral entre as concentrações 120, 180, 240 e 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Fig. 24). Para as cinco concentrações testadas (60 a 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), o extrato aquoso apresentou maior potencial antiviral do que o extrato metanólico. Na máxima concentração, o extrato metanólico apresentou a atividade de inibição da TR-HIV de  $64,90 \pm 2,12\%$ , e o extrato aquoso apresentou atividade de  $79,17 \pm 2,94\%$  na maior concentração testada (Fig. 24). O  $\text{IC}_{50}$  do extrato metanólico foi de  $118,35 \pm 0,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Para o extrato aquoso, o valor de  $\text{IC}_{50}$  não foi calculado, já que na menor concentração testada ( $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) a atividade foi superior a 60%. A substância padrão, Foscarnet, apresentou  $\text{IC}_{50}$  de  $0,061 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

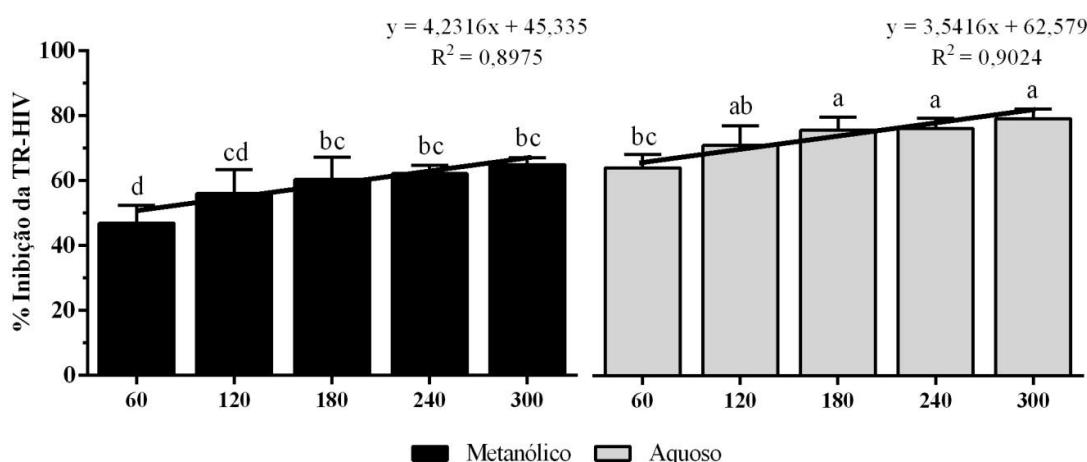


Figura 24: Porcentagem de inibição da transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana (TR-HIV) (média ± DP;  $n = 3$ ) pelos extratos metanólico e aquoso de *Codium isthmocladum* nas concentrações 60, 120, 180, 240 e 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Letras distintas representam diferenças significativas pelo teste *post-hoc* de Newmann-Keuls ( $p < 0,05$ ).

### 3.5 Inibição do crescimento celular pelo método do MTT

O extrato aquoso de *C. isthmocladum* apresentou maior citotoxicidade frentes às linhagens celulares MCF-7 (Fig. 25A) e HCT-116 (Fig. 25B) do que o extrato metanólico. Na inibição do crescimento da linhagem MCF-7, o extrato metanólico apresentou atividade de  $12,77 \pm 8,05\%$  e o extrato aquoso atividade de  $40,81 \pm 11,41\%$  na concentração de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de extrato. Para inibição do crescimento da linhagem HCT-116, o extrato metanólico apresentou atividade de  $56,00 \pm 31,18\%$  na concentração de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e o extrato aquoso apresentou atividade acima de 90% nas duas concentrações testadas.

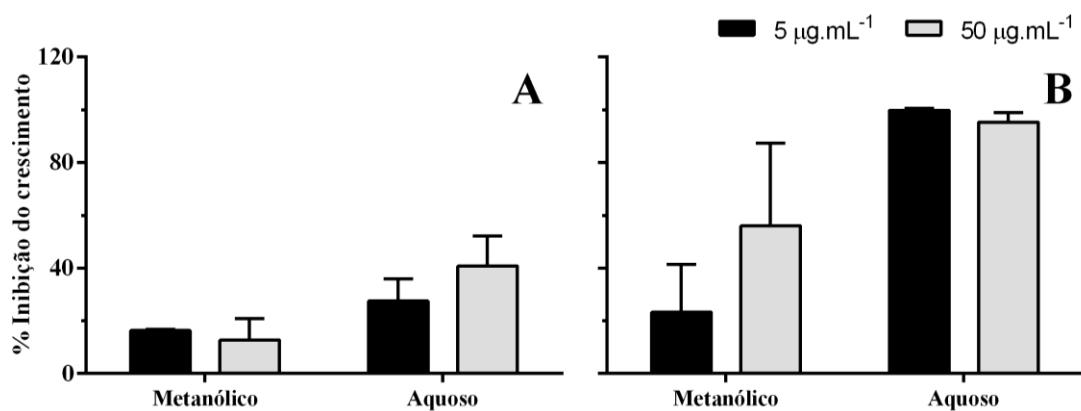


Figura 25: Porcentagem de inibição (média ± erro padrão; n = 2) do crescimento das linhagens celulares A) MCF-7 e B) HCT-116 pelos extratos metanólicos e aquosos de *Codium isthmocladum*, nas concentrações de 5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  e 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

### 3.6 Inibição do crescimento bacteriano

Os extratos metanólico e aquoso de *C. isthmocladum* não apresentaram atividade de inibição do crescimento de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis* em nenhuma das concentrações testadas (100 a 2000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

### 3.7 Composição química

O extrato aquoso apresentou maior teor de carboidratos solúveis totais ( $11,04 \pm 1,07\%$ ) do que o extrato metanólico ( $6,39 \pm 0,18\%$ ; Fig. 26A). O grau de sulfatação do extrato aquoso foi de  $10,37 \pm 1,74\%$  e no extrato metanólico não foi detectado teor de enxofre esterificado (Fig. 26B).

Para o teor de substâncias fenólicas totais (Fig. 26C), o extrato metanólico ( $0,39 \pm 0,04\%$ ) apresentou maior quantidade do que extrato aquoso ( $0,25 \pm 0,04\%$ ). O extrato metanólico apresentou teor de proteínas solúveis totais de  $0,18 \pm 0,018\%$ , já no extrato aquoso não foram detectadas PST (Fig. 26D).

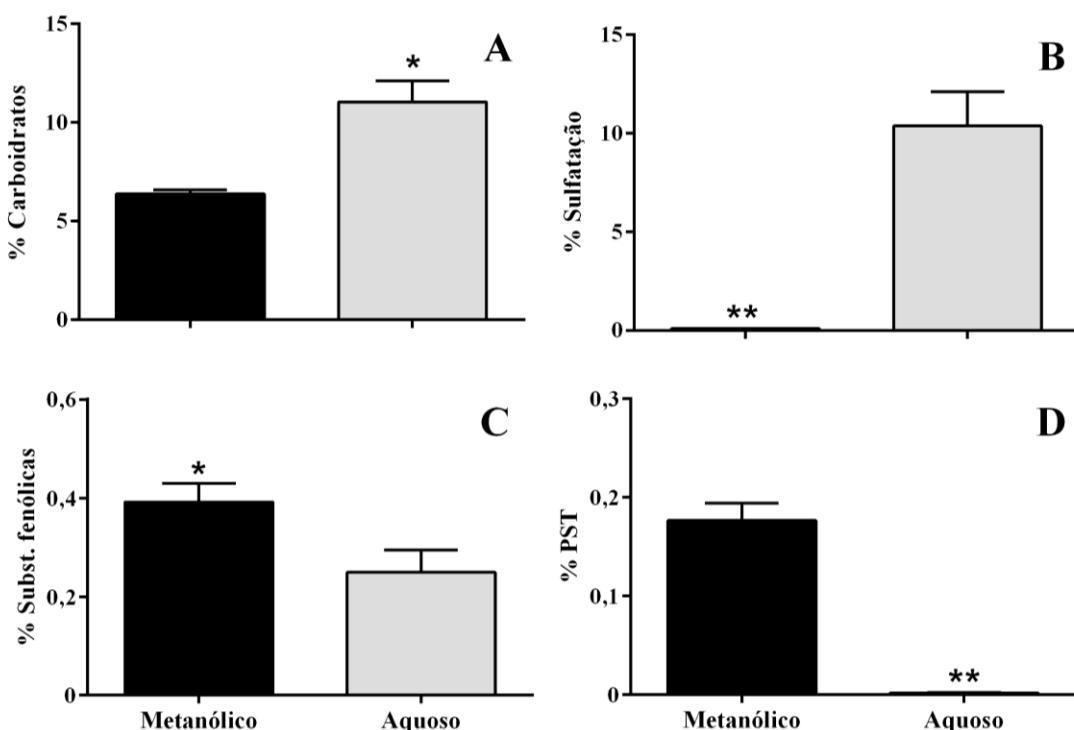


Figura 26: Teores percentuais (média ± DP;  $n = 3$ ) de A) carboidratos totais, B) grau de sulfatação, C) teor de substâncias fenólicas totais e D) conteúdo de proteínas solúveis totais (PST) dos extratos brutos metanólico e aquoso de *Codium isthmocladum*. \*Diferenças significativas entre extrato metanólico e aquoso pelo teste-*t* para amostras independentes ( $p < 0,05$ ). \*\*Não detectado.

#### 4 DISCUSSÃO

No presente estudo, a alga verde *C. isthmocladum* foi analisada quanto o rendimento de extratos, potencial antioxidante e bioativo, e composição química. O procedimento de extração utilizado afeta o rendimento, e o potencial antioxidante e bioativo de extratos de macroalgas, já que as substâncias ativas apresentam polaridades e solubilidades diferentes (Kadhasamy et al. 2008; Sultana et al. 2009). Os extratos metanólico e aquoso apresentaram maior rendimento, indicando maior teor de substâncias polares. Esses extratos, devido ao seu maior rendimento foram utilizados nas análises do potencial antioxidante e bioativo.

Os extratos metanólicos e aquosos foram submetidos a uma análise exploratória do perfil espectral nos comprimentos de onda UV-vis, pois o padrão de absorção de extratos pode indicar a presença de algumas classes de substâncias (Torres 2012; Tomazzoli et al. 2015; Schmitz et al. 2018). Ambos os extratos apresentaram padrão de absorção semelhante. Na região do espectro visível (400-700 nm) as absorbâncias foram próximas a zero, indicando que durante o procedimento de extração adotado ocorreu a remoção de pigmentos fotossintetizantes.

Na região do espectro UV (200-399 nm), foi observada uma banda de absorção entre 200-239 nm, indicando alto teor de substâncias que absorvem na faixa da radiação UV-C (100 – 280

nm). Essa banda de absorção pode estar relacionada a substâncias que apresentam o fragmento de  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada (219 nm), como acetogeninas e lactonas sesquiterpenicas (Liu et al. 1999; Chadwick et al. 2013). A banda de absorção entre 240-279 nm, relacionada à substâncias fenólicas (Solovchenko e Merzlyak 2008), apresentou valor de área sob a curva maior para o extrato metanólico do que para o aquoso, tendência também encontrada pelo ensaio Folin-Ciocalteu. Isso demonstra que a absorbância de extratos na região entre 240-279 nm pode ser utilizada como uma ferramenta para a detecção de substâncias fenólicas.

Pelo ensaio Folin-Ciocalteu, o teor de substâncias fenólicas dos extratos metanólicos e aquosos de *C. isthmocladum* foi baixo quando comparado a outras espécies de macroalgas, o que pode estar relacionado ao baixo potencial antioxidante encontrado (Pinteus et al. 2017). Outros trabalhos com espécies do gênero *Codium* também observaram baixo teor de substâncias fenólicas e baixo potencial antioxidante (Raymundo et al. 2004; Zubia et al. 2007; Costa et al. 2010; Valentão et al. 2010; Pinteus et al. 2017).

Em trabalho de Zubia et al. (2007), a atividade de captura do radical DPPH de *C. decorticatum* ( $EC_{50} = 51,48 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foi a menor entre as algas verdes analisadas, enquanto que *Avrainvillea longicaulis* (Kützing) G. Murray & Boodle apresentou o maior potencial antioxidante, com  $EC_{50}$  de  $1,44 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Pinteus et al. (2017) encontraram para os extratos metanólicos de *Codium adhaerens* C. Agardh, *Codium tomentosum* Stackhouse e *Codium vermilara* (Olivi) Delle Chiaje atividade de captura do radical DPPH superior a  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e teor de substâncias fenólicas entre 0,33% a 0,74%. Nesse mesmo trabalho, a maior atividade de captura do radical DPPH foi encontrada para o extrato metanólico da alga vermelha *Sphaerococcus coronopifolius* Stackhouse, com  $EC_{50}$  de  $34,66 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e o maior teor de substâncias fenólicas totais foi encontrado para o extrato metanólico da alga parda *Fucus spiralis* Linnaeus (39,72%), demonstrando o baixo potencial antioxidante e o baixo teor de substâncias fenólicas em espécies do gênero *Codium*.

Em todas as concentrações testadas, os extratos metanólico e aquoso de *C. isthmocladum* apresentaram atividade de inibição da TR-HIV, demonstrando potencial antiviral. Substâncias antivirais podem atuar em diferentes fases da infecção viral, como na adsorção e penetração do vírus na célula hospedeira, na replicação do genoma viral e na montagem e liberação do vírus (Shi et al. 2017). Nessas fases, as substâncias antivirais podem atuar em diferentes alvos moleculares, que variam de acordo com o tipo de vírus. Neste estudo, o potencial antiviral foi testado pela inibição da transcriptase reversa (TR), enzima essencial para a replicação dos retrovírus, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV).

Comparando os tipos de extrato, o aquoso apresentou maior atividade de inibição da TR-HIV do que o extrato metanólico. De acordo com Cos et al. (2006), extratos vegetais apresentam atividade biológica promissora quando o IC<sub>50</sub> é inferior a 100 µg.mL<sup>-1</sup>, demonstrando que o extrato aquoso de *C. isthmocladum* apresentou alta atividade na inibição da TR-HIV (IC<sub>50</sub> < 60 µg.mL<sup>-1</sup>). Os resultados da quantificação de carboidratos e sulfato indicam que o extrato aquoso apresenta polissacarídeos sulfatados, que podem estar relacionados ao potencial antiviral. Alguns estudos demonstram que polissacarídeos sulfatados de algas verdes (Lee et al. 1999), vermelhas (Nakashima et al. 1987; Haslin et al. 2001) e pardas (Dinesh et al. 2016) são capazes de inibir a TR-HIV.

No entanto, para extratos de espécies do gênero *Codium* existem poucos estudos sobre o potencial anti-HIV. Até onde conhecemos, apenas Ahn et al. (2002) analisaram o potencial anti-HIV de espécies deste gênero, e de acordo com os autores, os extratos metanólicos de *C. adhaerens* e *Codium fragile* (Suringar) Hariot não apresentaram atividade de inibição da TR-HIV. Em contrapartida, os resultados obtidos para os extratos de *C. isthmocladum* na inibição da TR-HIV foram promissores. Esse cenário demonstra que são necessários mais estudos sobre o potencial antirretroviral de *C. isthmocladum* para que se possam identificar as substâncias responsáveis pela sua ação anti-HIV.

