Janaína Pires Santos

Versão corrigida

Perfil antioxidante e bioatividade de três espécies de macroalgas da Praia do Morro de Pernambuco no litoral Sul da Bahia, Brasil

Antioxidant profile and bioactivity of three species of macroalgae of Morro de Pernambuco Beach in the south coast of Bahia, Brazil

São Paulo

2016

Janaína Pires Santos

**Perfil antioxidante e bioatividade de três
espécies de macroalgas da Praia do Morro
de Pernambuco no litoral Sul da Bahia,
Brasil**

**Antioxidant profile and bioactivity of three
species of macroalgae of Morro de
Pernambuco Beach in the south coast of
Bahia, Brazil**

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Ciências, na área de
Botânica.

Orientador (a): Prof. Dra. Fanly Fungyi Chow Ho

São Paulo

2016

Pires, Janaína

Perfil antioxidante e bioatividade de três espécies de macroalgas da Praia do Morro de Pernambuco no litoral Sul da Bahia. 225 páginas.

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. Antioxidantes; 2. Biotecnologia; 3. Bioatividades; 5. Fisiologia; 6. Prospecção; 7. Lipídios; 8. *Sargassum*; 9. *Palisada*; 10. *Ulva*

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências, Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof. (a) Dr. (a)

Prof. (a) Dr. (a)

Prof. (a) Dr. (a)

Prof. (a) Dr. (a)

Prof. (a) Dr.(a) Fungyi Chow ho
Orientador (a)

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,
mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não
somos o que deveríamos ser não somos o que
iremos ser. mas Graças a Deus, não somos o que
éramos.”

Martin Luther King

Agradecimentos

Tão difícil quanto escrever a tese, é tentar expor em poucas páginas o quanto sou imensamente grata a cada pessoa que fez parte da minha trajetória, nesses quatro anos de Laboratório de Algas Marinhas Édson José de Paula (LAM) na Universidade de São Paulo.

Início agradecendo aos meus pais, Marizete Pereira dos Santos e Paulo Roberto Pires Santos e a meu irmão Rodrigo Pires Santos, por serem os meus grandes incentivadores e por terem colocado a ciência na minha vida desde o princípio. Amo vocês!!!

À CAPES, pelas duas bolsas concedidas para que eu me dedicasse a este trabalho e fizesse com que ele fosse realizado da melhor forma possível.

À minha orientadora, Profa. Dra. Fungyi Chow por todo ensinamento, disponibilidade e incentivo acadêmico proporcionado durante a minha caminhada.

À Dra. Deborah Yara Cursino dos Santos e a Dra. Claudia Maria Furlan do Laboratório de Fitoquímica da Universidade de São Paulo, pelas parcerias, aconselhamento e ajuda durante o processo de doutorado.

Ao pessoal do Depto. Botânica IB-USP o quais sempre foram muito atenciosos e prestativos nas questões burocráticas: Norberto, Carlos e Danilo.

Da mesma forma o meu obrigada para eficiência e cuidado do pessoal da secretária de pós graduação IB-USP Erika, Helder, Shirlene e Lilian.

Special thanks to the research groups of Dr. Dagmar Stengel and Dr. Ger Fleiming of National University of Ireland: Anna, Aileen, Dara, Donal, Freddy, Helena, Justine, Lilit, Mathias, Pedro, Udo for all affection, laugh, teaching and help.

Aos amigos brasileiros feitos na Irlanda, levo vocês no coração para vida toda: Walquíria (Amiga querida e housemate), Guilherme, Éder (obrigada por me ensinar sempre o caminho de volta para casa) e Beatriz (a nossa novinha) vocês tornaram tão afetuosos uma experiência que era tão assustadora.

Aos amigos que viraram família: Andrezão Faria, o cara das *Gracilaria*, com quem dividi muitas conversas, café e risadas. Biazinha e Fábio (tchu tchu), obrigada por sempre estarem presentes segurando as pontas ou sendo feliz comigo, saibam que a vida me presenteou com os dois e eu tive muita sorte! A Ana Maria, por ser tão amável e sensata nos seus comentários. A Lígia, que foi se chegando bem de mansinho e hoje é uma queridona por quem tenho um amor imenso! Sem vocês essa jornada não teria sido tão especial, AMO cada um!

À Alice, Paula e Priscila por todo carinho, conversas, risadas, apoio, ensinamentos e pelo Jacques Cousteau (o gato). Meninas, vocês são muito especiais e se incluem entre os amigos que viraram família, obrigada de coração!

À Luiza pelo carinho extra e recém-chegado que foi fundamental no fechamento da tese.

A todos os LAMigos por terem contribuído para que esse processo fosse mais leve, as conversas entre um café e outro fez toda a diferença, obrigada!]

Aos professores do LAM IB-USP, Dra. Estela Maria Plastino, Dr. Flávio Berchez. Dra. Mariana Cabral de Oliveira e Dra. Valeria Cassano. Por toda atenção e aprendizado. Muito Obrigada!

À equipe de técnicos do LAM: Rosário, André Nakasato e Willian Oliveira por toda presteza, atenção e amizade.

À Alice, Ana, Bia, Fábio, Priscila que estiveram o tempo inteiro comigo principalmente na fase final, sempre lembrando que eu era capaz e me dando um suporte incrível! Eu nunca terei palavras para agradecer depois de todo o envolvimento de vocês, vi que estou rodeada das melhores pessoas!

Por fim, mas não menos importante a todos que passaram e contribuíram direta ou indiretamente durante a realização deste trabalho e aos ensinamentos proporcionados, isso é viver!!

Sumário

Resumo Geral	1
Abstract	2
1. Introdução Geral	3
1.1 Respostas fisiológicas e bioquímicas ao ambiente.....	3
1.2 Defesas antioxidantes em macroalgas	6
1.3 Ácidos graxos e lipídios em macroalgas	8
1.4 Potencial antiviral das macroalgas.....	10
1.5 Contextualização do estudo.....	12
Hipóteses	15
Objetivo Geral.....	15
Objetivos Específicos	15
Referências	16
2. Metodologia Geral.....	29
2.1 Testes preliminares com algas de Itanhaém	29
2.2 Estudos bioquímicos e de bioatividade.....	32
2.2.1 Material biológico	33
2.2.2 Obtenção dos extratos	35
2.2.3 Potencial antioxidante in vitro dos extratos brutos	35
2.2.3.1 Sequestro do radical DPPH.....	36
2.2.3.2 Sequestro do radical ABTS	38
2.2.3.3 Método da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico	40
2.2.3.4 Poder antioxidante de redução do ferro.....	42
2.2.3.5 Poder antioxidante pela quelação de metais	43
2.2.3.6 Quantificação de substâncias redutoras pelo método Folin-Ciocalteu.....	44
2.2.4 Ensaio de bioatividade	46
2.2.4.1 Ensaio de inibição da enzima transcriptase reversa (RT-HIV)	46
2.2.4.2 Potencial citotóxico frente ao crustáceo <i>Artemia salina</i>	49
2.3 Estudos fisiológicos.....	51
2.3.1 Pigmentos fotossintetizantes e proteínas solúveis totais	51
2.3.2 Potencial antioxidante	54
2.3.3 Scan espectrofotométrico dos extratos na faixa do UV	55
2.4 Doutorado sanduíche: perfil de ácidos graxos, lipídios e suas classes	55
2.5 Análises estatísticas	57
Referências.....	58

3. Atividades antiviral e citotóxica de extratos brutos das macroalgas <i>Sargassum vulgare</i>, <i>Palisada flagellifera</i> e <i>Ulva fasciata</i>	63
3.1 Introdução	65
3.2 Materiais e Métodos.....	69
3.2.1 Coleta do material.....	69
3.2.2 Obtenção e preparo dos extratos.....	69
3.2.3 Atividade anti-HIV	70
3.2.4 Atividade citotóxica	70
3.2.5 Análise estatística.....	70
3.3 Resultados	70
3.4 Discussão	76
Agradecimentos	83
Referências.....	83
 4. Potencial antioxidante de extratos metanólicos e aquosos de três espécies de macroalgas marinhas do nordeste do Brasil em duas estações do ano	91
4.1 Introdução	93
4.2 Materiais e Métodos.....	97
4.2.1 Coleta do material.....	97
4.2.2 Obtenção e preparo dos extratos.....	97
4.2.3 Avaliação do potencial antioxidante	98
4.2.3.1 Ensaio antioxidante de redução do radical DPPH.....	99
4.2.3.2 Ensaio do potencial de sequestro do radical ABTS	100
4.2.3.3 Co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico	100
4.2.3.4 Poder redutor de Ferro (FRAP).....	100
4.2.3.5 Atividade quelante de metais.....	100
4.2.3.6 Substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu	100
4.2.4 Análise estatística dos dados	100
4.3 Resultados	101
4.3.1 Sequestro do radical DPPH	101
4.3.2 Sequestro do radical ABTS	104
4.3.3 Co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico	106
4.3.4 Potencial antioxidante redutor de ferro (FRAP).....	109
4.3.5 Atividade quelante de metais	112
4.3.6 Substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu	114
4.3.7 Análise de Componentes Principais (PCA)	116
4.4 Discussão	119
Agradecimentos	124
Referências.....	124
 5. Respostas fisiológicas de três espécies de macroalgas marinhas do nordeste do Brasil nas estações seca e chuvosa	130
5.1 Introdução.....	132
5.2 Materiais e Métodos.....	134

5.2.1 Área de estudo e coleta do material	134
5.2.2 Quantificação de pigmentos fotossintetizantes e proteínas solúveis totais	135
5.2.3 Avaliação do potencial antioxidante e espectro UV de absorção	136
5.2.3.1 Espectros de absorção UV	136
5.2.4 Análises estatísticas	136
5.3 Resultados	136
5.3.1 Dados climatológicos	136
5.3.2 Quantificação de pigmentos fotossintetizantes e proteínas solúveis totais	137
5.3.3 Avaliação do potencial antioxidante e espectro UV de absorção	141
5.4 Discussão	146
Referências	150
6. Caracterização lipídica de três espécies de macroalgas marinhas do nordeste do Brasil em duas estações do ano	157
6.1 Introdução	159
6.2 Materiais e Métodos	161
6.2.1 Coleta e preparo das amostras	161
6.2.2 Transmetilação direta e quantificação de ácidos graxos totais a partir da biomassa liofilizada	161
6.2.3 Análise estatística	162
6.3 Resultados	163
6.3.1 Ácidos graxos totais	163
6.3.2 Perfil de ácidos graxos para cada espécie	164
6.4 Discussão	170
Referências	175
7. Conclusões gerais	179
Anexos	181

Resumo Geral

As macroalgas desempenham importante papel no ambiente marinho como produtores primários. Elas ocupam diversas zonas do costão rochoso, entre elas, o mediolitoral que é a mais estudada devido às rápidas mudanças nos fatores ambientais (temperatura, dessecação, irradiância, salinidade, entre outros) direcionados pela dinâmica das marés. Esse dinamismo possibilitou com que os organismos desenvolvessem defesas que garantissem a sua sobrevivência nesses ambientes. E essas defesas, na maioria das vezes químicas, também possuem utilidade e aplicações biotecnológicas, pois as algas são fonte de novas substâncias com propriedades bioativas com importância nutricional, médica ou farmacêutica.

Como forma de reconhecer o potencial químico e bioativo, ainda subexplorado nas algas brasileiras, o presente trabalho avaliou o potencial antioxidante, antiviral e toxicidade, aspectos da fisiologia e a caracterização de ácidos graxos de três espécies de macroalgas do nordeste brasileiro: *Sargassum vulgare* (Ochrophyta), *Palisada flagellifera* (Rhodophyta) e *Ulva fasciata* (Chlorophyta) e seus potenciais foram testados para diferentes extratos. As espécies apresentaram potencial inibitório da enzima transcriptase reversa do vírus HIV e essa bioatividade se mostrou promissora, pois os extratos apresentaram baixa toxicidade frente ao crustáceo *Artemia salina*.

Para todas as espécies foi observado potencial antioxidante, tanto para os extratos com finalidade química, quanto para os extratos com finalidade fisiológica e, este último, aliado às repostas fisiológicas de constituição pigmentar e proteínas sugerem que as algas desse estudo possuem uma boa aclimação ao ambiente, pois não foi notada expressivas variações nos seus conteúdos pigmentares. Quanto à caracterização de ácidos graxos, *P. flagellifera* se mostrou a maior fonte de ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) entre as espécies estudadas, o que faz dela um potencial recurso para obtenção de AGPIs com importância na suplementação alimentar como possíveis nutracêuticos e de importância médica.

Abstract

Macroalgae plays an important role in the marine environment as primary producers. They inhabit different zones of the intertidal rocky shore, among them the midlittoral is the most studied due to rapid changes in environmental factors (temperature, desiccation, irradiance, salinity, etc.) influenced by the dynamics of the tides. This dynamism enabled organisms to develop defenses for guarantee their survival in these environments. These defenses, mostly chemical, also have biotechnological utility and applications because the algae are a source of new substances and bioactivity properties with nutritional importance, medical or pharmaceutical.

As a way to recognize the chemical and bioactive potential still underexploited in Brazilian seaweeds, this study evaluated the potentials of antioxidant, antiviral and toxicity, aspects of physiology and fatty acids characterization of seaweeds of the Brazilian northeastern *Sargassum vulgare* (Ochrophyta), *Palisada flagellifera* (Rhodophyta) and *Ulva fasciata* (Chlorophyta) tested for different extracts. The species showed potential as inhibitors of the enzyme reverse transcriptase of HIV virus and this bioactivity was more promising because the extracts showed low toxicity against the crustacean *Artemia salina*.

All species showed antioxidant potential for extracts with chemical purposes and for the extracts with physiological purpose, and the latter coupled with the physiological responses of pigment composition and proteins suggest that the algae in this study have a good acclimation to the environment, since no significant variations were observed in their pigment contents. As regards the characterization of fatty acids, *P. flagellifera* was the largest source of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) among the studied species, which makes it a potential resource for obtaining PUFAs with importance in food supplementation as possible nutraceutical and medical importance.

Introdução Geral

1.1 Respostas fisiológicas e bioquímicas ao ambiente

Os ambientes costeiros são áreas de expressiva variabilidade ambiental, onde os componentes bióticos e abióticos interagem e regem o funcionamento e a estabilidade de um ecossistema dinâmico e complexo. Particularmente, os costões rochosos são sistemas de alta complexidade ambiental por se situarem na transição entre os ambientes terrestre e aquático. Devido à alta riqueza de espécies que abrigam esses ecossistemas, sua importância ecológica e econômica é imensurável frente à diversidade de bens e serviços ecossistêmicos que eles proporcionam (Burritt et al., 2002; Cox, 2010).

A faixa do mediolitoral dos costões rochosos, região que compreende a zona entremarés, está sujeita a condições bióticas (e.g. predação, competição e herbivoria) e abióticas extremas (e.g. radiação solar, radiação UV, dessecação e exposição à atmosfera, temperatura e salinidade) que podem se alterar a curto (diariamente), médio (sazonalmente) ou longo prazo (anualmente). Esses fatores podem propiciar situações de estresse celular nos organismos, o que levaria a um aumento na produção de compostos oxidantes e, conseqüentemente, danos por estresse oxidativo. Esses estressores ambientais podem interagir e ter efeitos sinérgicos ou antagônicos sobre as respostas fisiológicas (Bischof et al., 2006). Quando os estressores agem sinergicamente, os efeitos sobre os organismos podem ser imprevisíveis (Xenopoulos et al., 2002). Por outro lado, quando os estressores agem de maneira aditiva torna-se mais fácil prever os efeitos sobre os organismos (Martínez et al., 2012).

Organismos bentônicos da zona do mediolitoral, devido à sua característica sésil, estão sujeitos a mudanças das condições abióticas durante o ciclo das marés (Davison & Pearson, 1996). As respostas desses

organismos aos estressores podem variar muito rápido e envolvem ajustes em suas atividades metabólicas, bioquímicas e moleculares (Southward et al., 1995, Hoegh- Guldberg & Bruno, 2010, Sorte et al., 2010).

A disponibilidade de luz é um fator chave que afeta o ambiente marinho (Huovinen & Gómez, 2011). A luz é responsável por gerar atividade fotossintetizante, mas também pode inibir diversos processos biológicos se houver radiação excessiva (Hanelt & Figueroa, 2012). O interesse por estudos que avaliem as respostas à luz é inevitável, pois essa condição está diretamente ligada à produtividade primária e composição nutricional do organismo, informação principalmente valiosa em espécies de interesse comercial. Além disso, fornecem informações sobre a biologia e distribuição geográfica desses organismos, que podem ser utilizadas para aplicações como manejo e exploração racional (Hanelt, 1996; Guihéneuf et al., 2010; 2014; 2015).

As macroalgas são componentes fundamentais dos ecossistemas marinhos, ocorrem principalmente na faixa do mediolitoral e estão submetidas a diversas mudanças nas condições ambientais, e por isso, possuem mecanismos eficientes para combater essas adversidades. Estas condições extremas de radiação solar, radiação UV, dessecação, entre outros, constituem cenários de estresse para as algas, provocando situações que favorecem a oxidação celular (Cox et al., 2010). Macroalgas possuem diversos mecanismos de fotoproteção, tais como a dissipação de energia através de pigmentos específicos através do ciclo das xantofilas (e.g. carotenoides; Goss & Jakob, 2010) ou ainda fotoinibição dinâmica mediante mudanças reversíveis na capacidade e eficiência fotossintetizante, acúmulo de compostos que absorvem na faixa do UV e aumento da atividade antioxidante (Gómez et al., 2009).

No caso das algas pardas, elas acumulam substâncias fenólicas (polifenóis) que possuem forte atividade antioxidante, situação que tem sido extensamente relacionada com alta radiação fotossinteticamente ativa (PAR) e radiação UV (Pavia et al., 1997; Connan et al., 2004; Cruces et al., 2012). Por outro lado, a tolerância da maioria das algas vermelhas ao excesso de radiação, incluindo a radiação UV, está relacionada e regida pela produção e acúmulo de aminoácidos tipo micosporinas (MAAs; de la Coba et al., 2009). A

avaliação e caracterização do perfil de clorofila e ficobiliproteínas como respostas fisiológicas ao estresse são comuns em algas vermelhas (Levy & Gantt, 1988; Cunningham et al., 1989; Bernard et al., 1996; Faria et al., 2015; Wu et al., 2015).

Outra condição ambiental que afeta os organismos é a exposição ao ar que, no caso das macroalgas, geram estresse por dessecação. As algas verdes apresentam supressão da fotossíntese frente ao estresse por dessecação (Häubner et al., 2006; Gray et al., 2007; Karsten et al., 2010; Karsten & Holzinger, 2012). Holzinger & Karsten (2013) fizeram uma revisão sobre as respostas fisiológicas de algas verdes frente ao estresse por dessecação, e identificaram a presença de potentes sistemas antioxidantes como proteção contra dessecação, além do acúmulo de carotenoides secundários (astaxantina) e da modificação na ultraestrutura dos cloroplastos.

A disponibilidade de nutrientes é outro fator ambiental limitante para o crescimento de macrófitas, especialmente em habitats temperados e tropicais, visto que constituem ambientes oligotróficos (Hanisak, 1979; Conolly & Drew, 1985). A limitação de nitrogênio afeta muitos processos metabólicos em macroalgas, incluindo a capacidade fotossintetizante (Pérez-Lloréns et al., 1996), o teor de proteínas (Vergara et al., 1995; Martínez & Rico, 2002) e os mecanismos de fotoproteção (Korbee-Peinado et al., 2004; Korbee et al., 2005; Huovinen et al., 2006).

Os mecanismos de defesa ao estresse abiótico em macroalgas variam entre as diferentes espécies e entre as condições ambientais, assim como também com a variação diurna e a sazonalidade. Estudos sazonais tiveram início com as pesquisas de Haas (1950). Nesse estudo, o autor isolou peptídeos de algas e verificou alterações sazonais, as quais foram atribuídas à baixa intensidade de luz disponível durante o inverno e a períodos de exposição ao ar durante a maré baixa. Estudos que abordam a sazonalidade dos metabólitos secundários em espécies de algas brasileiras ainda são escassos, fazendo-se necessário investir neste tema para melhor compreensão do funcionamento, da produção e do mecanismo de ação desses compostos.

Sakamoto (1993) realizou estudos no litoral de São Paulo com extratos da clorófitica *Bryopsis pennata* J.V. Lamouroux em diferentes épocas do ano. O autor observou que os extratos provenientes de amostras coletadas durante

o verão apresentaram maior bioatividade que amostras provenientes do inverno. Resultados semelhantes foram observados pelos autores Abdala-Díaz et al. (2006), que realizaram estudos sobre o ciclo anual e diário das substâncias fenólicas na alga parda *Cystoseira tamariscifolia* (Hudson) Papenfuss. Eles observaram variações anuais, sendo os máximos valores encontrados nos meses de verão, provavelmente atribuídos à maior incidência de irradiância solar. Os valores mínimos foram encontrados nos meses de inverno. Os autores observaram ainda que houve uma variação diária na produção de substâncias fenólicas durante o verão, com produção 50% menor durante a manhã do que no fim do dia, e sugeriram a existência de uma estreita relação entre os mecanismos de fotorregulação da produção de compostos fenólicos e a incidência de luz.

Desta forma, avaliar as respostas fisiológicas em macroalgas é de grande importância, porque possibilita entender como esse grupo responde às adversidades do ambiente, além de entender como se dá o processo de aclimação desses organismos em campo. Já os trabalhos de cunho bioquímico, avaliam as respostas dos organismos a partir de extratos brutos provindos de algas secas com foco mais biotecnológico, muitas vezes investigando bioatividades tais como antiviral, antitumoral e de toxicidade. Portanto, integrar as respostas fisiológicas e bioquímicas possibilita uma caracterização mais global da fisiologia e do potencial bioativo desses organismos.

1.2 Defesas antioxidantes em macroalgas

Uma única espécie de macroalga pode conter diversas classes de substâncias químicas com grande diversidade de ações biológicas, propiciando seu desenvolvimento e sobrevivência em um cenário muito competitivo por substrato ou nutrientes, como é o caso dos ambientes onde elas habitam (Stein, 2011).

As substâncias ou frações com atividade antioxidante isoladas de organismos fotossintetizantes podem ser originárias tanto do metabolismo primário, ou seja, decorrentes do metabolismo essencial como ácidos graxos, carotenoides, vitaminas e esteroides, quanto do metabolismo secundário, que está relacionado à produção de moléculas induzida por algum estímulo

externo, como os flavonoides, alcaloides, taninos e polifenóis, entre outros (Veiga et al., 2005). Os antioxidantes são um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos e outros compostos e, ainda, enzimas que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres. Mesmo presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, os antioxidantes podem atrasar ou inibir as taxas oxidativas (Sies, 1993).

Entre os mecanismos de defesa antioxidantes conhecidos em macroalgas, destacam-se as substâncias fenólicas, que são fitoquímicos que apresentam um anel aromático em sua estrutura, com uma ou mais hidroxilas. Constituem um dos mais numerosos e representativos grupos de metabólitos secundários de plantas e algas, como as vitaminas C e E, flavonoides em geral, ácidos fenólicos, bromofenóis e florotaninos. A relevância das substâncias fenólicas nas algas é devido à sua participação na fisiologia, no metabolismo celular, no crescimento, na proteção contra herbivoria e como antioxidantes. A atividade antioxidante das substâncias fenólicas deve-se à sua estrutura química e à sua propriedade redutora. Estas características desempenham função importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de íons metálicos, agindo tanto na etapa de iniciação quanto na propagação do processo oxidativo (Melo & Guerra, 2002; Pimentel et al., 2005; Zhang et al., 2006; Souza et al., 2007).

O sistema de defesa antioxidante pode ser classificado em dois tipos: (a) os não enzimáticos, que incluem moléculas que atuam diretamente na ação antioxidante, dentre elas vitaminas C e E (e.g. tocoferol), carotenoides (e.g. β -caroteno e licopeno), substâncias fenólicas (e.g. fenóis, flavonoides e outros polifenóis) e taninos (e.g. florotaninos e taninos hidrolisáveis) e (b) os enzimáticos, que são catalisados mediante a ação de enzimas específicas, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GP) e ascorbato peroxidase (APX) (Mordi et al., 1993; Burri, 1997; Burton et al., 1998; Palace et al., 1999; Iwashina, 2000; Novoa et al., 2001; Junior, 2002; Barreiros et al., 2006; Zhang et al., 2006; Lee et al., 2007; Guarantini, 2008; Koivikko, 2008; Machado et al., 2008; Kamiya et al., 2010).

De acordo com a ação sobre os radicais livres, os antioxidantes não enzimáticos, foco deste trabalho, podem ser classificados como “*scavengers*” (sequestradores), quando agem transformando um radical livre em outro

menos reativo, ou “*quencher*” (dissipadores), quando neutralizam completamente o radical livre através da absorção de toda a energia de excitação (Renz, 2003; Guarantini, 2008).

Um trabalho relevante do ponto de vista da atividade antioxidante é o de Raymundo et al. (2004), que realizaram a determinação dos metabólitos secundários de quatro espécies de clorofíceas: *Ulva fasciata* Delile, *Codium decortatum* (Woodward) M. Howe, *Ulva intestinalis* Linnaeus (como *Enteromorpha intestinalis* (Linnaeus) Nees S.) e *Chaetomorpha anteninna* (Bory) Kutzing. Nesse trabalho, os autores avaliaram a atividade antioxidante através de testes para inibição da peroxidação lipídica em ácido linoleico e observaram que os extratos orgânicos de todas as espécies estudadas apresentaram alto potencial antioxidante, constituindo uma fonte interessante de novas substâncias para as indústrias alimentícia e farmacêutica brasileiras. Outro estudo de destaque é o de Zubia et al. (2007), que realizaram uma triagem para a atividade antioxidante de extratos brutos de 48 espécies de algas mexicanas com representantes dos três grupos de macroalgas. Os autores observaram que várias das espécies estudadas apresentaram um interessante potencial antioxidante, podendo servir como fonte para possível aplicação farmacêutica, alimentícia ou cosmética.

A procura por fontes naturais de antioxidantes que não causem efeitos colaterais ou danos à saúde tem crescido nos últimos anos devido à mudança no perfil de consumidores que atualmente têm interesse por alimentos mais naturais e minimamente processados. Sob essa perspectiva, há uma pressão mundial para o aumento da qualidade e segurança desses produtos, o que exige que a indústria alimentícia remova progressivamente a adição de conservantes sintéticos (e.g. benzoato de sódio, nitrito de sódio e ácido sórbico). A utilização destes conservantes tem sido associada a alguns efeitos graves à saúde como irritações estomacais e doenças cardiovasculares; assim, a busca por fontes naturais de antioxidantes justifica o crescimento na bioprospecção de conservantes naturais (Lanciotti et al., 2004).

1.3 Ácidos graxos e lipídios em macroalgas.

As algas marinhas possuem a centenária tradição de compor a dieta em várias partes do mundo, principalmente em países asiáticos, onde

desempenham papel essencial na nutrição da população (Chapman & Chapman, 1980; McDermid & Stuercke, 2003; Dillehay et al., 2008; Bocanegra et al., 2009; Mouritsen et al., 2013).

Lipídios representam de 1 a 5% do peso seco das macroalgas e o interesse por essas substâncias tem crescido, principalmente pela composição de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs do inglês *PolyUnsaturated Fatty Acid*), principalmente os pertencentes à família do ômega-3 (ácido eicosapentaenoico 20:5 n-3; EPA) e ômega-6 (ácido docosahexaenoico 22:6 n-3; DHA) (Burtin, 2003; Schmid et al., 2014).

As algas marinhas têm mostrado um perfil lipídico preferencial na produção de PUFAs (Fleurence et al., 1994; van Ginneken et al., 2011; Pereira et al., 2012). Algas vermelhas e pardas possuem o ácido araquidônico (ARA, 20:4 n-6) e/ou EPA como representante majoritário dos PUFAs. Por outro lado, as algas verdes apresentam principalmente ácidos graxos saturados (SFA do inglês *Saturated Fatty Acid*), tendo como representante majoritário o ácido palmítico (16:0) (van Ginneken et al., 2011).

Os PUFAs são de grande importância para o metabolismo em humanos, pois são o principal componente das membranas fosfolipídicas das células, e também podem estar presentes em compartimentos celulares de estocagem. Além disso, participam na biossíntese de eicosanoides, que são moléculas sinalizadoras semelhantes a hormônios que incluem tromboxanos, prostaglandinas e lucotrienos (Radwan, 1991; Gill & Valivety, 1997; Calder, 2010).

Considerando seu papel fundamental no metabolismo, não surpreende o fato dos PUFAs também possuírem atividades biológicas já relatadas, tais como antimicrobiana (Ward & Singh, 2005; Huang & Ebersole, 2010; Guedes et al., 2011), anti-inflamatória (Pulz & Gross, 2004; Schmitz & Ecker, 2008) e antioxidante (Plaza et al., 2009), além de ajudar na prevenção de doenças cardíacas (Mozaffarian & Wu, 2011) e inibir a progressão de tumores (Field & Schley, 2004). Todas essas propriedades anteriormente citadas podem ser indicativas de que os ácidos graxos das macroalgas, que ainda são pouco estudados quando comparado com microalgas, podem representar mais um interessante recurso com aplicações nutracêutica e farmacêutica.

Atualmente, a principal fonte de PUFA's vem dos óleos de peixes, visto que apenas os organismos marinhos possuem a capacidade de sintetizar ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCPUFA do inglês *Very Long Chain PolyUnsaturated Fatty Acid*). A exploração abusiva dessa matriz gerou o declínio desse recurso, por isso, a procura por fontes alternativas desse recurso é sempre interessante (Pereira et al., 2012). As macroalgas são promissoras fontes de VLCPUFA's, pois ocupam a base da cadeia trófica marinha e podem representar uma alternativa a essa sobre-exploração, não só para a Ásia, que já possui tradição no cultivo de algas, mas também para o ocidente (Pereira et al., 2012).

1.4 Potencial antiviral das macroalgas.

Os vírus estão envolvidos em grandes epidemias históricas da humanidade. A década de 1980 foi marcada pela epidemia que se tornou o maior problema mundial de saúde pública até os dias de hoje. A descoberta da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, também conhecida como AIDS, é uma doença causada por um lentivírus da família Retroviridae, com RNA de fita simples que apresenta alta taxa de mutação, o que dificulta o controle e erradicação da doença. O vírus da AIDS ataca células vitais do sistema imunológico, como os linfócitos auxiliares T CD4⁺, macrófagos e células dendríticas. O ataque progressivo ao sistema imunológico faz com que o corpo perca a capacidade de se defender de infecções oportunistas (Weiss, 1993; Douek et al., 2009). Países subdesenvolvidos como a África são os mais afetados pela epidemia da AIDS, mas a doença não está restrita ao território africano, pois existem inúmeros casos documentados em todo o mundo (UNAIDS, 2014). Apesar dos dados de novas infecções no mundo terem declinado de 2001 até 2014 (2,1 milhões de pessoas vivendo com o vírus), esses dados ainda são alarmantes e a corrida pela descoberta de novos coquetéis ou vacinas que retardem ou cessem a progressão do vírus é de grande interesse médico (UNAIDS, 2014), além de serem mais eficientes e menos tóxicos.