Por outro lado, vários estudos demonstram o potencial de *Codium* contra o vírus herpes simplex (HSV), atuando principalmente na inibição da adsorção e da penetração do vírus na célula hospedeira (Hudson et al. 1998; Santos et al. 1999; Lee et al. 2004; Ohta et al. 2009; Soares et al. 2012; Kulshreshtha et al. 2015). Esses estudos, em conjunto com os resultados obtidos, que demonstram que os extratos de *C. isthmocladum* inibem a TR-HIV, indicam que espécies do gênero *Codium* podem apresentar diferentes mecanismos de ação antiviral e podem atuar na inibição de infecções por diferentes tipos de vírus.

Em relação ao potencial citotóxico, o extrato aquoso de *C. isthmocladum* apresentou maior atividade de inibição do crescimento de MCF-7 e HCT-116 do que o extrato metanólico. Para *C. fragile*, Kim et al. (2008) relacionaram a maior atividade citotóxica do extrato aquoso, quando comparado ao extrato metanólico, à presença de polissacarídeos sulfatados. A atividade citotóxica encontrada nos extratos aquosos de *C. isthmocladum* também pode estar relacionada à presença de polissacarídeos sulfatados, já que esse extrato apresentou maior teor de carboidratos e grau de sulfatação, no entanto, mais estudos são necessários para relacionar o potencial citotóxico à composição do extrato.

A atividade do extrato aquoso de *C. isthmocladum* na inibição de HCT-116 e MCF-7 foi superior a encontrada para o extrato aquoso de *C. decorticatum* na inibição de diferentes linhagens

celulares, com valores de IC<sub>50</sub> que variaram de 10,6 a 45,6 µg.mL<sup>-1</sup> (Torres et al. 2005). Ainda, de acordo com Torres et al. (2005), o extrato aquoso de *C. decorticatum* apresentou maior citotoxicidade quando comparado aos extratos de outras 12 espécies de macroalgas, demonstrando que o extrato aquoso de *C. isthmocladum* apresenta alta atividade de inibição do crescimento das linhagens HCT-116 e MCF-7 e potencial na busca de substâncias com atividade citotóxica.

Em relação ao ensaio antibacteriano, os extratos metanólico e aquoso de *C. isthmocladum* não apresentaram atividade de inibição do crescimento de *E. coli*, *P. aeruginosa* (Gram-negativas) e *B. subtilis* (Gram-positiva), o que está de acordo com Ríos et al. (2009) e Sunilson et al. (2009). Segundo os autores, para *C. decorticatum* foi observado baixo potencial de extratos alcoólicos na inibição de *E. coli* e *P. aeruginosa*, além de *Klebsiella pneumoniae* (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva). Indicando que extratos de *Codium* apresentam baixo potencial na inibição do crescimento de diferentes cepas bacterianas.

## 5 CONCLUSÃO

Existem poucos estudos sobre o potencial de espécies de *Codium* como fonte de bioativos, assim, este estudo vem a contribuir com o conhecimento da espécie e na área de prospecção.

O extrato aquoso de *C. isthmocladum* apresentou alto potencial na inibição da enzima RT-HIV e das linhagens de células tumorais HCT-116 e MCF-7, ações provavelmente ligadas à polissacarídeos sulfatados. Os resultados *in vitro* do potencial bioativo de *C. isthmocladum* sugerem maior investimento de pesquisa a fim de elucidar quais substâncias presentes nos extratos testados seriam os responsáveis pelas atividades biológicas, além de entender os mecanismos de atividade antiviral e citotóxica *in vivo*.

Já para as atividades antioxidante e antibacteriana, os extratos metanólicos e aquosos de *C. isthmocladum* apresentaram baixo potencial.

## Considerações Finais

---

A avaliação do potencial antioxidante e bioativo de macroalgas constitui um foco de pesquisa na área de fisiologia, pois contribui para o conhecimento da diversidade química das espécies. Além disso, a busca por novas fontes de produtos naturais, apresenta aplicação na área de alimentos funcionais e na área farmacêutica, contribuindo para prevenção e tratamento de doenças.

Algumas pardas são caracterizadas pela presença de substâncias fenólicas, principalmente da classe dos florotaninos, que são relacionadas a atividades biológicas. Por esse motivo, extratos acetato de etila e metanólicos foram submetidas à análise em CLAE-DAD. O método para análise dos extratos acetato de etila e metanólico em CLAE-DAD foi eficiente para a separação das substâncias presentes nos extratos, caracterizadas como substâncias fenólicas por apresentarem banda de absorção entre 240-290 nm. A partir dos dados de CLAE-DAD, foi possível observar que a composição fenólica variou principalmente entre os tipos de extrato.

Para as cinco espécies, os extratos metanólico e aquoso apresentaram os maiores rendimentos, e por esse motivo foram utilizados para avaliação do potencial antioxidante e bioativo. De modo geral, algas pardas apresentam alta atividade antioxidante, que pode estar relacionada à presença de substâncias fenólicas. Entre as algas pardas analisadas, o extrato metanólico de *P. gymnospora* apresentou maior potencial antioxidante e alto teor de substâncias fenólicas totais, indicando o potencial biotecnológico dessa espécie como fonte de substâncias antioxidantes naturais. Já a alga verde analisada, *C. isthmocladum*, apresentou baixo potencial antioxidante e baixo teor de substâncias fenólicas totais, quando comparada às algas pardas estudadas.

Os extratos metanólicos e aquosos das cinco espécies, apresentaram alguma atividade biológica *in vitro* (antiviral e/ou citotóxica), que podem estar relacionadas à presença de substâncias fenólicas e polissacarídeos sulfatados. No entanto, foram analisados extratos brutos, que podem apresentar uma variedade de substâncias pertencentes a diferentes classes químicas, as quais podem estar contribuindo para as atividades biológicas. Dessa forma são necessários mais estudos a fim de elucidar quais as substâncias presentes nos extratos são as responsáveis por essas atividades.

O potencial antiviral, analisado pela capacidade de inibição da TR-HIV, foi maior nos extratos aquosos de *P. gymnospora*, *S. cymosum* e *C. isthmocladum*. O maior potencial citotóxico foi encontrado nos extratos aquosos de *D. plagiogramma* e *C. isthmocladum*, que apresentaram alta atividade de inibição do crescimento da linhagem HCT-116. Os resultados encontrados

indicam o potencial bioativo das macroalgas estudadas, principalmente do extrato aquoso de *D. plagiogramma*, *P. gymnospora*, *S. cymosum* e *C. isthmocladum*. Além disso, essas espécies apresentaram potencial para prospecção de produtos naturais, assim sugere-se maior investimento de pesquisa sobre essas espécies a fim de entender os mecanismos de ação antioxidant, antiviral e citotóxica.

## Referências

---

- Abirami RG, Kowsalya S (2017) Quantification and correlation study on derived phenols and antioxidant activity of seaweeds from Gulf of Mannar. *J Herbs, Spices Med Plants* 23:9–17. doi: 10.1080/10496475.2016.1240132
- Agregán R, Munekata PES, Franco D, et al (2017) Phenolic compounds from three brown seaweed species using LC-DAD–ESI-MS/MS. *Food Res Int* 99:979–985. doi: 10.1016/j.foodres.2017.03.043
- Ahmadi A, Moghadamousi SZ, Abubakar S, Zandi K (2015) Antiviral potential of algae polysaccharides isolated from marine sources: A Review. *Biomed Res Int* 2015:1–8. doi: 10.1155/2015/825203
- Ahn M-J, Yoon K-D, Kim CY, et al (2002) Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 integrase and antiviral activity of Korean seaweed extracts. *J Appl Phycol* 14:325–329. doi: 10.1023/A:1022192329471
- Ahn M-J, Yoon K-D, Min S-Y, et al (2004) Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and protease by phlorotannins from the brown alga *Ecklonia cava*. *Biol Pharm Bull* 27:544–547. doi: 10.1248/bpb.27.544
- Alali FQ, Liu XX, McLaughlin JL (1999) Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. *Journal of Natural Products*, 62(3): 504–540. doi:10.1021/np980406d
- AlgaeBase (2018) Taxonomy Browser - Family: Codiaceae.  
<<http://www.algaebase.org/browse/taxonomy/?id=5201>>. Acesso em: 31 Ago 2018
- Allender BM, Kraft GT (1983) The marine algae of Lord Howe Island (New South Wales): the Dictyotales and Cutleriales (Phaeophyta). *Brunonia* 6:73–130
- Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, et al (2017) Phytochemicals: extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants* 6:42. doi: 10.3390/plants6040042
- Andreó D, Jorge N (2006) Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *Bol do CEPPA* 24:319–336. doi: 10.5380/cep.v24i2.7489
- Anggadiredja JT (2009) Ethnobotany study of seaweed diversity and its utilization in Warambadi, Panguhalodo areas of East Sumba District. *J Teknol Lingkung* 10:297–310. doi: 10.29122/jtl.v10i3.1476
- Atashrazm F, Lowenthal RM, Woods GM, et al (2015) Fucoidan and cancer: A multifunctional molecule with anti-tumor potential. *Mar Drugs* 13:2327–2346. doi: 10.3390/md13042327
- Audibert L, Fauchon M, Blanc N, et al (2010) Phenolic compounds in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*: Distribution and radical-scavenging activities. *Phytochem Anal* 21:399–405. doi: 10.1002/pca.1210
- Balanquit BJR, Fuentes RG (2015) Preliminary phycochemical screening and antioxidant activity of some brown algae *Sargassum* species for Lawaan, Eastern Samar. *J Nat Stud* 14:12–21. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Baliano AP, Pimentel EF, Buzin AR, et al (2016) Brown seaweed *Padina gymnospora* is a prominent natural wound-care product. *Brazilian J Pharmacogn* 26:714–719. doi: 10.1016/j.bjp.2016.07.003
- Barata G (2004) Clorofíceas marinhas bentônicas do estado do Espírito Santo. Instituto de Botânica
- Barbosa SO, Figueiredo M a. O, Testa V (2008) Estrutura e dinâmica de comunidades bentônicas dominadas por macrófitas na zona intramareal da Praia de Jacaraípe, Espírito Santo, Brasil. *Hoehnea* 35:563–575
- Barsanti L, Gualtieri P (2014) Algae: Anatomy, biochemistry, and biotechnology, 2.<sup>a</sup> ed. CRC Press, Boca Raton

- Batista D, Carvalho AP, Costa R, et al (2014) Extracts of macroalgae from the Brazilian coast inhibit bacterial quorum sensing. *Bot Mar* 57:441–447. doi: 10.1515/bot-2014-0031
- Blunt JW, Copp BR, Munro MHG, et al (2014) Marine natural products. *Nat Prod Rep* 31:160–258. doi: 10.1039/b415080p
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol* 28:25–30. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- Brito ES, Moraes SM, Sampaio CDG, Saura-Calixto FD (2006) Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo métodos de redução do ferro (FRAP). Embrapa - Comun Técnico 3–6
- Carneiro VA, Dos Santos HS, Arruda FVS, et al (2011) Casbane diterpene as a promising natural antimicrobial agent against biofilm-associated infections. *Molecules* 16:190–201. doi: 10.3390/molecules16010190
- Carvalho LR de, Roque NF (2000) Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. *Quim Nova* 23:757–764. doi: 10.1590/S0100-4042200000600009
- Carvalho VF de (2013) Avaliação dos impactos da urbanização sobre as comunidades de macroalgas bentônicas no litoral do Espírito Santo, Brasil. Universidade Federal Rural de Pernambuco
- Celikler S, Vatan O, Yildiz G, Bilaloglu R (2009) Evaluation of anti-oxidative, genotoxic and antigenotoxic potency of *Codium tomentosum* Stackhouse ethanolic extract in human lymphocytes *in vitro*. *Food Chem Toxicol* 47:796–801. doi: 10.1016/j.fct.2009.01.010
- Chadwick M, Trewin H, Gawthrop F, Wagstaff C (2013) Sesquiterpenoids lactones: Benefits to plants and people. *Int J Mol Sci* 14:12780–12805. doi: 10.3390/ijms140612780
- Chen Z, Bertin R, Froldi G (2013) EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH<sup>•</sup> assay using several statistical programs. *Food Chem* 138:414–420. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.001
- Chorilli M, Leonardi GR, Salgado HRN (2007) Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. *Rev Bras Farm* 88:113–118
- Ciancia M, Quintana I, Vizcargüénaga MI, et al (2007) Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermiculata* with controversial effects on hemostasis. *Int J Biol Macromol* 41:641–649. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2007.08.007
- Clardy J, Walsh C (2004) Lessons from natural molecules. *Nature* 432(7019): 829–837. doi:10.1038/nature03194
- Cofrades S, López-López I, Bravo L, et al (2010) Nutritional and antioxidant properties of different brown and red spanish edible seaweeds. *Food Sci Technol Int.* doi: 10.1177/1082013210367049
- Cos P, Vlietinck AJ, Berghe D, Vanden, Maes L (2006) Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* «proof-of-concept». *J Ethnopharmacol* 106:290–302. doi: 10.1016/j.jep.2006.04.003
- Costa LS, Fidelis GP, Cordeiro SL, et al (2010) Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomed Pharmacother* 64:21–28. doi: 10.1016/j.biopha.2009.03.005
- Costa LS, Fidelis GP, Telles CBS, et al (2011) Antioxidant and antiproliferative activities of heterofucans from the seaweed *Sargassum filipendula*. *Mar Drugs* 9:952–966. doi: 10.3390/md9060952
- Cox S, Abu-Ghannam N, Gupta S (2010) An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. *Int Food Res J* 17:205–220

- Crispino LMB (2000) Feofícias do litoral do Estado do Espírito Santo. Universidade Estadual Paulista
- Dai J, Mumper RJ (2010) Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15:7313–7352. doi: 10.3390/molecules15107313
- Damonte EB, Matulewicz MC, Cerezo AS (2004) Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. *Curr Med Chem* 11:2399–2419. doi: 10.2174/0929867043364504
- De Clercq E (2000) Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Med Res Rev* 20:323–349
- Degáspari CH, Waszczynskyj N (2004) Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica* 5:33–40. doi: 10.5380/acd.v5i1.540
- Dewick PM (2009) Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 3.<sup>a</sup> ed. John Wiley & Sons, Chichester
- Dilshara MG, Jayasooriya RGPT, Kang CH, et al (2016) Methanol extract of *Codium fragile* inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced matrix metalloproteinase-9 and invasiveness of MDA-MB-231 cells by suppressing nuclear factor- $\kappa$ B activation. *Asian Pac J Trop Med* 9:535–541. doi: 10.1016/j.apjtm.2016.04.010
- Dinesh S, Menon T, Hanna LE, et al (2016) *In vitro* anti-HIV-1 activity of fucoidan from *Sargassum swartzii*. *Int J Biol Macromol* 82:83–88. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.09.078
- Dodgson KS, Price RG (1962) A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem J* 84:106–110
- Dubois M, Gilles K, Hamilton JK, et al (1951) A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature* 168:167
- Eom S-H, Kang M-S, Kim Y-M (2008) Antibacterial activity of the Phaeophyta *Ecklonia stolonifera* on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Fish Sci Technol* 11:1–6
- El Shafay SM, Ali SS, El-Sheekh MM (2016) Antimicrobial activity of some seaweeds species from Red sea, against multidrug resistant bacteria. *Egypt J Aquat Res* 42:65–74. doi: 10.1016/j.ejar.2015.11.006
- El Shoubaky GA, Salem EAER (2014) Active ingredients fatty acids as antibacterial agent from the brown algae *Padina pavonica* and *Hormophysa triquetra*. *J Coast Life Med* 2:535–542. doi: 10.12980/JCLM.2.2014JCLM-2014-0025
- Farvin KHS, Jacobsen C (2013) Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chem* 138:1670–1681. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.10.078
- Fernando IPS, Kim M, Son K-T, et al (2016) Antioxidant activity of marine algal polyphenolic compounds: A mechanistic approach. *J Med Food* 19:1–14. doi: 10.1089/jmf.2016.3706
- Ferreira ALA, Matsubara LS (1997) Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Bras* 43:61–68
- Frankel EN, Meyer AS (2000) The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J Sci Food Agric* 80:1925–1941. doi: 10.1002/1097-0010(200010)80:13<1925::AID-JSFA714>3.0.CO;2-4
- Ghareib HR (2010) Effect of methanol extract of *Sargassum virgatum* AG (Mert.) - A marine brown macroalga on seed germination and seedling growth of some agricultural crops. *Thalassas* 26:13–21
- Ghosh T, Chattopadhyay K, Marschall M, et al (2009) Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: From structure-activity analysis to clinical evaluation. *Glycobiology* 19:2–15. doi: 10.1093/glycob/cwn092
- Gordon MH (1990) The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In: Hudson BJF (ed) *Food Antioxidants*. Springer Netherlands
- Guimarães S (2003) Uma análise da diversidade da flora marinha bentônica do estado do Espírito Santo, Brasil. *Hoehnea* 30:11–19
- Gupta RK, Jordan MR, Sultan BJ, et al (2012) Global trends in antiretroviral resistance in

- treatment-naive individuals with HIV after rollout of antiretroviral treatment in resource-limited settings: A global collaborative study and meta-regression analysis. Lancet 380:1250–1258. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61038-1
- Harb TB (2016) Análise do desempenho fisiológico e da composição química de *Pterocladiella capillacea* (Rhodophyta, Gelliadiales) submetida a diferentes irradiações. Universidade de São Paulo.
- Harb TB, Torres PB, Pires JS, et al (2016) Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do sistema quelante de metais para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo
- Haslin C, Lahaye M, Pellegrini M, Chermann JC (2001) *In vitro* anti-HIV activity of sulfated cell-wall polysaccharides from gametic, carposporic and tetrasporic stages of the Mediterranean red alga *Asparagopsis armata*. Planta Med 67:301–305. doi: 10.1055/s-2001-14330
- Hayakawa Y, Hayashi T, Lee JB, et al (2000) Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides isolated from green algae. Biochim Biophys Acta 1543:86–94. doi: 10.1016/S0167-4838(00)00193-X
- Horta PA, Amancio E, Coimbra CS, Oliveira EC (2001) Considerações sobre a distribuição e origem da flora de macroalgas marinhas brasileiras. Hoehnea 28:243–265
- Hu G-P, Yuan J, Sun L, et al (2011) Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. Mar Drugs 9:514–525. doi: 10.3390/md9040514
- Hudson JB, Kim JH, Lee MK, et al (1998) Antiviral compounds in extracts of Korean seaweeds: Evidence for multiple activities. J Appl Phycol 10:427–434. doi: 10.1023/A:1008004117305
- INCA (2017) Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro
- Incaper (2010) O Novo Cenário da Pesca no Espírito Santo. In: Incaper em Rev. <http://incaper.web407.uni5.net/revista.php?idcap=982>. Accessed 9 Ago 2015
- Jang K, Lee J (2015) Investigation of anti-bacterial activity against a food-borne pathogens among Korean domestic algae. Adv J Food Sci Technol 7:490–495. doi: 10.19026/ajfst.7.1346
- Jaswir I, Tawakalit Tope AH, Raus RA, et al (2014) Study on anti-bacterial potentials of some Malaysian brown seaweeds. Food Hydrocoll 42:275–279. doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.03.008
- Jurd KM, Rogers DJ, Blunden G, McLellan DS (1995) Anticoagulant properties of sulphated polysaccharides and a proteoglycan from *Codium fragile* ssp. *atlanticum*. J Appl Phycol 7:339–345. doi: 10.1007/BF00003790
- Kadhasamy M, Arunachalam KD, Kandhasamy M, Arunachalam KD (2008) Evaluation of *in vitro* antibacterial property of seaweeds of southeast coast of India. African J Biotechnol 7:1958–1961. doi: 10.4314/ajb.v7i12.58866
- Karaman I, Şahin F, Güllüce M, et al (2003) Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. J Ethnopharmacol 85:231–235. doi: 10.1016/S0378-8741(03)00006-0
- Karsten U, West JA, Zuccarello GC, et al (2002) Low molecular weight carbohydrate patterns in the Bangiophyceae (Rhodophyta). J Phycol 35:967–976. doi: 10.1046/j.1529-8817.1999.3550967.x
- Kim AD, Lee Y, Kang SH, et al (2013) Cytotoxic effect of clerosterol isolated from *Codium fragile* on A2058 human melanoma cells. Mar Drugs 11:418–430. doi: 10.3390/md11020418
- Kim AD, Kang KA, Piao MJ, et al (2014) *Dictyopteris undulata* extract induces apoptosis in human colon cancer cells. Biotechnol Bioprocess Eng 19:419–425. doi: 10.1007/s12257-014-0200-8
- Kim KN, Kim SH, Kim WS, et al (2008) Antitumor activities of sea staghorn (*Codium fragile*)

- against CT-26 Cells. *Food Sci Biotechnol* 17:976–982
- Koivikko R, Loponen J, Honkanen T, Jormalainen V (2005) Contents of soluble , cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus* , with implications on their ecological functions. *J Chem Ecol* 31:195–212. doi: 10.1007/s10886-005-0984-2
- Koivikko R, Loponen J, Pihlaja K, Jormalainen V (2007) High-performance liquid chromatographic analysis of phlorotannins from the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Phytochem Anal* 18:326–332. doi: 10.1002/pca.986
- Kolanjinathan K, Ganesh P, Saranraj P (2014) Pharmacological Importance of Seaweeds : A Review. *World J Fish Mar Sci* 6:1–15. doi: 10.5829/idosi.wjfms.2014.06.01.76195
- Kremb S, Helfer M, Kraus B, et al (2014) Aqueous extracts of the marine brown alga *Lobophora variegata* inhibit HIV-1 infection at the level of virus entry into cells. *PLoS One* 9:1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0103895
- Kulshreshtha G, Burlot AS, Marty C, et al (2015) Enzyme-assisted extraction of bioactive material from *Chondrus crispus* and *Codium fragile* and its effect on Herpes simplex virus (HSV-1). *Mar Drugs* 13:558–580. doi: 10.3390/md13010558
- Lara-Isassi G, Alvarez-Hernández S, Lozano-Ramírez C (1996) Actividad antibacteriana de algas marinas de Oaxaca, Pacífico Tropical Mexicano. *Rev Biol Trop* 44:895–898
- Lara-Isassi G, Alvarez-Hernández S, Lozano-Ramírez C, Hernández-Solo N (1999) Actividad antibiótica de macroalgas marinas mexicanas. *Hidrobiológica* 2:159–169
- Lavanya R, Veerappan N (2012) Pharmaceutical properties of marine macroalgal communities from Gulf of Mannar against human fungal pathogens. *Asian Pacific J Trop Dis* 2:S320–S323. doi: 10.1016/S2222-18081260174-1
- Le Tutour B, Benslimane F, Gouleau MP, et al (1998) Antioxidant and pro-oxidant activities of the brown algae, *Laminaria digitata*, *Himanthalia elongata*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus* and *Ascophyllum nodosum*. *J Appl Phycol* 10:121–129. doi: 10.1023/A:1008007313731
- Leal MC, Munro MHG, Blunt JW, et al (2013) Biogeography and biodiscovery hotspots of macroalgal marine natural products. *Nat Prod Rep* 30:1380–1390. doi: 10.1039/c3np70057g
- LeBlanc AM, Luerce TD, Miyoshi A, et al (2018) Functional food biotechnology: the use of native and genetically engineered lactic acid bacteria. In: Barh D, Azevedo V (eds) Omics Technologies and Bio-Engineering. Elsevier Inc., pp 105–128
- Lee DS, Kang MS, Hwang HJ, et al (2008) Synergistic effect between dieckol from *Ecklonia stolonifera* and β-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biotechnol Bioprocess Eng* 13:758–764. doi: 10.1007/s12257-008-0162-9
- Lee JB, Hayashi K, Hayashi T, et al (1999) Antiviral activities against HSV-1, HCMV, and HIV-1 of rhamnan sulfate from *Monostroma latissimum*. *Planta Med* 65:439–441. doi: 10.1055/s-2006-960804
- Lee JB, Hayashi K, Maeda M, Hayashi T (2004) Antiherpetic activities of sulfated polysaccharides from green algae. *Planta Med* 70:813–817. doi: 10.1055/s-2004-827228
- Lee JB, Ohta Y, Hayashi K, Hayashi T (2010) Immunostimulating effects of a sulfated galactan from *Codium fragile*. *Carbohydr Res* 345:1452–1454. doi: 10.1016/j.carres.2010.02.026
- Lhullier C, Horta PA, Falkenberg M (2006) Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. *Rev Bras Farmacogn* 16:158–163. doi: 10.1590/S0102-695X2006000200005
- Li N, Mao W, Yan M, et al (2015) Structural characterization and anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from the green alga *Codium divaricatum*. *Carbohydr Polym* 121:175–182. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.12.036
- Li Y, Fu X, Duan D, et al (2017) Extraction and identification of phlorotannins from the brown alga, *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchell. *Mar Drugs* 15:49. doi: 10.3390/md15020049
- Liu X, Alali FQ, Pilarinou E, McLaughlin JL (1999) Two bioactive mono-tetrahydrofuran acetogenins, annoglacins A and B, from *Annona glabra*. *Phytochemistry* 50:815–821

- López A, Rico M, Rivero A, Suárez de Tangil M (2011) The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stylocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chem* 125:1104–1109. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.09.101
- MacArtain P, Gill CIR, Brooks M, et al (2007) Nutritional value of edible seaweeds. *Nutr Rev* 65:535–543. doi: 10.1301/nr.2007.dec.535
- Machu L, Misurcova L, Ambrozova JV, et al (2015) Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules* 20:1118–1133. doi: 10.3390/molecules20011118
- Mallick N, Mohn FH (2000) Reactive oxygen species: response of algal cells. *J Plant Physiol* 157:183–193. doi: 10.1016/S0176-1617(00)80189-3
- Manivannan K, Karthikai devi G, Anantharaman P, Balasubramanian T (2011) Antimicrobial potential of selected brown seaweeds from Vedalai coastal waters, Gulf of Mannar. *Asian Pac J Trop Biomed* 1:114–120. doi: 10.1016/S2221-1691(11)60007-5
- Martínez JHI, Castañeda HGT (2013) Preparation and chromatographic analysis of phlorotannins. *J Chromatogr Sci* 51:825–838. doi: 10.1093/chromsci/bmt045
- Martins CDL, Ramlov F, Nocchi Carneiro NP, et al (2013) Antioxidant properties and total phenolic contents of some tropical seaweeds of the Brazilian coast. *J Appl Phycol* 25:1179–1187. doi: 10.1007/s10811-012-9918-x
- Maschek JA, Baker BJ (2008) The chemistry of algal secondary metabolism. In: Algal Chemical Ecology. p 313
- Masuko T, Minami A, Iwasaki N, et al (2005) Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Anal Biochem* 339:69–72. doi: 10.1016/j.ab.2004.12.001
- Matloub AA, Elsouda SSM, El-Senousy WM, et al (2015) *In vitro* antiviral, cytotoxic, antioxidant and hypolipidemic activities of polysaccharide isolated from marine algae. *Int J Pharmacogn Phytochem Res* 7:1099–1111
- Min B, McClung AM, Chen MH (2011) Phytochemicals and antioxidant capacities in rice brans of different color. *J Food Sci* 76:117–126. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01929.x
- Moon SM, Lee SA, Han SH, et al (2018) Aqueous extract of *Codium fragile* alleviates osteoarthritis through the MAPK/NF-κB pathways in IL-1β-induced rat primary chondrocytes and a rat osteoarthritis model. *Biomed Pharmacother* 97:264–270. doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.130
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Murugan K, Iyer V V. (2013) Differential growth inhibition of cancer cell lines and antioxidant activity of extracts of red, brown, and green marine algae. *Vitr Cell Dev Biol - Anim* 49:324–334. doi: 10.1007/s11626-013-9603-7
- Nakashima H, Kido Y, Kobayashi N, et al (1987) Purification and characterization of an avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor, sulfated polysaccharides extracted from sea algae. *Antimicrob Agents Chemother* 31:1524–1528. doi: 10.1128/AAC.31.10.1524
- Nunes JM de C, Paula ÉJ (2000) Estudos taxonômicos do gênero *Padina* Adanson (Dictyotaceae - Phaeophyta) no litoral do Estado da Bahia, Brasil. *Acta Bot Malacit* 25:21–43
- Nunes JM de C, Paula ÉJ de (2004) Chnoспорaceae, Scytoniphonaceae, Sporochnaceae e Sphacelariaceae (Phaeophyta) no estado da Bahia, Brasil. *Biotemas* 17:7–28. doi: <https://doi.org/10.5007/%25x>
- Nunes JM de C, Paula ÉJ de (2006) O gênero *Dictyopteris* J. V. Lamour. (Dictyotaceae - Phaeophyta) no estado da Bahia, Brasil. *Hidrobiológica* 16:251–258
- Ohta Y, Lee J-B, Hayashi K, Hayashi T (2009) Isolation of sulfated galactan from *Codium fragile* and its antiviral effect. *Biol Pharm Bull* 32:892–898. doi: 10.1248/bpb.32.892
- Oliveira-Carvalho M de F, Pereira SMB, Pedroche FF (2010) Taxonomy and distribution of the green algal genus *Codium* (Bryopsidales, Chlorophyta) in Brazil. *Nov Hedwigia* 91:87–109.