Atualmente, pesquisas têm voltado seus interesses para o ambiente marinho na procura de novas substâncias promissoras contra o Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV; *Human Immunodeficiency Virus*), e em menos

de três décadas esse ambiente já rendeu a descoberta de estruturas químicas inéditas e que possuem promissora atividade como antivirais. Entre os organismos promissores estão esponjas, poliquetas e macroalgas (Singh et al., 2005). As algas marinhas têm atraído à atenção também de setores da biomedicina e do desenvolvimento de vacinas, devido as suas possíveis atividades como anti-HIV ou contra o vírus da herpes (HSV-1 ou HSV-2; *Herpes Simplex Virus*). Tais produtos podem agir sobre as diferentes fases do ciclo viral, ligando-se ao vírus ou agindo sobre enzimas específicas durante a transcrição do vírus (Matsuse et al., 1999).

O potencial para atividade antiviral dos polissacarídeos das algas marinhas foi mostrado primeiramente por Gerber et al. (1958). Os autores observaram que polissacarídeos extraídos da alga vermelha *Gelidium cartilagineum* (Linnaeus) Gailon protegia ovos embrionários do vírus da influenza B. Muitas espécies de algas contêm significativas quantidades de polissacarídeos sulfatados de estrutura complexa, que têm mostrado habilidade de inibir vírus envelopados, incluindo membros dos flavivírus, togavírus, arenavírus, rhabdovírus e orthopoxvírus e da família do vírus da herpes (Witvrouw & De Clercq, 1997). O grau de sulfatação e a distribuição dos grupos sulfato do polissacarídeo desenvolvem um importante papel na atividade antiviral desses ficocoloides. Os polissacarídeos algais que possuem baixo grau de sulfatação geralmente são inativos para combater vírus (Damonte et al., 2004). Fucoidinas são polissacarídeos extraídos das algas pardas e têm mostrado atividade contra diversos vírus tais como HIV, herpes simplex dos tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) e citomegalovírus (Witvrouw & De Clercq, 1997). Carragenanas, fucoidanas e ramnogalactanas sulfatadas têm apresentado fortes efeitos inibitórios ao entrar em contato com os vírus da herpes e do HIV (Witvrouw & De Clercq, 1997).

Assim, tanto a demanda por novas drogas antivirais de espécies com potencial bioativo, a diversidade de substâncias com potencial antiviral demonstrado em macroalgas e a crescente busca por proteção contra doenças negligenciadas e epidemias tornam fundamentais estudos na busca de novas alternativas de terapias, drogas e tratamentos a partir de espécies pouco tradicionais, como é o caso das macroalgas.

1.5 Contextualização do estudo

A investigação do patrimônio químico provindo das algas brasileiras, além de inferências sobre as variações sazonais das suas defesas antioxidantes representam uma interessante abordagem com importância biotecnológica e econômica. O nordeste do Brasil apresenta a mais diversificada flora ficológica do país segundo classificação proposta por Oliveira et al. (1999), devido à abundância de águas oligotróficas e de substratos consolidados que propiciam a colonização pelas macroalgas. Porém, além da diversidade de espécies, a região do nordeste destaca-se também pela grande quantidade de biomassa algácea, o que facilita a coleta de material necessário para trabalhos com enfoque aplicado e biotecnológico.

De acordo com Silva et al. (2005), uma maior capacidade antioxidante é atribuída a fatores ambientais de estresse, particularmente à radiação solar e, particularmente, à radiação UV. O Brasil, assim como as regiões tropicais, apresenta naturalmente a camada de ozônio mais delgada e, portanto, a radiação UV é mais intensa. A variabilidade espaço-temporal da radiação UV está relacionada a diversos fatores como: inclinação solar, altitude e latitude, proximidade do Equador e níveis de nebulosidade.

A cidade de Ilhéus, localizada no sul baiano, onde foi realizado o presente estudo, apresenta alta incidência de radiação UV e altas temperaturas durante todo o ano, relacionados com a sua localização geográfica e baixa nebulosidade anual (Santos, 2010a). Portanto, esta área torna-se bastante atrativa no que diz respeito a estudos relacionados à produção de antioxidantes e substâncias bioativas por macroalgas.

Vários estudos taxonômicos têm sido realizados no litoral da Bahia, sendo a sua flora relativamente bem conhecida, dentre esses trabalhos podemos citar: Nunes (1999), Nunes & Paula (2000; 2001; 2002; 2004a; 2004b; 2006), Nunes (2005a; 2005b), Lyra et al. (2007), Marins et al. (2008), Alves (2008), Nunes & Guimarães (2009, 2010) e Bahia et al. (2010). Por outro lado, estudos que abordem o potencial biotecnológico das macroalgas para essa região são ainda reduzidos.

A escolha das espécies foi baseada na análise do trabalho realizado por Santos (2010b), que investigou em duas épocas do ano a riqueza de espécies através da cobertura percentual. Nesse trabalho, foi observado que as

espécies escolhidas para o presente estudo estavam entre as que apresentavam maiores biomassas anuais no costão rochoso do Morro de Pernambuco. Outro critério utilizado para a seleção das espécies foi baseado em um levantamento bibliográfico que mostrou grande potencial antioxidante e bioativo das espécies ou das famílias escolhidas (Shiu & Lee, 2005; Cho et al., 2007; Machado et al., 2011; Zhong et al., 2014; Topuz et al., 2015). Porém, os métodos utilizados nesses trabalhos apontam coletas únicas, não sazonais, e poucos estabelecem uma análise completa do perfil antioxidativo e avaliação de diversas bioatividades como a proposta no presente projeto.

A partir dos critérios de seleção mencionados, as três espécies escolhidas foram: a alga vermelha *Palisada flagellifera* (J. Agardh) K.W. Nam, a alga parda *Sargassum vulgare* C. Agardh e a alga verde *Ulva fasciata* Delile, cada uma com importância ecológica ou biotecnológica. Visando gerar conhecimento sobre a potencialidade biotecnológica das três espécies escolhidas nesse estudo, alguns trabalhos da literatura sustentam a escolha dessas espécies.

No caso de *U. fasciata* poucos são os trabalhos relacionados ao potencial antioxidante e a bioatividade para essa espécie, porém o gênero possui outras espécies que são comumente estudadas em trabalhos de prospecção. Espécies do gênero *Ulva* Linnaeus são comumente utilizadas na aquicultura mundial, por conter alto teor de proteínas, pigmentos, vitaminas e minerais, que são utilizadas em pequenas quantidades na suplementação alimentar de peixes (Guroy et al., 2007).

Palisada flagellifera pertence ao complexo *Laurencia* J.V. Lamouroux. Espécies pertencentes a este complexo têm sido bastante estudadas devido à diversificada produção de metabólitos secundários com bioatividade comprovada. Estudos cromatográficos têm evidenciado a presença de esteroides, sesquiterpenoides e glicolípídeos. Tais substâncias têm demonstrado atividades importantes para o setor biotecnológico como imunoestimulantes, antitumoral e antiviral (Lhullier et al., 2007). Stein (2011) analisou a composição química e bioatividade de quatro espécies do complexo, *Laurencia aldigensis* Saito & Womersley, *Laurencia catarinenses* Cordeiro-Marino & Fujii, *Laurencia intricata* J.V. Lamouroux e *Laurencia dendroidea* J. Agardh, e observou que a atividade antimicrobiana foi significativa nas quatro

espécies estudadas. Os extratos clorofórmicos de *L. aldigensis* foram os que apresentaram maior atividade antioxidante. Portanto, outras atividades (*i.g.* anticâncer, anticolinesterásico e fitopatógeno) deveriam ser investigadas mais profundamente.

Finalmente, algas do gênero *Sargassum* C. Agardh possuem grande importância econômica na produção de ficocoloides, com grande aplicabilidade em diversos setores industriais tais como alimentício, têxtil, farmacêutico, entre outros. Zahra et al. (2007) avaliaram a atividade antioxidante de extratos brutos etanólicos de *Sargassum boveanum* J. Agardh do Golfo Pérsico e observaram que essa espécie apresentou alta atividade antioxidante, que foi atribuída às grandes quantidades de substâncias redutoras. Corpuz et al. (2013) observaram alto potencial antioxidante para extratos alcoólicos de *Sargassum siliquosum* J. Agardh e através da sua caracterização química os autores sugeriram que esta espécie representa uma potencial fonte de antioxidantes e de substâncias anticâncer. De forma geral, os polissacarídeos das algas pardas têm sido bastante estudados nos últimos anos, devido à forte atividade inibitória da maquinaria vital de diversos vírus com importância médica. Entre eles, destacam-se os trabalhos de Ahn et al. (2002), Sinha et al. (2010) e Peng et al. (2012) que observaram alta atividade antiviral para diversas espécies do gênero *Sargassum*.

Finalmente, avaliar diversas bioatividades conjugadas com respostas fisiológicas desses organismos amplia e torna o conhecimento do potencial biotecnológico desse grupo mais completo. As macroalgas ainda são subestimadas no Brasil do ponto de vista aplicado, apesar do país apresentar grande diversidade de espécies. Sob esse ponto de vista, o trabalho se torna relevante por apresentar um panorama das atividades biológicas e a potencialidade de cada uma das espécies estudadas.

Este trabalho faz parte de um Auxílio à Pesquisa intitulado “Biodiversidade fisiológica e química de macroalgas ecológica e economicamente importantes”, financiado pela FAPESP (2013/50731-1) e coordenado pela Profa. Dra. Fungyi Chow. A construção desta tese também teve a parceria da National University of Ireland Galway (NUIG), onde foi realizado um estágio sanduíche de cinco meses relacionado à caracterização

dos perfis lipídicos das espécies em estudo sob a orientação da Profa. Dra. Dagmar Stengel e o Dr. Freddy Guihéneuf.

Hipóteses

1. Existe variação sazonal nas defesas antioxidativas (em quantidade e qualidade), com mecanismos de ação distintos em cada uma das espécies estudadas.
2. Sabendo-se dos perfis antioxidativos das espécies estudadas, os extratos também mostrariam uma resposta bioativa antiviral e de toxicidade.

Objetivo Geral

Contribuir para o conhecimento do potencial biológico e perfil químico de três espécies de macroalgas coletadas no litoral sul da Bahia e relacionar essas características com possíveis variações devidas a respostas sazonais (período seco *versus* período chuvoso). Assim como fornecer subsídios para a compreensão dessas respostas frente a possíveis alterações ambientais como radiação solar.

Objetivos específicos

1. Caracterizar o perfil antioxidativo a partir dos extratos brutos metanólicos e aquosos frio e quente das algas *P. flagellifera* (Rhodophyta), *S. vulgare* (Ochrophyta) e *U. fasciata* (Chlorophyta), com ênfase na quantificação de substâncias redutoras e atividade antioxidante total (métodos do DPPH e ABTS), atividade redutora de íons de ferro (ensaio quelante e FRAP) e inibição da peroxidação lipídica como forma de verificar se há diferenças entre as espécies estudadas e entre as duas estações do ano às quais as amostras foram coletadas.
2. Avaliar a atividade biológica dos extratos das algas *P. flagellifera*, *S. vulgare* e *U. fasciata*, investigando sua capacidade de inibir a enzima transcriptase reversa como método pré-avaliativo de atividade anti-HIV e avaliar a toxicidade frente a *Artemia salina*.
3. Avaliar o teor de proteínas solúveis totais, pigmentos fotossintetizantes (clorofilas, carotenoides totais e ficobiliproteínas) e atividade antioxidante a partir de material *in situ* congelado das espécies estudadas como forma de

compreender se há variação química entre as duas estações do ano que o trabalho foi realizado e entre as espécies estudadas.

4. Caracterizar o perfil lipídico e suas classes através de técnicas de cromatografia gasosa para as três espécies estudadas e investigar se há variação na composição dessas substâncias nas duas estações do ano em que as amostras foram coletadas.

Referências

- Abdala-Díaz, R. T.; Cabello-Pasini, A.; Pérez-Rodríguez, E.; Conde Álvarez, R. M.; Figueroa, F. L.; 2006. Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). *Mar. Biol.*, 148: 459-465.
- Ahn, M. J.; Yoon, K. D.; Kim, C. Y.; Min, S. Y.; Kim, Y.; Kim, H. J.; Kim, J. H.; Shin, C. G.; Lee, C. K.; Kim, T. G.; Kim, S. H.; Huh, H.; Kim, J. W. 2002. Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 integrase and antiviral activity of Korean seaweed extracts. *J. Appl. Phycol.*, 14(5): 325-329.
- Alves, A. M. 2008. Estudo morfo-taxonômico de Cladophorophyceae (Chlorophyta) do litoral do estado da Bahia, Brasil. Dissertação de Mestrado em Ciências – Botânica. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.
- Bahia, R. G.; Abrantes, D. P.; Brasileiro, P. S.; Pereira-Filho, G. H.; Amado-Filho, G. M. 2010. Rhodolith bed structure along a depth gradient on the northern coast of Bahia state, Brazil. *Brazilian J. Oceanogr.* 58: 323-337.
- Barbosa, K. B. F.; Costa, N. M. B.; Alfenas, R. C. G.; Paula, S. O.; Minin, V. P. R.; Bressan, J. 2008. Estresse oxidativo: avaliação de marcadores. *Nutrire: Revista Sociedade Bras. Alimen. Nutri.*, 33 (2): 111-128.
- Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P. 2006. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Quim.Nova*, 29: 113-123.
- Bernard, C.; Etienne, A. L.; Thomas, J. C. 1996. Synthesis and binding of phycoerythrin and its associated linkers to the phycobilisome in *Rhodella violacea* (Rhodophyta): compared effects of high light and translation inhibitors. *J. Phycol.*, 32: 265-271.

- Bischof, K.; Gómez, I.; Molis, M.; Hanelt, D.; Karsten, U.; Lüder, U.; Roleda, M. Y.; Zacher, K.; Wiencke, C. 2006. Ultraviolet radiation shapes seaweed communities. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 5: 141–166.
- Bocanegra, A.; Bastida, S.; Benedí, J.; Ródenas, S.; Sánchez- Muniz, F. J. 2009. Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *J. Med. Food.*, 12: 236-258.
- Boisvert, C.; Beaulieu, L.; Bonnet, C.; Pelletier, É. 2015. Assessment of the antioxidant and antibacterial activities of three species of edible seaweeds. *J. Food Biochem.*, 39(4): 377-387.
- Burri, B. J. 1997. Beta-carotene and human health: A review of current research. *Nutri. Res.*, 17: 547-580.
- Burritt, D. J.; Larkindale, J.; Hurd, C. L. 2002. Antioxidant metabolism in the intertidal red seaweed *Stictosiphonia arbuscula* following desiccation. *Planta* 215(5): 829–38.
- Burtin, P. 2003. Nutritional value of seaweeds. *Electr. J. Enviro. Agri. Food Chem.*, 2(4): 498-503.
- Burton, G. W.; Ingold, K. U. 1998. Autoxidation of biological molecules. 1. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *J. Ame. Chem. Soc.*, 103: 6472-6477.
- Calder, P. C. 2010. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. *Nutrients*, 2(3): 355-374.
- Chapman, V. J.; Chapman, D. J. 1980. Seaweeds and Their Uses. Chapman and Hall, London, p. 334.
- Conolly, N. J.; Drew, E. A. 1985. Physiology of *Laminaria*. III. Effect of a coastal eutrophication gradient on seasonal patterns of growth and tissue composition in *L. digitata* Lamour and *L. saccharina* (L.) Lamour. *Mar. Ecol. (Berl)*., 6: 181–195.
- Connan, S.; Delisle, F.; Deslandes, E.; Ar-Gall, E. 2006. Intrathallus phlorotannin content and antioxidant activity in Phaeophyceae of temperate waters. *Bot. Mar.*, 49: 39–46.
- Contreras, L.; Mella, D.; Moenne, A.; Correa, J. A. 2009. Differential responses to copper-induced oxidative stress in the marine macroalgae *Lessonia nigrescens* and *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae). *Aqua.Toxicol.*, 94(2): 94-102.

- Corpuz, M. J. A. T.; Osi, M. O; Santiago, L. A. 2013. Free radical scavenging activity of *Sargassum siliquosum* J. G. Agardh. *Inter. Food Res. J.*, 20(1): 291-297.
- Cox, S.; Abu-Ghannam, N.; Gupta, S. 2010. An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. *Inter. Food Res. J.*, 17: 205-220.
- Cox, S.; Turley, G. H.; Rajauria, G.; Abu-Ghannam, N.; Jaiswal, A. K. 2014. Antioxidant potential and antimicrobial efficacy of seaweed (*Himanthalia elongata*) extract in model food systems. *J. App. Phycol.*, 26(4): 1823-1831.
- Cruces, E.; Huovinen, P.; Gómez, I. 2012. Phlorotannin and antioxidant responses upon short-term exposure to UV radiation and elevated temperature in three south Pacific kelps. *Photochem. Photobiol.*, 88: 58-66.
- Cunningham, F. X.; Dennenberg, R. J.; Mustardy, L.; Jursinic, P. A.; Gantt, E. 1989. Stoichiometry of photosystem I, photosystem II, and phycobilisomes in the red alga *Porphyridium cruentum* as a function of growth irradiance. *Plant physiol.*, 91(3): 1179-1187.
- Damonte, E. B.; Matulewicz, M. C.; Cerezo, A. S. 2004. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. *Curr. Med. Chem.*, 11: 2399-2419.
- de la Coba, F.; Aguilera, J.; Figueroa, F. L.; De Gálvez, M. V.; Herrera, E. 2009. Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. *J. Appl. Phycol.*, 21: 161-169.
- Dillehay, T. D.; Ramirez, C.; Pino, M.; Collins, M. B.; Rossen, J.; Pino-Navarro, J. D. 2008. Monte Verde: seaweed, food, medicine, and the peopling of South America. *Science*, 320(5877): 784-786.
- Douek, D. C.; Roederer, M.; Koup, R. A. 2009. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Ann. Rev. Med.*, 60: 471.
- Faria, A. V.; Plastino, E. M. 2015. Physiological assessment of the mariculture potential of a *Gracilaria caudata* (Gracilariales, Rhodophyta) variant. *J. Appl. Phycol.*, 28(4): 2445-2452.
- Fleurence, J.; Gutbier, G.; Mabeau, S.; Leray, C. 1994. Fatty acids from 11 marine macroalgae of the French Brittany coast. *J. App. Phycol.*, 6(5-6): 527-532.

- Field, C. J., & Schley, P. D. 2004. Evidence for potential mechanisms for the effect of conjugated linoleic acid on tumor metabolism and immune function: lessons from n-3 fatty acids. *Amer. J. Clin. Nutri.*, 79(6): 1190S-1198S.
- Gerber P.; Dutcher J. D.; Adams E. V.; Sherman J. H. 1958. Protective effect of seaweed extracts for chicken embryos infected with influenza B including or mumps. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 99, 590–593.
- Glombitza K. W. 1979. Antibiotics from algae. In: Hoppe I.L.A., Ed., *Marine Algae in Pharmaceutical Science*, Waite de Gruyter, Berlin, New York, 303f.
- Gill, I., & Valivety, R. 1997. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. *Trends Biotech.*, 15(10): 401-409.
- Gómez, I.; Wulff, A.; Roleda, M. Y.; Huovinen, P.; Quartino, M. L.; Dunton, K.; Christian, W. 2009. Light and temperature demands of marine benthic microalgae and seaweeds in polar regions. *Bot. Mar.*, 52: 593-608.
- González Del Val, A.; Platas, G.; Basilio, A.; Cabello, A.; Gorrochategui, J.; Suay, I.; Vicente, F.; Portillo, E.; Jiménez Del Río, M.; Reina, G. G.; Peláez, F. 2001. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Int. Microbiol.*, 4: 35-40.
- Goss, R.; Jakob, T. 2010. Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae. *Photosynth. Res.*, 106: 103–122.
- Gray, D. W.; Lewis, L. A.; Cardon, Z. G. 2007. Photosynthetic recovery following desiccation of desert green algae (Chlorophyta) and their aquatic relatives. *Plant Cell Environ.*, 30: 1240–1255.
- Güroy, B. K.; Cirik, Ş.; Güroy, D.; Sanver, F.; Tekinay, A. A. 2007. Effects of *Ulva rigida* and *Cystoseira barbata* meals as a feed additive on growth performance, feed utilization, and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Turk. J. Vet. Ani. Sci.*, 31(2): 91-97.
- Guarantini, T. 2008. Antioxidantes de macroalgas marinhas: Caracterização química e atividade *in vitro*. Tese (doutorado). Programa de Pós Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química. Universidade São Paulo, São Paulo.
- Guedes, A. C.; Amaro, H. M.; Barbosa, C. R.; Pereira, R. D.; Malcata, F. X. 2011. Fatty acid composition of several wild microalgae and cyanobacteria,

- with a focus on eicosapentaenoic, docosahexaenoic and α -linolenic acids for eventual dietary uses. *Food Res. Inter.*, 44(9): 2721-2729.
- Guihéneuf, F.; Fouqueray, M.; Mimouni, V.; Ulmann, L.; Jacquette, B.; Tremblin, G. 2010. Effect of UV stress on the fatty acid and lipid class composition in two marine microalgae *Pavlova lutheri* (Pavlovophyceae) and *Odontella aurita* (Bacillariophyceae). *J. Appl. Phycol.*, 22(5): 629-638.
- Guihéneuf, F.; Mimouni, V.; Ulmann, L.; Tremblin, G. 2014. Environmental factors affecting growth and omega 3 fatty acid composition in *Skeletonema costatum*. the influences of irradiance and carbon source: Communication presented at the 25ème Congrès Annuel de l'Association des Diatomistes de Langue Française (ADLaF), Caen, 25-28 September 2006. *Diatom Res.*, 23(1): 93-103.
- Guihéneuf, F.; Mimouni, V.; Tremblin, G.; Ulmann, L. 2015. Light intensity regulates LC-PUFA incorporation into lipids of *Pavlova lutheri* and the final desaturase and elongase activities involved in their biosynthesis. *J. Agric. Food Chem.*, 63(4): 1261-1267.
- Gupta, S.; Abu-Ghannam, N. 2011. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends Food Sci. Technol.*, 22: 315-326.
- Gyawali, R.; Ibrahim, S. A. 2014. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46: 412-429.
- Hanelt, D. 1996. Photoinhibition of photosynthesis in marine macroalgae. In: F. L. Figueroa; C. Jiménez; J. L. Pérez-Lloréns; F. X. Niell (Eds.); Underwater Light and Algal Photobiology. Barcelona: *Sci. Mar.*, 60 (Suppl.1): 243-248.
- Haas, P. 1950. Certain peptides occurring in marine algae. *Biochem. J.*, 46: 503-505.
- Hanisak, M. D. 1979. Nitrogen limitation of *Codium fragile* ssp. *tomentosoides* determined by tissue analysis. *Mar. Biol.* 50: 333-337.
- Harder, R. 1917. Ernährungphysiologische untersuchungen an Cyanophyceen, Hauptsächlich am endophytischen *Nostoc punctiforme*. *Z. Bot.*, 9: 145.
- Häubner, N.; Schumann, R.; Karsten, U. 2006. Aeroterrestrial algae growing in biofilms on facades – response to temperature and water stress. *Microb. Ecol.*, 51: 285-293.

- Hollants, J.; Leliaert, F.; De Clerck, O.; Willems, A. 2013. What we can learn from sushi: a review on seaweed–bacterial associations. *FEMS Microbio. Ecol.*, 83(1): 1-16.
- Holzinger, A.; Karsten, U. 2013. Desiccation stress and tolerance in green algae: consequences for ultrastructure, physiological and molecular mechanisms. *Front. Plant Sci.*, 4: 327.
- Huang, C. B.; George, B.; Ebersole, J. L. 2010. Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms. *Arch. Oral Biol.*, 55(8): 555-560.
- Huovinen, P.; Gómez, I. 2011. Spectral attenuation of solar radiation in Patagonian fjord and coastal waters and implications for algal photobiology. *Cont. Shelf. Res.*, 31: 254–259.
- Iwashina, T. 2000. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J. Plant. Res.*, 113: 287-299.
- Junior, E. P. 2002. Modulação dos níveis de pigmentos e ácidos graxos em algas marinhas: Função dos carotenoides e efeitos de estresse ambiental. Tese (Doutorado). Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 129p.
- Kamiya, M.; Nishio, T.; Yokoyama, A.; Yatsuya, K.; Nishigaki, T.; Yoshikawa, S.; Ohki, K. 2010. Seasonal variation of phlorotannin in sargassacean species from the coast of the sea of Japan. *Phyco. Res.*, 58: 53-61.
- Kandhasamy, M.; Arunachalam, K. D. 2008. Evaluation of *in vitro* antibacterial property of seaweeds of southeast coast of India. *African J. Biotechnol.*, 7(12): 1958-1961.
- Karsten, U.; Lütz, C.; Holzinger, A. 2010. Ecophysiological performance of the aeroterrestrial green alga *Klebsormidium crenulatum* (Klebsormidiophyceae, Streptophyta) isolated from an alpine soil crust with an emphasis on desiccation stress. *J. Phycol.*, 4: 1187–1197.
- Karsten, U.; Holzinger, A. 2012. Light, temperature and desiccation effects on photosynthetic activity and drought-induced ultrastructural changes in the green alga *Klebsormidium dissectum* (Streptophyta) from a high alpine soil crust. *Microb. Ecol.*, 63: 51–63.
- Korbee-Peinado, N.; Abdala-Díaz, R.T.; Figueroa, F.L.; Helbling, E.W. 2004. Ammonium and UV radiation simulate the accumulation of mycosporine-like

- amino acids in *Porphyra columbina* (Rhodophyta) from Patagonia, Argentina. *J. Phycol.*, 40: 248–259.
- Korbee, N.; Figueroa, F. L.; Aguilera, J. 2005. Effect of light quality on the accumulation of photosynthetic pigments, proteins and mycosporine-like amino acids in the red alga *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Photochem. Photobiol. B.*, 80: 71–78.
- Koivikko, R. 2008. Brown algal phlorotannins improving and applying chemical methods. *Ann. Univer. Turk. Al.* 381, 60: 54p.
- Kumar, M.; Kumari, P.; Trivedi, N.; Shukla, M. K.; Gupta, V.; Reddy, C. R. K.; Jha, B. 2011. Minerals, PUFAs and antioxidant properties of some tropical seaweeds from Saurashtra coast of India. *J. Appl. Phycol.*, 23: 797-810.
- Lahaye, M.; Robic, A. 2007. Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules*, 8: 1765–1774.
- Lanciotti, R.; Gianotti, A.; Patrignani, A.; Belletti, N.; Guerzoni, M.E.; Gardini, F. 2004. Use of natural aroma compounds to improve shelf-life of minimally processed fruits. *Trends Food Sci. Technol.*, 15: 201-208.
- Lee, J. H.; Lee, T. K.; Kang, R. S.; Shin, H. J.; Lee, H. S., 2007. The *in vitro* antioxidant activities of the bromophenols from the red alga *Tichocarpus crinitus* and phenolic derivatives. *J. Korean Mag. Reson. Soc.*, 11: 56-63.
- Levy, I.; Gantt, E. 1988. Light acclimation in *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta): growth, photosynthesis, and phycobilisomes. *J. Phycol.*, 24: 452-458.
- Lhullier, C.; Horta, P. A.; Falkenberg, M., 2007. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 16: 158-163.
- Lyra, G. M.; Santos, A. C. C.; Nunes, J. M. C. 2007. Rodofíceas bentônicas das praias da Concha e Engenhoca, Município de Itacaré – Bahia, Brasil. *Acta Bot. Malac.*, 32: 234-240.
- Machado, H.; Nagem, T. J.; Peters, V. M.; Fonseca, C. S.; Oliveira, T. T., 2008. Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Bol. Cent. Biol. Repr.*, 27: 33-39.
- Marins, B. V.; Brasileiro, P. A.; Barreto, M. B. B.; Nunes, J. M. C.; Yoneshigue-Valentin, Y.; Amado Filho, G. M. 2008. Subtidal bentic marine algae of the Todos os Santos Bay, Bahia state, Brazil. *Oecol. Brasili.*, 12: 229-242.

- Martínez, B.; Rico, J. M. 2002. Seasonal variation of P content and major N pools in *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *J. Phycol.*, 38: 1082–1089.
- Martínez, B.; Arenas, F.; Rubal, M.; Burgués, S.; Esteban, R.; García-Plazaola, I.; Figueroa, F. L.; Pereira, R.; Saldaña, L.; Sousa-Pinto, I.; Trilla, A.; Viejo, R. M. 2012. Physical factors driving intertidal macroalgae distribution: physiological stress of a dominant furoid at its southern limit. *Oecologia*, 170: 341–353.
- Matsuse, I. T.; Lim, Y. A.; Hattori, M.; Correa, M.; Gupta, M. P. 1999. A search for Anti-viral properties in Panamanian medicinal plants: the effects on HIV and its essential enzymes. *J. Ethnopharmacol.*, 64: 15–22.
- McDermid, K. J.; Stuercke, B. 2003. Nutritional composition of edible Hawaiian seaweeds. *J. Appl. Phycol.*, 15: 513–524.
- Melo, E. A.; Guerra, N. B. 2002. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *Bol. SBCTA*, 36: 1-11.
- Michanek G. 1979. Seaweed resources for pharmaceutical uses. In: Hoppe I.L.A., Ed., *Marine Algae in Pharmaceutical Science*, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 203–235 p.
- Mohamed, S.; Hasim, S. N.; Rahman, H. A. 2012. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends Food Sci. Technol.*, 23: 83–96.
- Mordi, R. C.; Walton, J. C.; Burton, G. W.; Hughes, L.; Ingold, K. U.; Lindsay, D. A.; Moffatt, D. J. 1993. Oxidative-degradation of beta-carotene and beta-apo-8'-carotenal. *Tetrahedron*, 49: 911-928.
- Mouritsen, O. G.; Dawczynski, C.; Duelund, L.; Jahreis, G.; Vetter, W.; Schröder, M. 2013. On the human consumption of the red seaweed dulse (*Palmaria palmata* (L.) Weber & Mohr). *J. Appl. Phycol.*, 25(6): 1777-1791.
- Mozaffarian, D.; Wu, J. H. 2011. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J. Amer. Col. Cardio.*, 58(20): 2047-2067.
- Novoa, A. V.; Montidome, M.; Mancini-Filho, J.; Linares, A. S.; Tanae, M. M.; Torres, L. M. B.; Lapa, A. J., 2001. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelim) Howe. *Rev. Bra.Ciê. Farm.*, 37: 373-381.

- Nunes, J. M. C. 2005a. Rodofíceas marinhas bentônicas do estado da Bahia, Brasil. Tese de Doutorado em Ciências. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Nunes, J. M. C. 2005b. A família Liagoraceae (Rhodophyta, Nemaliales) no estado da Bahia, Brasil. *Hoehnea*, 32: 429-444.
- Nunes, J. M. C.; Paula, E. J. 2002. Composição e distribuição das Phaeophyta nos recifes da região metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. *Iheringia, Série Bot.*, 57: 113-130.
- Nunes, J. M. C.; Paula, E. J. 2004a. Chnoosporaceae, Scytosipnoneaceae, Sporochneaceae e Sphacelariaceae (Phaeophyta) no estado da Bahia, Brasil. *Biotemas*, 17: 7-28.
- Nunes, J. M. C.; Paula, E. J. 2004b. Estudos taxonômicos de Ectocarpaceae e Ralfsiaceae (Phaeophyta) da região metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. *Acta Biol. Leopold.*, 26: 37-50.
- Nunes, J. M. C.; Paula, E. J. 2006. O gênero *Dictyopteris* J. V. Lamour. (Dictyotaceae – Phaeophyta) no estado da Bahia – Brasil. *Hidrobiol.* 16: 251-258.
- Nunes, J. M. C.; Guimarães, S. M. P. B. 2009. Primeira referência de plantas gametofíticas em *Spermothamnion nonato* (Ceramiales, Rhodophyta). *Rodriguesia*, 60: 259-264.
- Nunes, J. M. C.; Guimarães, S. M. P. B. 2010. Morfología y toxonomía de *Scinaia halliae* (Scinaiaceae, Rhodophyta) em El litoral de Bahia y Espírito Santo, Brasil. *Rev. Biol. Mar. Oceanog.*, 45: 159-164.
- Nunes, J. M. C.; Santos, A. C. C.; Minervino, A.; Brito, K. S. 1999. Algas marinhas bentônicas do município de Ilhéus, Bahia, Brasil. *Acta Bot. Malac.*, 24: 5-12.
- Nunes, J. M. C.; Santos, A. C. C.; Minervino, A.; Brito, K. S. 2001. Marine benthic algae from Uruçuca, Bahia, Brazil. *Acta Bot. Malac.*, 26: 181-187.
- Pavia, H.; Cervin, G.; Lindgren, A.; Aberg, P. 1997. Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophylum nodosum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 157: 139-146.
- Palace, V. P.; Khaper, N.; Quin, Q. I.; Singal, P. K. 1999. Antioxidants potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Rad. Biol. Med.*, 26: 746-771.