- doi: 10.1127/0029-5035/2010/0091-0087
- Oliveira-Carvalho MF, Oliveira MC, Pereira SMB, Verbruggen H (2012) Phylogenetic analysis of *Codium* species from Brazil, with the description of the new species *C. pernambucensis* (Bryopsidales, Chlorophyta). *Eur J Phycol* 47:355–365. doi: 10.1080/09670262.2012.718363
- Oliveira Filho EC de (1977) Algas marinhas bentônicas do Brasil. Universidade de São Paulo
- Palanisamy S, Vinotha M, Marudhupandi T, et al (2017) Isolation of fucoidan from *Sargassum polycystum* brown algae: Structural characterization, *in vitro* antioxidant and anticancer activity. *Int J Biol Macromol* 102:405–412. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.182
- Paoli M De (2008) Degradação e estabilização de polímeros, 2.<sup>a</sup> ed. Chemkeys
- Paula ÉJ de (1988) O gênero *Sargassum* C. AG. (Phaeophyta - Fucales) no litoral do estado de São Paulo, Brasil. *Bol Botânica* 10:65–118
- Pereira L (2018) Therapeutic and nutrional uses of algae, 1.<sup>a</sup> ed. CRC Press, Boca Raton
- Pinteus S, Silva J, Alves C, et al (2017) Cytoprotective effect of seaweeds with high antioxidant activity from the Peniche coast (Portugal). *Food Chem* 218:591–599. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.067
- Pires J, Torres PB, Santos DYAC, Chow F (2017a) Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo
- Pires JS, Torres PB, Santos DYAC, Chow F (2017b) Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo
- Ponce NM, Pujol C, Damonte EB, et al (2003) Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydr Res* 338:153–165. doi: 10.1016/S0008-6215(02)00403-2
- Praveen NK, Chakraborty K (2013) Antioxidant and anti-inflammatory potential of the aqueous extract and polysaccharide fraction from brown marine macroalgae *Padina* sp. from Gulf of Mannar of Peninsular India. *J Coast Life Med* 1:39–49. doi: 10.12980/JCLM.1.2013C477
- Queiroz KCS, Medeiros VP, Queiroz LS, et al (2008) Inhibition of reverse transcriptase activity of HIV by polysaccharides of brown algae. *Biomed Pharmacother* 62:303–307. doi: 10.1016/j.biopha.2008.03.006
- Ragan MA, Glombitzka KW (1986) Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Prog Phycol Res* 4:129–241
- Ramalho VC, Jorge N (2006) Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quim Nova* 29:755–760. doi: 10.1590/S0100-40422006000400023
- Raymundo S, Horta P, Fett R (2004) Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). *Rev Bras Ciências Farm* 40:495–503. doi: 10.1590/S1516-93322004000400007
- Ríos N, Medina G, Jiménez J, et al (2009) Antibacterial and antifungal activity from extracts of Venezuelan marine algae. *Rev Peru Biol* 16:97–100. doi: 10.15381/rpb.v16i1.182
- Rocha FD, Pereira RC, Kaplan MAC, Teixeira VL (2007) Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante e antimicrobiano. *Rev Bras Farmacogn* 17:631–639
- Rufino MDSM, Alves RE, Brito ES, et al (2007) Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Embrapa - Comun. Técnico 27:1–3
- Rupérez P, Ahrazem O, Leal JA (2002) Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J Agric Food Chem* 50:840–845. doi: 10.1021/jf010908o
- Sá AD de (2011) Macroalgas bentônicas da Baía do Espírito Santo e adjacências: distribuição, concentração de metais pesados e influência do minério de ferro particulado. Universidade Federal do Rio de Janeiro

- Salgado LT, Tomazetto R, Cinelli LP, et al (2007) The influence of brown algae alginates on phenolic compounds capability of ultraviolet radiation absorption in vitro. *Brazilian J Oceanogr* 55:145–154. doi: 10.1590/S1679-87592007000200007
- Santos MGM, Lagrota C, Miranda S, et al (1999) A screening for the antiviral effect of extracts from Brazilian marine algae against acyclovir resistant herpes simplex virus type 1. *Bot Mar* 42:227–230
- Schmitz C, Ramlov F, de Lucena LAF, et al (2018) UVR and PAR absorbing compounds of marine brown macroalgae along a latitudinal gradient of the Brazilian coast. *J Photochem Photobiol B Biol* 178:165–174. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.10.029
- Sedano-Partida MD, Sala-Carvalho WR, Santos KP et al (in press) Anti-HIV and antibacterial potential of *Hyptis radicans* (Pohl) Harley & J.F.B. Pastore and *Hyptis multibracteata* Benth. (Lamiaceae). *Journal of Herbal Medicine*.
- Seeram NP, Aviram M, Zhang Y, et al (2008) Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *J Agric Food Chem* 56:1415–1422. doi: 10.1021/jf073035s
- Senthilkumar D, Jayanthi S (2016) Partial characterization and anticancer activities of purified glycoprotein extracted from green seaweed *Codium decorticatum*. *J Funct Foods* 25:323–332. doi: 10.1016/j.jff.2016.06.010
- Shi Q, Wang A, Lu Z, et al (2017) Overview on the antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides from seaweeds. *Carbohydr Res* 453–454:1–9. doi: 10.1016/j.carres.2017.10.020
- Shibata T, Ishimaru K, Kawaguchi S, et al (2008) Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese Laminariaceae. *J Appl Phycol* 20:705–711. doi: 10.1007/s10811-007-9254-8
- Siddhanta AK, Shanmugam M, Mody KH, et al (1999) Sulphated polysaccharides of *Codium dwarkense* Boergs. from the west coast of India: Chemical composition and blood anticoagulant activity. *Int J Biol Macromol* 26:151–154. doi: 10.1016/S0141-8130(99)00079-3
- Sies H (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215:213–219. doi: 10.1016/1043-6618(95)86904-2
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144–158
- Smit AJ (2004) Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *J Appl Phycol* 16:245–262. doi: 10.1023/B:JAPH.0000047783.36600.ef
- Soares SE (2002) Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr* 15:71–81. doi: 10.1590/S1415-52732002000100008
- Soares AR, Robaina MCS, Mendes S, et al (2012) Antiviral activity of extracts from Brazilian seaweeds against herpes simplex virus. *Brazilian J Pharmacogn* 22:714–723. doi: 10.1590/S0102-695X2012005000061
- Solovchenko AE, Merzlyak MN (2008) Screening of visible and UV radiation as a photoprotective mechanism in plants. *Russ J Plant Physiol* 55:719–737. doi: 10.1134/S1021443708060010
- Sosa MAG, Fazely F, Koch JA, et al (1991) N-Carboxymethylchitosan-N,O-sulfate as an anti-HIV-1 agent. *Biochem Biophys Res Commun* 174:489–496. doi: 10.1016/0006-291X(91)91443-G
- Stengel DB, Connan S, Popper ZA (2011) Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnol Adv* 29:483–501. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.05.016
- Sultana B, Anwar F, Ashraf M (2009) Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules* 14:2167–2180. doi: 10.3390/molecules14062167
- Sunilson JAJ, Suraj R, Anandarajagopal K, et al (2009) Preliminary phytochemical analysis,

- elemental determination and antibacterial screening of *Codium decorticatum* - A marine green algae. Int J Biol Chem 3:84–89. doi: 10.3923/ijbc.2009.84.89
- Surayot U, You S (2017) Structural effects of sulfated polysaccharides from *Codium fragile* on NK cell activation and cytotoxicity. Int J Biol Macromol 98:117–124. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.01.108
- Tabarsa M, Karnjanapratum S, Cho M, et al (2013) Molecular characteristics and biological activities of anionic macromolecules from *Codium fragile*. Int J Biol Macromol 59:1–12. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.04.022
- Taiz L, Zeiger E (2006) Fisiologia Vegetal, 3.<sup>a</sup> ed. Artmed, Porto Alegre
- Teixeira VL (2013) Produtos naturais de algas marinhas bentônicas. Rev Virtual Quim 5:343–362. doi: 10.5935/1984-6835.20130033
- Tenorio-Rodriguez PA, Murillo-Álvarez JI, Campa-Cordova ÁI, Angulo C (2017) Antioxidant screening and phenolic content of ethanol extracts of selected Baja California Peninsula macroalgae. J Food Sci Technol 54:422–429. doi: 10.1007/s13197-016-2478-3
- Thanigaivel S, Chandrasekaran N, Mukherjee A, Thomas J (2015) Investigation of seaweed extracts as a source of treatment against bacterial fish pathogen. Aquaculture 448:82–86. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.05.039
- Thuy TTT, Ly BM, Van TTT, et al (2015) Anti-HIV activity of fucoidans from three brown seaweed species. Carbohydr Polym 115:122–128. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.08.068
- Tomazzoli MM, Neto RDP, Moresco R, et al (2015) UV-visible scanning spectrophotometry and chemometric analysis as tools to build descriptive and classification models for propolis from Southern Brazil. In: Overbeek R, Rocha MP, Fdez-Riverola F, De Paz JF (eds) 9th International Conference on Practical Applications of Computational Biology and Bioinformatics. Advances in Intelligent Systems and Computing. Springer, Cham, pp 19–27
- Torres MR, De A, Sousa PA, et al (2005) Biological activity of aqueous and organic extracts of seaweeds from Ceará State, Brazil. Arq Ciências do mar 38:55–63
- Torres PB (2012) Pigmentos fotossintetizantes e substâncias fenólicas em *Gracilariaopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand em diferentes intensidades de luz. Universidade de São Paulo
- Torres PB (2017) Caracterização química e atividades biológicas de algumas espécies nativas de *Gracilaria* de importância econômica. Universidade de São Paulo
- Torres PB, Pires JS, Santos DYAC, Chow F (2017) Ensaio do potencial antioxidante de extratos de algas através do sequestro do ABTS<sup>+</sup> em microplaca. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo
- UNAIDS (2016) Get on the Fast-Track. Geneva
- Ugadim Y (1973a) Algas marinhas bentônicas do litoral sul do Estado de São Paulo e do Estado do Paraná. II-Divisão Phaeophyta. Port Acta Biol 12:69–131
- Ugadim Y (1973b) Algas marinha bentonicas litoral sul do estado de São Paulo e do litoral do estado do Paraná. I-Divisão Chlorophyta. Bol Botânica 1:11–77. doi: 10.11606/issn.2316-9052.v1i0p11-77
- Urrea-Victoria V, Pires J, Torres PB, et al (2016) Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo
- Valentão P, Trindade P, Gomes D, et al (2010) *Codium tomentosum* and *Plocamium cartilagineum*: Chemistry and antioxidant potential. Food Chem 119:1359–1368. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.09.015
- Van Duyn MAS, Pivonka E (2000) Overview of the health benefits of fruit and vegetable consumption for the dietetics professional. J. Am. Diet. Assoc. 100:1511–1521
- Verbruggen H, Leliaert F, Maggs CA, et al (2007) Species boundaries and phylogenetic relationships within the green algal genus *Codium* (Bryopsidales) based on plastid DNA sequences. Mol Phylogenet Evol 44:240–254. doi: 10.1016/j.ympev.2007.01.009

- Viennois E, Chen F, Laroui H, et al (2013) Dextran sodium sulfate inhibits the activities of both polymerase and reverse transcriptase: lithium chloride purification, a rapid and efficient technique to purify RNA. *BMC Res Notes* 6:360. doi: 10.1186/1756-0500-6-360
- Vijayabaskar P, Shiyamala V (2011) Antibacterial activities of brown marine algae (*Sargassum wightii* and *Turbinaria ornata*) from the Gulf of Mannar Biosphere Reserve. *Adv Biol Res* (Rennes) 5:99–102
- Vijayabaskar P, Vaseela N, Thirumaran G (2012) Potential antibacterial and antioxidant properties of a sulfated polysaccharide from the brown marine algae *Sargassum swartzii*. *Chin J Nat Med* 10:421–428. doi: 10.1016/S1875-5364(12)60082-X
- Wang J, Hu S, Nie S, et al (2016) Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant activity of polysaccharides. *Oxid Med Cell Longev* 2016:1–13. doi: 10.1155/2016/5692852
- Wang J, Zhang Q, Zhang Z, Zhien L (2008) Antioxidant activity of sulfated polysaccharides fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int J Biol Macromol* 42:127–132. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2007.10.003
- Wang L, Wang X, Wu H, Liu R (2014) Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years. *Mar Drugs* 12:4984–5020. doi: 10.3390/md12094984
- Wang T, Jónsdóttir R, Ólafsdóttir G (2009) Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chem* 116:240–248. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.02.041
- Wang T, Jónsdóttir R, Liu H, et al (2012) Antioxidant capacities of phlorotannins extracted from the brown algae *Fucus vesiculosus*. *J Agric Food Chem* 60:5874–5883. doi: 10.1021/jf3003653
- Wang X, Chen Y, Wang J, et al (2014) Antitumor activity of a sulfated polysaccharide from *Enteromorpha intestinalis* targeted against hepatoma through mitochondrial pathway. *Tumor Biol* 35:1641–1647. doi: 10.1007/s13277-013-1226-9
- Wanke T, Philippus AC, Zatelli GA, Vieira LFO, Lhullier C, Falkenberg M (2015) C15 acetogenins from the Laurencia complex: 50 years of research – an overview. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 25(6): 569–587. doi: 10.1016/j.bjp.2015.07.027
- Waterman PG, Mole S (1994) Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Whistler RL (1973) Solubility of polysaccharides and their behavior in solution. In: Isbell HS (ed) Carbohydrates in Solution. American Chemical Society, Washington, DC, pp 242–255
- WHO (2014) World Cancer Report 2014. Lyon
- WHO (2017) Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) report: early implementation 2016–2017. Geneva
- Witvrouw M, De Clercq E (1997) Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *Gen Pharmacol* 29:497–511. doi: 10.1016/S0306-3623(96)00563-0
- Woradulayapinij W, Soonthornchareonnon N, Wiwat C (2005) *In vitro* HIV type 1 reverse transcriptase inhibitory activities of Thai medicinal plants and *Canna indica* L. rhizomes. *J Ethnopharmacol* 101:84–89. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.03.030>
- Yan X, Chuda Y, Suzuki M, Nagata T (1999) Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Biosci Biotechnol Biochem* 63:605–607. doi: 10.1271/bbb.63.605
- Yang H, Dong Y, Du H, et al (2011) Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules* 16:3444–3455. doi: 10.3390/molecules16043444
- Ye H, Wang K, Zhou C, et al (2008) Purification, antitumor and antioxidant activities *in vitro* of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Food Chem* 111:428–432. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.04.012
- Yoneshigue-Valentin Y, Gestinari LMS, Fernandes DRP (2006) Macroalgas. In: Lavrado HP, Ignacio BL (eds) Biodiversidade bentônica da região central da Zona Econômica Exclusiva

- Brasileira. Museu Nacional, Rio de Janeiro, p 389
- Yoshie-Stark Y, Hsieh Y-P, Suzuki T (2003) Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan. *J Tokyo Univ Fish* 89:1–6
- Yoshimura C (2006) Avaliação do potencial de cultivo e produção de ágar de *Gracilaria domingensis* e de *Gracilaria caudata* (Rhodophyta, Gracilariales) na Enseada de Armação do Itapocoroy. Universidade de São Paulo
- Young RM, Schoenrock KM, Salm JL von, et al (2015) Structure and Function of Macroalgal Natural Products. In: Stengel DB, Connan S (eds) Natural products from marine algae. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p 439
- Zaid SAA, Abdel-Wahab KSE, Abed NN, et al (2016) Screening for antiviral activities of aqueous extracts of some Egyptian seaweeds. *Egypt J Hosp Med* 64:430–435
- Zeid AHA, Aboutabl EA, Sleem AA, El-Rafie HM (2014) Water soluble polysaccharides extracted from *Pterocladia capillacea* and *Dictyopteris membranacea* and their biological activities. *Carbohydr Polym* 113:62–66. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.06.004
- Zhao G, Chao J, Zeng L, McLaughlin JL (1996) (2,4-cis)-asimicinone and (2,4-trans)-asimicinone: two novel bioactive ketolactone acetogenins from *Asimina triloba* (Annonaceae). *Nat Toxins* 4:128–134
- Zhao Z li, Yang X qing, Gong Z qing, et al (2016) Antioxidant activities of crude phlorotannins from *Sargassum hemiphyllum*. *J Huazhong Univ Sci Technol - Med Sci* 36:449–455. doi: 10.1007/s11596-016-1607-6
- Zubia M, Robledo D, Freile-Pelegrin Y (2007) Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *J Appl Phycol* 19:449–458. doi: 10.1007/s10811-006-9152-5

## Apêndice A

### Caracterização e identificação morfológica das espécies estudadas

*Chnoospora minima* (Hering) Papenfuss (1956: 69-70)

Localidade tipo: Porto de Durban, África do Sul (Hering 1841: 92).

Plantas de cor parda esverdeada, atingindo 6-10 cm de altura, presas ao substrato por apressório discoide (Fig. 27A). Talo cilíndrico, achatado na base das ramificações, com 1-3 cm de largura e com ramificação dicotômica (Fig 27A). Em corte transversal, região cortical com camada de células pequenas e pigmentadas e região medular com células grandes, arredondadas e incolores (Fig. 27B). Descrição baseada em Nunes e Paula (2004).

Material examinado: BRASIL. ESPÍRITO SANTO. Município de Marataízes, Praia da Cruz ( $21^{\circ} 02,116' S$ ;  $40^{\circ} 48,812' O$ ), 08/03/2016 (SPF 58244). Município de Anchieta, Praia de Parati ( $20^{\circ} 48,456' S$ ;  $40^{\circ} 36,575' O$ ), 10/03/2016 (SPF 58246).

Nota: Espécie encontrada crescendo sobre mexilhões em costões com hidrodinamismo médio a alto.

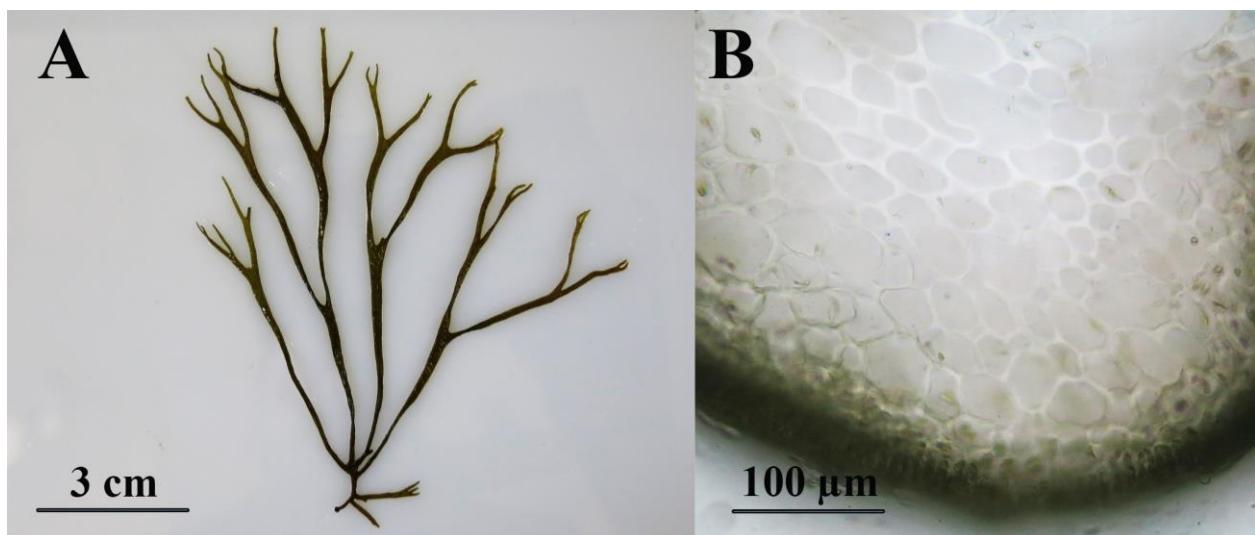


Figura 27: *Chnoospora minima*. A) Hábito da planta; B) Corte transversal do talo. Fotos: Fábio Nauer.

*Dictyopteris plagiogramma* (Montagne) Vickers (1905: 58)

Localidade tipo: Havana, Cuba (Silva, Basson & Moe 1996: 584).

Plantas de cor marrom amarelada, atingindo de 6-9 cm de altura, presas ao substrato por pequeno apressório (Fig. 28A). Apresenta ramificação dicotômica (Fig. 28A). Talo achatado em

forma de fita, com 6-8 mm de largura, apresenta nervura central evidente, mas não saliente, e nervuras secundárias pinadas (Fig. 28B). Em corte transversal (Fig. 28C), talo apresenta duas camadas de células (Fig. 28D), exceto na região da nervura central, que apresenta de 6-8 camadas de células. Descrição baseada em Nunes e Paula (2006).

Material examinado: BRASIL. ESPÍRITO SANTO. Município de Itapemirim, Praia de Itaoca ( $21^{\circ} 00,439' S$ ;  $40^{\circ} 48,563' O$ ), 09/03/2016, (SPF 58245).

Nota: Espécie encontrada submersa na região do infra-litoral superior.

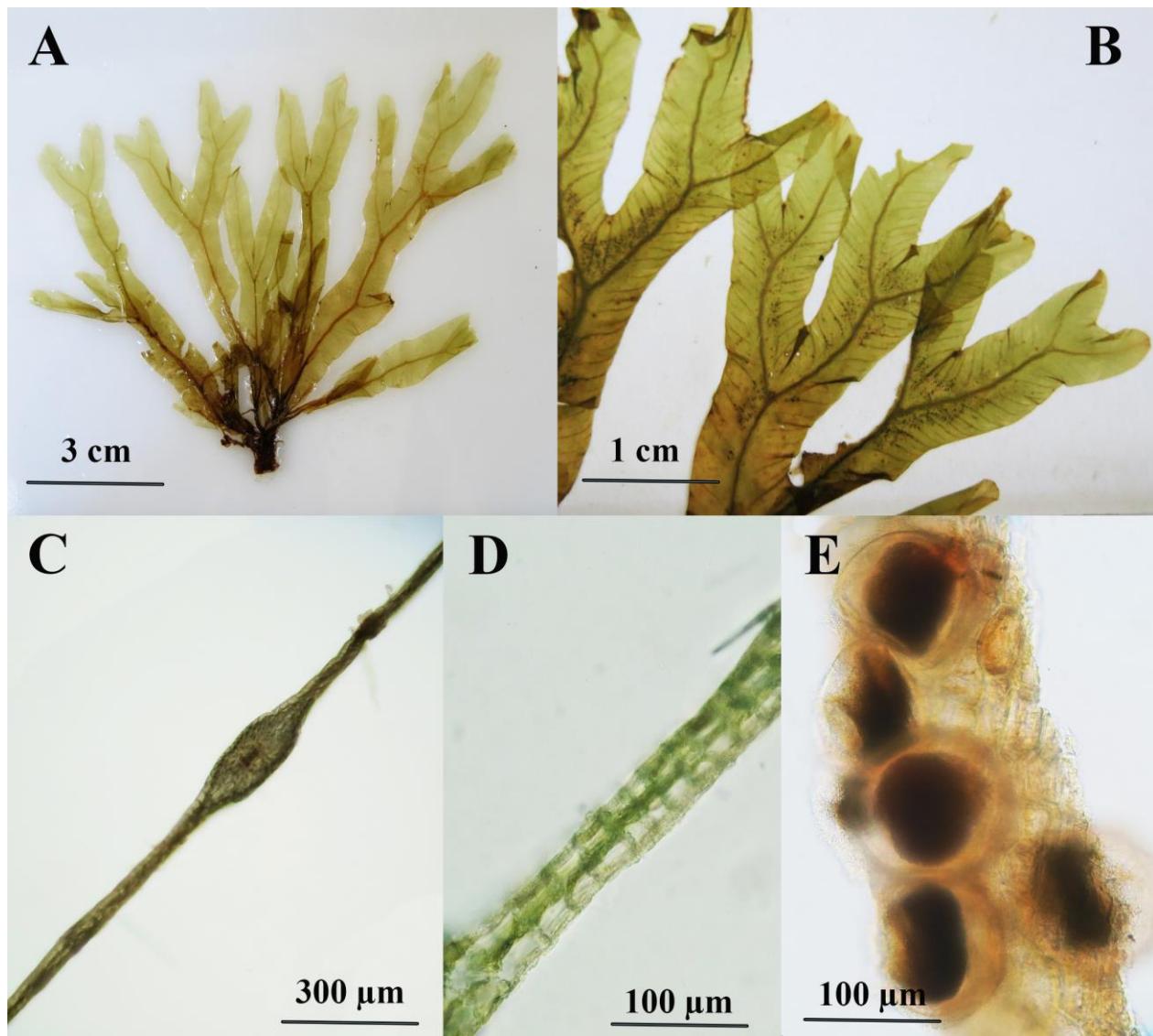


Figura 28: *Dictyopteris plagiogramma*. A) Hábito da planta; B) Ápice do talo com nervuras central e secundárias; C) Corte transversal do talo; D) Detalhe do corte transversal do talo mostrando duas camadas de células; D) Corte transversal do talo; E. Estruturas reprodutivas. Fotos: Fábio Nauer.

***Padina gymnospora* (Kützing) Sonder (1871: 47)**

Localidade tipo: Saint Thomas, Ilhas Virgens Americanas (Billard 1985: 29).

Plantas de cor marrom amarelada acima, marrom escura quase preta na base ou esbranquiçadas pela fina deposição de carbonato de cálcio (Fig. 29A), frequentemente conspicuamente zonadas (Fig. 29B). Talo em forma de ventarola e recortado, fixo ao substrato por um apressório grande de consistência esponjosa, atingindo de 6-10 cm de altura (Fig. 29A). Pelos longos pluricelulares distribuídos em ambas as superfícies em nítidas zonas concêntricas (Fig. 29C). Talo com 8 camadas de células nas porções basais (Fig. 29D). Descrição baseada em Ugadim (1973a) e Nunes e Paula (2000).

Material examinado: BRASIL. ESPÍRITO SANTO. Município de Marataízes, Praia de Marataízes (Igreja - 21° 02,620' S; 40° 49,453' O), 08/03/2016, (SPF 58243).

Nota: Espécie foi encontrada submersa em poças de maré, em costão rochoso pouco inclinado e com hidrodinamismo médio.

Pela chave de identificação de Nunes e Paula (2000) não foi possível identificar os exemplares em espécie, pois no material examinado não foram observadas estruturas reprodutivas. Além disso, a chave não apresenta a característica de talo em corte transversal com 8 camadas de células na porção basal. De acordo com essa chave, a espécie *P. gymnospora* apresenta, em corte transversal, 6 camadas de células na porção basal e as outras espécies do gênero *P.* apresentam de 2-4 camadas de células. No entanto, na descrição da espécie, os autores colocam que o tipo de *P. gymnospora* apresenta até 8 camadas de células na base. Já de acordo com a chave de identificação de Ugadim (1973a), a espécie foi identificada como *Padina vickersie* Hoyt in Britton & Millspaugh, entretanto, Allender e Kraft (1983) consideraram *P. vickersiae* como sinônimo de *P. gymnospora*, pois o material tipo de ambas corresponde a *Zonaria gymnospora* Kützing (basônimo).

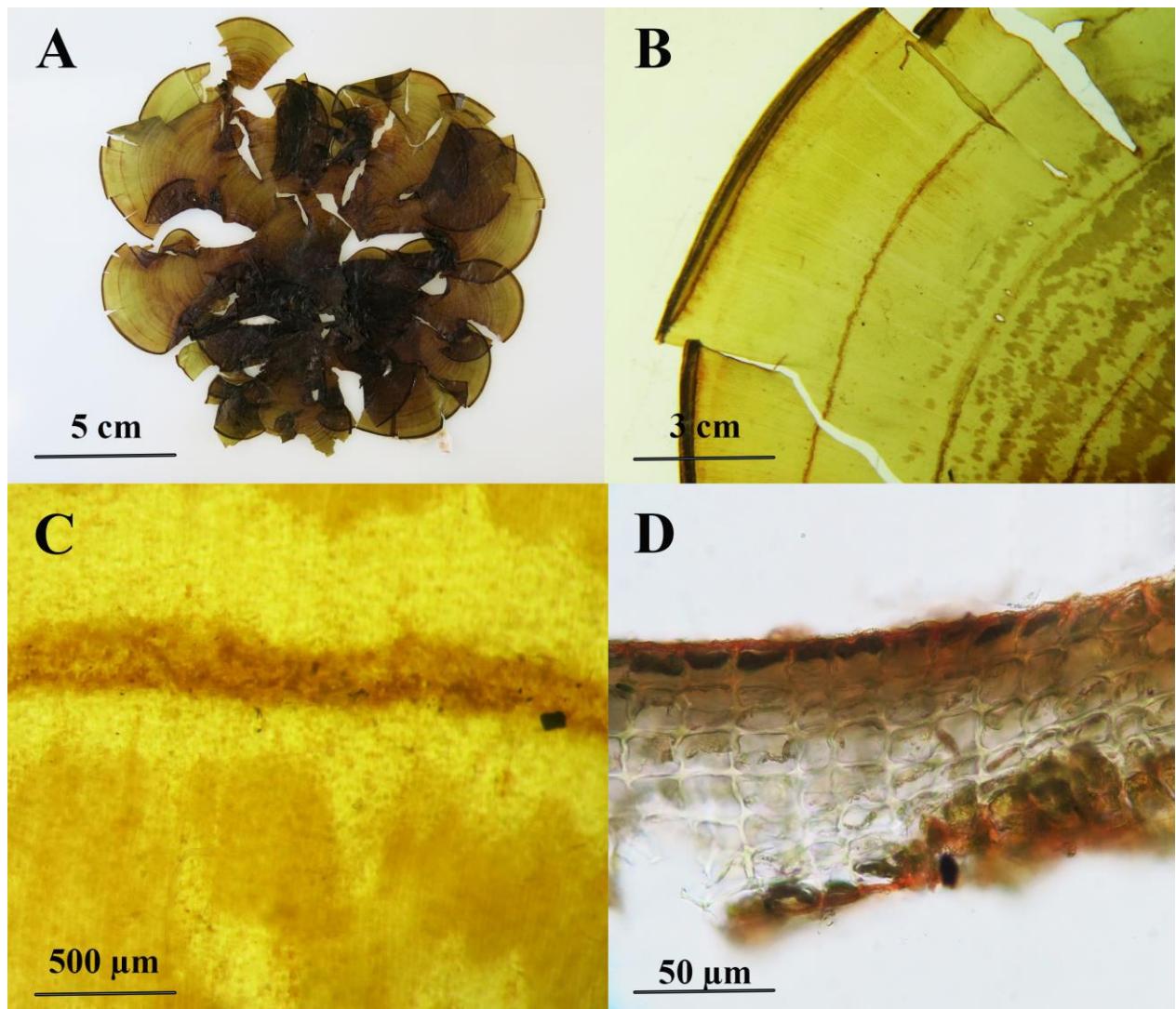


Figura 29: *Padina gymnospora*. A) Hábito da planta; B) Ápice do talo mostrando zonas concêntricas; C) Detalhe do ápice do talo mostrando zona de pelos; D) Corte transversal da porção basal do talo com 8 camadas de células. Fotos: Fábio Nauer.

***Sargassum cymosum* C. Agardh (1820: 20)**

Localidade tipo: Brasil (Silva, Basson & Moe 1996: 667).

Plantas de cor amarelada escura, crescendo fixadas às rochas por um apressório discóide. Com vários eixos eretos, raramente ramificados, atingindo altura de 9-20 cm, saindo de um só apressório (Fig. 30A). Eixos principais de 1-3 mm portando inúmeros râmulos alternados, curtos de crescimento determinado, achatados, com bordo irregular, com uma nítida nervura central, semelhante a folhas, com comprimento de 1,5-5,0 cm e largura de 3-5 mm (Fig. 30B). Esses folíolos podem ou não estar divididos dicotomicamente nas pontas, e apresentam inúmeras cavidades (criptostomas) organizadas em duas fileiras, uma de cada lado da nervura central (Fig. 30C). Em corte transversal (Fig. 30D), córtex com uma camada de células pigmentadas em formato fusiforme com até 15 µm de comprimento e 10 µm de largura, células medulares incolores e

arredondadas com até 37,5 µm de comprimento e 25 µm de largura (Fig. 30E). Estruturas de reprodução uniloculares, localizados em criptas férteis, os conceptáculos, imersos em ramos curtos, cilíndricos ou fusiformes, abundantemente ramificados, os receptáculos (Fig. 30B). Descrição baseada em Paula (1988).