- Paul, V. J.; Fenical, W. 1983. Isolation of halimedatrial: Chemical defense adaptation in the calcareous reef-building alga *Halimeda*. *Science*, 221: 747–749.
- Paul, V. J.; Puglisi, M. P.; Ritson-Williams, R. 2006. Marine chemical ecology. *Nat. Prod. Repor.*, 23(2): 153–80.
- Penesyan, A.; Marshall-Jones, Z.; Holmstrom, C.; Kjelleberg, S.; Egan, S. 2009. Antimicrobial activity observed among cultured marine epiphytic bacteria reflects their potential as a source of new drugs. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 69(1): 113-124.
- Peng, Y.; Enyi, X.; Kai, Z.; Mangaladoss, F.; Xianwen, Y.; Xuefeng, Z.; Yifei, W.; Bin, Y.; Xiuping, L.; Juan, L.; Yonghong, L. 2012. Nutritional and chemical composition and antiviral activity of cultivated seaweed *Sargassum naozhouense* Tseng et Lu. *Mar. Drugs*, 11(1): 20–32.
- Pereira, H.; Barreira, L.; Figueiredo, F.; Custódio, L.; Vizetto-Duarte, C.; Polo, C.; Rešek, E.; Engelen, A.; Varela, J. 2012. Polyunsaturated fatty acids of marine macroalgae: potential for nutritional and pharmaceutical applications. *Mar. Drugs*, 10(9): 1920-1935.
- Pérez-Lloréns, J. L.; Vergara, J. J.; Pino, R. R.; Hernandez, I.; Peralta, G.; Niell, F. X. 1996. The effect of photoacclimation on the photosynthetic physiology of *Ulva curvata* and *Ulva rotundata* (Ulvales, Chlorophyta). *Eur. J. Phycol.*, 31: 349–359.
- Pimentel, B. M. V.; Francki, M.; Gollücke, B. P. 2006. Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos. *Rev. Eletro. Farm.*, 3: 109-122.
- Plaza, M.; Herrero, M.; Cifuentes, A.; Ibáñez, E. 2009. Innovative natural functional ingredients from microalgae. *J. Agri. Food Chem.*, 57: 7159-7170.
- Pulz, O.; Gross, W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 65: 635–648.
- Radwan, S. S. 1991. Sources of C20-polyunsaturated fatty acids for biotechnological use. *App. Microbiol. Biotec.*, 35(4): 421-430.
- Rahman, K. 2001. Historical perspective on garlic and cardiovascular disease. *The J. Nutri.*, 131(3): 977S-979S.

- Raymundo, M. S.; Horta, P.; Fett, R., 2004. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, 40: 495-503.
- Renz, S. V., 2003. Oxidação e antioxidantes. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do tecido animal no Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS, 11p.
- de Souza, M. C. R.; Marques, C. T.; Dore, C. M. G.; da Silva, F. R. F.; Rocha, H. A. O.; Leite, E. L. 2007. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *J. Appl. Phycol.*, 19(2), 153-160.
- Sakamoto, M. M. 1993. Ações farmacológicas do extrato de alga marinha *Bryopsis pennata* (Chlorophyta, Caulerpales). Tese de doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 124p.
- Sampath-Wiley, P.; Neefus, C. D.; Jahnke, L. S. 2008. Seasonal effects of sun exposure and emersion on intertidal seaweed physiology: fluctuations in antioxidant contents, photosynthetic pigments and photosynthetic efficiency in the red alga *Porphyra umbilicalis* Kützinger (Rhodophyta, Bangiales). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 361: 83–91.
- Santos, J. C. 2010a. Radiação ultravioleta: Estudos dos índices de radiação, conhecimento e prática de prevenção a exposição na região de Ilhéus/Itabuna- Bahia. Dissertação de mestrado. Programa Regional de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Univesidade Estadual de Santa Cruz, 174p.
- Santos, J. P. 2010b. Avaliação do teor e análise qualitativa do ágar das espécies *Gelidiella acerosa* (Forsskål) Feldmann and G. Hamel (Gelidiales, Rhodophyta) e *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie em costões rochosos dos Municípios de Ilhéus e Uruçuca. 2010. 94f. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Feira de Santana,.
- Schmid, M.; Guihéneuf, F.; Stengel, D. B. 2014. Fatty acid contents and profiles of 16 macroalgae collected from the Irish Coast at two seasons. *J. App. Phycol.*, 26(1): 451-463.
- Schmitz, G.; Ecker, J. 2008. The opposing effects of n–3 and n–6 fatty acids. *Prog. Lipid Res.*, 47(2): 147-155.

- Shiu, C. T.; Lee, T. M. 2005. Ultraviolet-B-induced oxidative stress and responses of the ascorbate–glutathione cycle in a marine macroalga *Ulva fasciata*. *J. Exp. Bot.*, 56(421): 2851-2865.
- Sies, H. 1993. Strategies of antioxidant defence: review. *Eur. J. Biochem.*, 215: 213-219.
- Silva, F. R. 2008. Estudo da radiação ultravioleta na cidade de Natal – RN. 75 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Materiais; Projetos Mecânicos; Termociências) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.
- Singh, I. P.; Bharate, S. B.; Bhutani, K. K. 2005. Anti-HIV natural products. *Curr. Sci. Banga.*, 89(2): 269.
- Sinha, S.; Akram, A.; Tuhin, G.; Paul, S.; Bimalendu, R. 2010. Polysaccharides from *Sargassum tenerrimum*: Structural features, chemical modification and anti-viral activity. *Phytochem.*, 71(2-3): 235–242.
- Souza, M. C. R.; Marques, C. T.; Dore, C. M. G.; Silva, F. R. F.; Rocha, H. A. O.; Leite, E. L. 2007. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *J. Appl. Phycol.*, 19: 153-160.
- Stein, E. M. 2011. Avaliação da atividade biológica e composição química do extrato de algas vermelhas do gênero *Laurencia* (Rhodomelaceae, Ceramiales) do litoral do Espírito Santo, Brasil. 167f. Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- Topuz, O. K.; Gokoglu, N.; Yerlikaya, P.; Ucak, I.; Gumus, B. 2015. Optimisation of antioxidant activity and phenolic compound extraction conditions from red seaweed (*Laurencia obtusa*). *J. Aqua. Food Prod. Technol.*, 25(3): 414-422.
- United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). 2014. Report on the global AIDS epidemic, Available online: http://www.unaids.org/en/HIV_data/2014GlobalReport/default.asp.
- van Ginneken, V. J.; Helsper, J. P.; de Visser, W.; van Keulen, H.; Brandenburg, W. A. 2011. Polyunsaturated fatty acids in various macroalgal species from north Atlantic and tropical seas. *Lipids Hhealth Disea.*, 10(1): 1.
- Veiga, V. R.; Pinto, A. C.; Maciel, M. A. M. 2005. Medicinal Plants: Safe cure?. *Quím. Nova*, 28: 519-528.

- Vergara, J. J.; Bird, K. T.; Niell, F. X. 1995. Nitrogen assimilation following NH_4^+ pulses in the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis*: effect on C metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 122: 253–263.
- Ward, O. P.; Singh, A. 2005. Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochem.*, 40(12): 3627-3652.
- Weiss, R. A. 1993. E EWC. *Science*, 260: 1273.
- Witvrouw, M.; De Clercq, E. 1997. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *General Pharmacology: The Vascular System*, 29(4): 497–511.
- Wordell filho, J. A. 2004. Manejo ecológico de doenças de plantas em Santa Catarina. In: Stadnik, M. J.; Talamini, V. (eds.). Manejo ecológico de doenças de plantas. Florianópolis, p. 31.
- Wu, H.; Jiang, H.; Liu, C.; Deng, Y. 2015. Growth, pigment composition, chlorophyll fluorescence and antioxidant defenses in the red alga *Gracilaria lemaneiformis* (Gracilariales, Rhodophyta) under light stress. *South African J. Bot.*, 100: 27-32.
- Xenopoulos, M. A.; Frost, P. C.; Elser, J. J. 2002. Joint effects of UV radiation and phosphorus supply on algal growth rate and elemental composition. *Ecol.*, 83: 423–435.
- Zahra, R.; Mehranian, M.; Vahabzadeh, F.; Sartavi, K. 2007. Antioxidant activity of extract from a brown alga, *Sargassum boveanum*. *Afric. J. Biotech.*, 6(24): 2740–2745.
- Zhang, Q.; Zhang, J. Z.; Shen, J. K.; Silva, A.; Denis, D. A.; Barrow, C. J. 2006. A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *J. App. Phycol.*, 18(3–5): 445–450.
- Zhong, Y.; Chen, T.; Zheng, W.; Yang, Y. 2014. Selenium enhances antioxidant activity and photosynthesis in *Ulva fasciata*. *J. App. Phycol.*, 27(1): 555-562.
- 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.

Metodologia Geral

Este estudo inclui diferentes enfoques fisio-químicos complementares que compõem os quatro capítulos deste trabalho. Sendo assim, a descrição do delineamento amostral e das metodologias gerais do presente trabalho foram divididas em quatro aspectos distintos que serão descritos nos itens a seguir e esquematizados no fluxograma da Figura 1:

- 2.1 Testes preliminares com algas de Itanhaém
- 2.2 Estudos bioquímicos e de bioatividade
- 2.3 Estudos fisiológicos
- 2.4 Doutorado sanduíche

2.1. Testes preliminares com algas de Itanhaém

Com o objetivo de avaliar aspectos fitoquímicos e fisiológicos de algas dominantes do litoral sul da Bahia foi necessário responder alguns questionamento mediante testes preliminares que estão resumidos na Figura 1A. Uma das incógnitas era conhecer a estabilidade dos componentes químicos de algas processadas com diferentes metodologias de secagem (ar condicionado, em sílica gel e em estufa a 40°C), assim como estimar o rendimento dos extratos sob diferentes solventes de extração (hexano, metanol, água a temperatura ambiente e água a 70°C) e testes com o protocolo de atividade antioxidante. Para tal, testes preliminares foram realizados com material coletado na Praia de Cibratel em Itanhaém, litoral sul do estado de São Paulo. O local escolhido foi devido à proximidade e logística de coleta.

Figura 1. Fluxograma representando o delineamento amostral e experimental do presente trabalho, com os parâmetros medidos segundo os aspectos de: (A) Testes preliminares com algas de Itanhaém, (B) Estudos fitoquímicos e de bioatividade, (C) Estudos fisiológicos e (D) Doutorado sanduíche.

Assim, no dia 1° de março de 2013 foram coletados *Sargassum vulgare* C. Agardh (Ochrophyta), *Palisada flagellifera* (J. Agardh) K.W. Nam (Rhodophyta) e *Ulva fasciata* Delile (Chlorophyta) na Praia de Cibratel em Itanhaém (24°13'31"S, 46°51'7"W), litoral sul do estado de São Paulo, acondicionados em sacos plásticos e transportados em caixas térmicas para o Laboratório de Algas Marinhas "Édison José de Paula" do Instituto de Biociências da USP. O material foi cuidadosamente triado, limpo de macroepífitos e lavado com abundante água do mar filtrada. Aproximadamente 1 g de massa fresca (MF) de cada uma das espécies (n = 5) foi seca de três formas distintas (tratamentos): (a) ar condicionado por cinco dias, (b) estufa a 40°C por três dias até massa constante e (c) em sílica gel. A partir dessas amostras foram avaliados:

2.1a) rendimento de MF para massa seca (MS). Este teste permitiria estimar a quantidade de perda de massa após as respectivas secagens do material, de forma a poder conhecer, aproximadamente, a quantidade de biomassa úmida necessária no momento de coleta (detalhes e resultados são apresentados no Anexo 1);

2.1b) rendimento dos extratos sob diferentes solventes de extração (hexano, metanol, água a temperatura ambiente e água a 40°C). Para tal, as amostras de cada um dos tratamentos de secagem, aproximadamente 240 mg MS (n = 5), foram extraídas por maceração em 1 mL de metanol P.A. por três vezes a cada 24h, seguido de extração em água a temperatura ambiente por três vezes a cada 24h e finalmente em água quente a 70°C por três vezes por 1 h. O sobrenadante, produto da extração do mesmo solvente, foi filtrado e reunido como um único extrato, e foi chamado de extrato bruto: metanólico (MeOH), aquoso a frio (Aq. Frio) e aquoso a quente (Aq. Quente). Os extratos metanólicos foram concentrados por rotaevaporação a 40°C e, posteriormente, liofilizados. Os extratos aquosos foram congelados em nitrogênio líquido e liofilizados. Todos os extratos brutos liofilizados foram mantidos em freezer - 80°C até posteriores análises (detalhes e resultados são apresentados no Anexo 1);

2.1c) o ensaio de potencial antioxidante foi analisado apenas para os extratos metanólicos de cada um dos tratamentos de secagem através do ensaio de sequestro do radical DPPH. A ação antioxidante foi testada a partir

de uma concentração inicial de extrato bruto de 15 mg.mL⁻¹ e diluições para alcançar as concentrações de 30, 50 e 100% foram realizadas em relação ao volume final de amostra correspondente ao protocolo. Adicionalmente, foi testada a estabilidade do reagente de DPPH, pois a maioria dos protocolos sugere utilizar a solução de DPPH no mesmo dia da análise. Assim, a estabilidade da solução armazenada a 4°C foi verificada ao longo dos dias mediante a mensuração da sua absorbância (detalhes e resultados são apresentado no Anexo 1).

2.2. Estudos bioquímicos e de bioatividade

Este bloco experimental foi realizado segundo a descrição sumarizada na Figura 1B e com material coletado na região do mesolitoral do costão rochoso do Morro de Pernambuco (14°47'00"S, 39°02'00"W), situado no litoral sul da Bahia, Município de Ilhéus, nordeste do Brasil (Fig. 2). O litoral baiano apresenta cerca de 1.103 km de extensão de costa. O Município de Ilhéus está inserido na faixa costeira do litoral nordestino que é também conhecida como Zona da Mata, apresentando clima equatorial ou tropical úmido, segundo a classificação proposta por Köppen – Geiger (1936). A média anual de temperatura é de 24,5°C (Alvares et al., 2013), com totais pluviométricos anuais entre 600 e 3.000 mm. O período mais chuvoso é registrado de abril a junho, com picos de chuva em maio; enquanto que o mais seco é registrado de outubro a dezembro (Molion & Bernardo, 2002).

Figura 2. Mapa mostrando a área de coleta, com destaque para o Estado da Bahia (seta vermelha) e para costa do Município de Ilhéus situado ao sul do Estado (asterisco). As fotos ilustram os locais onde as espécies foram coletadas.

2.2.1. Material biológico

Aproximadamente 3 kg MF de *P. flagellifera* (Fig. 3A), *S. vulgare* (Fig. 3B) e *U. fasciata* (Fig. 3C) foram coletadas durante a maré baixa, de 1 a 5 de novembro de 2013 (época de seca) e em 16 de maio de 2014 (época chuvosa), com o objetivo de avaliar a diversidade fitoquímica e atividade biológica e possíveis variações sazonais. As algas coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas em caixas térmicas para o Laboratório de Ecotoxicologia da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC, Ilhéus). No laboratório, as algas foram triadas, limpas de macroepífitos e outros organismos associados e lavadas com água da torneira para retirada de resíduos de areia e sal. Após o processo de triagem, porções de cinco indivíduos de cada espécie foram separados e secos em sílica gel para posteriores análises moleculares de identificação taxonômica, com auxílio da técnica de “DNA barcode” (detalhes e resultados são apresentados no Anexo 2).

Figura 3. Aspecto geral das espécies estudadas. (A) *Sargassum vulgare* (Ochrophyta), (B) *Palisada flagellifera* (Rhodophyta) e (C) *Ulva fasciata* (Chlorophyta) coletadas no costão rochoso do Morro de Pernambuco, Ilhéus, Bahia.

A porção restante de cada indivíduo foi fixada em solução de formalina 4%, preparada em água do mar filtrada, para confecção de exsicatas e depósito no Herbário da Universidade de São Paulo (SPF) (Tabela1).

Tabela 1. Número de voucher de depósito de exsicatas no Herbário da Universidade de São Paulo (SPF), referente às coletas dos anos de 2013 e 2014 na Praia do Morro de Pernambuco.

Espécies	Coletas Praia do Morro de Pernambuco	
	Novembro 2013	Mai 2014
<i>Sargassum vulgare</i>	SPF 57908	SPF 57907 SPF 57909
<i>Palisada flagellifera</i>	SPF 57902	SPF 57904 SPF 57905
<i>Ulva fasciata</i>	SPF 57903	SPF 57906

O restante da biomassa foi seco em estufa a 40°C, até atingir peso constante (aproximadamente três dias) e, em seguida, pesados para calcular o percentual de umidade para cada amostra. As amostras foram então trituradas até obter um fino pó em moinho de facas, acondicionadas em recipientes e armazenadas em caixas plásticas com sílica gel, protegidas da luz e da umidade, até o momento da extração.

2.2.2. Obtenção dos extratos

As amostras pulverizadas foram extraídas por maceração em metanol (n = 5), seguido de extração em água a 25°C (temperatura ambiente; n = 5) e finalmente em água a 70°C (n = 5); sempre em uma proporção de 50 g MS em 100 mL de solvente. O procedimento de obtenção dos extratos brutos foi igual ao descrito no item 2.1b. O rendimento da extração para cada um dos solventes foi calculado baseado na massa seca inicial da amostra e na massa do extrato bruto seco obtido de cada alga. A partir desses extratos foram avaliados o potencial antioxidante e a atividade biológica, segundo descrições a seguir.

2.2.3. Potencial antioxidante in vitro dos extratos brutos

Foram escolhidos seis diferentes metodologias para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos brutos das espécies estudadas: sequestro do radical DPPH, sequestro do radical ABTS, método da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico, poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), poder antioxidante pela quelação de metais e quantificação de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu.

De forma geral, os ensaios analíticos para determinação do potencial antioxidante baseiam-se em dois mecanismos de reação que são a transferência de um átomo de hidrogênio (HAT; do inglês *Hydrogen Atom Transfer*) e a transferência de um elétron (SET; do inglês *Single Electron Transfer*). Os métodos baseados no mecanismo de HAT investigam a capacidade dos antioxidantes em doar átomos de hidrogênio para bloquear a ação de radicais peroxila ($\text{ROO}\bullet$). Os métodos baseados no mecanismo de SET detectam a capacidade da amostra em reduzir o oxidante, que não precisa ser estritamente um radical livre, ao contrário dos ensaios com mecanismo de HAT (Castelo-Branco & Torres, 2011).

Para os ensaios do potencial antioxidante, 3 mg MS de extrato bruto (n = 5) foram dissolvidos em 1 mL de metanol (extratos alcoólicos) ou em 1 mL de DMSO 10% (no caso dos extratos aquosos, pois foram imiscíveis em álcool). A

partir dessa solução mãe de extrato, a ação antioxidante foi analisada nas concentrações 25, 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de extrato bruto (concentração final) mediante a respectiva reação e leitura das absorbâncias em espectrofotômetro de microplacas UV-vis EPOCH (Biotek Instruments, EUA).

Para todos os ensaios antioxidantes foi preparado um branco amostra para cada amostra, a fim de registrar a possível interferência da coloração da amostra na absorbância da reação, pois devido à presença de pigmentos e outras substâncias, estas poderiam interferir na leitura e interpretação dos resultados. As absorbâncias dos brancos amostras foram utilizadas como brancos e descontadas dos valores das absorbâncias das respectivas amostras de reação. Alguns ensaios incluíram um controle negativo.

Os resultados foram expressos em percentual de atividade antioxidante *versus* concentração de extrato bruto, que foram utilizados para calcular os valores de EC_{50} (concentração efetiva do extrato para reduzir em 50% a atividade antioxidante máxima). Os cálculos de EC_{50} foram feitos através de ajustes de curvas para um modelo sigmoide de dose-resposta no programa Prisma Graph Pad® 6.

Os padrões ácido gálico (Sigma-Aldrich, Brasil) e Trolox (Sigma-Aldrich, Brasil) foram utilizados para a construção das curvas nas faixas de concentrações específicas para cada ensaio. As curvas padrões foram empregadas para calcular o potencial antioxidante em equivalentes de padrão (mg.g^{-1}).

A seguir, se apresenta a descrição de cada um dos ensaios antioxidantes.

2.2.3.1. Sequestro do radical DPPH

O ensaio de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um dos mais amplamente utilizados para investigação do potencial antioxidante. O método utilizado foi modificado por Pires et al. (em preparação) a partir dos ensaios descritos em Brand-Williams et al. (1995), Santos (2014) e Furlan et al. (2015). Este ensaio se baseia primariamente no mecanismo de SET e, marginalmente, no de HAT. A substância com potencial antioxidante age como doador de um átomo de hidrogênio quando é adicionada à solução de DPPH.

Essa mistura provoca a redução do radical DPPH em hidrazina, o que promove a mudança simultânea na coloração, de violeta para amarelo claro (Fig. 4).

Figura 4. Esquema da reação do ensaio de sequestro do radical livre DPPH.

Alíquotas de 20 μL de amostra, nas respectivas concentrações de extrato bruto a serem analisadas, foram misturadas com 280 μL de solução de DPPH $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$, preparado em metanol (Sigma-Aldrich, Brasil), e incubadas por 30 min sob temperatura ambiente e protegidas da luz. Após o tempo de incubação, as leituras das absorbâncias foram feitas no comprimento de onda de 517 nm. Foram elaboradas curvas padrão de ácido gálico (Fig. 5A; 0 – 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; $y = -0,3205x + 0,7303$; $R^2 = 0,9926$) e de Trolox (Fig. 5B; 0 – 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; $y = -0,05382x + 0,8436$; $R^2 = 0,9965$).

Figura 5. Curvas padrões de (A) ácido gálico (0-2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e (B) Trolox (0-10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) utilizadas para calcular o potencial antioxidante dos extratos das algas estudadas em equivalente padrão através do método sequestro do radical DPPH.

2.2.3.2. Sequestro do radical ABTS

O método de sequestro do radical ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina)-6- sulfônico) utilizado no presente trabalho foi baseado em Yang et al. (2011) e Santos (2014) e modificado por Torres et al. (em preparação). Assim como o ensaio de sequestro do DPPH, este baseia-se nos mecanismos de SET e HAT. O ensaio de sequestro do radical ABTS (ABTS⁺) estima a capacidade do antioxidante em capturar o radical cromóforo ABTS, que tem sua absorbância reduzida à medida que reage com os antioxidantes. No ensaio, o ABTS é oxidado quimicamente pela adição de persulfato de

potássio levando à formação da espécie reativa $ABTS^+$, que possui coloração verde intensa ($\lambda_{max} = 734 \text{ nm}$); a atividade antioxidante é medida a partir da perda dessa coloração verde.

A solução reativa de ABTS 7,46 mM foi obtida pela mistura de 17,6 μL de solução de persulfato de potássio (140 mM; Sigma-Aldrich, Brasil) com a solução de ABTS 7 mM (Sigma-Aldrich, Brasil), que foi mantida a temperatura ambiente e no escuro por no mínimo 16 h. Após isso, a solução reativa foi diluída em metanol na proporção de 1:60 (v/v) ou até alcançar a absorbância entre 0,8 e 1 no comprimento de onda de 734 nm.

Alíquotas de 20 μL de amostras, nas respectivas concentrações de extrato bruto a serem analisadas, foram misturadas com 280 μL de solução reativa de ABTS e incubadas por 10 min sob temperatura ambiente e protegidas da luz. As leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 734 nm. As curvas padrões de ácido gálico e Trolox foram elaboradas nas concentrações de 0 – 1,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para ácido gálico (Fig. 6A; $y = -1,4687x + 0,8566$; $R^2 = 0,9932$) e de 0 – 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para Trolox (Fig. 6B; $y = -0,1183x + 0,8178$; $R^2 = 0,9962$).

Figura 6. Curvas padrões de (A) ácido gálico (0 – 1,5 μg.mL⁻¹) e (B) Trolox (0 - 5 μg.mL⁻¹) utilizadas para estimar o potencial antioxidante dos extratos das algas estudadas através do método sequestro do radical ABTS.

2.2.3.3. Método da co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico

Para avaliação da co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico foi utilizada a metodologia de Harb et al. (em preparação), modificada de Duarte-Almeida et al. (2006) e Santos (2014). Entre os métodos para avaliar a peroxidação lipídica, destaca-se o sistema de co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico, originalmente descrito por Marco (1968) e modificado posteriormente por Miller (1971). Este método permite avaliar a capacidade de uma determinada substância em prevenir a oxidação do β-caroteno, protegendo-o dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (Silva et al., 1999), ou seja, o método avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (Duarte-Almeida et al., 2006). O método utiliza

ácido linoleico, monopalmitato de polioxietileno sorbitan (Tween 40) e β -caroteno.

A solução reativa (2 mg.mL^{-1}) foi preparada em diclorometano e misturando ácido linoleico (Sigma-Aldrich, Brasil), Tween 40 (Sigma-Aldrich, Brasil) e β -caroteno (Sigma-Aldrich, Brasil). Essa solução foi aquecida em banho-maria a 45°C até a completa evaporação do diclorometano, em seguida, 20 mL de água ultrapura previamente saturada em oxigênio foi adicionada e a solução foi homogeneizada. A solução deve possuir aparência translúcida e apresentar absorvância entre 0,8 e 1 no comprimento de onda de 450 nm.

Alíquotas de 20 μL de amostra, nas respectivas concentrações de extrato bruto a serem analisadas, foram misturadas com 280 μL de solução reativa contendo o β -caroteno. As absorvâncias iniciais tiveram as leituras medidas em espectrofotômetro no comprimento de onda 450 nm e a cada 20 min durante 2 h de reação, com incubação das amostras a 45°C , agitação constante e protegidas da luz. A curva padrão de Trolox foi elaborada na concentração de 0 – $1,25 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Fig. 7; $y = 0,5377x + 0,1593$; $R^2 = 0,9985$).

Figura 7. Curva padrão de Trolox (0 – $1,25 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) utilizada para estimar o potencial antioxidante dos extratos das algas estudadas através do método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico.

2.2.3.4. Poder antioxidante de redução do ferro

O ensaio do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) foi baseado em Urrea-Victoria et al. (2016), modificado de Rufino et al. (2006), Santos (2014) e Furlan et al. (2015). Esse ensaio é baseado no mecanismo de SET e quantifica a capacidade do antioxidante em reduzir o complexo ferro férrico tripiridiltriazina (Fe^{+3} -TPTZ) para o complexo ferro ferroso tripiridiltriazina (Fe^{+2} -TPTZ) em pH 3,6. No ensaio FRAP, o complexo Fe^{+2} -TPTZ apresenta coloração azul e a absorbância da solução é medida no comprimento de onda de 595 nm, permitindo o acompanhamento da capacidade redutora da amostra. Este ensaio tem sido eficiente para quantificar o potencial antioxidante principalmente de amostras que contenham substâncias fenólicas e que possuam um comportamento mais ácido (Gorinstein et al., 2003; Szydowska-Czerniak et al., 2008).

A solução do reagente FRAP foi preparada em um frasco âmbar no dia da análise, e consistiu na adição de tampão acetato 0,3 M (pH 3,6), solução de TPTZ 10 mM (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina; Fluka Sigma-Aldrich, Brasil) preparada em HCl (Synth, Brasil) e solução aquosa de cloreto férrico 20 mM (Synth, Brasil).

Alíquotas de 20 μL de amostra, nas respectivas concentrações de extrato bruto a serem analisadas, foram misturadas com 15 μL de água ultrapura e 265 μL da solução reativa FRAP, e incubada a 37°C por 30 min protegida da luz. Após o tempo de incubação, as leituras das absorbâncias foram feitas no comprimento de onda de 595 nm. Foram elaboradas curvas padrões de ácido gálico (Fig. 8A; 0 – 1,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; $y = 0,8264x - 0,0234$; $R^2 = 0,9952$) e de Trolox (Fig. 8B; 0 – 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; $y = 0,1956x + 0,0023$; $R^2 = 0,9995$).

Figura 8. Curvas padrões de (A) ácido gálico (0 - 1,5 µg.mL⁻¹) e (B) Trolox (0 – 7,5 µg.mL⁻¹) utilizadas para estimar o potencial antioxidante dos extratos das algas estudadas através do método poder de redução do ferro (FRAP).

2.2.3.5. Poder antioxidante pela quelação de metais

O ensaio foi realizado seguindo a metodologia de Harb et al. (2016), modificada de Min et al. (2011) e Santos (2014). A capacidade de quelar o íon ferro é também muito utilizado para examinar o potencial antioxidante. Esse ensaio avalia o quanto os extratos algais bloqueiam a geração do radical OH• pela ligação com o metal de transição Fe. Esse método também segue principalmente o mecanismo de SET.

Alíquotas de 20 µL de amostra, nas respectivas concentrações de extrato bruto a serem analisadas, foram misturadas com 250 µL de acetato de amônio 10% (Sigma-Aldrich, Brasil) e 15 µL da solução de sulfato de amônio 1 mM (Sigma-Aldrich, Brasil). Após 5 min de reação foram adicionados 15 µL de

ferrozine 6,1 mM (Sigma-Aldrich, Brasil) (exceto para os brancos amostra) e incubadas por 10 min adicionais sob baixa agitação. A curva padrão de ácido gálico foi elaborada na concentração de 0 – 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Fig. 9; $y = -0,0707x + 0,8052$; $R^2 = 0,9908$).

Figura 9. Curva padrão de ácido gálico (0 – 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) utilizada para estimar o potencial antioxidante dos extratos das algas estudadas através do método poder quelante de metais.

2.2.3.6. Quantificação de substâncias redutoras pelo método Folin-Ciocalteu

Existem diversos métodos espectrométricos que quantificam substâncias redutoras, porém a metodologia que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu é, sem dúvida, a mais utilizada na atualidade. O presente trabalho quantificou essas substâncias utilizando a metodologia descrita em Pires et al. (em preparação) e modificada de Singleton & Rossi (1965), Waterman & Mole (1994), Santos (2014) e Furlan et al. (2015).

O reagente Folin Ciocalteu consiste da mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação +6, porém, em presença de agentes redutores, como compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, cuja coloração permite a determinação das substâncias redutoras sob condições de pH básico, que não necessariamente precisam ter natureza

fenólica (Hou et al., 2003; Ikawa et al., 2003; Bonoli et al., 2004; Naczki & Shahidi, 2004; Valko et al., 2004; Roginsky & Lissi, 2005).

Alíquotas de 20 µL de amostra, nas respectivas concentrações de extrato bruto a serem analisadas, foram misturadas com 200 µL de água ultrapura, 20 µL de reagente Folin Ciocalteu 1 N (Dinâmica, Brasil) e 60 µL de solução de carbonato de sódio saturada. A mistura foi homogeneizada e deixada em repouso à temperatura ambiente por 30 min e protegida da luz. As leituras das absorbâncias foram feitas no comprimento de onda de 760 nm. Foram elaboradas curvas padrões de ácido gálico (Fig. 10A; 0 – 8,5 µg.mL⁻¹; $y = 0,0960x + 0,0090$; $R^2 = 0,9931$) e de Trolox (Fig. 10B; 0 – 100 µg.mL⁻¹; $y = 0,0121x + 0,0093$; $R^2 = 0,9920$).

Figura 10. Curvas padrões de (A) ácido gálico ($0 - 8,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e (B) Trolox ($0 - 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) utilizada para estimar a quantidade de substâncias redutoras presente nos extratos das algas estudadas através do método Folin Ciocalteu.

2.2.4. Ensaios de bioatividade

Substâncias bioativas é uma expressão criada para definir aqueles componentes químicos que possuem alguma ação sobre outros seres vivos e cujo efeito pode se manifestar tanto pela sua presença em um ambiente quanto pelo uso direto de substâncias delas extraídas.

2.2.4.1. Ensaio de inibição da enzima transcriptase reversa (RT-HIV)

O potencial antiviral dos extratos foi avaliado mediante o ensaio da atividade inibitória da transcriptase reversa do vírus HIV (RT-HIV), utilizando o kit transcriptase reversa (Roche, Suíça), um método colorimétrico para microplacas que possui quatro etapas de execução (Fig. 11). O protocolo foi executado seguindo as instruções do fabricante, baseado no protocolo proposto por Woradulayapinij et al. (2005) e com a colaboração da pesquisadora Dra. Lucimar Barbosa da Motta.

Os extratos algáceos foram solubilizados em DMSO 10% na concentração estoque de 1 mg.mL^{-1} . Todos os extratos foram triados de forma preliminar quanto ao seu potencial antiviral nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50 e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As amostras que apresentaram altos percentuais de inibição ($> 80\%$) foram testadas novamente nas concentrações de 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 e $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para cálculo da concentração para inibição de 50% da atividade da RT-HIV (IC_{50}).

A primeira etapa consistiu na mistura em microtubo de 20 μL de cada extrato ou controle positivo (Foscarnet), 20 μL dos nucleotídeos marcados (biotina e digoxigenina), 19 μL do RNA viral e 1 μL da enzima transcriptase reversa (RT). Após o período de 1 h de aquecimento a 37°C da mistura, foi obtido o DNA viral. Se o extrato for ativo, não haverá formação de DNA, pois ele será capaz de inativar a RT-HIV (Fig. 11).

Numa segunda etapa, o conteúdo do microtubo foi transferido para uma microplaca de 96 poços e incubado a 37°C por 1 h, após a incubação inicia-se a segunda etapa do ensaio. Cada poço da microplaca contém estreptavidina, uma proteína tetramérica que possui forte afinidade com a biotina presente nos nucleotídeos marcados do DNA viral. Posterior ao período de incubação, a placa foi lavada quatro vezes com tampão de lavagem. Nesta fase, ocorre a ligação do DNA viral com a estreptavidina, ele permanece aderido fortemente à microplaca (Fig. 11).

Figura 11. Princípio das reações que ocorrem em cada uma das etapas do ensaio colorimétrico de inibição da atividade da enzima transcriptase reversa (RT-HIV). Esquema baseado no método descrito por Woradulayapinij et al. (2005).

Durante a terceira etapa, após a lavagem e retirada total do tampão, foram adicionados 198 μL do tampão de incubação (pH 7,8, tampão Tris 50 mM, contendo cloreto de potássio 319 mM, cloreto de magnésio 33 mM e DTT 11 mM), mais 2 μL da solução de anticorpo anti-digoxigenina-peroxidase (ANTI-DIG-POD) e a microplaca foi incubada por mais 1 h a 37°C. O anticorpo (peroxidase) se ligará fortemente à digoxigenina, que assim como a biotina está presente nos nucleotídeos marcados do DNA viral. Após a incubação, a microplaca foi lavada novamente por cinco vezes com 250 μL de tampão de lavagem, retirando todo o tampão e certificando-se que a placa esteja completamente seca ao final das lavagens. Para acelerar a secagem da placa, recomenda-se usar apenas agitação intermediária na incubadora por cerca de 5 min ou até a completa secagem da microplaca (Fig. 11).

Na última etapa foram adicionados 200 μL de 2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina)-6-sulfônico (ABTS) dissolvidos em tampão de perborato de sódio e ácido cítrico/fosfato, recomendado pelo fabricante. A peroxidase reagirá

com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) do tampão produzindo um radical livre hidroxila (OH^{*}), que atuará sobre o ABTS formando o radical ABTS⁺, que possui coloração verde intensa. Após a adição do ABTS, a placa foi novamente incubada a 25°C por 30 min. Ao final, as absorbâncias foram lidas nos comprimentos de onda de 405 e 490 nm em espectrofotômetro de microplacas UV-vis EPOCH (Biotek Instruments, EUA). Quanto mais intensa for a coloração menor será a atividade do extrato para inibir a enzima RT-HIV.

Foram utilizados dois diferentes controles: o branco controle contendo 20 µL de DMSO 10% em água DPEC em substituição à amostra e o controle positivo contendo 20 µL de Foscarnet no lugar da amostra.

O Foscarnet foi utilizado como controle positivo, a solução estoque foi preparada na concentração de 1 mg.mL⁻¹ em DMSO 10% e, a partir desta, foram feitas cinco diluições nas concentrações de 0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 e 1 µg.mL⁻¹ para construção da curva de concentração inibitória (IC₅₀) e as leituras das absorbâncias foram feitas em triplicata.

Os resultados foram apresentados sob a forma de percentual de inibição da enzima RT-HIV seguindo a fórmula proposta por Woradulayapinij et al. (2005):

$$\% \text{ inibição} = (\text{Abs}_{405\text{-B}} - \text{Abs}_{490\text{-B}}) - (\text{Abs}_{405\text{-A}} - \text{Abs}_{490\text{-A}}) \times 100 / (\text{Abs}_{405\text{-B}} - \text{Abs}_{490\text{-B}})$$

Onde, Abs_{405-B} representa a absorbância do branco em 405 nm, Abs_{490-B} a absorbância do branco em 490 nm, Abs_{405-A} a absorbância da amostra em 405 nm, Abs_{490-A} a absorbância da amostra em 490 nm.

As concentrações inibitórias (IC₅₀) para as amostras e do controle positivo (Foscarnet) foram calculadas utilizando os percentuais de inibição da RT-HIV e ajustes não lineares de curva com o software Prisma Graph Pad® 6.

2.2.4.2. Potencial tóxico frente ao crustáceo *Artemia salina*

Os bioensaios para avaliação de toxicidade de extratos brutos ou substâncias isoladas são de grande relevância, pois ensaios de letalidade são muito utilizados em análises preliminares de toxicidade geral.

O método utilizado para avaliar a citotoxicidade dos extratos brutos foi o da letalidade de *Artemia salina* Leach. O princípio do método é simples e consiste em expor as artemias a concentrações conhecidas do extrato ou substância que se quer testar. Após 24 h de exposição, os animais mortos são contados para obter os valores de EC₅₀.

Em frasco Erlenmeyer foram colocados para eclodir cerca de 50 a 100 mg de cistos de *A. salina* (Maramar Aquacultura, Brasil) em 450 mL de água do mar esterilizada (32 ups) e condições controladas de forte aeração, temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e intensidade luminosa de $100 \mu\text{mol de fótons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ por 24 h.

Os extratos (2 mg MS) foram diluídos em 1 mL de DMSO 10% (preparado em água do mar), denominada aqui como concentração estoque. O dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) foi utilizado como controle positivo na concentração de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ em água do mar e DMSO 10% em água do mar como controle negativo.

O ensaio foi feito utilizando a concentração de 1 mg.mL^{-1} dos extratos. Amostras com atividades maiores do que 50% de letalidade foram adicionalmente testadas em, no mínimo, cinco diluições para o cálculo da concentração citotóxica (CC₅₀).

Os náuplios de artemia foram depositados em um reservatório para reagentes e atraídos para um dos lados por uma fonte de luz. Com uma micropipeta foram misturados em uma microplaca 100 μL do volume contendo os náuplios, de 10 a 30 náuplios, e 100 μL de cada amostra ($n = 5$) e incubada a 25°C por 24 h. Após a incubação, com auxílio de um estereomicroscópio, os indivíduos mortos foram contabilizados. Em seguida, 100 μL de metanol 80% foram adicionados, deixado repousar por 30 min e o número total de indivíduos contabilizado.

Os valores de CC₅₀ (pode ser representado também como dose letal DL₅₀) foram calculados a partir das concentrações de extrato bruto utilizadas *versus* o percentual de indivíduos mortos, utilizando o ajuste de dose-resposta através do software Prisma GraphPad® 6.

2.3. Estudos fisiológicos

Dados climatológicos dos dois anos de coleta da localidade como: variações de temperatura e de precipitação foram obtidas da estação meteorológica da Universidade Livre do Mar e da Mata, situada no Município de Ilhéus, e índice de radiação ultravioleta (IUV) foram coletados do Instituto de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (INEMA- <http://www.inema.ba.gov.br/>). Estes dados permitiram subsidiar o estudo fisiológico deste trabalho (ver Capítulo 4).

Para os estudos fisiológicos (Fig. 1C), a biomassa fresca das três espécies estudadas e coletadas na Praia do Morro de Pernambuco foi pesada e dividida em subamostras, de acordo às massas necessárias para as análises descritas nos próximos itens ($n = 5$). O material foi mantido em baixa temperatura (-4°C) e transportado ao Laboratório de Algas Marinhas “Édison José de Paula” do Instituto de Biociências da USP. Uma vez no laboratório, o material foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em ultrafreezer (-80°C) até o momento das análises de pigmentos fotossintetizantes, proteínas solúveis totais e potencial antioxidante.

2.3.1. Pigmentos fotossintetizantes e proteínas solúveis totais

As análises de conteúdo de pigmentos fotossintetizantes e proteínas solúveis totais (PST) foram realizadas a partir de amostras de 70 mg MF. Na primeira etapa, as amostras foram trituradas em nitrogênio líquido e extraídas em 1 mL de tampão fosfato 50 μM de sódio pH 5,5 por 1 h a 4°C , protegidas da luz. Após a extração, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Esse extrato foi chamado de extrato tamponado e utilizado para as análises de ficobiliproteínas (apenas para a alga vermelha) e PST para todas as espécies estudadas.

Os teores de ficobiliproteínas (mg.g^{-1} de alga fresca) foram calculados segundo Kursar et al. (1983) seguindo as fórmulas da Tabela 2. Como branco foi utilizado tampão fosfato.

Tabela 2. Fórmulas utilizadas para quantificação de ficobiliproteínas extraídas em tampão fosfato de sódio pH 5,5 para a alga vermelha *P. flagellifera*.

Pigmentos	Fórmula
Ficoeritrina	$(155,8 \times \text{Abs}_{498}) - (40 \times \text{Abs}_{614}) - (10,5 \times \text{Abs}_{652})$
Ficocianina	$(151,1 \times A_{614}) - (99,1 \times A_{652})$
Aloficocianina	$(181,3 \times A_{652}) - (22,3 \times A_{614})$

Abs_x representa a absorvância no respectivo comprimento de onda.

O método de quantificação de PST estabelecido por Bradford (1976) e utilizado neste trabalho, baseia-se na reação colorimétrica com o ácido Coomassie® Brilliant Blue G-250. Os extratos tamponados tiveram o teor de PST determinados baseando-se pelo método proposto por Bradford (1976) e foi feito utilizando a solução para ensaio proteico colorimétrico Bio - Rad® (Bio Rad, EUA). A solução de Bio Rad foi preparada no momento da análise na proporção 1:4 v/v em água ultrapura. A reação foi preparada adicionado 40 µL de água ultrapura, 900 µL da solução de Bio Rad e 60 µL do extrato tamponado. O teor de PST foi expresso em µg.g⁻¹ MF e o padrão utilizado foi a albumina de soro bovino (BSA; Sigma, Brasil). A curva padrão foi construída na faixa de concentrações de 0 – 16 µg.mL⁻¹ (Fig. 12). As leituras das absorvâncias tanto do padrão quanto das amostras foram feitas em cubeta de quartzo de 1 cm de percurso óptico no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro UV-vis (Hewlett Packard, modelo 8452A, EUA). Como branco foi utilizado a solução de Bio Rad.

Figura 12. Curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) para quantificação de proteínas solúveis em extratos tamponados das três espécies de algas estudadas.

Na segunda etapa de extração, a partir do resíduo (pellet) obtido do extrato tamponado, clorofilas e carotenoides foram extraídos adicionando-se 1,5 mL de N,N dimetilformamida (DMF) por 3 h a 4°C e protegidos da luz. Como branco foi utilizado DMF. As leituras das absorbâncias foram medidas em cubeta de quartzo de 1 cm de percurso óptico em espectrofotômetro UV-vis Hewlett Packard, modelo 8452A (EUA). Os teores de clorofilas e carotenoides ($\mu\text{g.g}^{-1}$ MF) foram calculados de acordo com as espécies utilizando-se as fórmulas apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Fórmulas utilizadas para quantificação dos pigmentos fotossintetizantes extraídos em DMF para as três espécies de algas estudadas.

Pigmentos	Fórmula
	<i>Sargassum vulgare</i> Inskeep & Bloom (1985)
Clorofila <i>a</i> (Cl <i>a</i>)	$(12,7 \times A_{664}) - (2,79 \times A_{647})$
Clorofila <i>c</i> (Cl <i>c</i>)	$(24,36 \times A_{647}) - (3,73 \times A_{664})$
Carotenoides	$(7,6 \times A_{480}) - (1,49 \times A_{510})$
	<i>Palisada flagellifera</i> Chow & Wanderley (com.pess.)
Clorofila <i>a</i> (Cl <i>a</i>)	$11,0607 \times \text{Abs}_{664}$
Carotenoides	$(1000 \times A_{480} - 0,89 \times \text{Cl } a) / 245$
	<i>Ulva fasciata</i> Welburn (1994)
Clorofila <i>a</i> (Cl <i>a</i>)	$12 \times A_{664} - 3,11 \times A_{647}$
Clorofila <i>b</i> (Cl <i>b</i>)	$20,78 \times A_{647} - 4,88 \times A_{664}$
Carotenoides	$(1000 \times A_{480} - 1,12 \times \text{Cl } a - 34,07 \text{ Cl } b) / 245$

Abs_x representa a absorbância no respectivo comprimento de onda.

2.3.2. Potencial antioxidante

O potencial antioxidante das amostras do estudo fisiológico foi avaliado a partir de amostras de 300 mg MF trituradas em nitrogênio líquido e extraídas em 1 mL de metanol por maceração durante 3 h a 4°C protegidas da luz. Após o processo de extração, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 min a 4°C e o sobrenadante transferido para um novo microtubo. Os extratos foram armazenados em ultrafreezer -80°C até o momento das análises. O potencial antioxidante dos extratos foi testado em seis diferentes concentrações: 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 mg.mL⁻¹ para *S. vulgare* e nas concentrações de 0, 4, 8, 10, 12, 16 e 20 mg.mL⁻¹ para *P. flagellifera* e *U. fasciata*. Os métodos utilizados para avaliar o potencial antioxidante foram os mesmos descritos no item 2.2.3.

2.3.3. Varredura espectrofotométrica dos extratos na faixa do UV

Os extratos metanólicos resultantes da avaliação do potencial antioxidante (subitem 2.3.2) foram também analisados qualitativamente em espectrofotômetro UV-vis EPOCH (Biotek Instruments, EUA) na faixa de absorção do UV, que compreende os comprimentos de onda entre 200 e 400 nm, utilizando alíquotas de 150 μL da concentração de 10 mg.mL^{-1} do extrato de cada uma das espécies. A partir dos gráficos com os espectros de absorção UV de cada extrato foi calculada a área embaixo da curva utilizando-se o software Prisma GraphPad® 6.

2.4. Doutorado sanduíche: perfil de ácidos graxos, lipídios e suas classes

Em maio de 2015, foi realizado um doutorado sanduíche no Ryan Institute for Environment, Marine and Energy da Universidade Nacional da Irlanda, Galway sob a supervisão da Dra. Dagmar Stengel e do Dr. Gerard Fleiming, com o objetivo de caracterizar o perfil de ácidos graxos, lipídios e suas classes das algas *S. vulgare*, *P. flagellifera* e *U. fasciata*. A descrição geral está sumarizada na Figura 1D.

A cromatografia gasosa (CG) utilizando o detector de ionização de chamas (DIC) é a metodologia mais difundida para quantificação de ácidos graxos. Esse método requer que os ácidos graxos sejam previamente transformados em derivados mais voláteis, e normalmente são transformados em ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAGs).

A quantificação dos EMAGs foi feita através do método de transmetilação direta (derivatização). Amostras de aproximadamente 50 mg de massa liofilizada (ML) das estações seca e chuvosa de *P. flagellifera*, *S. vulgare* e *U. fasciata* ($n = 5$) foram transmetiladas utilizando-se 2 mL de metanol 2% em meio ácido (H_2SO_4) e 20 μL do padrão interno de ácido pentadecanoico ($\text{C}_{15:0}$), na concentração final de 5 mg.mL^{-1} . Todas as amostras foram vaporizadas com N_2 gasoso para evitar a degradação do ácido graxo. A transmetilação dos ácidos graxos foi processada durante 90 min na temperatura entre 80 - 90°C, em banho seco com agitação, seguindo o método

descrito por Guihéneuf et al. (2015). O esquema geral das etapas está descrito na Fig. 13.

Figura 13. Fluxograma resumido com as etapas seguidas para a caracterização do perfil de ácidos graxos das macroalgas estudadas.

Após a transmetilação, 1 mL de água ultrapura e 2 mL de hexano foram adicionados ao tubo que foram centrifugados a 1.000 g por 2 min. Um sistema bifásico foi formado após a centrifugação e apenas a fase superior foi coletada e colocada em frascos de vidro do tipo *vials* que seguiram para as análises de cromatografia gasosa.

As análises de EMAGs foram feitas em cromatógrafo gasoso (Agilent Technologies, EUA) modelo 7890A GC/5975 com detector seletivo de massa e equipado com um detector de ionização de chamas e uma coluna capilar de sílica fundida (DB-WAXETR 0,25 mm x 30m x 0,25 µm, Agilent Technologies, EUA). Alíquotas de 2 µL de cada amostra foram injetadas no modo de separação seriada (razão 20:1) usando um auto injetor Agilent série 7683B. O hidrogênio foi usado como veículo para o gás. O injetor e o detector possuíam temperatura de 250 e 300°C, respectivamente. A temperatura foi programada

para 140°C por 1 min e aumentada de 140 para 200°C em uma taxa de 15°C por min e por último de 200 a 250°C em uma taxa de 2°C por min e o tempo total de corrida para cada amostra foi de 30 min.

Uma segunda etapa do trabalho foi a obtenção de extratos brutos lipídios, que foi feita utilizando-se massa entre 4,5 e 6,5 g ML e uma mistura de clorofórmio/metanol (1:2 v/v). A extração foi processada durante três dias. Nos dois primeiros dias, as amostras com o solvente foram vaporizadas com N₂ gasoso para evitar a degradação dos lipídios, a maceração foi processada por 24 h com renovação do solvente a cada 24 h e filtradas por processo simples. No terceiro dia de extração, foi adicionado clorofórmio e água em todas as amostras até atingir a proporção de clorofórmio/metanol/água 1:1:0,9 v/v. Essa mistura foi posta em funil de separação e lavada duas vezes com 50 mL de água ultrapura com o objetivo de retirar impurezas do extrato. A fase superior aquosa do sistema bifásico formado foi descartada e apenas a fase inferior (extrato lipídico) foi coletada. Após a coleta, os extratos lipídicos brutos foram rotaevaporados a 40°C, solubilizados em 10 mL de clorofórmio e armazenados em freezer -20°C até o momento das análises. Todos os processos de extrações foram feitos com n = 5 para cada espécie.

As classes lipídicas foram separadas a partir dos extratos lipídicos brutos através de uma coluna de sílica (Bond Elut Si da Agilent, 5000 mg, 20 mL) e analisadas por cromatografia gasosa. As fases móveis utilizadas para separação foram escolhidas de acordo com polaridade de cada classe lipídica. Os primeiros a serem separados foram os lipídios neutros, e foi utilizado clorofórmio, em seguida os glicolipídios com a mistura clorofórmio/metanol (5:1 v/v) e, por último, os fosfolipídios utilizando metanol 100%. O processo de separação das classes lipídicas foi seriado e consistiu em adicionar um volume e concentração conhecida do extrato lipídico bruto na coluna (esperar a total absorção do extrato pela coluna), seguida da adição individualizada de 40 mL de cada um dos solventes utilizados. A troca da fase móvel foi realizada quando a fase anterior não apresentava mais coloração indicando que havia mais lipídios daquela classe no interior da coluna.

O programa *Agilent MSD Productivity Chem Station* (catalogo G1701EA E.02.00) foi utilizado para controlar e fornecer os dados gerados nas análises (integração, tempo de retenção e área dos picos). A identificação dos EMAGs

foi feita utilizando-se padrões de EMAGs comerciais denominados Supelco™ 37 componente misto do EMAGs (EUA) e o EMAG de óleo de peixe, o óleo Menhaden (Supelco, EUA).

O total de ácidos graxos (TAG) das amostras algáceas e a quantificação do ácido eicosapentanoico (C 20:5 n-3) foram comparados em relação ao ácido pentadecanoico (C15:0) 99% (Alfa Aesar, UK) que foi utilizado como padrão interno durante o processo de transmetilação direta.

2.5. Análises estatísticas

Os conjuntos de dados para cada um dos parâmetros estudados foram testados quanto à normalidade através do teste de Kolmogorov–Smirnov & Lilliefors e homocedasticidade pelo teste de Bartlett ($p < 0,05$). Os dados foram avaliados para cada espécie utilizando análise de variância (ANOVA).

ANOVA bifatorial ($p < 0,05$) foi utilizada para as comparações entre os parâmetros avaliados (antioxidantes e antiviral) e os três tipos de extratos (MeOH, Aq. Frio e Aq. Quente), definido como primeiro fator, e as duas estações (seca e chuvosa), definido como segundo fator.

ANOVA unifatorial ($p < 0,05$) foi utilizada para os resultados do estudo fisiológico, onde os parâmetros (pigmentos fotossintetizantes, proteínas e antioxidantes) foram avaliados em relação a um único fator (estações seca e chuvosa).

Para ambos os casos de ANOVA bi e unifatorial, as comparações múltiplas entre as médias foram determinadas pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls com diferenças significativas $p < 0,05$ utilizando-se o programa Statistica v.13.

Para avaliação quantitativa dos espectros de absorção na faixa do UV resultante do estudo fisiológico (valores das áreas embaixo da curva) foi utilizado Teste *t* ($p < 0,05$) para cada uma das espécies comparando-se a variação entre as estações seca e chuvosa.

O conjunto de dados referentes à caracterização lipídica foi testado para as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o conteúdo de ácidos nas estações seca e chuvosa utilizando o Teste *t* ($p < 0,05$) para as amostras independentes.

Referências

- Alvares, C. A., Stape, J. L., Sentelhas, P. C., de Moraes, G., Leonardo, J., & Sparovek, G. 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorol. Zeitschrift*, 22(6): 711-728.
- Beer, S., & Eshel, A. 1985. Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. *Mar. Freshw. Res.*, 36(6): 785-792.
- Bonoli, M., Verardo, V., Marconi, E., & Caboni, M. F. 2004. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. *J. Agri. Food Chem.*, 52(16): 5195-5200.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analy. Biochem.*, 72(1-2): 248-254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. L. W. T. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.*, 28(1): 25-30.
- Castelo-Branco, V. N. & Torres, A. G. 2011. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. *Rev. Nutr.*, 24(1): 173-187.
- Duarte-Almeida, J. M., Santos, R. D., Genovese, M. I. & Lajolo, F. M. 2006. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. *Ciê. Tecnol. Alim.*, 26(2): 446-452.
- Furlan, C. M., Santos, K. P., Sedano-Partida, M. D., da Motta, L. B., Santos, D. Y. A., Salatino, M. L. F., Negri, G., Berry, P. E., Van Ee, B. W. & Salatino, A. 2015. Flavonoids and antioxidant potential of nine Argentinian species of Croton (Euphorbiaceae). *Braz.J. Bot.*, 38(4): 693-702.
- Gorinstein, S., Martin-Belloso, O., Katrich, E., Lojek, A., Ciz, M., Gligelmo-Miguel, N., Haruenkit, R., Park, Y.S., Jung, S.T. & Trakhtenberg, S. 2003. Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the

- antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. *J. Nutr. Biochem.*, 14: 154–159.
- Gorinstein, S., Martin-Belloso, O., Katrich, E., Lojek,, A., Ciz, M. & Gligelmo-Miguel, N. 2003. Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. *J. Nutr. Biochem.* 14: 154-59.
- Guihéneuf, F., Schmid, M. & Stengel, D. B. 2015. Lipids and fatty acids in algae: extraction, fractionation into lipid classes, and analysis by gas chromatography coupled with flame ionization detector (GC-FID). *Nat. Prod. Marine Algae: Methods and Protocols*, 173-190.
- Hou, W. C., Lin, R. D, Cheng, K. T., Hung, Y. T., Cho, C. H, Chen, C. H, Hwang, S. Y & Lee, M. H. 2003. Free radical scavenging activity of Taiwanese native plants. *Phytomed.*, 10: 170-175.
- Ikawa, M., Schaper, T.D., Dollard, C. A. & Sasner, J. J. 2003. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1811-1815.
- Imatomi, M., Novaes, P., Matos, A. P., Gualtieri, S. C., Molinillo, J. M., Lacret, R.,Varela, R. M. & Macías, F. A. 2013. Phytotoxic effect of bioactive compounds isolated from *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) leaves. *Biochem. System. Eco.*, 46: 29-35.
- Inskeep, W. P. & Bloom, P. R. 1985. Extinction coefficients of chlorophyll *a* and *b* in N, N-dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physio.*, 77(2): 483-485.
- Kursar, T. A., van der Meer, J. & Alberte, R.S. 1983. Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*: I. Biochemical analyses if pigment mutations. *Plant Physiol.*, 73: 353–360.
- Marco, G.J. 1968. Rapid method for evaluation of antioxidants. *JAOCS.*, 45: 594p.
- Miller, H.E. 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *JAOCS.*, 48: 91.
- Min, B., McClung, A.M. & Chen, M.-H. 2011. Phytochemicals and antioxidant capacities in rice brans of different color. *J. Food Sci.*, 76(1): 117–26.

- Molion, L. C. B. & Bernardo, S. D. O. 2002. Uma revisão da dinâmica das chuvas no Nordeste Brasileiro. *Rev. Bras. Meteor.*, 17(1): 1-10.
- Nitsch, J. P., & Nitsch, C. 1956. Studies on the growth of coleoptile and first internode sections. A new, sensitive, straight-growth test for auxins. *Plant Physiol.* 31(2): 94.
- Pires, J., Torres, P. B., Santos, D.Y.C. & Chow, F. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH. (em preparação). 1- 9 p.
- Pires, J., Torres, P. B., Santos, D. Y. C. & Chow, F. Ensaio em microplacas de substâncias redutoras pelo método Folin-Ciocalteu para extratos de algas. (em preparação). 1-10 p.
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Moraes, S. M., Sampaio, C. G., Pérez-Jiménez, J. & Saura-Calixto, F. D. 2006. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Comunicado Técnico, 125. Disponível em: http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/cot_125.pdf
- Santos, K. P. 2014. *Croton sphaerogynus* Baill.: substâncias fenólicas e atividades biológicas. Diss. Universidade de São Paulo. 104 pp.
- Silva, F. A., Borges, M. F. M., & Ferreira, M. A. 1999. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, 22(1): 94-103.
- Singleton, V. & Rossi, J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Ame. J. Enol. Viticul.*, 16: 144–158.
- Soares, S. A. 2013. Isolamento biomonitorado de substâncias ativas de *Croton pallidulus* var. *pallidulus* (Euphorbiaceae). Diss. Universidade de São Paulo. 96 pp.
- Solis, P. N., Wright, C.W., Anderson, M. M., Gupta, M.P. & Phillipson, J.D. 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. *Planta Med.* 59: 250-252.
- Szydowska-Czerniak, A., Karlovits, G., Dianoczki, C., Recseg, K. & SzByk, E. 2008. Comparison of two analytical methods for assessing antioxidant capacity of rapeseed and olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 85: 141-149.

- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol.Cell. Biochem.*, 266: 37–56.
- Yang, H., Dong, Y., Du, H., Shi, H., Peng, Y. & Li, X. 2011. Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16 (4): 3444–3455.
- Waterman, P. & Mole, S. 1994. Extraction and chemical quantification. In *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Wiley-Blackwell, pp. 83–85.
- Wellburn, A. R. 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.*, 144(3): 307-313.
- 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. Ethnopharm.*, 101(1-3): 84-89.

Atividade antiviral e ensaio de toxicidade de extratos brutos das macroalgas *Sargassum vulgare*, *Palisada flagellifera* e *Ulva fasciata*

Resumo

O tratamento do vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1, agente causador da AIDS) representa o principal desafio no processo terapêutico antiviral. Muitas das dificuldades estão associadas ao tratamento, incluindo toxicidade das drogas, resistência do vírus e altos custos. Por isso, pesquisas por novos produtos naturais tornam as macroalgas fontes potenciais para novos bioprodutos, devido à sua reconhecida atividade biológica podem minimizar as limitações no tratamento da AIDS. Extratos metanólicos e aquosos das macroalgas *Sargassum vulgare* (Ochrophyta), *Palisada flagellifera* (Rhodophyta) e *Ulva fasciata* (Chlorophyta), coletadas em costões rochosos do nordeste brasileiro, durante as estações de seca e chuvosa, foram avaliados quanto a sua atividade antiviral por meio da inibição da enzima transcriptase reversa (RT-HIV) e sua toxicidade em *Artemia salina*. Os resultados mostraram que os extratos das algas vermelha e verde apresentaram atividades menores do que 50% para inibição da RT-HIV. Porém o extrato aquoso a quente da alga parda *S. vulgare*, que possuem principalmente polissacarídeos, apresentou forte atividade inibitória da RT-HIV ($\geq 90\%$) e IC_{50} entre $12,39 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (estação seca) e $28,47 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (estação chuvosa), mostrando que houve uma variação sazonal neste tipo de resposta. A baixa toxicidade dos extratos ($CC_{50} > 200 \mu\text{g.mL}^{-1}$), avaliada mediante teste toxicidade frente ao crustáceo *A. salina*, assegura que os extratos estudados e, principalmente, os que apresentaram alta atividade antiviral, constituem recursos potenciais na busca por novas substâncias químicas.

Palavras-chave: atividade antiviral; macroalgae; toxicidade; extrato bruto; RT-HIV; produtos naturais.