Material examinado: BRASIL. ESPÍRITO SANTO. Município de Marataízes, Praia de Marataízes (Igreja - 21° 02,620' S; 40° 49,453' O), 08/03/2016, (SPF 58248).

Nota: Espécie encontrada no médio litoral inferior em costão rochoso com pouca inclinação e hidrodinamismo médio.

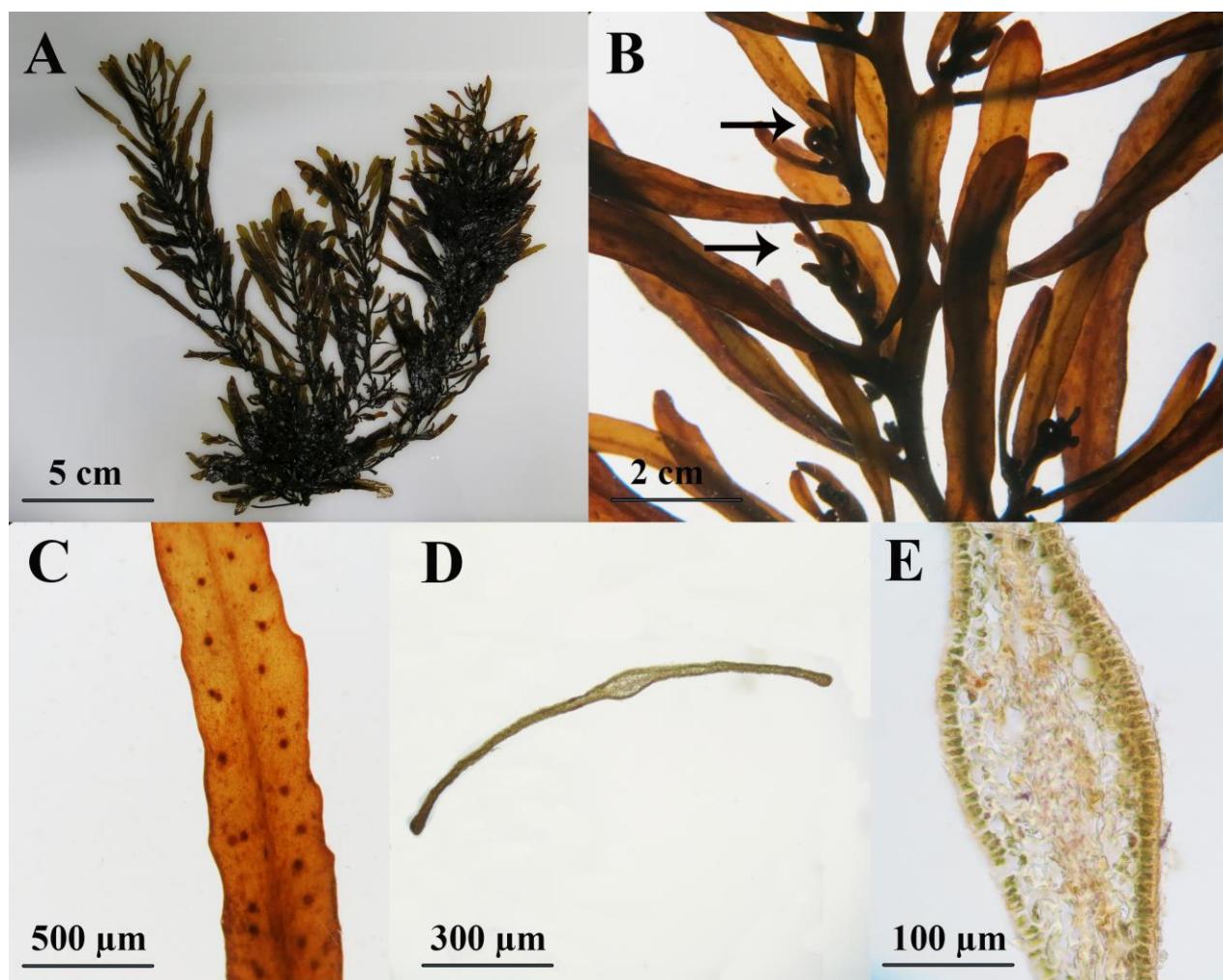


Figura 30: *Sargassum cymosum*. A) Hábito da planta; B) Detalhe de um eixo mostrando os folíolos e os receptáculos (setas); C) Folíolo mostrando os criptostomas organizados em duas fileiras; D) Folíolo em corte transversal; E) Corte transversal do folíolo mostrando uma camada de células corticais pigmentadas e células medulares incolores. Fotos: Fábio Nauer.

***Codium isthmocladum*** Vickers (1905:57)

Localidade tipo: Barbados (Silva 1996).

Plantas de cor verde escura (Fig. 31A), eretas, cilíndricas, medindo de 5-8 cm de altura, ramificadas dicotomicamente (Fig. 31B e Fig. 31C), de consistência esponjosa, constituídas por filamentos cenocíticos ramificados, abundantes e densamente dispostos. Presas ao substrato por meio de apressório discoide. Ramificação dicotômica com orientação variada, dando a planta âmbito esférico. Filamentos internos incolores, originando osutrículos de cor verde, densamente dispostos (Fig. 31D). Utrículos com diâmetro de até 37,5 µm e comprimento de até 2000 µm (Fig. 31E). Gametângios ovóides, pedunculados (Fig. 31F), medindo diâmetro de 62-87 µm e com comprimento de 135,0-165,5 µm. Descrição baseada em Ugadim (1973b) e Oliveira-Carvalho et al. (2010).

Material examinado: BRASIL. ESPÍRITO SANTO. Município de Marataízes, Praia de Marataízes (Igreja - 21° 02,620' S; 40° 49,453' O), 08/03/2016, (SPF 58247).

Nota: Espécie encontrada exposta no médio litoral e submersa em poças de maré, em costão rochoso com pouca inclinação e hidrodinamismo médio.

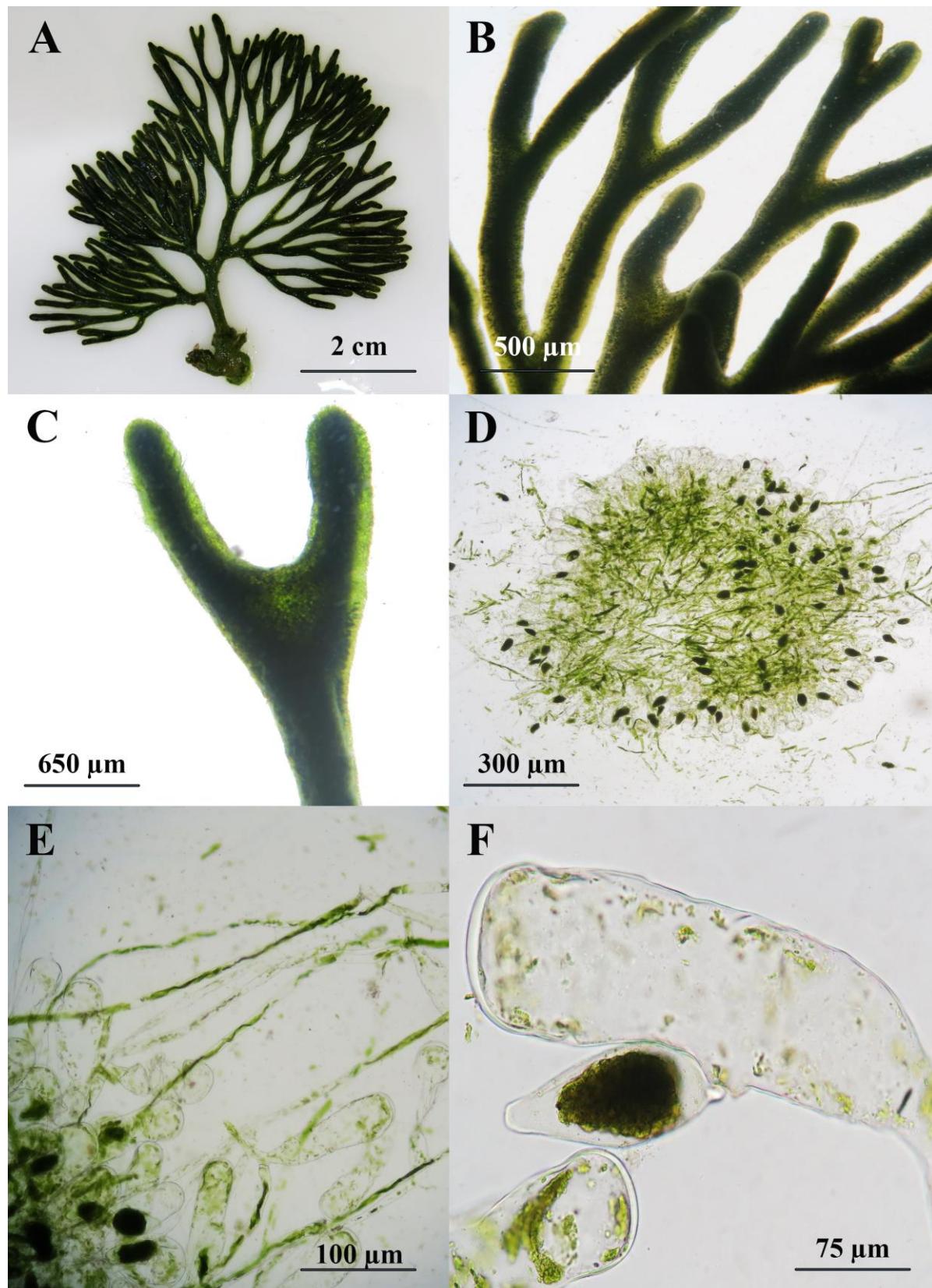


Figura 31: *Codium isthmocladum*. A) Hábito da planta; B) Ápice do talo com ramificação dicotômica; C) Detalhe do ápice do talo, evidenciando dicotomia; D) Filamentos medulares, e utrículos densamente dispostos; E) Utrículos; F) Detalhe do utrículo reprodutivo, evidenciando gametângio ovóide e pedunculado. Fotos: Fábio Nauer.

## REFERÊNCIAS

- Nunes JM de C, Paula ÉJ de (2000) Estudos taxonômicos do gênero *Padina* Adanson (Dictyotaceae- Phaeophyta) no litoral do Estado da Bahia, Brasil. Acta Bot Malacit 25:21–43
- Nunes JM de C, Paula ÉJ de (2004) Chnoosporaceae, Scytoniphonaceae, Sporochnaceae e Sphacelariaceae (Phaeophyta) no estado da Bahia, Brasil. Biotemas 17:7–28. doi: <https://doi.org/10.5007/25x>
- Nunes JM de C, Paula ÉJ de (2006) O gênero *Dictyopteris* J. V. Lamour. (Dictyotaceae - Phaeophyta) no estado da Bahia, Brasil. Hidrobiológica 16:251–258
- Oliveira-Carvalho M de F, Pereira SMB, Pedroche FF (2010) Taxonomy and distribution of the green algal genus *Codium* (Bryopsidales, Chlorophyta) in Brazil. Nov Hedwigia 91:87–109. doi: 10.1127/0029-5035/2010/0091-0087
- Paula ÉJ de (1988) O gênero *Sargassum* C. AG. (Phaeophyta - Fucales) no litoral do estado de São Paulo, Brasil. Bol Botânica 10:65–118
- Ugadim Y (1973b) Algas marinha bentônicas litoral sul do estado de São Paulo e do litoral do estado do Paraná. I-Divisão Chlorophyta. Bol Botânica 1:11–77. doi: 10.11606/issn.2316-9052.v1i0p11-77
- Urrea-Victoria V, Pires J, Torres PB, et al (2016) Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo

## Apêndice B

---

### Identificação molecular de *Codium isthmocladum* Vickers

**Extração de DNA:** Para a extração do DNA de *Codium sp.* utilizou-se protocolo manual de extração com SDS 20% (Dodecil Sulfato de Sódio), acrescido com tampão homogenizador (TMD – 100 µL Tris-HCl 1 M; 100 µL EDTA 0,5 M; 600 µL NaCl 5 M). As amostras, em triplicata (C1, C2 e C3), foram inicialmente pesadas em aproximadamente 10 mg de massa fresca cada e trituradas em nitrogênio líquido. Foi adicionado 300 µL do Tampão TMD, subsequentemente acrescido com 12 µL de SDS 20% e 3 µL de Proteinase K (10 mg/mL), agitando gentilmente os tubos com as amostras e incubando durante 30 min à 65 °C. Aumentou-se 300 µL de solução Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico (25:24:1), agitando durante 3 min. Centrifugou-se a 24000 g (Mikro 220R, Hettich, Alemanha), à temperatura ambiente durante 5 min. Foram transferidos 300 µL do sobrenadante para novo microbubo, acrescido com 600 µL de etanol e invertido gentilmente. Centrifugou-se a 24000 g à temperatura ambiente durante 5 min. Descartado o sobrenadante, aumentou-se 200 µL de etanol 70% e centrifugou-se nas mesmas condições que a etapa anterior, durante 5 min. Descartado o sobrenadante totalmente, as amostras foram acondicionadas em estufa à 60 °C durante 30 min, observando-se que as amostras estejam totalmente secas. Foi adicionado 40 µL de água ultrapura autoclavada e armazenado a 4 °C.

**Amplificação por PCR:** A região Exon 1 do gene *rbcL* foi amplificada utilizando os iniciadores 12-34F e 799-778R (Verbruggen et al. 2007). A reação de PCR foi realizada utilizando o kit de amplificação *AmpliTaq Gold 360 Master Mix* (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, EUA) seguindo as instruções do fabricante, acrescida de 10 µL de DNA extraído, 1,5 µL de iniciadores cada (10 µM) e 10 µL de água ultrapura autoclavada, totalizando 50 µL de reação final. A reação foi realizada no Termociclador (TC-4000, Techne, Reino Unido) usando as seguintes condições de ciclagem: 94 °C por 4 min.; 35 ciclos de 94 °C por 30 s; 45 °C por 1 min e 72 °C por 2 min. Seguiu-se uma extensão final de 72 °C por 7 min. Foram realizadas reação de PCR em triplicata das amostras (C1, C2 e C3), realizando-se reações independentes que viabilizam a não formação de erros na obtenção dos resultados e garantindo uma melhor performance na purificação do produto formado (Baldwin et al. 1995).

**Purificação do produto da PCR:** O produto adquirido foi purificado em outra etapa utilizando-se do kit de purificação *Pure Link Quick PCR Purification Kit* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA) e todas as padronizações seguiram as instruções do fabricante. Para adquirir uma maior eficiência e garantir um resultado confiável, o produto do PCR foi submetido à análise em gel de eletroforese de agarose 0,8%, comparando-se com marcador padrão *1 Kb Ladder* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA).

**Sequenciamento:** As reações de saequenciamento foram realizadas em aproximadamente 30 ng do produto do PCR purificado, utilizando-se o kit de sequenciamento *BigDye TM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, EUA). Na realização do sequenciamento foram utilizados os iniciadores 12-34F e 799-778R separadamente por reação para obter-se leituras diretas e reversas, respectivamente, no aparelho sequenciador automático (ABI 3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, EUA).