Abstract

The treatment of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1, the agent of AIDS) is a major challenge to antiviral therapeutic process. Many difficulties are associated with the treatment including drug toxicity, virus resistance and high costs. Therefore, researches for new natural products make macroalgae potential sources for novel bioproducts because of their recognized biological activity can minimize the limitations in the treatment of AIDS. Methanolic and aqueous crude extracts of the marine algae *Sargassum vulgare* (Ochrophyta), *Palisada flagellifera* (Rhodophyta) and *Ulva fasciata* (Chlorophyta) collected from rocky shores of northeastern Brazil, during dry and rainy seasons, were evaluated for their antiviral activity by the inhibition of the enzyme reverse transcriptase (RT-HIV) and its toxicity in *Artemia salina*. The results showed that extracts of red and green algae showed activities lower than 50% for inhibition of RT-HIV. However, the hot aqueous extract of the brown seaweed *S. vulgare* which is mainly composed of polysaccharides showed strong inhibitory activity of RT-HIV ($\geq 90\%$) and IC_{50} between $12.39 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (dry season) and $28.47 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (rainy season) showing that there was a seasonal variation for this response. The low cytotoxicity of the extracts ($CC_{50} > 200 \mu\text{g.mL}^{-1}$), evaluated by the toxicity assay in *A. salina* ensures that the studied extracts, especially those with high antiviral activity, are potential resources in the search for new chemical substances.

Key words: antiviral activity; crude extracts; toxicity; RT-HIV; natural products; seaweeds.

3.1. Introdução

Estima-se que cerca de 36,9 milhões de pessoas em todo o mundo convivam com o vírus da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS; do inglês *Acquired Immune Deficiency Syndrome*), constituindo um dos maiores problemas contemporâneos de saúde pública (UNAIDS, 2015). Esse cenário tem despertado uma série de pesquisas em busca de novas drogas para combater o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV; do inglês *Human Immunodeficiency Virus*), responsável pela disseminação da doença. Existem dois principais tipos de HIV, o HIV-1 com alta taxa de mutação, responsável pela epidemia mundial e referido comumente como HIV, e o HIV-2 que é menos patogênico e restrito geograficamente ao oeste da África (De Clercq, 1995).

Um marco importante no combate da AIDS tem sido estabelecido com a descoberta de drogas antirretrovirais, formulações que impedem a multiplicação do vírus. Entretanto, com o passar dos anos essas drogas têm evidenciado desvantagens como resistência do vírus, alta toxicidade mitocondrial, hipersensibilidade cutânea, lipodistrofia, disponibilidade limitada, altos custos e baixa eficiência de cura (Jung et al., 2000; Carr et al., 2003; Gulick, 2003; Mallipeddi & Rohan, 2010). Diante disto, a comunidade científica tem direcionado um grande esforço na descoberta de novos agentes antirretrovirais com efeitos colaterais minimizados (Van Wyk & Gericke, 2000; Scott et al., 2004).

As macroalgas têm sido bioprospectadas para a descoberta de novas drogas, uma vez que apresentam metabólitos primários e secundários que incluem substâncias ativas com ação biológica comprovada como antifúngico, inseticida, anticâncer, analgésico, antioxidante e antiviral, dentre outras (Kim et al., 1997; Almeida-Lima et al., 2010; Harnedy & FitzGerald, 2011; Wijesekara et al., 2011; Pereira & Costa-Lotufo, 2012; Silva et al., 2013). Além disso, produtos naturais de algas exibem baixa toxicidade quando comparadas com drogas sintéticas (Wang et al., 2008).

Diversas substâncias provindas de algas marinhas com efeito antiviral têm sido investigadas, evidenciando a inibição de diferentes etapas do ciclo de vida do vírus (Ng et al., 1997). Inibidores da enzima transcriptase reversa (RT;

do inglês *Reverse Transcriptase*) têm recebido destaque, pois essa enzima desenvolve um papel multifuncional no ciclo de replicação do vírus, tornando-se peça chave para o desenvolvimento de novas drogas (Kohistaedt et al., 1992; Jonckheere et al., 2000; Jung et al., 2000; Wang et al., 2004). Entre essas substâncias encontram-se alcaloides, polissacarídeos sulfatados, polifenóis, flavonoides, cumarinas, taninos, triterpenos, lectinas, floroglucinois, lactonas, iridoides, lactonas, saponinas, xantonas, fosfolipídios, quininas e peptídeos como alguns dos metabólitos com atividade biológica de ação antiviral que podem atuar em diferentes fases do ciclo de vida do vírus (Ng et al., 1997; Vlietinck et al., 1998; Yang et al., 2001). O trabalho de Yasuhara-Bell & Lu (2010) aponta para polissacarídeos sulfatados, lectinas e diterpenos como substâncias produzidas por macroalgas que mais se destacaram quanto à atividade antiviral.

A produção desses bioativos pode variar de acordo com os fatores ambientais. Uma extensa revisão feita por Stengel et al. (2011) sobre a diversidade química e a bioatividade de extratos provindos de macroalgas demonstrou que a sazonalidade foi um fator importante na produção de metabólitos e na resposta de atividade biológica desses organismos. Fatores como localização geográfica, intensidade luminosa e fase do ciclo de vida são fatores sujeitos a mudanças sazonais e que já provaram ter influência na diversidade química das macroalgas (Stengel & Connan, 2015).

O cenário brasileiro de pesquisas com produtos naturais provindos de algas marinhas, focado no potencial antiviral, é bastante recente. A maioria dos trabalhos está voltada para prospecção de algas pardas, com reduzido número de trabalhos para algas vermelhas e verdes (Tabela 1). Diante deste cenário, faz-se necessário contribuir com a busca de outras espécies candidatas com potencial bioativo.

Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo, investigar a atividade antiviral mediante a avaliação da ação inibitória da enzima transcriptase reversa (RT) e o efeito tóxico em *Artemia salina* de extratos brutos metanólicos e aquosos de três espécies de macroalgas do litoral nordestino do Brasil: *Sargassum vulgare* C. Agardh (alga parda, Ochrophyta), *Palisada flagellifera* (J. Agardh) K.W. Nam (alga vermelha, Rhodophyta) e *Ulva*

fasciata Delile (alga verde, Chlorophyta), e comparar as respostas em dois períodos do ano: época de seca e época chuvosa. Este estudo representa uma contribuição científica importante para o conhecimento do patrimônio biológico da diversidade química das macroalgas brasileiras e traz novas fronteiras para a prospecção de novos bioprodutos.

Tabela 1. Estudos com macroalgas brasileiras sobre bioatividade contra os vírus da herpes (HSV-1 e HSV-2), metapneumovírus e da AIDS (HIV-1), durante o período de 2004 a 2013.

Espécie	Tipo de vírus estudado	Referência
Ochrophyta		
<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	HSV-1	Vallim et al. (2010)
<i>Dictyopteris delicatula</i>	HSV-1 e HSV-2	Soares et al. (2012)
<i>Dictyota menstrualis</i>	HSV-1, HSV-2 e HIV1	Pereira et al. (2004) Soares et al. (2012) Cavalcanti et al. (2011)
<i>Dictyota pfaffi</i>	HSV-1 e HIV-1	Barbosa et al. (2004) Cirne-Santos et al. (2007)
<i>Lobophora variegata</i>	HSV-1 e HSV-2	Soares et al. (2012)
<i>Padina gymnospora</i>	HSV-1 e HSV-2	
<i>Sargassum cymosum</i>	HSV-1 e HSV-2	
<i>Sargassum polyceratum</i>	HSV-1 e HSV-2	
<i>Sargassum vulgare</i>	HSV-1 e HSV-2	Soares et al. (2012) Plouguerné et al. (2013)
<i>Spatoglossum schroederi</i>	HIV-1	Queiroz et al. (2008)
<i>Styopodium zonale</i>	HSV-1e HIV-1	Soares et al. (2007)
<i>Styopodium zonale</i>	metapneumovírus	Mendes et al. (2011)
<i>Styopodium zonale</i>	HSV-1 e HSV-2	Soares et al. (2012)
Rhodophyta		
<i>Bostrychia radicans</i>	HSV-1 e HSV-2	Soares et al. (2012)
<i>Centroceras clavulatum</i>	HSV-1 e HSV-2	
<i>Chondracanthus acicularis</i>	HSV-1 e HSV-2	

Atividade antiviral e ensaio de toxicidade

<i>Cryptonemia seminervis</i>	HSV-1 e HSV-2	
<i>Gracilaria domingensis</i>	HSV-1 e HSV-2	
<i>Hypnea musciformis</i>	HSV-1 e HSV-2	
<i>Hypnea spinella</i>	HSV-1 e HSV-2	
<i>Jania adhaerens</i>	HSV-1 e HSV-2	
<i>Jania crassa</i>	HSV-1 e HSV-2	
<i>Laurencia dendroidea</i>	HSV-1 e HSV-2	
<i>Osmundaria obtusiloba</i>	HSV-1 e HSV-2	
<i>Plocamium brasiliense</i>	HSV-1 e HSV-2	
<i>Pterocladia capillacea</i>	HSV-1 e HSV-2	
<i>Spyridia clavata</i>	HSV-1 e HSV-2	
<i>Tricleocarpa cylindrical</i>	HSV-1 e HSV-2	
Chlorophyta		
<i>Ulva fasciata</i>	metapneumovírus	Mendes et al. (2010)
<i>Ulva fasciata</i>	HSV-1e HSV-2	Soares et al. (2012)
<i>Avrainvillea elliotii</i>	HSV-1 e HSV-2	
<i>Bryopsis</i> sp.	HSV-1 e HSV-2	
<i>Caulerpa racemosa</i>	HSV-1 e HSV-2	
<i>Chaetomorpha antennina</i>	HSV-1 e HSV-2	Soares et al. (2012)
<i>Cladophora prolifera</i>	HSV-1 e HSV-2	
<i>Codium decorticatum</i>	HSV-1 e HSV-2	
<i>Codium spongiosum</i>	HSV-1 e HSV-2	
<i>Halimeda opuntia</i>	HSV-1 e HSV-2	
<i>Halimeda tuna</i>	HSV-1 e HSV-2	
<i>Penicillus capitatus</i>	HSV-1 e HSV-2	
<i>Udotea flabellum</i>	HSV-1 e HSV-2	

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Coleta do material

Para o presente estudo foram escolhidas três espécies de macroalgas abundantes na costa nordestina do Brasil, cada uma pertencente a linhagens diferentes: *Sargassum vulgare* (alga parda), *Palisada flagellifera* (alga vermelha) e *Ulva fasciata* (alga verde). As algas foram coletadas durante a época de seca (novembro de 2013) e a época chuvosa (maio de 2014), na região entremarés do costão rochoso da Praia do Morro de Pernambuco (14°47'00"S, 39°02'00"W), localizado no Município de Ilhéus e situado no litoral sul da Bahia. O material foi triado, limpo de macroepífitos e lavado com abundante água corrente e, posteriormente, seco em estufa a 40°C até massa constante (aproximadamente 48 horas).

3.2.2. Obtenção e preparo dos extratos

Cerca de 50 g de massa seca (MS) de cada espécie foram trituradas em moinho de facas, separadas em cinco subamostras para cada espécie e extraídas por maceração simples, sempre protegidas da luz. As amostras foram extraídas em metanol (MeOH), a temperatura ambiente por 24 horas, e repetido três vezes. Após a extração metanólica, o resíduo algal foi seco completamente por simples evaporação para retirada do metanol remanescente e foi extraída em água ultrapura a temperatura ambiente durante 24 horas por três vezes, e por último, em água ultrapura a 70°C durante 2 horas por três vezes. Cada extrato foi filtrado e reunido em um único extrato bruto: metanólico, aquoso frio ou aquoso quente, mantendo sempre as cinco subamostras como repetições separadas. Os extratos metanólicos foram concentrados por rotaevaporação (40°C) e em seguida liofilizados, enquanto os extratos aquosos foram diretamente liofilizados. Todos os extratos brutos liofilizados foram armazenados em freezer -80°C até o seu uso. Cada um dos extratos foi denominado de extrato bruto metanólico (MeOH), extrato bruto aquoso frio (Aq. Frio) ou extrato bruto aquoso quente (Aq. Quente).

3.2.3. Atividade anti-HIV

O potencial antiviral dos extratos foi avaliado através do ensaio de inibição da enzima transcriptase reversa (RT) do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), utilizando-se o kit colorimétrico de ensaio da RT (Roche Diagnostics, Suíça) e seguindo as instruções do fabricante. Os detalhes deste ensaio estão descritos no subitem 2.2.4.1 do Capítulo 2- Metodologia Geral.

3.2.4. Atividade citotóxica

Os extratos brutos foram testados quanto à sua toxicidade no crustáceo *Artemia salina* Leach, seguindo o protocolo de Soares (2013) e descrito no item 2.2.4.2. presente no Capítulo 2- Metodologia Geral.

3.2.5. Análise estatística

Os conjuntos de dados foram testados quanto à normalidade através do teste de Kolmogorov–Smirnov & Lilliefors e a homocedasticidade pelo teste de Bartlett ($p < 0,05$). Os dados foram avaliados para cada espécie por separado, utilizando análise de variância (ANOVA) bifatorial, sendo o percentual de inibição da RT-HIV testado quanto a sua interação com as épocas de coleta (seca ou chuvosa), que foram definidas como primeiro fator e os três tipos de extratos (MeOH, aquoso a frio e aquoso a quente) como segundo fator. As diferenças significativas entre os conjuntos de dados foram identificadas pelo teste *post hoc* Newman-Keuls ($p < 0,05$), utilizando-se o programa Statistica v.13.

3.3. Resultados

Os resultados da atividade antiviral para extratos de *S. vulgare*, *P. flagellifera* e *U. fasciata* na concentração final de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de extrato bruto estão apresentados na Figura 1. De forma geral, a maioria dos extratos testados na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ não apresentou variação entre as estações seca e chuvosa para a ação inibitória da RT (Fig. 1). Essa variação foi observada apenas para os extratos MeOH e Aq. Frio da alga verde *U. fasciata* (Fig. 1C).

Comparando os percentuais de inibição da RT-HIV entre o tipo de extrato, o extrato Aq. Quente foi o que apresentou os maiores valores de atividade antiviral para as três espécies (Fig. 1), seguido dos extratos Aq. Frio, exceto para *U. fasciata* na estação seca que foi o extrato com a menor atividade para a espécie. Os menores potenciais antivirais foram observados para os extratos MeOH das algas *P. flagellifera* e *S. vulgare*.

Para *S. vulgare*, o extrato Aq. Quente apresentou altos percentuais de inibição da RT-HIV, com $89,92 \pm 0,33\%$ e $79,31 \pm 2,69\%$ para as estações chuvosa e seca, respectivamente (Fig. 1A). Foi possível observar também que os extratos MeOH e Aq. Frio apresentaram as menores atividades, sem diferenças significativas entre elas. Os extratos Aq. Frio apresentaram atividades de $32,62 \pm 1,12\%$ (seca) e $37,21 \pm 8,43\%$ (chuvosa) e MeOH apresentaram percentuais de inibição da RT-HIV de $31,73 \pm 9,69\%$ (chuvosa) e $23,53 \pm 7,00\%$ (seca) (Fig. 1A).

Para *P. flagellifera*, os percentuais de inibição do extrato Aq. Quente foi de $37,18 \pm 6,35\%$ e $43,42 \pm 2,56\%$ para as estações seca e chuvosa, respectivamente (Fig. 1B). O extrato Aq. Frio não apresentou diferenças significativas com o Aq. Quente, observando-se valores de $32,68 \pm 6,89\%$ e $37,94 \pm 1,47\%$ para as estações seca e chuvosa, respectivamente (Fig. 1B). Os extratos MeOH para essa espécie apresentaram os menores percentuais de inibição da RT-HIV, com valores de $23,11 \pm 7,11\%$ e $19,31 \pm 5,30\%$ para estação seca e chuvosa, respectivamente (Fig. 1B).

A alga *U. fasciata* apresentou percentuais de inibição da RT-HIV para os extratos Aq. Quente de $35,85 \pm 1,51\%$ e $37,81 \pm 3,77\%$ para as estações seca e chuvosa, respectivamente (Fig. 1C). Os extratos Aq. Frio para esta espécie apresentou variação significativa entre os períodos estudados, com valores de $19,94 \pm 4,42\%$ e $39,20 \pm 2,28\%$ para as estações seca e chuvosa, respectivamente (Fig. 1C). Variação da atividade antiviral também foi observada para o extrato MeOH, com valores de $27,84 \pm 1,51\%$ (seca) e $21,62 \pm 2,49\%$ (chuvosa) (Fig. 1C).

A Tabela 2 mostra as porcentagens de inibição viral para os diferentes extratos na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de extrato bruto e de valor de IC₅₀ obtidas no presente estudo comparadas com as de alguns trabalhos que

avaliaram o potencial antiviral de substâncias ativas isoladas de algas marinhas. O percentual de inibição da RT HIV-1 do extrato Aq. Quente de *S. vulgare* teve valores de 79,31 – 89,92%, percentuais semelhantes aos isolados registrados para *Ulva lactuca* Linnaeus (El-Baky et al., 2009) e *Canistrocarpus cervicornis* (Kützinger) De Paula & De Clerck (Vallim et al., 2010) para inibição do vírus HSV-1. Os valores de IC₅₀ estimados para o extrato Aq. Quente de *S. vulgare* foram menores que os extratos isolados de *U. lactuca* e *Sargassum trichophyllum* (Kützinger) Kuntze, indicando atividade antiviral potencial do extrato estudado. Cabe destacar que os estudos compilados nessa tabela correspondem a extratos isolados de polissacarídeos e diterpenos.

Figura1. Atividade antiviral estimada pela porcentagem de inibição da enzima transcriptase reversa (RT-HIV) de extratos brutos ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) de três espécies de macroalgas (A) *S. vulgare*, (B) *P. flagellifera* e (C) *U. fasciata* coletadas durante as épocas de seca e chuvosa. MeOH = extrato metanólico, Aq. Frio = extrato aquoso a frio, Aq. Quente = extrato aquoso a quente. As barras representam a média $\pm$ desvio ($n = 5$) e letras distintas representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Tabela 2. Percentuais de inibição e concentrações inibitória (IC₅₀) para substâncias ativas isoladas ou extratos brutos obtidos de macroalgas contra os vírus da AIDS do tipo 1 (HIV-1) e da herpes dos tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2).

Espécie	% inibição	IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Substância isolada ou extrato bruto	Tipo de vírus	Referência
Chlorophyta					
<i>Caulerpa racemosa</i>	NA	3,00	Polissacarídeos	HSV-2	Ghosh et al. (2004)
<i>Codium fragile</i>	NA	4,70	Polissacarídeos	HSV-2	Ohta et al. (2009)
<i>Ulva lactuca</i>	65,62 – 79,15	118,00 – 126,00	Polissacarídeos	HSV-1	El-Baky et al. (2009)
Rhodophyta					
<i>Gracilaria corticata</i>	NA	1,10 - 27,40	Polissacarídeos	HSV-1 e HSV-2	Chattopadhyay et al. (2008)
<i>Grateloupia indica</i>	NA	0,12 - 1,06	Polissacarídeos	HSV-1	Chattopadhyay et al. (2007)
Ochrophyta					
<i>Adenocystis utricularis</i>	NA	0,60 - 70,00	Polissacarídeos	HIV-1	Trinchero et al. (2009)
<i>Canistrocarpus cervicornis</i>	90,00-99,00	NA	Diterpenos	HSV-1	Vallim et al. (2010)
<i>Dictyota menstrualis</i>	NA	1,00	Diterpenos	HIV-1	Cavalcanti et al. (2011)
<i>Fucus vesicularis</i>	NA	0,50-1,00	Polissacarídeos	HIV-1	Queiroz et al. (2008)
<i>Sargassum naozhouense</i>	NA	8,92	Polissacarídeos	HSV-1	Peng et al. (2012)
<i>Sargassum trichophyllum</i>	NA	18,00 – 410,00	Polissacarídeos	HSV-1	Lee et al. (2011)
Ochrophyta					
<i>Sargassum vulgare</i>	23,53 – 31,73 32,62 – 37,21 79,31 – 89,93	NA NA 12,39 – 28,47	Metanólico Aq. Frio Aq. Quente	HIV-1	Este estudo
Rhodophyta					
<i>Palisada flagellifera</i>	19,32 – 23,12 32,68 - 37,94 37,18 - 43,42	NA NA NA	Metanólico Aq. Frio Aq. Quente	HIV-1	Este estudo
Chlorophyta					
<i>Ulva fasciata</i>	21,63 – 27,84 19,94 – 39,20 35,85 - 37,82	NA NA NA	Metanólico Aq. Frio Aq. Quente	HIV-1	Este estudo

NA - Não avaliado.

O IC_{50} foi calculado apenas para os extratos aquosos a quente de *S. vulgare* das duas épocas coletadas (Fig. 2), pois foram os únicos que mostraram percentuais de inibição da RT-HIV acima de 80%, que foi considerada atividade promissora. Os valores de IC_{50} foram $12,39 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a estação seca (Fig. 2A) e $28,47 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a estação chuvosa (Fig. 2B). O controle positivo Foscarnet apresentou valor de IC_{50} de $0,061 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Fig. 2C).

Figura 2. Curva dose-resposta da atividade antiviral pela inibição da enzima RT-HIV de extratos Aq. Quente da alga parda *Sargassum vulgare* coletada durante as épocas de (A) seca e (B) chuvosa. (C) Representa a curva dose-resposta do Foscarnet, utilizado como controle positivo. Para cada curva é apresentada a concentração necessária para inibir 50% da atividade da enzima RT (IC_{50}).

Os resultados para o ensaio de toxicidade dos extratos evidenciaram que todas as concentrações dos extratos brutos não foram tóxicas para o crustáceo *A. salina*, apresentando mais de 50% dos náuplios vivos e sendo classificadas como NCT (não citotóxico) segundo Vinayak et al. (2011).

Tabela 3. Atividade citotóxica frente ao crustáceo *Artemia salina* dos extratos das algas pardas *Sargassum vulgare*, vermelha *Palisada flagellifera* e verde *Ulva fasciata* em dois períodos sazonais distintos, seca e chuvosa. Os dados são apresentados como CC₅₀, concentração citotóxica para matar em 50% as artêmias.

	CC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)		Categoria de toxicidade	
	Seca	chuvosa	seca	chuvosa
<i>Sargassum vulgare</i>				
MeOH	> 2.000	> 2.000	NCT	NCT
Aquoso Frio	> 2.000	> 2.000	NCT	NCT
Aquoso Quente	> 2.000	> 2.000	NCT	NCT
<i>Palisada flagellifera</i>				
MeOH	> 2.000	> 2.000	NCT	NCT
Aquoso Frio	> 2.000	> 2.000	NCT	NCT
Aquoso Quente	> 2.000	> 2.000	NCT	NCT
<i>Ulva fasciata</i>				
MeOH	> 2.000	> 2.000	NCT	NCT
Aquoso Frio	> 2.000	> 2.000	NCT	NCT
Aquoso Quente	> 1.000	> 1.000	NCT	NCT

NCT - Não citotóxico, número de indivíduos mortos menor ou igual a 50%.

3.4. Discussão

No ciclo de vida do vírus HIV, a ação da enzima RT é importante para dar início à transcrição do RNA viral em DNA complementar (cDNA), que rapidamente migra para o núcleo da célula hospedeira incorporando-se ao cromossomo (Singh & Bodiwala, 2010). Na ausência de atividade da RT, o vírus não consegue implantar o seu material genético na célula hospedeira e, por conseguinte, não consegue completar o seu ciclo de vida. Essa ação

enzimática essencial no ciclo do retrovírus do HIV tem impulsionado diversos estudos na busca de novas drogas retrovirais, tais como a Nevaparina e a Delavirdina, que são utilizadas para tratar pacientes infectados com HIV (Woradulayapinij et al., 2005; De Clercq, 2006).

Os resultados do presente estudo se assemelham a outros estudos que investigam o potencial antiviral das macroalgas, como pode ser observado na Tabela 2. A ação dos polissacarídeos de macroalgas na inibição da replicação de vírus envelopados como o vírus da herpes, o vírus da AIDS, citomegalovírus e o vírus da dengue já é bem estabelecida. Portanto, o interesse envolvendo a atividade antiviral de extratos aquosos e polissacarídeos vem aumentando substancialmente nos últimos anos. Assim, pôde-se evidenciar que a maioria dos extratos algáceos apresentou de reduzida a moderada atividade inibitória da enzima RT, com exceção dos extratos aquosos da alga parda *S. vulgare* que apresentou alto potencial com mais de 80% de inibição da RT-HIV. A alga *P. flagellifera* apresentou baixa atividade antiviral de forma geral para todos os extratos testados, sendo o extrato bruto aquoso frio aquele que apresentou as melhores respostas antivirais para a espécie (cerca de 45% de inibição da RT-HIV). Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Iliopoulou et al. (2002) com cinco sesquiterpenos inéditos isolados de *Laurencia obtusa* (Hudson) J.V. Lamouroux. Os autores realizaram testes contra os vírus HIV-1 e herpes 1 e 2, vaccinia, estomatite vesicular, respiratório sincicial, parainfluenza 3 e rinovírus e as atividades antivirais também não foram significativas para nenhum dos vírus testados, mesmo utilizando substâncias isoladas.

Estudos que abordam o potencial antiviral de metabólitos de espécies do complexo *Laurencia* J. V. Lamouroux, que inclui a espécie *P. flagellifera*, são escassos. Machado et al. (2010) sugerem que esse tipo de atividade está restrita a triterpenos produzidos pelo grupo. Soares et al. (2012), estudando a alga *Laurencia dendroidea* J. Agardh, observaram atividade contra o vírus da herpes tipo 1 (97,5% de inibição). Os autores atribuíram a atividade a sesquiterpenos halogenados presentes em extratos alcoólicos dessa alga, reforçando o potencial dos terpenos deste grupo para atividade antiviral.

Os resultados do presente trabalho para *P. flagellifera* foram distintos dos resultados obtidos do trabalho de Soares et al. (2012), no qual os extratos metanólicos apresentaram alto potencial antiviral. Cabe destacar que a

extração de terpenos, que são hidrocarbonetos, é usualmente realizada em solventes orgânicos, diferente dos extratos testados neste estudo, os quais são todos extratos mais polares. Os extratos aquosos de *P. flagellifera* apresentaram os mais altos potenciais de inibição viral, talvez por não se tratar de substâncias isoladas ou ainda por pertencerem a gêneros distintos mesmo que da mesma família de *Laurencia*, essa atividade antiviral pode ser produto de sinergia de substâncias, que pode incluir polissacarídeos e terpenos hidrossolúveis, muito presentes neste grupo de algas vermelhas.

Aparentemente, os polissacarídeos presentes nas macroalgas são os principais responsáveis pela forte inibição da enzima RT, como pode ser observado em resultados semelhantes de outros trabalhos citados na Tabela 2, que corroboram a atividade antiviral atribuída aos polissacarídeos. As macroalgas lideram a lista de maiores produtores de polissacarídeos entre os organismos marinhos, essa quantidade pode ser bastante alta, podendo superar 65% do seu peso seco de acordo com a espécie (Kraan, 2012).

No caso específico de *P. flagellifera*, o estudo de Vlietinck et al. (1998) atribui a atividade anti-HIV à presença de grupamentos sulfatados nos polissacarídeo produzidos por esse grupo, que por sua vez são os responsáveis pela inibição da ligação do vírus com a célula hospedeira.

Outro ponto importante, voltado também para os polissacarídeos presentes em extratos aquosos, é a grande densidade de cargas negativas presentes nestas substâncias, e devido à presença de grupamentos polissulfatados torna possível a interação com os domínios glicoproteicos virais, carregados positivamente. Tem sido proposto também que além da proteção das cargas positivas da glicoproteína viral, os polissulfatos promovem um potencial negativo adicional, que interrompe o contato inicial vírus-célula (Callahan et al., 1991).

É importante ressaltar também que a utilização de temperatura para extração aquosa da alga parda *S. vulgare* (70°C) pode ter beneficiado os resultados obtidos, pois polissacarídeos e substâncias hidrofílicas presentes nessa espécie, reconhecidamente como bioativas, podem ter sido extraídas com maior eficiência. Por conseguinte, o aumento da bioatividade pode ser explicada pela maior presença dessas substâncias, fato este, corroborado

também pelos trabalhos listados na Tabela 2, pois todos foram extraídos com a utilização de temperatura.

A maior atividade antiviral observada para extratos de *S. vulgare* em relação a *P. flagellifera* e *U. fasciata* pode ser atribuída aos polissacarídeos sulfatos específicos de algas pardas, como fucanas, laminarina e alginatos, que têm se mostrado muito superiores em relação aos polissacarídeos sulfatos de algas vermelhas e verdes (Witvrouw & De Clercq, 1997; Chattopadhyay et al., 2008; Hidari et al., 2008; El-Baky et al., 2009; Lee et al., 2011; Wang et al., 2012). Esses resultados indicam que algas pardas, especificamente *S. vulgare* alvo deste estudo, podem representar um recurso interessante e alternativo na busca de novas biomoléculas no combate de doenças virais importantes.

Peng et al. (2012) avaliaram a composição nutricional e química e a atividade antiviral de *Sargassum naozhouense* C. K. Tseng & B. Ren Lu. A espécie apresentou alta atividade contra o vírus da herpes tipo 1 e a caracterização química dos polissacarídeos permitiu aos autores atribuir essa bioatividade aos polissacarídeos alginato e fucoidana. Resultados semelhantes foram observados para polissacarídeos extraídos da alga *Sargassum trichophyllum* J. Agardh, que foi testado contra o vírus da herpes tipo 2, no trabalho realizado por Lee et al. (2011). Já é sabido que as substâncias fenólicas apresentam interessante atividade antiviral, e é um dos metabólitos majoritários das algas pardas (Quideau et al., 2004; Likhitwitayawuid et al., 2005; Tareq et al., 2007, Soares et al., 2012). Por possuírem natureza química polar assim como os polissacarídeos sulfatos, em extratos aquosos brutos, as substâncias fenólicas podem estar presentes e atuar como agentes antivirais em sinergia com os polissacarídeos sulfatos.

Algas verdes, principalmente do gênero *Ulva*, possuem uma grande quantidade de compostos bioativos, tais como polissacarídeos sulfatos e compostos fenólicos, com importantes bioatividades comprovadas, como anticarcinogênico, antiviral, antioxidantes e anticoagulante (Cassolato et al., 2008; Sathivel et al., 2008; El-Baky et al., 2009; Godard et al., 2009). Diferente das evidências mostradas na literatura, no presente trabalho, os extratos de *U. fasciata* apresentaram baixa atividade para os três tipos de extratos brutos testados. Esses extratos podem ter mostrado baixa bioatividade devido ao fato da metodologia utilizada para extração ser pouco específica para a espécie, o

qual poderia não ter proporcionado uma extração completa dos polissacarídeos sulfatos.

As seis horas de extração dos extratos aquosos quente, a temperatura e a forma simples de extração (maceração) podem não ter sido suficientes para o material algáceo. Sinha et al. (2010) descreveram que a forma de extração influencia diretamente no rendimento das substâncias com atividade biológica e, portanto, na atividade antiviral dos extratos aquosos. A forma de extração (solvente, tempo e temperatura) é fundamental na eficiência do extrato, possibilitando maior extração dos grupamentos sulfatados, identificados como os responsáveis pela atividade biológica. Trabalhos na literatura citam em média oito horas de extração alcoólica e a maioria utilizou formas mais sofisticadas de extração, possibilitando um extrato mais concentrado nas suas substâncias bioativas. Uma das metodologias de extração mais citadas é por refluxo utilizando Soxhlet, ou ainda por sonicação durante longos períodos para obtenção das substâncias hidrofílicas (Soares et al., 2007; Rhimou et al., 2010; Thuy et al., 2015).

Existem poucos trabalhos que avaliem o potencial antiviral das clorofíceas e, os poucos que existem, atribuem essa atividade aos heteropolissacarídeos sulfatados produzidos por esse grupo de algas. Contudo, essas substâncias não apresentam grande potencial na inibição de vírus tanto não envelopados quanto envelopados (El-Baky et al., 2009; Karnjanapratum et al., 2011; Wijesekara et al., 2011; Kazlowski et al., 2012).

El-Baky et al. (2009) investigaram o potencial de extratos aquosos e etanólicos contra o vírus da herpes tipo 1 (HSV-1) da alga *U. lactuca*. Em relação ao tipo de extrato, os aquosos apresentaram os maiores potenciais para inibição viral, assim como o presente trabalho com *U. fasciata*. Os autores classificaram os extratos etanólicos de *U. lactuca* como sendo de baixo potencial antiviral e os extratos aquosos quentes como de potencial moderado (aproximadamente 66% de inibição viral), e essa atividade foi duas vezes maior do que a do presente trabalho com *U. fasciata*. Estas diferenças podem sugerir que há diferenças na constituição química dos polissacarídeos sulfatos e eles variam entre as espécies do gênero *Ulva*. Outra hipótese para a maior atividade antiviral no trabalho de El-Baky et al. (2009) é o fato da extração por refluxo utilizada pelos autores talvez ser mais eficiente na extração das

substâncias com potencial antiviral do que a extração simples por maceração utilizada no presente estudo.

Desta forma, aprimorar metodologias de extração e avaliar mais profundamente o perfil químico dos extratos brutos podem dar pistas de quais moléculas seriam as responsáveis pela atividade. A elucidação química também é fundamental, pois, a partir disso, seria possível aprofundar o entendimento dos mecanismos químicos responsáveis pela ação biológica e assim gerar modificações na estrutura química que possam aumentar essa atividade, tornando-a viável e interessante biotecnologicamente.

A maioria dos estudos atribui a atividade antiviral à classe química dos polissacarídeos sulfatos, essas substâncias possuem comportamento polar e, provavelmente, estão presentes mesmo que em diferentes proporções nos extratos obtidos nesse estudo e, principalmente, dos que apresentaram interessante potencial antiviral. E as evidências sustentam cada vez mais a atuação destas substâncias na inibição da replicação do vírus. Os polissacarídeos sulfatos são hidrofílicos e possuem diversos mecanismos de ação, relacionados com fatores químicos como peso molecular e conformação estrutural, o que sustenta que não se trata de simples interações não específicas como se presumia antigamente (Witvrouw & De Clercq, 1997; Luescher-Mattli, 2003; Ghosh et al., 2009).

O teor de polissacarídeos varia de acordo com as fases do histórico de vida e o período sazonal, e essas substâncias obtidas a partir das macroalgas têm sido importantes recursos na descoberta e produção de novas drogas. (Roleda et al., 1997; Holdt & Kraan, 2011).

Mesmo que seja sabido que a constituição desses polissacarídeos sulfatos pode mudar com a sazonalidade, estudos que investiguem o potencial antiviral dos extratos algáceos sob essa ótica ainda são reduzidos. Sobre a abordagem de variação sazonal, existe um número reduzido de estudos, que analisaram as atividades antioxidante, antimicrobiana ou os aspectos fisiológicos das espécies (Bischof et al., 2002; Lohrmann et al., 2004; Zubia et al., 2007).

Os polissacarídeos sulfatos podem interagir com partículas virais de forma extracelular, impedindo a adesão do vírus à célula; Ainda testes com receptores celulares podem servir como alternativas na elucidação da ação

viral e como medidas preventivas de infecção e de terapias antirretrovirais. Por exemplo, são utilizadas em mulheres gestantes soro positivas para proteção do feto (Mendes et al., 2010). Desta forma, os extratos das algas estudadas no presente trabalho podem constituir fontes interessantes para terapias preventivas do HIV.

Assim, investigações exploratórias em torno da composição química desses extratos são necessárias a fim de identificar quais classes químicas poderiam ser responsáveis por essa bioatividade. Esse conhecimento constitui um interessante passo para o entendimento de substâncias algáceas com potencial antiviral, pois esse tema envolve doenças com grande problemática para a saúde pública mundial, e algumas espécies de macroalgas estudadas mostraram interessantes potenciais para prospecção neste sentido.

O ensaio de toxicidade frente ao crustáceo *A. salina*, um organismo sensível a substâncias químicas, foi escolhido como modelo biológico. Este procedimento é um teste rápido, eficiente, fácil de ser executado e barato, além de ser bastante utilizado como forma preliminar de investigar a toxicidade de substâncias bioativas. A toxicidade de uma substância é um ponto indispensável para tornar uma nova droga segura e reduzir a possibilidade de intoxicação ou até mesmo morte de pacientes se a dose administrada for incorreta (Cáceres, 1996). No presente estudo, nenhuma das amostras apresentou toxicidade para este ensaio e esse resultado faz com que os extratos com alto poder inibitório da enzima RT-HIV, como é o caso da alga *S. vulgare*, sejam ainda mais promissores para os passos seguintes da investigação do potencial antiviral.

De forma geral, foi observado para todos os extratos algum potencial antiviral e mesmo os que apresentaram baixa a moderada inibição da RT-HIV-1 podem ser futuramente empregados em testes quanto ao seu potencial virucida, que principalmente, impedem a entrada do vírus na célula. Assim, novas abordagens para produtos naturais das algas marinhas, como elucidar os mecanismos químicos ou melhorias nos métodos de extração, que inibam ou retardem a proliferação do HIV, constituirão sempre um interessante foco para as pesquisas científicas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Biota/Fapesp (2013/50731-1) pelo suporte financeiro. JPS é bolsista de doutorado CAPES. Também se agradece à Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC por todo o apoio de infraestrutura oferecidos.

Referências

- Almeida-Lima, J., Costa, L. S., Silva, N. B., Melo-Silveira, R. F., Silva, F. V., Felipe, C., Medeiros, S. R. B., Leite, E. L. & Rocha, H. A. O. 2010. Evaluating the possible genotoxic, mutagenic and tumor cell proliferation-inhibition effects of a non-anticoagulant, but antithrombotic algal heterofucan. *J. App. Toxicol.*, 30(7): 708-715.
- Barbosa, J. P., Pereira, R. C., Abrantes, J. L., Cirne dos Santos, C.C., Rebello, M. A., Frugulhetti, I. C. & Texeira, V. L. 2004. *In vitro* antiviral diterpenes from the Brazilian brown alga *Dictyota paffii*. *Planta Med.*, 70: 856–860.
- Bischof, K., Hanelt, D., Aguilera, J., Karsten, U., Vögele, B., Sawall, T. & Wiencke, C. 2002. Seasonal variation in ecophysiological patterns in macroalgae from an Arctic fjord. I. Sensitivity of photosynthesis to ultraviolet radiation. *Marine Biology*, 140: 1097-1106.
- Cáceres, P.J., Faudcz, C. A., Matsuhira, I., Vasquez, J. A. 1997. Carragenophyte identification by second derivative Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J. App. Phycol.*, 1: 523-521.
- Callahan, L. N., Phelan, M., Mallinson, M. & Norcross, M. A. 1991. Dextran sulfate blocks antibody binding to the principal neutralizing domain of human immunodeficiency virus type 1 without interfering with gp120–CD4 interactions. *J. Virol.*, 65: 1543–1550.
- Cassolato, E. F. J., Nosedá, D. M., Pujol, C. A., Pellizzari, E. B., Damonte & Duarte, M. E. R. 2008. Chemical structure and antiviral activity of the sulfated hetero rhamnan isolated from the green seaweed *Gayralia axysperma*. *Carbohydrate Res.*, 343: 3085-3095.
- Carr, A., Emery S., Law M., Puls R., Lundgren, J.D. & Powderly, W.G. 2003. HIV lipodystrophy case definition study group. An objective case

- definition of lipodystrophy in HIV-infected adults: a case-control study. *Lancet.*, 361: 726-735.
- Cavalcanti, D. N., Oliveira, M. R., De-Paula, J. C., Barbosa, L. S., Fogel, T., Pinto, M. A., Paixão, I. C. N. P. & Teixeira, V. L. 2011. Variability of a diterpene with potential anti-HIV activity isolated from the Brazilian brown alga *Dictyota menstrualis*. *J. Appl. Phycol.*, 23: 873-876.
- Chattopadhyay, K., Mateu, C. G., Mandal, P., Pujol, C. A., Damonte, E. B. & Ray, B. 2007. Galactan sulfate of *Grateloupia indica*: Isolation, structural features and antiviral activity. *Phytochem.*, 68: 1428-1435.
- Chattopadhyay, K., Ghosh, T., Pujol, C. A., Carlucci, M. J., Damonte, E. B. & Ray, B. 2008. Polysaccharides from *Gracilaria corticata*: Sulfation, chemical characterization and anti-HSV activities. *Inter. J. Biol. Macromol.*, 43: 346-351.
- Cirne-Santos, C.C., Teixeira, V.L., Castello-Branco, L. R., Frugulhetti, I.C.P.P. & Bou-Habib, D. C. 2006. Inhibition of HIV-1 replication in human primary cells by a dolabellane diterpene isolated from the Brazilian algae *Dictyota paffii*. *Planta Med.*, 72: 295–299.
- De Clercq, E. 1995. Toward improved anti-HIV chemotherapy: therapeutic strategies for intervention with HIV infections, *J. Med. Chem.*, 38: 2491–2517.
- De Clercq, E. 2006. Anti-HIV drugs. *Verhandelingen- Koninklijke Academie voor Geneeskunde van Belgie*, 69: 81-104.
- El-Baky, H. H. A., El-Baz, F. K. & El-Baroty, G. S. 2009. Natural preservative ingredient from marine alga *Ulva lactuca* L. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 44: 1688-1695.
- Ghosh, P., Adhikari, U., Ghosal, P. K., Pujol, C. A., Carlucci, M. J., Damonte, E. B. & Ray, B. 2004. *In vitro* anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. *Phytochemistry*, 65: 3151-3157.
- Godard, M., Kelly, D., Ventura, E. W., Soteras, G., Bacocou, J., Ristol, J. & Rouanet, J. 2009. Polysaccharide from the green algae *Ulva rigida* improve the antioxidant status and prevent fatty streak lesions in the high cholesterol fed hamster, an animal model of nutritionally – induced atherosclerosis. *Food Chem.*, 115: 176-180.

- Gulick, R. M., Meibohm, A., Havlir, D., Eron, J. J., Mosley, A., Chodakewitz, J. A. & Robertson, M. 2003. Six-year follow-up of HIV-1-infected adults in a clinical trial of antiretroviral therapy with indinavir, zidovudine, and lamivudine. *Aids*, 17: 2345-2349.
- Harnedy, P. A. & FitzGerald, R. J. 2011. Bioactive proteins, peptides, and amino acids from macroalgae. *J. Phycol.*, 47: 218-232.
- Hidari, K. I. P. J., Takahashia, N., Arihara, M., Nagaoka, M., Morita, K. & Suzuki, T. 2008. Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 376: 91-95.
- Holdt, S. L. & Kraan, S. 2011. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *J. App. Phycol.*, 23: 543-597.
- Iliopoulou, D., Roussis, V., Pannecouque, C., De Clercq, E. & Vagias, C. 2002. Halogenated sesquiterpenes from the red alga *Laurencia obtusa*. *Tetrahedron*, 58: 6749-6755.
- Jonckheere, H., De Clercq, E. & Anné, J. 2000. Fidelity analysis of HIV-1 reverse transcriptase mutants with an altered amino-acid sequence at residues Leu74, Glu89, Tyr115, Tyr183 and Met184. *Eur. J. Bioch.*, 267: 2658-2665.
- Jung, M., Lee, S. & Kim, H. 2000. Recent studies on natural products as anti-HIV agents. *Curr. Med. Chem.*, 7: 649–661.
- Karnjanapratum, S. & You, S. 2011. Molecular characteristics of sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their *in vitro* anticancer and immunomodulatory activities. *Inter. J. Biol. Macromol.*, 48: 311-318.
- Kazłowski, B., Chiu, Y. H., Kazłowska, K., Pan, C. L. & Wu, C. J. 2012. Prevention of Japanese encephalitis virus infections by low-degree-polymerisation sulfated saccharides from *Gracilaria* sp. and *Monostroma nitidum*. *Food Chem.*, 133: 866-874.
- Kim, S.K. & Wijesekara, I. 2010. Development and biological activities of marine derived bioactive peptides: A review. *J. Fuct. Foods*, 1-9.
- Kim, J. H., Hudson, J. B., Huang, A. M., Bannister, K., Hin, H., Choi, T.J., Towers, G.H.N., Hong, Y.K. & DeWreede, R.E. 1997. Biological activities of seaweed extracts from British Columbia, Canada and Korea. 1. Antiviral activity. *Can. J. Bot.*, 75: 1656–1660.

- Kohistaedt, L. A., Wang, J., Friedman, J. M., Rice, P. A. & Steitz, T. A. 1992. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science*, 256: 1783-1790.
- Kraan, S. 2012. Algal polysaccharides, novel applications and outlook. *Carbohydr. Compr. Stud. Glycobiol. Glycotechnol.*, 22: 489–532.
- Lee, J., Takeshita, A., Hayashi, K. & Hayashi, T. 2011. Structures and antiviral activities of polysaccharides from *Sargassum trichophyllum*. *Carbohydrate Polymers*, 86: 995-999.
- Likhitwitayawuid, K., Supudompol, B., Sritularak, B., Lipipun, V., Rapp, K. & Schinazi, R. F. 2005. Phenolics with anti-HSV and anti-HIV activities from *Artocarpus gomezianus*, *Mallotus pallidus* and *Triphasia trifolia*. *Pharm. Biol.*, 43: 651-657.
- Lohrmann, N. L., Logan, B. A. & Johnson, A. S. 2004. Seasonal acclimatization of antioxidants and photosynthesis in *Chondrus crispus* and *Mastocarpus stellatus*, two co-occurring red algae with differing stress tolerances. *Biol. Bul.*, 207: 225–232.
- Luescher-Mattli, M. 2003. Algae, a possible source for new drugs in the treatment of HIV and other viral diseases. *Curr. Med. Chem.*, 2: 219-225.
- Machado, F. L. S., Kaiser, C. R., Costa, S. S., Gestinari, L. M. & Soares, A. R. 2010. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas do gênero *Laurencia*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 20: 441-452.
- Mallipeddi, R. & Rohan, L. C. 2010. Nanoparticle-based vaginal drug delivery systems for HIV prevention. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7: 37-48.
- Mendes, G. S., Soares, A. R., Martins, F. O., Albuquerque, M. C. M., Costa, S. S., Yoneshigue-Valentin, Y., Gestinari, L. M. S., Santos, N. & Romanos, M. T. V. 2010. Antiviral activity of the green alga *Ulva fasciata* on the replication of human metapneumovirus. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 52: 3-10.
- Mendes, G., Soares, A. R., Sigiliano, L., Machado, F., Kaiser, C., Romeiro, N. & Romanos, M. T. V. 2011. *In vitro* anti-HMPV activity of meroditerpenoids from marine alga *Stypopodium zonale* (Dictyotales). *Molecules*, 16: 8437-8450.
- Ng, T.B., Huang, B., Fong, W.P. & Yeung, H.W. 1997. Anti-human immunodeficiency virus (anti-HIV) natural products with special emphasis on HIV reverse transcriptase inhibitors. *Life Sciences*, 61: 933–949.

- Ohta, Y., Lee, J.-B., Hayashi, K. & Hayashi, T. 2009. Isolation of sulfated galactan from *Codium fragile* and its antiviral effect. *Biol. Pharmac. Bul.*, 32: 892–898.
- Peng, Y., Xie, E., Zheng, K., Fredimoses, M., Yang, X., Zhou, X., Wang, Y., Yang, B., Lin, X., Liu, J. & Liu, Y. 2012. Nutritional and chemical composition and antiviral activity of cultivated seaweed *Sargassum naozhouense* Tseng et Lu. *Mar. Drugs*, 11: 20-32.
- Pereira, R. C. & Costa-Lotufo, L. V. 2012. Bioprospecting for bioactives from seaweeds: potential, obstacles and alternatives. *Rev. Bras. Farmacog.*, 22: 894-905.
- Pereira, H. S., Leão-Ferreira, L. R., Moussatché, N., Teixeira, V. L., Cavalcanti, D. N., Costa, L. J., Diaz, R. & Frugulhetti, I. C. P. P. 2004. Antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazilian marine alga *Dictyota menstrualis* against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Antiviral Res.*, 64: 69–76.
- Plouguerné, E., de Souza, L. M., Sassaki, G. L., Cavalcanti, J. F., Villela Romanos, M. T., da Gama, B. A., Crespo, R. P. & Barreto-Bergter, E. 2013. Antiviral sulfoquinovosyldiacylglycerols (SQDGs) from the Brazilian brown seaweed *Sargassum vulgare*. *Marine Drugs*, 11: 4628-4640.
- Queiroz, K. C. S., Medeiros, V. P., Queiroz, L. S., Abreu, L. R. D., Rocha, H. A. O., Ferreira, C. V., Jucá, M. B., Aoyama, H. & Leite, E. L. 2008. Inhibition of reverse transcriptase activity of HIV by polysaccharides of brown algae. *Biomed Pharmacother.*, 62: 303–307.
- Quideau, S., Varadinova, T., Karagiozova, D., Jourdes, M., Pardon, P., Baudry, C., Genova, P., Diakov, T. & Petrova, R. 2004. Main structural and stereochemical aspects of the antiherpetic activity of nonahydroxyterphenoyl- containing C-glycosidic ellagitannins. *Chem. Biodivers.*, 1: 247-258.
- Rhimou, B., Hassane, R. & Bourgougnon, N. 2010. Antiviral activity of the extract of Rhodophyceae from Morocco. *Afr. J. Biotechnol.*, 9: 7968-7975.
- Roleda, M. Y., Ganzon-Fortes, E. T., & Montaña, N. E. 1997. Agar from vegetative and tetrasporic *Gelidiella acerosa* (Gelidiales, Rhodophyta). *Bot. Mar.*, 40(1-6): 501-506.

- Sathivel, A., Raghavendran, R. H., Srinivasan, P. & Devaki, T. 2008. Anti-peroxidative and anti-hiperlipidemic nature of *Ulva lactuca* crude polysaccharide on D-Galactosamine induced hepatitis in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 3262-3267.
- Scott, G., Springfield, E.P. & Coldrey, N., 2004. A pharmacognostical study of 26 South African plant species used as traditional medicines. *Pharm. L. Biol.*, 42: 186–213.
- Silva, M., Vieira, L., Almeida, A. P. & Kijjoo, A. 2013. The marine macroalgae of the genus *Ulva*: chemistry, biological activities and potential applications. *Oceanog.*, 1(1): 1-6.
- Singh, I. P. & Bodiwala, H. S. 2010. Recent advances in anti-HIV natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 27: 1781-1800.
- Sinha, S., Astani, A., Ghosh, T., Schnitzler, P. & Ray, B. 2010. Polysaccharides from *Sargassum tenerrimum*: structural features, chemical modification and anti-viral activity. *Phytochem.*, 71: 235-242.
- Soares, S. A. 2013. Isolamento biomonitorado de substâncias ativas de *Croton pallidulus* var. *pallidulus* (Euphorbiaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo. 105p.
- Soares, A. R., Abrantes, J. L., Souza, T. M. L., Fontes, C. F. L., Pereira, R. C., Frugulhetti, I.C.P.P. & Teixeira, V. L. 2007. Antiviral effect of meroditerpenes isolated from *Stypopodium zonale* (Dictyotaceae) against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and Herpes simplex virus (HSV-1). *Planta Med.*, 73: 1221-1224.
- Soares, A. R., Robaina, M. C. S., Mendes, G. S., Silva, T. S. L., Gestinari, L. M. S., Pamplona, O. S., Yoneshigue-Valentin, Y. & Kaiser, C. R. 2012. Antiviral Activity of extracts from Brazilian seaweeds against herpes simplex virus. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 22: 714-723.
- Stengel, D. B. & Connan, S. 2015. Marine algae: A source of biomass for biotechnological applications. *Natural Products From Marine Algae: Methods and Protocols*, 1-37p.
- Stengel, D. B., Connan, S. & Popper, Z. A. 2011 Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnol. Adv.*, 29: 483-501.

- Tareq, M., Khan, H. & Ather, A. 2007. Potentials of phenolic molecules of natural origin and their derivatives as anti-HIV agents. *Biotech. Ann. Rev.*, 13: 223-264.
- Thuy, T. T. T., Bui, M. L., Van, T. T. T., Quang, N. V., Tu, H. C., Zheng, Y., Seguin-Devaux, C., Mi, B. & Usov, A. 2015. Anti-HIV activity of fucoidans from three brown seaweed species. *Carb. Poly.*, 115: 122-128.
- Trinchero, J., Ponce, N. M. A., Córdoba, O. L., Flores, M. L., Pampuro, S., Stortz, C. A., Salomón, H. & Turk, G. 2009. Antiretroviral activity of fucoidans extracted from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*. *Phytother. Res.*, 23: 707-712.
- UNAIDS. 2015. Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS. Relatório Global sobre AIDS 2015. Disponível em <http://www.unaids.org.br/documentos>. Acesso em 02/02/2016 às 14h57min.
- Van Wyk, B. & Gericke, N. 2000. People's Plants: A Guide to Useful Plants of South Africa, first ed. Briza Publications, South Africa. 10–12p.
- Vallim, M. A., Barbosa, J. E., Cavalcanti, D. N., De-Paula, J. C., da Silva, V. A. G. G., Teixeira, V. L. & Paixão, I. C. N. P. 2010. *In vitro* antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazilian brown alga *Canistrocarpus cervicornis*. *J. Med. Plant Res.*, 4: 2379–2382.
- Vlietinck, A.J., De Bruyne, T., Apers, S. & Pieters, L.A., 1998. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta Medica*, 64: 97–109.
- Vinayak, R. C., Sabu, A. S. & Chatterji, A. 2011. Bio-prospecting of a few brown seaweeds for their cytotoxic and antioxidant activities. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 1-9.
- Yang, S.S., Gragg, G.M., Newman, D.J. & Bader, J.P. 2001. Natural product-based anti-HIV drug discovery and development facilitated by the NCI developmental therapeutics program. *Journal of Natural Products*, 64: 265–277.
- Yasuhara-Bell, J. & Lu, Y. 2010. Marine compounds and their antiviral activities. *Antivi. Res.*, 86: 231-240.
- Wang, H., Ooi, E. V. & Ang Jr, P. O. 2008. Antiviral activities of extracts from Hong Kong seaweeds. *J.f Zhej. Univ. Sci. B*, 9: 969-976.

- Wang, Q., Ding, Z.H., Liu, J.K. & Zheng, Y.T. 2004. Xanthohumol, a novel anti-HIV-1 agent purified from Hops, *Humulus lupulus*. *Antiviral Res.*, 64: 189–194.
- Wang, W., Wang, S. X. & Guan, H. S. 2012. The antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides: an overview. *Marine Drugs*, 10: 2795-2816.
- Wijesekara, I., Pangestuti, R. & Kim, S. K. 2011. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carb. Poly.*, 84: 14-21.
- Witvrouw, M. & De Clercq, E. 1997. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *Gen. Pharmacol.*, 29: 497–511.
- 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. Ethnopharm.*, 101: 84-89.
- Zubia, M., Robledo, D. & Freile-Pelegrín, Y. 2007. Antioxidant activities in marine macroalgae from the coasts of Quintana Roo and Yucatan, Mexico. *J. Appl. Phycol.*, 19: 449–458.

Potencial antioxidante de extratos metanólicos e aquosos de três espécies de macroalgas marinhas do nordeste do Brasil em duas estações do ano

Resumo

Macroalgas são ricas em diversas classes de produtos naturais que são utilizados nas áreas nutricionais e farmacêutica. Nesse estudo, extratos metanólicos, aquosos frio e quente das algas *Sargassum vulgare* (Ochrophyta), *Palisada flagellifera* (Rhodophyta) e *Ulva fasciata* (Chlorophyta) foram investigados quanto ao seu potencial antioxidante em duas estações (seca e chuvosa) no litoral sul da Bahia. Os extratos de todas as espécies apresentaram potencial antioxidante frente ao ensaio de sequestro do radical ABTS e *S. vulgare* apresentou percentuais de até 100% para o extrato aquoso quente da estação chuvosa. Os extratos aquosos quente de *S. vulgare* mostraram poder redutor significativo avaliados pelo ensaio de Folin-Ciocalteu, $20,20 \pm 1,13 \text{ mg.g}^{-1}$ EAG (seca) e $40,53 \pm 2,21 \text{ mg.g}^{-1}$ EAG (chuvosa), que pode estar relacionado à presença de substâncias fenólicas. *Ulva fasciata* apresentou os menores potenciais antioxidantes quando comparada às algas parda e vermelha deste estudo. Os extratos metanólicos de todas as espécies apresentaram alta resposta frente ao ensaio de co-oxidação do β -caroteno. Não foi possível observar uma variação do potencial antioxidante entre as estações para as algas parda e vermelha, porém *U. fasciata* mostrou uma clara variação entre as estações seca e chuvosa para o potencial antioxidante, e essas propriedades podem estar relacionados tanto a mudanças ambientais, quanto às técnicas de extração. De forma geral, *S. vulgare* e *P. flagellifera* foram consideradas uma fonte promissora de substâncias antioxidantes com potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Antioxidantes, biotecnologia, extratos, macroalgas, radicais livres.

Abstract

Macroalgae are rich in several classes of natural products which are used in nutritional and pharmaceutical areas. In this study methanol, cold and hot aqueous extracts of *Sargassum vulgare* (Ochrophyta) *Palisada flagellifera* (Rhodophyta) and *Ulva fasciata* (Chlorophyta) were investigated for their antioxidant potential in two seasons (dry and rainy) on the south coast of Bahia. The extracts of all species showed antioxidant potential against the ABTS radical scavenging and *S. vulgare* showed percentages of up to 100% for the hot aqueous extract of the rainy season. The hot aqueous extracts of *S. vulgare* showed significant reducing power evaluated by the Folin-Ciocalteu assay, 20.20 ± 1.13 mg g⁻¹ EAG (dry) and 40.53 ± 2.21 mg g⁻¹ EAG (rainy), which may be related to the presence of phenolic compounds. *Ulva fasciata* showed the smallest antioxidant potential when compared to the brown and red algae of this study. Methanolic extracts of all species showed a high response for the β -carotene co-oxidation assay. It was not possible to observe a variation of the antioxidant potential between the seasons for the antioxidant potential, and these properties may be related to both environmental changes and extraction procedures. In general, *S. vulgare* and *P. flagellifera* were considered a promising source of antioxidant substances with biotechnological potential.

Keywords: Antioxidants, biotechnology, extracts, free radicals, macroalgae.

4.1. Introdução

As macroalgas possuem substâncias já conhecidas e importantes do ponto de vista médico, entre elas estão os antioxidantes que provavelmente são considerados um dos mais interessantes (Kohen & Nyska, 2002). Os antioxidantes são substâncias que desempenham um importante papel no combate a várias doenças graves como, por exemplo, câncer, inflamações crônicas, aterosclerose e doenças cardiovasculares, além de atuar retardando o processo de envelhecimento (Kohen & Nyska, 2002). Embora o benefício no consumo de antioxidantes seja, na maioria das vezes, associado a plantas terrestres (vegetais e frutas), tem sido observado um aumento no número de pesquisas científicas que atribuem às macroalgas os mesmos benefícios (Cornish & Garbary, 2010).

As macroalgas que ocorrem nos costões rochosos, principalmente no mediolitoral, estão submetidas frequentemente a bruscas mudanças de radiação solar e UV, dessecação por exposição à atmosfera e variações na temperatura e na salinidade, que podem se alterar a curto (diariamente), médio (sazonalmente) ou longo prazo (anualmente). Frente a essas condições ambientais, as macroalgas precisam de mecanismos, entre eles os antioxidantes, para combater de forma eficiente essas adversidades e evitar assim o dano por estresse oxidativo (Addala-Díaz et al., 2006; Rocha et al., 2007; Cox et al., 2010).

Estudos sazonais sobre a fisiologia das macroalgas tiveram início com as pesquisas de Haas (1950). Ele isolou peptídeos de macroalgas e verificou alterações sazonais, que atribuiu à baixa intensidade de luz disponível durante o inverno e a períodos de exposição ao ar durante a maré baixa. Após esse estudo, outros estudos fenológicos foram publicados, mas poucos com uma abordagem verificando variações sazonais do potencial antioxidante de macroalgas (Sakamoto, 1993; Addala-Díaz et al., 2006; El Gamal, 2010; Apostolidis et al., 2011; Trigui et al., 2013).

Macroalgas, assim como as plantas terrestres, apresentam inúmeros compostos antioxidantes, entre eles florotaninos, ácido ascórbico, tocoferol, carotenoides, fosfolipídios, compostos relacionados à clorofila, bromofenóis, catequinas, aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) e polissacarídeos. Todos

eles possuem comprovados benefícios à saúde humana e por isso são considerados uma fonte de compostos bioativos com alta diversidade de classes químicas e reconhecida atividade antioxidante (Fujimoto, 1990; Le Tutour et al., 1998; Kuda et al., 2002; Rupérez et al., 2002; Yuan et al., 2005; Bansemir et al., 2006; Chew et al., 2008; Cox et al., 2010; Souza et al., 2012; Dotulong et al., 2013; Lee et al., 2013; Sabeena Farvin et al., 2013; Rodriguez-Jasso et al., 2014).

Tratando-se da avaliação do potencial antioxidante de diversas algas marinhas, alguns trabalhos merecem destaque. Zhang et al. (2007) realizaram o *screening* de extratos metanol:clorofórmio (2:1 v/v) de 28 espécies de algas clorófitas, rodófitas e feófitas para os ensaios de inibição do radical DPPH e poder redutor (Folin-Ciocalteu). De todas as espécies estudadas, os autores encontraram o maior potencial antioxidante na alga vermelha *Symphyclocladia latiuscula* (Harvey) Yamada. O trabalho de Zubia et al. (2007), com 48 extratos diclorometano:metanol (2:1 v/v) de macroalgas, mostrou que as maiores atividades de sequestro de DPPH foram encontradas na alga parda *Lobophora variegata* (J.V. Lamouroux) Womersley ex E.C. Oliveira, seguido da alga verde *Avrainvillea longicaulis* (Kützinger) G. Murray & Boodle e, por último, da alga vermelha *Chondria baileyana* (Montagne) Harvey. Apesar da grande contribuição desses trabalhos, nenhum deles fez uma comparação em períodos sazonais diferentes.

Matanjan et al. (2008) realizaram o *screening* de extratos metanólicos que foram testados frente aos ensaios do sequestro do radical ABTS, poder redutor FRAP e quantificação de substâncias redutoras pelo Folin-Ciocalteu com oito espécies de algas vermelhas (*Eucheuma cottonii* Weber-van Bosse, *Eucheuma spinosum* J. Agardh, *Halymenia durvillaei* Bory de Saint-Vicent), algas verdes (*Caulerpa lentillifera* J. Agardh e *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J. Agardh) e algas pardas (*Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V. Lamouroux, *Sargassum polycystum* C. Agardh, *Padina* spp.). Nesse trabalho os autores observaram que de forma geral, *C. lentillifera* e *S. polycystum* apresentaram os maiores potenciais antioxidantes frente os ensaios testados.