## Resultados

- Amostra C1 - Sequência consenso:

```
ACTCCACAAACCTGGAGTCCTCCAGAAGAACGTTGCGGCTGTTGCTGAATCT
TCTACTGGTACATGGACTACAGTTGGACGGATGGTTAACAAAGCTCAGATAAGTTAT
AAAGGACGTTGTTATGATTAGAACCGGTGAAAGGGGAAGAAAATCAATATATCGC
CTTATGTGGCTTATCCGCTTGATTATTGAAGAAGGATCGGTTACCAATTATTAC
ATCAATTGTTGAAATGTGTTGGATTAAAGCATTACGAGCTCTCGATTAGAAGA
TTTACGTATTCCACCAGCTACGTTAAAACCTTCAGGGACCTCCGCATGGAATTGA
AGTGGAGAGAGATAAATTAAATAATGGACGGCATTAGGATGTACTATTA
AACCCAAATTAGGTTATCAGCTAAAAATTATGGACGAGCTGTTATGAATGTTACG
AGGTGGACTCGATTACAAAAGATGATGAAAATGTTAATTCTCAGCCTTTATGCG
TTGGAGAGAGATAGATTATTGTTGCAGAAGCTATCTATAATCGCAAGCAGAAC
TGGCGAAATTAAAGGACATTATTAAATGCAACAGCTGGTACGTGTGAAGTAAATG
TAAAACCGCGCAGGCAGTCCTCC
```

*Codium isthmocladium* 99% ident; score 1147; ID JQ950527.1

- Amostra C2 – Sequência consenso:

```
CAACCTGGATTCCCTCCAGAAGAACGTTGCGGCTGTTGCTGAATCTTCTACTG
GTACATGGACTACAGTTGGACGGATGGTTAACAAAGCTAAAGGACGTTGTTATGAT
TTAGAACCGGGAAAGGGAAAATCAATATCGCTTATGTGGCTTATCCGCTTGAT
```

TTATTGAAGAAGGATCGGTACCAATTATTACATCAATTGTTGGAAATGTGTTT  
GGATTAAAGCATTACGAGCTTCGATTAAAAAGATTACGTATTCCACCAGCTTT  
ACGTTAAAACCTTCAGGGACCTCCGCATGGAATTGAAGTGGAGAGAGATAAATTA  
AATAAATATGGACGGCCTTATTAGGATGTACTATTAAACCAAATCCGGTTATCA  
GCTAAAAATTATGGACGAGCTTTAGATTAACGAGGTGGACTCGATTTACAAAAA  
ATGATGTTAATTGTC

*Codium isthmocladium* 94% ident ; score 697; ID JQ950527.1

- Amostra C3 – Sequência consenso

CTCCAGAAGAATGTGGTGGCTGCTGAATCTTCTACTGGTACATGGACTA  
CAGTTGGACGGATGGTTAACAAAGCTTAGATAGTTAAAGGACGTTATGATT  
TAGAACCGGTGAAAGGGAAAGAAAATCAATATATCGCTTATGTGGCTTATCCGCTT  
GATTATTGAAGAAGGATCGGTACCAATTATTACATCAATTGTTGGAAATGTG  
TTGGATTAAAGCATTACGAGCTTCGATTAGAAGATTACGTATTCCACCAGCTT  
ACGTTAAAACCTTCAGGGACCTCCGCATGGAATTGAAGTGGAGAGAGATAAATTA  
AATAAATATGGACGGCCTTATTAGGATGTACTATTAAACCAAATTAGGTTATCA  
GCTAAAAATTATGGACGAGCTGTTATGAATGTTACGAGGTGGACTCGATTTACA  
AAAGATGATGAAAATGTTAATTCTCAGCCTTATGCGTTGGAGAGATAGATTTTA  
TTGTTGCAGAAG

*Codium isthmocladium* 100% ident; score 970; ID JQ950527.1

## REFERÊNCIAS

- Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, et al (1995). The its region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny. Annals of the Missouri Botanical Garden, 82(2): 247. doi:10.2307/2399880
- Verbruggen H, Leliaert F, Maggs CA, et al (2007) Species boundaries and phylogenetic relationships within the green algal genus *Codium* (Bryopsidales) based on plastid DNA sequences. Mol Phylogenet Evol 44:240–254. doi: 10.1016/j.ympev.2007.01.009

## Apêndice C

### Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Nas Fig. 32, Fig. 32 e Fig. 34 são apresentados os espectros de absorção no UV dos constituintes fenólicos detectados por CLAE-DAD nos extratos acetato de etila e metanólico de *C. minima*, *D. plagiogramma*, *P. gymnospora* e *S. cymosum*.

Na Tabela 10 são apresentados o tempo de retenção (TR), absorção UV e teor de substâncias fenólicas dos constituintes fenólicos detectados por CLAE-DAD nos extratos acetato de etila e metanólico de *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*.

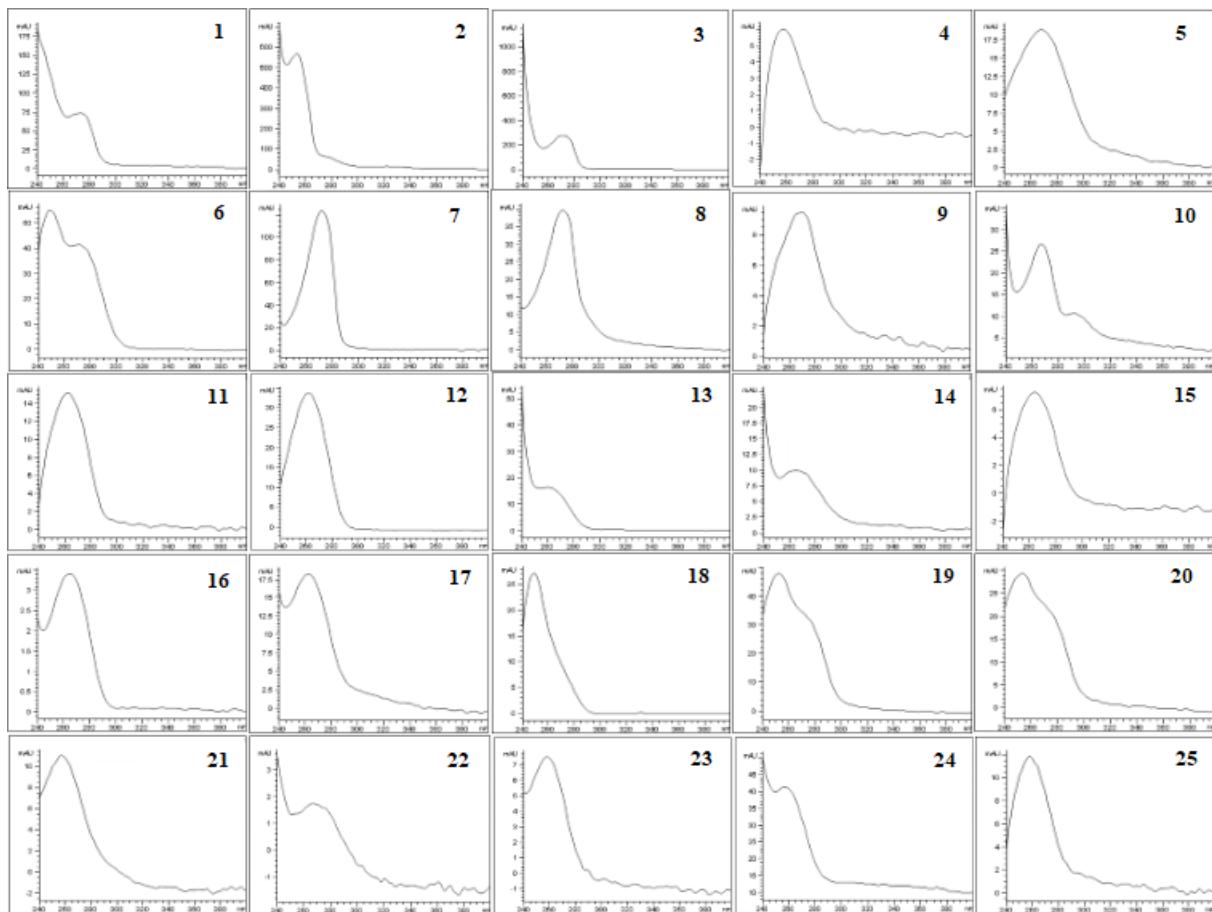


Figura 32: Espectros de absorção UV dos constituintes fenólicos até o tempo de retenção de 8,528 minutos, detectados por CLAE-DAD ( $\lambda = 270$  nm) nos extratos acetato de etila e metanólico de *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*. Os números 1-25 correspondem à identificação dos constituintes apresentados na Tabela 10.

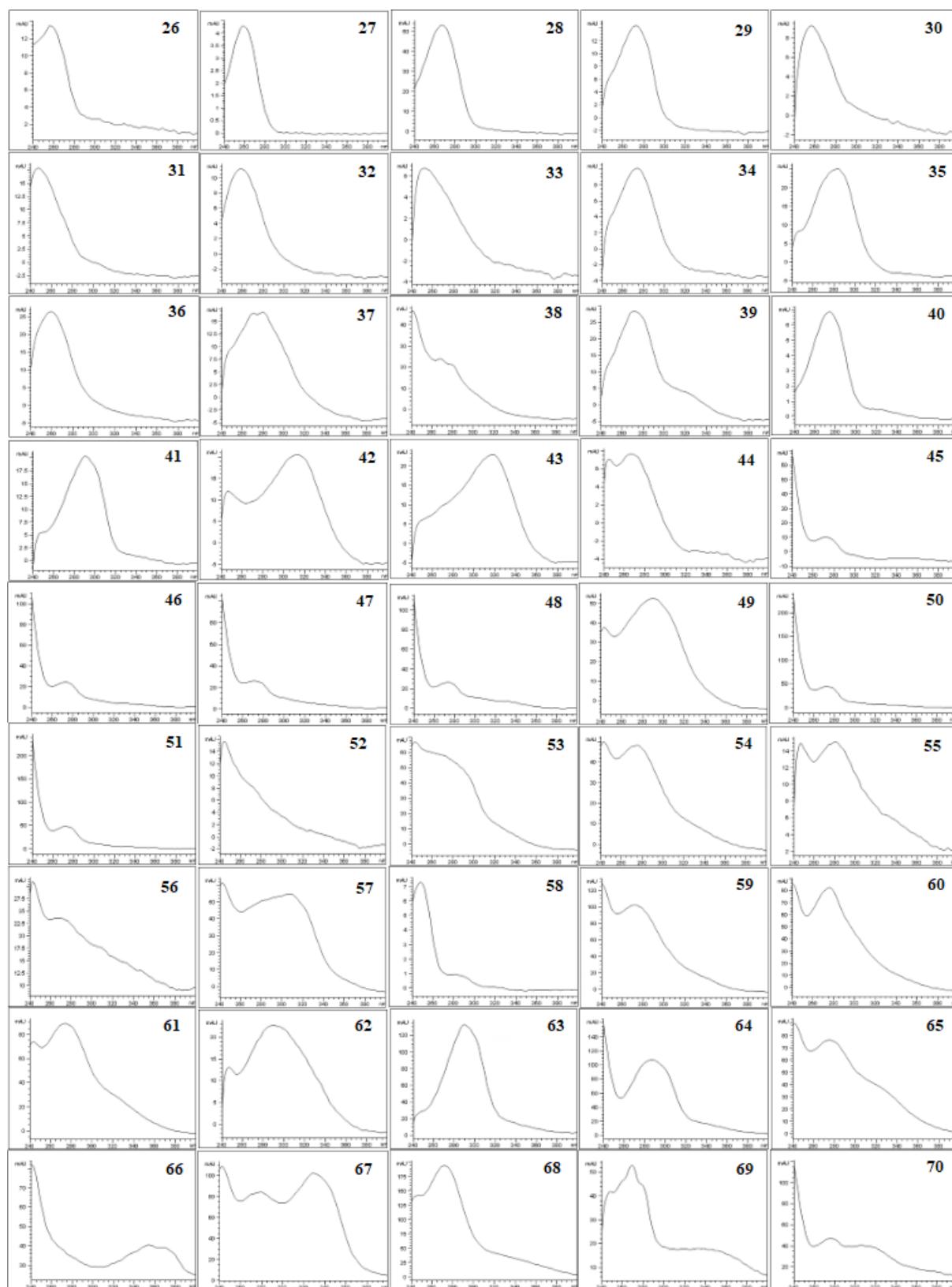


Figura 33: Espectros de absorção UV dos constituintes fenólicos entre os tempos de retenção de 8,542 a 26,493 minutos, detectados por CLAE-DAD ( $\lambda = 270$  nm) nos extratos acetato de etila e metanólico de *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*. Os números 26-70 correspondem à identificação dos constituintes apresentados na Tabela 10.

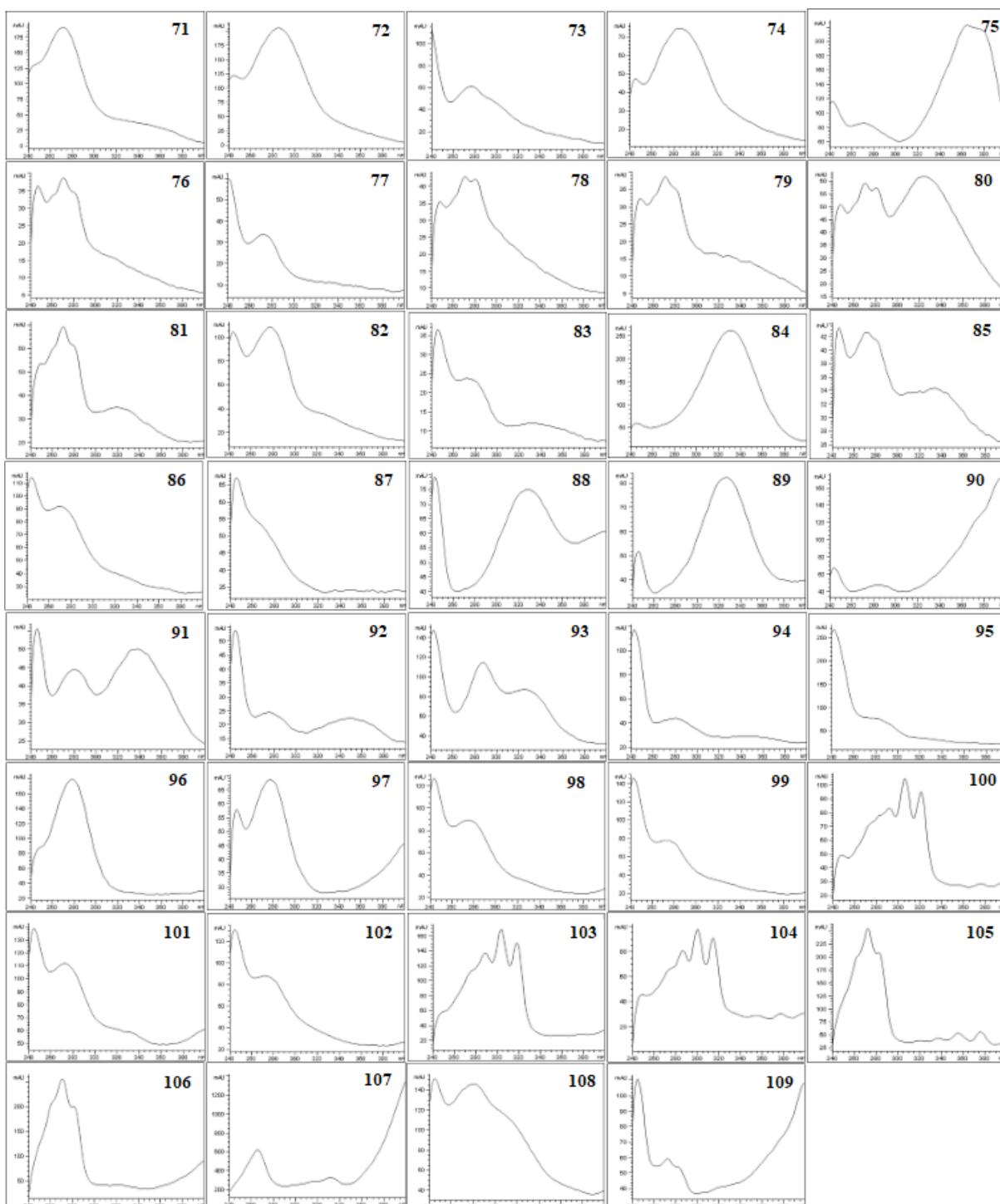


Figura 34: Espectros de absorção UV dos constituintes fenólicos entre os tempos de retenção de 26,563 a 32,128 minutos, detectados por CLAE-DAD ( $\lambda = 270$  nm) nos extratos acetato de etila e metanólico de *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*. Os números 71-109 correspondem à identificação dos constituintes apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Porcentagem dos constituintes fenólicos (média ± DP;  $n = 3$ ) dos extratos acetato de etila (AcEtO) e metanólico (MeOH) de *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*, analisados por CLAE-DAD ( $\lambda = 270$  nm).