Belattmania et al. (2016) avaliaram o potencial nutracêutico da alga parda *Cystoseira humilis* Schousboe ex Kützinger quanto ao potencial antioxidante de extratos metanólicos dessa alga e observaram alta atividade

frente ao ensaio sequestro do radical DPPH (82%) e moderada atividade quelante de metais (68%) e concluíram que esta espécie possui interessante aplicabilidade como recurso promissor de substâncias bioativas.

Existe grande diversidade de substâncias com comprovada atividade antioxidante em algas marinhas. Alguns desses grupos químicos podem ser observados na Figura 1.

Substâncias bromadas são comuns em macroalgas vermelhas; bromofenóis foram encontrados em *Symphyocladia latiuscula* (Harvey) Yamada (Fig. 1A) e foram responsáveis pela alta capacidade antioxidante desta espécie (Mayer et al., 2009). Alguns compostos aromáticos das algas parda *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Fig. 1B), vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamouroux (Fig. 1C) e verde *Ulva compressa* Linnaeus (como *Enteromorpha compressa* (Linnaeus) Nees) (Fig. 1C) têm sido investigados quanto ao seu possível potencial antioxidante (Dembitsky, 2006). Carotenoides, presentes em uma variedade de grupos de macroalgas, possuem conhecida capacidade antioxidante e conferem proteção às algas contra radiação UV. A fucoxantina (Fig. 1D), um tipo de carotenoide encontrado em algas pardas, atribui-se que as ligações alênicas presentes nessa molécula são responsáveis pela alta ação antioxidante (Peng et al., 2011).

Algas pardas possuem grande quantidade de substâncias fenólicas, o eckol (Fig. 1F) e o dieckol (Fig. 1G) são florotaninos que possuem reconhecida capacidade antioxidante, isolados da alga *Ecklonia cava* Kjellman (Shibata et al., 2008). Polissacarídeos sulfatados como as fucoidanas (Fig. 1H), presentes também em algas pardas como *Laminaria japonica* Areschoug, conferem alta atividade redutora dos radicais livres DPPH e ABTS (Li et al., 2008).

Dois sesquiterpenos (Fig. 1I, 1J), isolados da alga verde *Ulva fasciata* Delile também apresentaram alta ação antioxidante de acordo com o trabalho de Chakraborty et al. (2010), assim como o alcaloide fragilamina (FRG) (Fig. 1E) isolado da alga vermelha *Martensia fragilis* Harvey (Güven et al., 2010).

Figura 1. Substâncias com reconhecida atividade antioxidante encontradas em macroalgas. (A) Bromofenol da alga vermelha *Symphyocladia latiuscula*, (B) substância aromática isolada de *Undaria pinnatifida*, (C) substância aromática encontrada em *Hypnea musciformis* e *Enteromorpha compressa*, (D) carotenoide fucoxantina isolado de algas pardas, (E) alcaloide fragilamina (FRG) isolado da alga vermelha *Martensia fragilis*, (F e G) florotaninos eckol e dieckol, respectivamente, isolados da alga *Ecklonia cava*, (H) polissacarídeo do tipo fucoidana isolado da alga parda *Laminaria japonica*, (I e J) sesquiterpenos isolados da alga verde *Ulva fasciata*.

Trabalhos que investiguem o potencial antioxidante em macroalgas tropicais ainda são escassos. E este é um fato curioso, pois a zona tropical do globo terrestre é caracterizada por possuir alta incidência de radiação UV e elevada temperatura, devido à proximidade com a linha do equador. Essa condição, varia consideravelmente com a sazonalidade, e estudos prévios afirmam que essa combinação de fatores estimula o desenvolvimento de

defesas antioxidantes nos organismos que ocupam essa zona (Aguilera et al., 2002; Bischof et al., 2002; Zubia et al., 2007; Hupel et al., 2011; Cruces et al., 2012; Cruces et al., 2013).

O presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial antioxidante de extratos metanólicos, aquosos a frio e aquosos a quente das espécies *Sargassum vulgare* C. Agardh, *Palisada flagellifera* (J. Agardh) K.W. Nam e *Ulva fasciata* Delile, macroalgas abundantes da costa nordeste do Brasil, região tropical. Assim como avaliar sua variação entre uma época de seca e uma chuvosa.

4.2. Materiais e métodos

4.2.1. Coleta do material

Sargassum vulgare (Ochrophyta), *Palisada flagellifera* (Rhodophyta) e *Ulva fasciata* (Chlorophyta), macroalgas abundantes na costa nordestina do Brasil e pertencentes a três linhagens diferentes, foram coletadas durante a estação de seca (1 a 5 de novembro de 2013) e a estação chuvosa (16 de maio de 2014), na região entremarés do costão rochoso da Praia do Morro de Pernambuco (14°47'00"S, 39°02'00"W), localizada no Município de Ilhéus, situado no litoral sul da Bahia. O material foi triado, limpo de macroepífitos e lavado com abundante água corrente e posteriormente seco em estufa a 40°C até peso constante (aproximadamente 48 h).

4.2.2. Obtenção e preparo dos extratos

As amostras secas e pulverizadas de cada espécie foram extraídas por maceração simples em metanol (n = 5), água ultrapura a 25°C (temperatura ambiente; n = 5) e água ultrapura a 70°C (n = 5), em uma proporção de aproximadamente 50 g de massa seca (MS) em 100 mL de solvente. A maceração em metanol e água a temperatura ambiente foi realizada a cada 24 h por três vezes. A maceração em água a 70°C foi realizada por 1 h em banho-maria e repetida três vezes. O produto resultante da extração do mesmo solvente foi reunido como um único extrato e foi chamado de extrato bruto: extrato metanólico (MeOH), extrato aquoso frio (Aq. Frio) e extrato aquoso quente (Aq. Quente).

Os extratos brutos metanólicos foram filtrados com auxílio de funil de vidro e papel filtro. Os extratos aquosos, devido à alta viscosidade, foram filtrados em sistema a vácuo. Os extratos metanólicos foram concentrados por rotaevaporação a 40°C e, posteriormente, liofilizados. Os extratos aquosos foram congelados em freezer -80°C e em seguida liofilizados. Todos os extratos brutos liofilizados foram mantidos em freezer -80°C até posteriores análises.

4.2.3. Avaliação do potencial antioxidante

O potencial antioxidante foi avaliado por meio de seis diferentes ensaios colorimétricos: sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), redução do radical ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), sistema β -caroteno/ácido linoleico, potencial antioxidante de redução do ferro (FRAP, do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*), atividade quelante de metais e determinação de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu.

Os extratos metanólicos destinados para os ensaios antioxidantes foram solubilizados em 1 mL de MeOH (Synth, Brasil) e os extratos aquosos em 1 mL de DMSO 10% (Sigma-Aldrich, Brasil), devido à incompatibilidade dos constituintes desses extratos com solventes orgânicos.

O potencial antioxidante dos extratos de *S. vulgare*, *P. flagellifera* e *U. fasciata*, para todos os ensaios, foi testado em concentrações de 25, 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de extrato bruto (Anexo 3). As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro de microplacas UV-vis EPOCH (Biotek Instruments, EUA). Os resultados foram expressos em percentual de atividade antioxidante *versus* concentração de extrato bruto e foram utilizados para calcular os valores de EC_{50} (concentração efetiva do extrato para reduzir em 50% a atividade antioxidante máxima). Os cálculos de EC_{50} foram feitos através de ajustes de curvas para um modelo sigmoide de dose-resposta no programa Prisma Graph Pad® 6.

Os resultados foram também expressos em equivalentes padrão, utilizando ácido gálico (Sigma-Aldrich, Brasil), BHT (Sigma-Aldrich, Brasil) e Trolox (Sigma-Aldrich, Brasil) como padrões, nas concentrações descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Faixa de concentração dos padrões utilizada para a construção da curva padrão de ácido gálico, butil-hidroxi-tolueno (BHT) e Trolox, equação da reta e coeficiente de correlação para os diferentes ensaios.

Ensaio	Ácido gálico		BHT		Trolox	
	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Eq. da reta Correlação	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Eq. da reta Correlação	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Eq. da reta Correlação
DPPH	0 – 2	$y = -1,0684x + 0,7303$ $R^2 = 0,9936$	-----	-----	0 – 10	$y = -0,1794x + 0,8436$ $R^2 = 0,9987$
ABTS	0 – 1,5	$y = -1,4687x + 0,8566$ $R^2 = 0,9932$	0 – 50	$y = -0,0428x + 0,8375$ $R^2 = 0,9945$	0 – 5	$y = -0,3942x + 0,8178$ $R^2 = 0,9979$
FRAP	0 – 2,5	$y = 2,8627x - 0,0554$ $R^2 = 0,9958$	0 – 17,5	$y = 0,1552x - 0,0131$ $R^2 = 0,9948$	0 – 7,5	$y = 0,6522x + 0,0024$ $R^2 = 0,9995$
Quelante	0 – 3,5	$y = -0,3842x + 0,7542$ $R^2 = 0,9943$	-----	-----	-----	-----
Folin-Ciocalteu	0 – 8,5	$y = 0,3201x + 0,009$ $R^2 = 0,9931$	-----	-----	0 – 100	$y = 0,0121x + 0,0093$ $R^2 = 0,9920$

Para todos os ensaios antioxidantes foi necessário preparar um branco amostra para cada amostra, pois a presença de pigmentos nos extratos poderia interferir na leitura e interpretação dos resultados. As absorbâncias dos brancos amostra foram descontadas das respectivas absorbâncias das amostras.

A comparação do potencial antioxidante entre os diferentes tratamentos foi realizada apenas para a concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de extrato bruto, comparando o percentual de atividade.

4.2.3.1. Ensaio antioxidante de redução do radical DPPH

O potencial antioxidante foi avaliado utilizando-se o ensaio de sequestro do radical DPPH seguindo o método de Pires et al. (em preparação), modificado de Brand-Williams et al. (1995) que encontra-se descrito no subitem 2.2.3.1. no Capítulo 2- Metodologia Geral.

4.2.3.2. Ensaio do potencial de sequestro do radical ABTS

O ensaio foi preparado seguindo o método de Torres et al. (em preparação), modificado de Yang et al. (2011) descrito no subitem 2.2.3.2. no Capítulo 2- Metodologia Geral.

4.2.3.3. Co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico

Para avaliação da co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico foi utilizada a metodologia de Harb et al. (em preparação), modificada de Duarte-Almeida et al. (2006) descrita no subitem 2.2.3.3. do Capítulo 2- Metodologia Geral.

4.2.3.4. Poder redutor de Ferro (FRAP)

O ensaio do poder de redução do ferro (FRAP) foi preparado seguindo método Urrea-Victoria et al. (2016) modificado de Brito et al. (2006) descrita no subitem 2.2.3.4. do Capítulo 2- Metodologia Geral.

4.2.3.5. Atividade quelante de metais

O ensaio foi realizado seguindo a metodologia de Harb et al. (2016), modificada de Min et al. (2011) descrita no subitem 2.2.3.5. do Capítulo 2- Metodologia Geral.

4.2.3.6. Substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu

O ensaio capacidade redutora do Folin-Ciocalteu foi feito seguindo metodologia de Pires et al. (em preparação), adaptado de Singleton & Rossi (1965) e Waterman & Mole (1994) descrita no subitem 2.2.3.6. do Capítulo 2- Metodologia Geral.

4.2.4. Análise estatística dos dados

A ação antioxidante de *S. vulgare*, *P. flagellifera* e *Ulva fasciata* foi avaliada separadamente para cada espécie quanto à potencialidade dos três tipos de extratos estudados (MeOH, Aq. Frio, Aq. Quente) e a sua variação sazonal. Para tanto, a normalidade dos dados foi avaliada através do teste de Kolmogorov–Smirnov & Lilliefors e a homocedasticidade das variâncias pelo teste de Bartlett, dentro de um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). A análise das diferenças entre as médias foi realizada mediante análises de

variância (ANOVA) bifatorial ($p < 0,05$), considerando os fatores tipo de extrato e período de coleta. Comparações múltiplas dentre os tratamentos com diferenças significativas ($p < 0,05$) foram determinadas pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. Análise multivariada utilizando o método de PCA (Análise de Componentes Principais) foi feita utilizando-se os valores em porcentagem.

4.3. Resultados

4.3.1. Sequestro do radical DPPH

Todos os tipos de extrato de *S. vulgare* apresentaram variação significativa entre a época de seca e a chuvosa (Fig. 2A). A estação chuvosa apresentou os maiores potenciais antioxidantes quando comparados com os da estação seca. O extrato aquoso quente (Aq. Quente) apresentou potencial antioxidante de $64,82 \pm 4,24\%$ para a estação chuvosa e valores menores na estação seca ($1,67 \pm 1,37\%$). O mesmo foi observado para o extrato aquoso frio (Aq. Frio), que apresentou potencial antioxidante de $37,01 \pm 1,69\%$ na estação chuvosa, atividade que foi reduzida a $12,32 \pm 1,24\%$ na estação seca (Fig. 2A).

Todos os extratos da alga *P. flagellifera* apresentaram variação entre as estações seca e chuvosa para o potencial antioxidante (Fig. 2B). A maior atividade antioxidante foi observada para o extrato metanólico (MeOH), $38,68 \pm 1,65\%$ para estação seca. Em relação aos extratos aquosos frios houve diferenças significativas entre a estação seca, com valores menores de $16,60 \pm 1,55\%$, em relação à estação chuvosa, $28,41 \pm 1,65\%$. O extrato Aq. Quente da estação seca apresentou reduzido potencial antioxidante, enquanto que o mesmo extrato da estação chuvosa apresentou potencial antioxidante de $19,84 \pm 1,62\%$ (Fig. 2B).

O extrato que apresentou maior potencial antioxidante da alga *U. fasciata* foi o MeOH, $42,19 \pm 4,06\%$ durante à estação seca (Fig. 2C). O mesmo tipo de extrato apresentou uma redução maior que 50% do potencial durante a estação chuvosa ($19,45 \pm 6,14\%$). As respostas de potencial antioxidante dos extratos aquosos a frio e a quente para essa espécie mostrou variação oposta na estação chuvosa, com baixos potenciais de $19,21 \pm 1,21\%$ e $16,89 \pm 2,03\%$, respectivamente (Fig. 2C).

Figura 2. Atividade antioxidante (%) de extratos brutos na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pelo método do sequestro do radical DPPH para três espécies de macroalgas do baixo sul baiano: (A) *S. vulgare*, (B) *P. flagellifera* e (C) *U. fasciata* para os extratos metanólicos (MeOH), aquoso a frio (Aq. Frio) e

aquoso a quente (Aq. Quente). Letras distintas representam diferença significativa para $p < 0,05$.

Os valores de EC_{50} para o ensaio de DPPH estão apresentados na Tabela 2. O respectivo valor de EC_{50} para os padrões ácido gálico e Trolox também são apresentados na Tabela 2. Vale ressaltar que os valores de EC_{50} são inversamente proporcionais ao potencial antioxidante, portanto, quanto menor for o valor desse parâmetro maior será o potencial antioxidante.

Para o ensaio de sequestro do DPPH, o extrato Aq. Quente da alga parda *S. vulgare* apresentou o maior potencial antioxidante entre as espécies estudadas, com EC_{50} de $96,61 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para amostras da estação chuvosa (Tabela 2).

Os extratos metanólicos apresentaram uma tendência semelhante no EC_{50} para as três espécies, pois apenas para estação a seca foi possível calcular esse parâmetro, devido às baixas atividades desses extratos durante a estação chuvosa (Tabela 2).

Os resultados de EC_{50} apresentados na Tabela 2 demonstram que os extratos das espécies estudadas não apresentaram alto potencial antioxidante frente ao radical DPPH quando comparados com o EC_{50} dos padrões utilizados neste ensaio.

Tabela 2. Concentração efetiva para atingir 50% do potencial antioxidante do ensaio de sequestro do radical DPPH ($EC_{50} \mu\text{g.mL}^{-1}$) de três tipos de extratos das macroalgas *Sargassum vulgare*, *Palisada flagellifera* e *Ulva fasciata* em duas estações de coleta.

Extratos	DPPH ($EC_{50} \mu\text{g.mL}^{-1}$)					
	<i>Sargassum vulgare</i>		<i>Palisada flagellifera</i>		<i>Ulva fasciata</i>	
	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa
MeOH	8336,81	*	847,22	*	291,07	*
Aq. Frio	867,3	257	*	*	*	921,4
Aq. Quente	*	96,61	*	585,8	*	*
Padrão	Ác. Gálico	1,04	Trolox	4,2		

*Não foi possível calcular o EC_{50} .

4.3.2. Sequestro do radical ABTS

Foi observada variação significativa entre as estações seca e chuvosa para o potencial antioxidante em todos os extratos da alga parda *S. vulgare*, observando-se menor capacidade antioxidante na estação seca para todos os três tipos de extrato (Fig. 3A). A alga parda *S. vulgare* apresentou potenciais antioxidantes superiores a 80% para os todos os extratos estudados quando comparado com as outras espécies, exceto para o extrato metanólico que apresentou percentuais próximos a 60%. O extrato Aq. Quente apresentou os maiores potenciais, com valores de $105,31 \pm 1,18\%$ durante a estação chuvosa, seguido do extrato Aq. Frio, também para estação chuvosa, com valores de $95,69 \pm 2,34\%$. O extrato MeOH foi o que apresentou o menor potencial antioxidante com valores de $57,50 \pm 4,36\%$ durante a estação seca (Fig. 3A).

Para *P. flagellifera* houve variação entre as estações seca e chuvosa apenas para os extratos MeOH e Aq. Quente, com maior potencial antioxidante na estação chuvosa (Fig. 3B). Essa tendência foi observada mais claramente para os extratos MeOH, que apresentaram capacidade antioxidante de $29,36 \pm 4,59\%$ durante a estação seca e esse potencial mais que dobrou durante a estação chuvosa, $62,88 \pm 11,30\%$ (Fig. 3B). O maior potencial antioxidante foi observado para o extrato MeOH $62,88 \pm 11,30\%$ na estação chuvosa, seguindo pelo Aq. Frio $61,19 \pm 9,30\%$ da estação seca e, por fim, do extrato Aq. Quente $53,36 \pm 6,69\%$ da estação chuvosa (Fig. 3B).

Não foram observadas diferenças significativas entre as estações seca e chuvosa para nenhum dos três tipos de extrato testados da alga verde *U. fasciata*, para esse ensaio (Fig. 3C). A alga verde *U. fasciata* apresentou a menor atividade antioxidante quando comparada às outras duas espécies (Fig. 3).

Figura 3. Atividade antioxidante (%) de extratos brutos na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pelo método do sequestro do radical ABTS para três espécies de macroalgas do baixo sul baiano: (A) *S. vulgare*, (B) *P. flagellifera* e (C) *U. fasciata* para os extratos metanólicos (MeOH), aquoso a frio (Aq. Frio) e aquoso a quente (Aq. Quente). Letras distintas representam diferença significativa para $p < 0,05$.

Tabela 3. Concentração efetiva para atingir 50% do potencial antioxidante do ensaio de sequestro do radical ABTS (EC_{50} $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de três tipos de extratos das macroalgas *S. vulgare*, *P. flagellifera* e *U. fasciata* em duas estações de coleta.

Extratos	ABTS (EC_{50} $\mu\text{g.mL}^{-1}$)					
	<i>Sargassum vulgare</i>		<i>Palisada flagellifera</i>		<i>Ulva fasciata</i>	
	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa
MeOH	171,39	135,83	409,26	133,97	289,73	*
Aq. Frio	65,46	52	139,96	151,36	295,8	292,41
Aq. Quente	44,67	24,83	235,5	184,93	*	394,8
Padrão	Ac. Gálico	0,79	BHT	31,92	Trolox	3,42

*Não foi possível calcular o EC_{50} .

Os resultados da concentração efetiva (EC_{50}) (Tabela 3) mostraram que principalmente o extrato Aq. Quente da alga parda *S. vulgare* apresentou alto potencial antioxidante na estação chuvosa ($EC_{50} = 24,83 \mu\text{g.mL}^{-1}$), sendo mais potente que o padrão comercial BHT ($EC_{50} = 31,92 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Houve variação dos valores de EC_{50} para todos os extratos de *S. vulgare* e foi possível observar um aumento do potencial antioxidante na estação chuvosa (Tabela 3). A alga vermelha *P. flagellifera* apresentou tendência parecida para os extratos MeOH e Aq. Quente, com menores valores na estação chuvosa do que a estação seca. A alga verde *U. fasciata* apresentou um discreto aumento no EC_{50} para o extrato Aq. Frio na estação chuvosa (Tabela 3).

4.3.3. Co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico

Todas as espécies tiveram um bom desempenho quanto à proteção da peroxidação lipídica (Fig. 4), na qual a maioria dos extratos apresentaram percentuais de atividade antioxidante acima de 50%. A alga parda *S. vulgare* apresentou os maiores percentuais de proteção e os extratos MeOH foram os melhores, com atividade antioxidante de $96,01 \pm 1,86\%$ para a estação seca e $95,13 \pm 2,02\%$ na estação chuvosa (Fig. 4A). O desempenho antioxidante do extrato Aq. Frio não diferiu estatisticamente entre as estações coletadas, com percentuais de $63,99 \pm 3,92\%$ na estação seca e $63,50 \pm 3,55\%$ na estação chuvosa. Foi observada uma queda na atividade antioxidante do extrato Aq.

Quente em relação aos períodos de coleta, com atividade antioxidante de $79,55 \pm 2,31\%$ na estação seca e $59,82 \pm 5,98\%$ na estação chuvosa (Fig. 4A).

Para a alga vermelha *P. flagellifera* foi observada variação entre as estações na capacidade antioxidante, principalmente para o extrato MeOH, que apresentou um aumento da estação seca ($76,33 \pm 7,76\%$) para a estação chuvosa ($88,05 \pm 4,76\%$) (Fig. 4B). Para os extratos Aq. Frio e Aq. Quente, não houve diferenças estatística entre eles e nem entre as estações (Fig. 4B).

A alga verde *U. fasciata* apresentou variação sazonal nas atividade antioxidante (Fig. 4C), com maior amplitude no extrato MeOH. Na estação seca, os percentuais para o extrato MeOH foram de $84,11 \pm 5,13\%$ e na chuvosa de $58,64 \pm 3,21\%$. Um decréscimo na atividade também foi observado para os extratos Aq. Frio e Aq. Quente na estação chuvosa, $28,94 \pm 0,97\%$ e $33,50 \pm 3,13\%$, respectivamente, em relação à estação seca, $44,95 \pm 2,86\%$ e $50,58 \pm 3,21\%$ (Fig. 4C).

Figura 4. Atividade antioxidante (%) de extratos brutos na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pelo método da peroxidação lipídica do β -caroteno para três espécies de macroalgas do baixo sul baiano: (A) *S. vulgare*, (B) *P. flagellifera* e (C) *U. fasciata* para os extratos metanólicos (MeOH), aquoso a frio (Aq. Frio) e aquoso a quente (Aq. Quente). Letras distintas representam diferença significativa para $p < 0,05$.

Para esse ensaio, independente da espécie e estação, foi possível observar que os extratos metanólicos apresentaram melhor desempenho na proteção do β -caroteno contra a peroxidação lipídica e, portanto, atuaram como potentes antioxidantes para as três espécies estudadas (Fig. 3).

Tabela 4. Concentração efetiva para atingir 50% do potencial antioxidante do ensaio peroxidação lipídica do β -caroteno (EC_{50} $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de três tipos de extratos das macroalgas *S. vulgare*, *P. flagellifera* e *U. fasciata* em duas estações de coleta.

Peroxidação lipídica do β - caroteno (EC_{50} $\mu\text{g.mL}^{-1}$)						
Extratos	<i>Sargassum vulgare</i>		<i>Palisada flagellifera</i>		<i>Ulva fasciata</i>	
	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa
MeOH	14,45	29,58	74,49	25,18	35,73	124,45
Aq. Frio	154,17	136,77	175,79	142,5	371,53	*
Aq. Quente	61,8	142,56	135,3	157,04	190,54	777,5
Padrão	Trolox	0,83				

*Não foi possível calcular o EC_{50} .

Os extratos com maiores potenciais contra a oxidação do β -caroteno, avaliados pela estimativa do EC_{50} (Tabela 4), foram os extratos MeOH das algas *S. vulgare* ($EC_{50} = 14,45 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $EC_{50} = 29,58 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em ambas estações, *P. flagellifera* para a estação chuvosa ($EC_{50} = 25,18 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e *U. fasciata* ($EC_{50} = 35,73 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para a estação seca.

Foi possível observar variações para os valores de EC_{50} entre as estações seca e chuvosa (Tabela 4), porém essa variação não seguiu um padrão entre as estações para as espécies. Por exemplo, os extratos de *S. vulgare* e *U. fasciata* apresentaram aumento do potencial antioxidante da estação chuvosa para seca, enquanto que *P. flagellifera* apresentou aumento na atividade da estação seca para chuvosa, excetuando para o extrato Aq. Quente (Tabela 4).

4.3.4. Potencial antioxidante redutor de ferro (FRAP)

Houve variação significativa entre as duas estações para a resposta antioxidante do poder redutor de ferro de todos os extratos da alga parda *S.*

vulgare, com redução da estação seca para a chuvosa (Fig. 5A). A maior atividade redutora de ferro para *S. vulgare* foi observada na estação seca no extrato MeOH com $17,87 \pm 1,17 \text{ mg.g}^{-1}$ equivalentes de Trolox (ET), seguido do extrato Aq. Quente com $15,40 \pm 1,44 \text{ mg.g}^{-1}$ ET e, por último, o extrato Aq. Frio com valores de $6,77 \pm 0,77 \text{ mg.g}^{-1}$ ET (Fig. 5A).

Para todos os extratos estudados da alga vermelha *P. flagellifera* foram observadas variações significativas entre as estações seca e chuvosa (Fig. 5B). A atividade antioxidante foi menor durante a estação chuvosa com valores entre $4,12 \pm 1,35 \text{ mg.g}^{-1}$ ET e $1,70 \pm 0,18 \text{ mg.g}^{-1}$ ET. Durante a estação seca, a maior atividade antioxidante foi observada no extrato Aq. Frio, com valores de $12,88 \pm 0,90 \text{ mg.g}^{-1}$ ET, seguido do extrato MeOH e Aq. Quente com valores de $7,36 \pm 0,44 \text{ mg.g}^{-1}$ ET e $5,09 \pm 0,20 \text{ mg.g}^{-1}$ ET, respectivamente (Fig. 5B).

Na alga verde *U. fasciata*, houve variação significativa entre as estações seca e chuvosa (Fig. 5C), sendo observada uma queda do potencial antioxidante nos extratos metanólicos da estação seca para a chuvosa, com valores de $7,45 \pm 1,76 \text{ mg.g}^{-1}$ ET e $2,45 \pm 1,06 \text{ mg.g}^{-1}$ ET, respectivamente. Essa redução também foi observada nos extratos Aq. Frio, de $5,69 \pm 0,36 \text{ mg.g}^{-1}$ ET (seca) para $0,94 \pm 0,16 \text{ mg.g}^{-1}$ ET (chuvosa) e para o extrato Aq. Quente de $5,78 \pm 0,10 \text{ mg.g}^{-1}$ ET (seca) para $1,87 \pm 0,26 \text{ mg.g}^{-1}$ ET (chuvosa). A alga verde apresentou o menor potencial redutor entre as três espécies estudadas (Fig. 5).

Figura 5. Potencial antioxidante em equivalente Trolox (mg.g^{-1}) pelo método redutor de ferro (FRAP) para três espécies de macroalgas do baixo sul baiano: (A) *S. vulgare*, (B) *P. flagellifera* e (C) *U. fasciata* para os extratos metanólicos (MeOH), aquoso a frio (Aq. Frio) e aquoso a quente (Aq. Quente). Letras distintas representam diferença significativa para $p < 0,05$.

4.3.5. Atividade quelante de metais

Em *S. vulgare* o extrato Aq. Quente apresentou o maior potencial quelante de metais na estação chuvosa, com percentual de $32,52 \pm 9,09\%$ (Fig. 6A). Apenas esse extrato variou significativamente na sua atividade para a estação seca ($17,54 \pm 1,56\%$), com redução do potencial antioxidante na estação seca (Fig. 6A).

O extrato MeOH da estação seca da alga *P. flagellifera* (Fig. 6B) apresentou os maiores potenciais antioxidantes frente ao ensaio quelante de metais em relação às outras espécies (Fig. 6). Para o extrato MeOH, o maior potencial foi de $44,62 \pm 5,34\%$ para a estação seca, enquanto que para estação chuvosa essa atividade foi reduzida quase a zero, com valor de $0,81 \pm 0,05\%$ (Fig. 6B). Foi observado um aumento do potencial antioxidante do extrato Aq. Frio da estação seca, de $7,93 \pm 1,20\%$ para $13,84 \pm 6,44\%$ na estação chuvosa. O oposto ocorreu com o extrato Aq. Quente, sendo observada uma redução no potencial oxidante da estação seca, $24,09 \pm 0,00\%$, para a estação chuvosa, $14,46 \pm 1,16\%$ (Fig. 6B).

Figura 6. Atividade antioxidante (%) de extratos brutos na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pelo método quelante de metais para três espécies de macroalgas do baixo sul baiano: (A) *S. vulgare*, (B) *P. flagellifera* e (C) *U. fasciata* para os extratos metanólicos (MeOH), aquoso a frio (Aq. Frio) e aquoso a quente (Aq. Quente). Letras distintas representam diferença significativa para $p < 0,05$.

O extrato MeOH da alga verde *U. fasciata* apresentou o maior potencial quelante de metais na estação chuvosa (Fig. 6C), com percentual de $39,83 \pm 3,10\%$ e uma queda significativa desse potencial na estação seca, $28,28 \pm 6,68\%$. Os extratos Aq. Frio e Aq. Quente não foram significativamente distintos entre as estações (Fig. 6C).

Devido à baixa porcentagem de atividade antioxidante, não foi possível calcular a concentração efetiva (EC_{50}) para nenhuma das espécies, extratos e estações.

4.3.6. Substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu

Os extratos Aq. Quente da alga parda *S. vulgare* apresentaram as maiores quantidades de substâncias redutoras representadas em equivalentes de ácido gálico (EAG), $38,93 \pm 2,09 \text{ mg.g}^{-1}$ para a estação seca e $309,18 \pm 16,52 \text{ mg.g}^{-1}$ para a estação chuvosa (Fig. 7A). O extrato Aq. Frio também apresentou elevada quantidade de substâncias redutoras para a estação chuvosa, $18,07 \pm 1,31 \text{ mg.g}^{-1}$ EAG, com a mesma tendência de variação entre as estações seca e chuvosa observada para o extrato Aq. Quente (Fig. 7A). Os extratos MeOH de *S. vulgare* apresentaram a menor quantidade de substâncias redutoras, com valores de $9,64 \pm 4,47 \text{ mg.g}^{-1}$ de EAG, ambos para estação chuvosa (Fig. 7A). *Sargassum vulgare* apresentou variação na quantidade de substâncias redutoras entre as estações estudadas, com uma tendência de aumento dessas substâncias durante a estação chuvosa (Fig. 7A).

A alga vermelha *P. flagellifera* apresentou a maior quantidade de substâncias redutoras no extrato Aq. Frio, com valores de $8,13 \pm 0,41 \text{ mg.g}^{-1}$ EAG na estação seca (Fig. 7B), não mostrando diferença significativa com o extrato MeOH da estação seca e os extratos MeOH e Aq. Frio da estação chuvosa. Os extratos não mostraram variação entre as estações.

A alga verde *U. fasciata* foi a espécie que, comparativamente, apresentou a menor quantidade de substâncias redutoras (Fig. 7). O extrato que apresentou a maior quantidade de substâncias redutoras foi o extrato MeOH para a estação seca, $5,44 \pm 1,31 \text{ mg.g}^{-1}$ EAG (Fig. 7C).