Constituinte	TR (min)	UV (nm)	<i>C. minima</i>		<i>D. plagiogramma</i>		<i>P. gymnospora</i>		<i>S. cymosum</i>	
			AcEtO	MeOH	AcEtO	MeOH	AcEtO	MeOH	AcEtO	MeOH
1	2,529	272						0,470±0,144		
2	2,883	254				0,631		0,456*		
3	2,976	272								4,006±0,818
4	3,686	258			0,125					
5	3,746	268				0,355		0,244±0,166		
6	4,064	250; 274		0,199±0,010						
7	4,104	272								1,275±0,390
8	4,296	272						0,468±0,263		
9	5,137	266								0,115±0,007
10	5,179	268; 294					0,163±0,091	0,401±0,090		
11	5,769	262	0,193±0,028				0,106*			0,145±0,016
12	5,813	262		0,620±0,081	0,065				1,241±0,143	
13	5,922	264				0,478				
14	6,251	268								0,066±0,002
15	6,525	264			0,108					
16	6,626	266				0,138		0,044*		
17	6,888	264				0,056		0,117±0,019		
18	7,449	250				0,055				
19	7,513	254; 270		0,048±0,008				0,245±0,047		
20	8,058	254						0,062±0,012		
21	8,192	256						0,055*		0,080±0,008
22	8,207	266			0,035					
23	8,217	258		0,041±0,005						
24	8,509	256	0,308±0,009							
25	8,528	258		0,578±0,088				0,587*		0,037±0,007
26	8,542	256				0,077	0,076*			
27	8,802	258						0,124±0,007		
28	9,360	268			0,279	0,415	0,085±0,029	0,414±0,050		

(continua)

Tabela 10: Porcentagem dos constituintes fenólicos (média ± DP;  $n = 3$ ) dos extratos acetato de etila (AcEtO) e metanólico (MeOH) de *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*, analisados por CLAE-DAD ( $\lambda = 270$  nm).

(continuação)

Constituinte	TR (min)	UV (nm)	<i>C. minima</i>		<i>D. plagiogramma</i>		<i>P. gymnospora</i>		<i>S. cymosum</i>	
			AcEtO	MeOH	AcEtO	MeOH	AcEtO	MeOH	AcEtO	MeOH
29	10,878	272			0,233					
30	12,797	254							0,058*	
31	12,827	248			0,100					
32	13,903	258			0,147					
33	14,614	252			0,102					
34	15,167	274			0,113					
35	16,041	284			0,662					
36	18,721	260			0,305					
37	19,398	270; 280			0,216					
38	20,246	242; 280			0,524					
39	20,761	272			0,660					
40	20,879	274				0,112				
41	21,147	248; 290	0,066±0,008				0,069±0,024			
42	21,365	246; 314			0,065					
43	21,689	318			0,108					
44	23,024	244; 268		0,045±0,001						
45	23,046	272	0,089±0,031				0,037±0,002			
46	23,221	272					0,041*			
47	23,356	272					0,050±0,019	0,037*		
48	23,471	274					0,056±0,025	0,035*		
49	23,489	242; 290			0,115					
50	23,548	272					0,045*			
51	23,627	272					0,035*			
52	23,671	244	0,053±0,006							
53	23,676	242			0,233					
54	23,891	242; 274			0,075					
55	24,100	246; 280							0,035*	
56	24,129	242; 266	0,051±0,012							

(continua)

Tabela 10: Porcentagem dos constituintes fenólicos (média ± DP;  $n = 3$ ) dos extratos acetato de etila (AcEtO) e metanólico (MeOH) de *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*, analisados por CLAE-DAD ( $\lambda = 270$  nm).

(continuação)

Constituinte	TR (min)	UV (nm)	<i>C. minima</i>		<i>D. plagiogramma</i>		<i>P. gymnospora</i>		<i>S. cymosum</i>	
			AcEtO	MeOH	AcEtO	MeOH	AcEtO	MeOH	AcEtO	MeOH
57	24,135	242; 308			0,048					
58	24,141	248;282				0,067			0,046*	
59	24,477	240; 272	0,040±0,002		0,252					
60	24,561	240; 276			0,235					
61	24,739	244; 274			0,187					
62	24,988	246; 290							0,047*	
63	25,083	290	0,374±0,071		1,303				0,252±0,075	
64	25,088	288					0,120±0,070			
65	25,504	242; 276			0,057					
66	25,723	242; 354	0,090±0,025						0,067±0,019	
67	25,976	242; 280; 330			0,042					
68	26,184	248; 272			0,595					
69	26,210	246; 270; 350	0,199±0,075						0,233*	
70	26,493	276; 306					0,035*			
71	26,563	272			0,821					
72	26,623	244; 286			0,501					
73	26,634	276					0,122±0,050			
74	26,640	246; 284	0,147±0,053						0,071±0,002	
75	26,819	242; 270; 366			0,037					
76	26,916	246; 270							0,039*	
77	27,165	240; 272				0,061*				
78	27,214	246; 270; 280							0,054±0,002	
79	27,318	246; 270							0,061*	
80	27,414	246; 270; 280; 320							0,094*	
81	27,458	246; 270; 320							0,195±0,018	
82	27,537	244; 278			0,193					
83	27,546	246; 274; 328	0,038*							

(continua)

Tabela 10: Porcentagem dos constituintes fenólicos (média ± DP;  $n = 3$ ) dos extratos acetato de etila (AcEtO) e metanólico (MeOH) de *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora* e *Sargassum cymosum*, analisados por CLAE-DAD ( $\lambda = 270$  nm).

(continuação)

Constituinte	TR (min)	UV (nm)	<i>C. minima</i>		<i>D. plagiogramma</i>		<i>P. gymnospora</i>		<i>S. cymosum</i>	
			AcEtO	MeOH	AcEtO	MeOH	AcEtO	MeOH	AcEtO	MeOH
84	27,715	246; 332	0,108±0,032		0,265		0,077*		0,163±0,087	
85	27,890	246; 272; 334	0,069±0,007							
86	27,918	244; 270			0,167					
87	28,053	246	0,146±0,006		0,158					
88	28,194	244; 328	0,036±0,004							
89	28,198	246; 326							0,043±0,002	
90	28,362	244; 284; 396	0,057±0,007		0,097				0,050±0,017	
91	28,515	246; 280; 338							0,091±0,034	
92	28,538	244; 276; 350	0,037*							
93	28,825	242; 288; 322	0,199±0,036		0,426					
94	29,127	242; 280	0,058*						0,043±0,008	
95	29,611	242			0,069					
96	29,817	278							0,792±0,362	
97	29,820	246; 276	0,226±0,042							
98	29,906	244; 276			0,115		0,037*			
99	30,456	242; 272			0,084					
100	30,695	248; 292; 306; 320					0,127*			
101	30,884	244; 272			0,327					
102	31,026	244; 272			0,051					
103	31,286	290; 304; 318					0,415*			
104	31,393	250; 286; 300; 314					0,152*			
105	31,686	272; 356; 378					0,834*			
106	31,827	270					2,610±0,790	0,229*		
107	31,823	266	2,416±0,331							
108	31,909	244; 280			0,216					
109	32,128	244; 272; 400					0,052±0,018			

TR: tempo de retenção médio em minutos; UV: pico máximo de absorção no espectro ultravioleta (200-400 nm); \*Para os extratos de *D. plagiogramma* foi analisada apenas uma réplica; \*\*Constituinte presente em apenas uma das réplicas.

## Apêndice D

## Espécies dos gêneros *Chnoospora*, *Dictyopteris*, *Padina* e *Sargassum* com potencial antibacteriano

Tabela 11: Extratos de espécies dos gêneros *Chnoospora*, *Dictyopteris*, *Padina* e *Sargassum* que apresentam atividade antibacteriana.

Especie	Método	Extrato	Bactéria	Referência
<i>C. minima</i>	Difusão em disco	Acetona	<i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Streptococcus pyogenes</i>	Lara-Isassi et al. (1996, 1999)
<i>D. membranaceae</i> (= <i>D. polypodioides</i> )	Difusão em disco	Aquoso frio e quente	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Zeid et al. (2014)
		Aquoso quente	<i>Escherichia coli</i>	
<i>D. undulata</i>	Difusão em poço	Metanol 70%	<i>Bacillus cereus</i> ; <i>Salmonella choleraesuis</i> ; <i>S. aureu</i> ; <i>Listeria monocytogenes</i>	Jang e Lee (2015)
<i>P. boergesenii</i>	Difusão em disco	Acetona	<i>S. aureus</i> ; <i>S. pyogenes</i>	Lara-Isassi et al. (1999)
		Etanolílico	<i>S. pyogenes</i>	
<i>P. durvillaei</i>	Difusão em disco	Acetona	<i>S. aureus</i> ; <i>S. pyogenes</i>	Lara-Isassi et al. (1996)
		Metanolílico, éter de petróleo, etanolílico, acetato de etila, clorofórmio e éter etílico, acetona	<i>Bacillus subtilis</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; <i>Streptococcus sp.</i> ; <i>Aeromonas liquefaciens</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>Enterococci sp.</i> ; <i>Enterococci faecalis</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Proteus sp.</i> ; <i>Salmonella sp.</i> ; <i>Shewanella sp.</i> ; <i>Shigella flexneri</i> ; <i>Vibrio cholerae</i> ; <i>Vibrio fluvialis</i> ; <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ;	Manivannan et al. (2011)
<i>P. gymnospora</i>	Difusão em poço e atividade <i>in vivo</i> contra infecção em peixe	Etanolílico e aquoso	<i>P. aeruginosa</i>	Thanigaivel et al. (2015)
	Microdiluição em caldo (microplaca)	Diclorometano:metanol	<i>S. aureus</i> ; <i>Mycobacterium genitalium</i> ; <i>M. capricolum</i> ; <i>M. pneumoniae</i>	Bianco et al. (2015)
		Metanolílico	<i>S. aureus</i>	Baliano et al. (2016)
<i>P. pavonia</i>	Difusão em disco	Acetona e fração lipídica	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> ; <i>Salmonella typhimurium</i> ; <i>Shigella boydii</i> ; <i>Streptomyces antibioticus</i>	El Shoubaky e Salem (2014)

(continua)

Tabela 11: Extratos de espécies dos gêneros *Chnoospora*, *Dictyopteris*, *Padina* e *Sargassum* que apresentam atividade antibacteriana.

(continuação)

		Éter etílico	<i>Corynebacterium</i> sp.; <i>S. aureus</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. flexneri</i>	
<i>P. pavonia</i>	Microdiluição em caldo (microplaca)	Clorofórmio	<i>Corynebacterium</i> sp.; <i>S. aureus</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. flexneri</i>	Shafay et al. (2016)
		Etanólico	<i>S. aureus</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. flexneri</i>	
		Metanólico	<i>S. aureus</i> ; <i>S. flexneri</i>	
<i>S. binderi</i>	Difusão em disco	Acetona e metanólico	<i>B. subtilis</i> ; <i>S. aureus</i>	Jaswir et al. (2014)
		Acetato de etila	<i>B. subtilis</i>	
<i>S. filipendula</i>	Difusão em disco	Acetona	<i>S. aureus</i>	Lara-Isassi et al. (1999)
<i>S. flavelum</i>	Difusão em disco	Acetato de etila	<i>B. subtilis</i> ; <i>S. aureus</i>	Jaswir et al. (2014)
		Acetona e metanólico	<i>B. subtilis</i>	
<i>S. fusiforme</i>	Microdiluição em caldo (microplaca)	Éter etílico e etanólico	<i>Corynebacterium</i> sp.; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. flexneri</i>	Shafay et al. (2016)
		Clorofórmio	<i>S. aureus</i> ; <i>S. flexneri</i>	
		Metanol	<i>P. aeruginosa</i>	
<i>S. liebmamii</i>	Difusão em disco	Acetona	<i>S. aureus</i> ; <i>S. pyogenes</i>	Lara-Isassi et al. (1996)
<i>S. plagyophilum</i>	Difusão em disco	Clorofórmio, acetato de etila, acetônico	<i>S. aureus</i>	Jaswir et al. (2014)
		Metanólico	<i>B. subtilis</i> ; <i>S. aureus</i>	
<i>S. swartzii</i>	Difusão em disco	Extrato bruto de polissacarídeos	<i>B. subtilis</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>Aeromonas hydrophilla</i> ; <i>E. faecalis</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>Proteus vulgaris</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>Salmonella typhi</i> ; <i>S. flexneri</i>	Vijayabaskar et al. (2012)
<i>S. tenerrimum</i>	Difusão em disco	Metanólico, acetona, éter de petróleo, etanólico, acetato de etila, clorofórmio e éter etílico	<i>B. subtilis</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>S. epidermidis</i> ; <i>Streptococcus</i> sp.; <i>A. liquefaciens</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>Enterococci</i> sp.; <i>E. faecalis</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>Proteus</i> sp.; <i>Salmonella</i> sp.; <i>Shewanella</i> sp.; <i>S. flexneri</i> ; <i>V. cholerae</i> ; <i>V. fluvialis</i> ; <i>V. parahaemolyticus</i> ; <i>Vibrio splendidus</i>	Manivannan et al. (2011)
		Metanólico	<i>S. aureus</i> ; <i>E. coli</i> ; <i>K. pneumoniae</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. typhi</i> ; <i>V. cholerae</i>	
<i>S. vulgare</i>	Microdiluição em caldo (microplaca)	Diclorometano:metanol (2:1)	<i>S. aureus</i> ; <i>M. genitalium</i> ; <i>M. pneumoniae</i>	Bianco et al. (2015)
		Éter etílico	<i>E. coli</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. flexneri</i>	
		Clorofórmio	<i>S. aureus</i>	
		Etanol	<i>K. pneumoniae</i>	Shafay et al. (2016)
		Metanol	<i>S. flexneri</i>	