Figura 7. Atividade do potencial antioxidante de substâncias redutoras pelo método de Folin- Ciocalteu em equivalente de ácido gálico para três espécies de macroalgas do baixo sul baiano para as estações seca e chuvosa: (A) *S. vulgare*, (B) *P. flagellifera* e (C) *U. fasciata* para os extratos metanólicos (MeOH), aquoso a frio (Aq. Frio) e aquoso a quente (Aq. Quente). Letras distintas representam diferença significativa para $p < 0,05$.

4.3.7 Análise de Componentes Principais (PCA)

Todos os resultados do potencial antioxidante para os seis ensaios, as três espécies, os três extratos e as duas estações foram diagnosticadas conjuntamente mediante uma análise multivariada de componentes principais (PCA). As PCA foram avaliadas para cada uma das espécies por separado

Para *S. vulgare*, o componente 1 foi capaz de explicar 46,94% da variação do conjunto de dados e o componente 2 explica 22,98% da variação dos dados (Fig. 8). Os extratos MeOH de *S. vulgare* apresentaram alta correlação com o ensaio de co-oxidação do β -caroteno, tanto para a estação seca quanto a estação chuvosa, formando um único agrupamento (Fig. 8). Outros agrupamentos evidenciados na análise de PCA destacam a separação entre as estações seca e chuvosa para os extratos Aq. Frio e Aq. Quente. Os extratos aquosos da estação seca apresentaram alta correlação com os ensaios Folin e FRAP (Fig. 8). Por outro lado, os extratos aquosos da estação chuvosa apresentaram correlação com o ensaio de sequestro do radical ABTS (Fig. 8). Os ensaios de sequestro do radical DPPH e quelante de metais não mostraram correlação com os extratos estudados para essa espécie (Fig. 8).

Figura 8. Análise de componentes principais para três tipos de extratos de *S. vulgare* em duas estações e frente aos ensaios antioxidantes sequestro dos radicais DPPH e ABTS, co-oxidação do β -caroteno (β -car), potencial redutor do ferro (FRAP), quelante de metais (Quelante) e quantificação de substâncias

redutoras Folin-Ciocalteu (Folin). AFCh = aquoso frio-chuvosa, AFS = aquoso frio-seca, AQCh = aquoso , Metanólico (M), Aq. Frio (AF) e Aq. Quente (AQ), seca (S) e chuvosa (Ch) de *S. vulgare* (SRG)

A PCA para *P. flagellifera* mostrou que em relação às respostas antioxidantes os tratamentos de extratos e de estação tiveram 62,08% da variação do conjunto de dados explicados pela componente 1 e 26,48% explicado pela componente 2 (Fig. 9). Foi possível observar que o extrato metanólico na estação chuvosa apresentou alta correlação com os ensaios de co-oxidação do β -caroteno (β -car), FRAP e ABTS (Fig. 9). Enquanto que os extratos aquosos de ambas as estações formaram um único grupo com o ensaio de substâncias redutoras Folin-Ciocalteu (Fig. 9). Um agrupamento isolado foi formado pelo extrato MeOH da estação de seca. Os ensaios sequestro do radical DPPH e quelante de metais não foram informativos para as respostas antioxidativa de *P. flagellifera* (Fig. 9).

Figura 9. Análise de componente principal de três tipos de extrato, Metanólico (M), Aq. Frio (AF) e Aq. Quente (AQ) em duas estações seca (S) e chuvosa (Ch) de *P. flagellifera* (PLD) frente aos ensaios antioxidantes sequestro dos radicais DPPH e ABTS, co-oxidação do β -caroteno, potencial redutor do ferro (FRAP) e quantificação de substâncias redutoras Folin-Ciocalteu.

A PCA para os extratos e ensaios antioxidantes de *U. fasciata* teve 60,02% da variação do seu conjunto de dados explicadas pelo componente 1 e 24,98% explicado pelo componente 2 (Fig. 10). Foi possível observar a formação de dois grupos entre os extratos e as respostas antioxidativas para *U. fasciata* (Fig. 10). Um grupo composto por todos os extratos (metanólicos e aquosos) pertencentes a estação seca e que foram mais correlacionados com os ensaios sequestro do radical ABTS, co-oxidação do β -caroteno e potencial redutor do ferro (FRAP) (Fig. 10). E um outro grupo formado por todos os extratos da estação chuvosa, com maior correlação com os ensaios de sequestro do radical DPPH e quelante de metais (Fig. 10). Nenhum dos extratos de *U. fasciata* apresentou forte correlação com o ensaio de quantificação de substâncias redutoras Folin-Ciocalteu (Fig. 10).

Figura 10. Análise de componente principal de três tipos de extrato, Metanólico (M), Aq. Frio (AF) e Aq. Quente (AQ) em duas estações seca (S) e chuvosa (Ch) de *U. fasciata* (ULV) frente aos ensaios antioxidantes sequestro dos radicais DPPH e ABTS, co-oxidação do β -caroteno, potencial redutor do ferro (FRAP) e quantificação de substâncias redutoras Folin-Ciocalteu.

4.4. Discussão

O *screening* da potencialidade antioxidante dos extratos de macroalgas é de grande importância, pois esse conhecimento pode levar também ao conhecimento de seus metabólitos secundários. Além disso, a diversidade estrutural e das propriedades químicas de substâncias que ocorrem na natureza podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de produtos naturais com interesse comercial e fitoterápico.

Os métodos antioxidantes mensuram o potencial dos extratos testados, porém cada ensaio possui um princípio e uma afinidade química particular e característica com os componentes de cada extrato. Desta forma, avaliar o potencial antioxidante utilizando diversos ensaios possibilita respostas antioxidativas mais completas das espécies estudadas (Matanjun et al., 2008).

De forma geral, os extratos das algas testadas neste trabalho apresentaram baixo potencial de sequestro do radical livre DPPH para as estações seca e chuvosa, comprovado pelas análises de componentes principais nas quais, apenas a alga *U. fasciata* apresentou interação com esse ensaio. Uma possível explicação é o fato dos extratos serem extratos brutos e as diferentes substâncias presentes podem atuar como antagonistas, reduzindo a atividade para esse ensaio. Isso corrobora o descrito por Heo et al. (2005), que também observaram baixos potenciais antioxidantes para o ensaio de sequestro do DPPH em extratos enzimáticos da alga parda *Ecklonia cava* Kjellman.

O baixo percentual de atividade antioxidante registrado nas espécies estudadas para o ensaio de DPPH, de 20 a 60%, também pode ser explicado pelas características polares dos extratos testados. Esse ensaio é amplamente utilizado para óleos vegetais, que são altamente apolares. Segundo Castelo Branco & Torres (2011), o ensaio de DPPH não seria o mais indicado para avaliar o potencial em extratos polares como os metanólicos e aquosos testados no presente trabalho.

Os extratos de *S. vulgare* e *P. flagellifera* apresentaram alto potencial antioxidante frente ao ensaio de sequestro do radical ABTS. Castelo & Torres (2011) e Floegel et al. (2011) descreveram detalhadamente o princípio dos ensaios mais utilizados na avaliação do potencial antioxidante. Segundo esses

autores, o sequestro do radical ABTS é compatível com substâncias hidrofílicas e lipofílicas, sugerindo que esse ensaio é mais sensível do que o do sequestro do DPPH, que possui afinidade por substâncias apolares. Os autores sugerem a combinação dos dois ensaios para avaliar de forma global o potencial de alimentos e/ou extratos candidatos a novas fontes antioxidantes.

O alto potencial antioxidante frente ao ensaio de sequestro do radical ABTS observado em extratos aquosos frio e quente de ambas estações da alga parda *S. vulgare* no presente trabalho pode ser explicado através dos resultados semelhantes encontrados por Jiménez-Escrig et al. (2012) para extratos aquosos da alga parda *Bifurcaria bifurcata* R. Ross frente ao ensaio de sequestro do radical ABTS. Esses autores justificam que o alto potencial esteja ligado a presença de polissacarídeos sulfatados no extrato aquoso, os quais possuem reconhecida importância pelo papel que desempenham no sequestro de radicais livres e na prevenção ao dano oxidativo nas macroalgas.

A resposta antioxidativa da alga vermelha *P. flagellifera* foi semelhante à observada para *S. vulgare* com maior potencial de sequestro do radical ABTS para os extratos aquosos frio e quente de ambas estações. Uma explicação para o alto potencial antioxidante desses extratos pode estar relacionada com características estruturais dos polissacarídeos das macroalgas tais como: o tipo de açúcar, a ramificação glicosídica e o grau e posição das sulfatações e essas características podem variar entre os grupos de algas e entre as espécies. No trabalho proposto por Jiménez-Escrig et al. (2012), que apesar de não ter observado potencial para os extratos aquosos das algas vermelhas *Chondracanthus acicularis* (Roth) Fredericq, *Dumontia contorta* (S.G.Gmelin) Ruprecht, *Gigartina pistillata* (S.G.Gmelin) Stackhouse, *Mastocarpus stellatus* (Stackhouse) Guiry, *Nemalion helminthoides* (Velley) Batters e *Osmundea pinnatifida* (Hudson) Stackhouse, observaram forte correlação entre o grau de sulfatação de polissacarídeos das algas vermelhas e a atividade antioxidante.

O potencial antioxidante do extrato metanólico da alga vermelha *P. flagellifera* foi considerado interessante e houve variação entre as estações seca e chuvosa. Uma explicação para essa atividade é a grande quantidade de sesquiterpenoides halogenados presentes em representantes da Ordem Ceramiales, na qual a espécie *Palisada flagellifera* está incluída. De acordo com Gressler et al. (2011) cerca de 50% da composição da alga *Laurencia*

dendroidea J. Agardh, também representante da Ordem Ceramiales, são dos sesquiterpenoides LD3 e LD4 que podem variar com a época do ano e localização geográfica. Os autores atribuíram o potencial antioxidante de *L. dendroidea* a essas substâncias e afirmam ainda que os sesquiterpenos halogenados ocorrem exclusivamente em algas vermelhas.

Os resultados obtidos, suportados pelas análises de PCA, mostraram que o ensaio de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico apresentou elevados percentuais de proteção do β -caroteno para os extratos metanólicos das estações seca e chuvosa em todas as espécies. Esse resultado foi inesperado, pois de acordo com a teoria do “paradoxo polar”, proposta por Porter (1993) e Frankel et al. (1994), extratos polares, como os extratos metanólicos, não deveriam apresentar alta atividade antioxidante em uma emulsão lipofílica, como é o sistema do ensaio de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico. Isso ocorre porque os antioxidantes polares permanecem na fase aquosa da emulsão e são menos eficazes em proteger substâncias lipofílicas, como o β -caroteno. No entanto, resultados semelhantes ao presente estudo também foram encontrados por Koleva et al. (2002). Uma possível explicação para a alta atividade dos extratos metanólicos no ensaio de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico é que nem sempre se deve atribuir à polaridade dos extratos como o principal fator da bioatividade, mas levar em consideração a complexa constituição de alguns extratos e que essa bioatividade pode ser resultado de interações (efeitos sinérgicos, aditivos ou antagônicos) entre os compostos e/ou entre o meio (Koleva et al., 2002; Wang et al., 2009).

Os resultados para o ensaio do potencial redutor de íons ferro (FRAP) para alga *S. vulgare* apresentaram os maiores valores para os extratos metanólicos e houve variação entre a estação seca e chuvosa. De acordo com Matanjun et al. (2008), os extratos metanólicos de algas pardas apresentaram alta quantidade de substâncias fenólicas, e foi observada uma forte correlação entre essas substâncias e o FRAP, o que pode explicar a alta atividade dos extratos metanólicos para este ensaio. Segundo Castelo Branco & Torres (2011), o FRAP é bastante utilizado para avaliar o comportamento redutor das substâncias em meio ácido, e as substâncias fenólicas estão incluídas neste grupo.

As substâncias fenólicas são responsáveis pela maioria das atividades antioxidantes em extratos e óleos vegetais, e devido ao potencial redox semelhante ao do Fe^{+3} e do radical ABTS os resultados destes métodos deveriam ser positivamente correlacionados. Porém, no presente trabalho não foi possível observar essa tendência. A ausência de uma tendência próxima entre os ensaios FRAP e ABTS para o presente estudo pode indicar que existem outras classes de substâncias que contribuem para o potencial antioxidante das espécies estudadas (Matanjun et al., 2008).

As amostras testadas no presente trabalho não apresentaram alto potencial frente ao ensaio quelante de metais. Uma explicação para esse comportamento, segundo Sabeena Farvin & Jacobsen (2013), é o fato de que os fenóis podem não ser os únicos envolvidos nessa atividade. A partir da análise multivariada de PCA, os autores observaram que a atividade quelante não apresentou correlação com o teor fenólico e sugeriram que pode haver outros compostos agindo sinergicamente ou antagonicamente, orquestrando a intensidade dessa atividade.

O método do Folin-Ciocalteu quantifica as substâncias com comportamento redutor, mas ao contrário do FRAP, sob condições de pH básico. Os resultados mostraram que os extratos aquosos frio e quente da alga parda *S. vulgare* para ambas estações apresentaram os maiores potenciais redutores. Comportamento semelhante foi observado para os extratos da alga *P. flagellifera*, nos quais a maior quantidade de substâncias redutoras foi encontrada no extrato aquoso frio das estações secas e chuvosas. De acordo com Yuan et al. (2005), o comportamento redutor dos extratos aquosos de algas pardas e vermelhas está relacionada à presença de polifenóis.

Representantes da família Myrtaceae tiveram o seu potencial antioxidante avaliado no trabalho de Reynertson et al. (2008), a partir da constituição fenólica de 14 frutas dessa família. Comparando com o presente trabalho, os extratos aquosos da alga *S. vulgare* possuem maior quantidade de substâncias redutoras do que o encontrado em frutos de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg., a jabuticaba ($31,6 \text{ mg AG. g}^{-1}$), e quantidades semelhantes à fruta *Syzygium curranii* C. B. Rob. (Merr.), conhecida como lipote ($39,6 \pm 0,77 \text{ mg AG. g}^{-1}$). A comparação entre os trabalhos mostra que a macroalga *S.*

vulgare constitui um recurso com interessante potencial para medicina tradicional e nutricional.

Não foi possível observar um padrão de variação entre as estações seca e chuvosa para as respostas antioxidativas da alga parda *S. vulgare*. Uma hipótese levantada por Kamiya et al. (2010) foi a presença de um padrão sazonal para a quantidade de substâncias fenólicas em algas pardas do Japão, e os autores sugerem que essas alterações podem ser independentes da sazonalidade e mais relacionadas à idade das plantas, estágio reprodutivo ou parte da planta utilizada no experimento.

Os extratos metanólicos da estação chuvosa da alga *P. flagellifera* apresentaram correlação entre os ensaios sequestro do radical DPPH e co-oxidação do β -caroteno. Provavelmente a constituição desse extrato possui características mais lipofílicas do que os extratos metanólicos da estação seca, no qual essa interação foi fraca, indicando que pode haver uma diferença na constituição dos extratos metanólicos dessa espécie.

Dentre as espécies estudadas, *U. fasciata*, foi a única que apresentou uma variação clara entre as respostas antioxidativas dos extratos e as estações seca e chuvosa, resultados que foram suportados pelas análises de PCA. Trigui et al. (2013) também observaram variação sazonal para extratos alcóolicos e aquosos de *U. rigida* C. Agardh, porém para essa espécie o potencial antioxidante foi alto, incluindo a grande quantidade de substâncias fenólicas, o que não foi observado no presente trabalho. Uma possível explicação sugerida por Trigui et al. (2013), é o fato das respostas antioxidantes estarem ligadas também com a variação dos bioativos entre as espécies, a polaridade do solvente e a forma de extração.

De forma geral, os extratos das algas estudadas se mostraram um interessante recurso como fonte alternativa de antioxidantes. Os potenciais antioxidantes variaram entre os ensaios, podendo-se concluir que as substâncias presentes nesses extratos possuem diferentes mecanismos para combater a ação dos radicais livres e que as respostas antioxidativas variam muito entre os grupos de macroalgas.

Sargassum vulgare e *P. flagellifera* parecem ter desenvolvido perfis antioxidativos com características redutoras, muitas vezes relacionadas com a

presença de fenóis. Enquanto que *U. fasciata* apresentou baixo potencial antioxidante quando comparada com as outras duas espécies estudadas. Essas respostas antioxidativas sugerem um processo de aclimação dessas espécies aos fatores ambientais do local de estudo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Biota/Fapesp (2013/50731-1) pelo suporte financeiro. JPS é bolsista de doutorado CAPES. Também se agradece à Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira – CEPLAC pelo apoio de infraestrutura.

Referências

- Abdala-Díaz, R. T., Cabello-Pasini, A., Pérez-Rodríguez, E., Conde Álvarez, R. M. & Figueroa, F. L. 2006. Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). *Mar. Biol.*, 148: 459-465.
- Aguilera, J., Bischof, K., Karsten, U., Hanelt, D. & Wiencke, C. 2002. Seasonal variation in ecophysiological patterns in macroalgae from an Arctic fjord. II. Pigment accumulation and biochemical defense systems against light stress. *Mar. Biol.*, 140:1087–1095.
- Apostolidis, E., Karayannakidis, P. D., Kwon, Y. I., Lee, C. M. & Seeram, N. P. 2011. Seasonal variation of phenolic antioxidant-mediated α -glucosidase inhibition of *Ascophyllum nodosum*. *Plant F. Hum. Nutri.*, 66(4): 313-319.
- Bischof, K., Kräbs, G., Wiencke, C. & Haneltm D. 2002. Solar ultraviolet radiation affects the activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase and the composition of photosynthetic and xanthophylls cycle pigments in the intertidal green alga *Ulva lactuca* L. *Planta*, 215: 502–509.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. L. W. T. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.*, 28(1): 25-30.
- Castelo-Branco, V. N. & Torres, A. G. 2011. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. *Rev. Nutr.*, 24(1): 173-187.

- Chakraborty, K., Lipton, A. P., Raj, R. P. & Vijayan, K. K. 2010. Antibacterial labdane diterpenoids of *Ulva fasciata* Delile from southwestern coast of the Indian Peninsula. *Food Chem.*, 119(4): 1399-1408.
- Chew, Y. L., Lim, Y. Y., Omar, M., & Khoo, K. S. 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT-Food Sci. Technol.*, 41(6): 1067-1072.
- Cornish, M. L., & Garbary, D. J. 2010. Antioxidants from macroalgae: potential applications in human health and nutrition. *Algae*, 4(25): 155-171.
- Cox, S., Abu-Ghannam, N. & Gupta, S., 2010. An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. *Inter. Food Res. J.*, 17: 205-220.
- Cragg, G. M., Newman, D. J. & Snader, K. M. 1997. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.*, 60: 52-60.
- Cruces, E., Huovinen, P. & Gómez, I. 2012. Phlorotannin and antioxidant responses upon short-term exposure to UV radiation and elevated temperature in three South Pacific kelps. *Photochem. Photobiol.*, 88: 58–66.
- Cruces, E., Huovinen, P. & Gómez, I. 2013. Interactive effects of UV radiation and enhanced temperature on photosynthesis, phlorotannin induction and antioxidant activities of two sub-Antarctic brown algae. *Mar. Biol.*, 160(1): 1-13.
- Dembitsky, V. M. 2006. Natural neo acids and neo alkanes: their analogs and derivatives. *Lipids*, 41(4): 309-340.
- Demirel, Z., Yilmaz-Koz, F. F., Karabay-Yavasoglu, N. U., Ozdemir, G. & Sukatar, A. 2011. Antimicrobial and antioxidant activities of solvent extracts and the essential oil composition of *Laurencia obtusa* and *Laurencia obtusa* var. *pyramidata*. *Romanian Biotechnol. Letters*, 16(1): 5927-5936.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P. & Vidal, N. 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.*, 97: 654–660.
- Duarte-Almeida, J. M., Santos, R. D., Genovese, M. I. & Lajolo, F. M. 2006. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. *Ciê. Tecnol. Alim.*, 26(2): 446-452.

- Dotulong, V., Widjanarko, S.B., Yunianta, & Mamahit, L.P. 2014. Antioxidant activity of three-marine algae methanol extract collected from North Sulawesi Waters, Indonesia. *Inter. J. Sci. Eng. Invest.*, 2(23): 26–30.
- El Gamal, A. A. 2010. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharma. J.*, 18(1): 1-25.
- Sabeena Farvin, K. S. & Jacobsen, C. 2013. Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chem.*, 138(2): 1670-1681.
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I. & Chun, O. K. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Comp. Anal.*, 24(7): 1043-1048.
- Frankel, E. N., Huang, S. W., Kanner, J. & German, J. B. 1994. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *J. Agri. Food Chem.*, 42(5): 1054-1059.
- Freitas; Mariglio. 1986. Pharmacological activity of some marine algae from Brazilian coast. In: International Seaweed Symposium, 12. Programme and Book Abstracts. Santa Bárbara: Science Press. p.501.
- Fujimoto, K. 1990. Antioxidant activity of algal extracts. In: Akatsuka I. (ed) Introduction to applied phycology. SPB Academic Publishing, The Hague. 199–208 pp.
- Güven, K. C., Percot, A. & Sezik, E. 2010. Alkaloids in marine algae. *Mar Drugs*, 8: 269-284.
- Haas, P. 1950. Certain peptides occurring in marine algae. *Biochem. J.*, 46: 503-505.
- Heo, S. J., Park, E. J., Lee, K. W. & Jeon, Y. J. 2005. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Biores. Technol.*, 96(14): 1613-1623.
- Hupel, M., Lecointre, C., Meudec, A., Poupart, N. & Gall, E. A. 2011. Comparison of photoprotective responses to UV radiation in the brown seaweed *Pelvetia canaliculata* and the marine angiosperm *Salicornia ramosissima*. *J. Experi. Mar. Biol. Ecol.*, 401(1): 36-47.

- Jiménez-Escrig, A., Gómez-Ordóñez, E. & Rupérez, P. 2012. Brown and red seaweeds as potential sources of antioxidant nutraceuticals. *J. Appl. Phycol.*, 24(5): 1123-1132.
- Kamiya, M., Nishio, T., Yokoyama, A., Yatsuya, K., Nishigaki, T., Yoshikawa, S. & Ohki, K. 2010. Seasonal variation of phlorotannin in sargassacean species from the coast of the Sea of Japan. *Phycol. Res.*, 58(1): 53-61.
- Kohen, R. & Nyska, A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and method for their quantification. *Toxicol. Pathol.* 30: 620–650.
- Koleva, I. I., Van Beek, T. A. & Linssen, J. P. H. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Anal.*, 13: 8-17.
- Kuda, T., Taniguchi, E., Nishizawa, M. & Araki, Y., 2002. Fate of water-soluble polysaccharides in dried *Chorda filum*, a brown alga during water washing. *J. Food Compos. Anal.*, 15: 3–9.
- Le Tutour, B., Benslimane, F., Gouleau, M. P., Gouygou, J. P., Saadan, B. & Quemeneur, F. 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.
- Lee, J. C., Hou, M. F., Huang, H. W., Chang, F. R., Yeh, C. C., Tang, J. Y. & Chang, H. W. .2013. Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. *Cancer Cell Inter.I*, 13(1): 1.
- Li, B., Lu, F., Wei, X. & Zhao, R. 2008. Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules*, 13: 1671-1695.
- Matanjun, P., Mohamed, S., Mustapha, N.M., Muhammad, K. & Ming, C.H. 2008. Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from North Borneo. *J. Appl. Phycol.*, 20: 367– 373.
- Mayer, A.M.S., Rodriguez, A.D., Berlinck, R.G. & Hamann, M.T. 2009. Marine pharmacology in 2005–6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1790: 283–308.

- Min, B., McClung, A.M. & Chen, M.-H. 2011. Phytochemicals and antioxidant capacities in rice brans of different color. *J. Food Sci.*, 76(1): 117–26.
- Murugan, K. & Iyer, V. V. 2014. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts of selected red and brown seaweeds from the Mandapam Coast of Tamil Nadu. *J. Food Biochem.*, 38(1): 92-101.
- O'Sullivan, A. M., O'Callaghan, Y. C., O'Grady, M. N., Queguineur, B., Hanniffy, D., Troy, D. J. & O'Brien, N. M. 2011. *In vitro* and cellular antioxidant activities of seaweed extracts prepared from five brown seaweeds harvested in spring from the west coast of Ireland. *Food Chem.*, 126(3): 1064-1070.
- Peng, J., Yuan, J. P., Wu, C. F. & Wang, J. H. 2011. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health. *Mar. Drugs*, 9(10): 1806-1828.
- Porter, W. L. 1993. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. *Toxicol. Ind.Health*, 9(1-2): 93.
- Raymundo, M. S., Horta, P. & Fett, R. 2004. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, 40: 495-503.
- Reynertson, K. A., Yang, H., Jiang, B., Basile, M. J. & Kennelly, E. J. 2008. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chemistry*, 109(4), 883-890.
- Rocha, F. D., Pereira, R. C., Kaplan, M. A. C. & Teixeira, V. L. 2007. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 17: 631-639.
- Rodriguez-Jasso, R. M., Mussatto, S. I., Pastrana, L., Aguilar, C. N. & Teixeira, J. A. 2014. Chemical composition and antioxidant activity of sulphated polysaccharides extracted from *Fucus vesiculosus* using different hydrothermal processes. *Chem. Papers*, 68(2): 203-209.
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Pérez-Jiménez, J. & Saura-Calixto, F. D. 2006. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 4p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 125) Disponível em: < http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/cot_125.pdf>

- Rupérez, P., Ahrazem, O. & Leal, J. A. 2002. Potential antioxidant capacity of sulphated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 840–845.
- Sakamoto, M. M. 1993. Ações farmacológicas do extrato de alga marinha *Bryopsis pennata* (Chlorophyta, Caulerpales). Tese de doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 124p.
- Shibata, T., Ishimaru, K., Kawaguchi, S., Yoshikawa, H. & Hama, Y. 2008. Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese Laminariaceae. *J. App. Phycol.*, 20(5): 705-711.
- Singleton, V. & Rossi, J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Ame. J. Enol. Viticul.*, 16: .144–158.
- Souza, B. W., Cerqueira, M. A., Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C; Martins, J. T., Teixeira, J. A., Coimbra, M. A. & Vicente, A. A. 2012. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Food Hydrocol.*, 27(2): 287-292.
- Trigui, M. L., Gasmi, I. Zouari and Tounsi, S. 2012. Seasonal variation in phenolic composition, antibacterial and antioxidant activities of *Ulva rigida* (Chlorophyta) and assessment of antiacetylcholinesterase potential. *J. App. Phycol.*, 25:319–328.
- Yang, H., Dong, Y., Du, H., Shi, H., Peng, Y. & Li, X. 2011. Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(4): 3444–3455.
- Yuan, Y. V., Bone, D. E. & Carrington, M. F. 2005. Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmata*) extract evaluated in vitro. *Food Chem.*, 91: 485–494.
- Waterman, P. & Mole, S., 1994. Extraction and chemical quantification. In *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Wiley-Blackwell, pp. 83–85.
- Zhang, Q., Zhang, J., Shen, J., Silva, A., Dennis, D. A. & Barrow, C. 2006. A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *J. Appl. Phycol.*, 18: 445-450.
- 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.

Respostas fisiológicas de três espécies de macroalgas marinhas do nordeste do Brasil nas estações seca e chuvosa

Resumo

Macroalgas da faixa do mediolitoral experimentam rápidas e frequentes mudanças nas condições abióticas, condicionadas à constante flutuação do nível das marés. Fatores abióticos como alta intensidade de luz PAR e UV, choque osmótico e alterações na salinidade e elevadas temperaturas podem ser potenciais estressores e, por isso, as macroalgas desenvolveram ao longo da sua evolução diversas respostas de adaptação e aclimação para sobreviver esses ambientes estressantes. Alterações nos pigmentos fotossintetizantes, proteínas ou nos potenciais antioxidantes são respostas fisiológicas comumente observadas para macroalgas, e avaliar a existência de tais mudanças foi o objetivo do presente trabalho. Extratos de *Sargassum vulgare*, *Palisada flagellifera* e *Ulva fasciata* foram avaliados quanto à sua constituição pigmentar, teor de proteínas solúveis e potencial antioxidante em dois períodos de coleta (estações de seca e chuvosa). Os resultados das algas *S. vulgare* e *P. flagellifera* mostraram pouca ou nenhuma variação no teor de pigmentos e proteínas entre as estações de seca e chuvosa, essa pode ser uma resposta de aclimação dos pigmentos dessas macroalgas que aliada a um bom sistema de defesa antioxidante promove o estabelecimento dessas espécies no costão rochosos. Para *U. fasciata* foi possível observar alta quantidade de carotenoides variando entre as estações. Os carotenoides são substâncias conhecidas pelo seu potencial como fotoprotetor e antioxidante em altas irradiâncias e são acumulados por plantas terrestres e algas verdes. O espectro de absorção na faixa dos comprimentos de onda do UV dos extratos mostrou que a constituição dos extratos variou qualitativamente e quantitativamente entre as espécies, com perfis quantitativos diferentes entre as estações. Os resultados do presente trabalho demonstram que as algas estudadas possuem uma boa resposta de aclimação suportada pela baixa variação dos seus pigmentos fotossintetizantes e presença defesas antioxidantes.

Palavras-chave: Antioxidantes, biotecnologia, extratos brutos, fisiologia, macroalgas, radicais livres.

Abstract

Macroalgae of the mid intertidal zone experience rapid and frequent changes in abiotic conditions, conditioned by the constant fluctuation of the tidal levels. Abiotic factors such as high intensity of PAR and UV radiations, osmotic shock and variation in salinity and elevated temperatures may be potential stressors and, therefore, macroalgae have developed along their evolution several adaptation and acclimation responses to survive these stressful environments. Changes in photosynthetic pigments, proteins or antioxidant potential are physiological responses commonly observed for macroalgae, and to evaluate the existence of such changes was the aim of this work. Extracts of *Sargassum vulgare*, *Palisada flagellifera* and *Ulva fasciata* were evaluated for their pigment composition, soluble protein content and antioxidant potential in two collection periods (dry and rainy seasons). The results of the algae *S. vulgare* and *P. flagellifera* showed little or no change in pigment composition and protein content between the dry and rainy seasons, this can be an acclimation response of the pigments of these macroalgae that together with a good antioxidant defense system promotes the establishment of these species in the rocky shore coast. For *U. fasciata* it was observed a high amount of carotenoids varying between the seasons. Carotenoids are substances known for their potential as a sunscreen and antioxidant at high irradiance are accumulated by land plants and green algae. The absorption spectra in the UV wavelength range of the extracts showed that the composition of the extracts varied qualitatively and quantitatively among species, with different quantitative profiles between seasons. The results of this study demonstrate that the studied algae have a good acclimation response supported by low variation of their photosynthetic pigments and the presence of antioxidant defenses.

Key words: Antioxidants, biotechnology, crude extracts, free radicals, macroalgae, physiology.

5.1. Introdução

As macroalgas são importantes componentes do ecossistema marinho (costões rochosos), além de produtores primários possuem inúmeras funções nesses ambientes (Luning, 1990; Bischof et al., 2006). A zona do mediolitoral dos costões rochosos é um ambiente dinâmico, sujeita a rápidas mudanças nos parâmetros físicos e químicos relacionados à flutuação das marés e às alterações causadas pelas variações sazonais diurnas e meteorológicas (Collén et al., 2007). Entre essas mudanças, estão incluídas as variações de umidade, dessecação quando emersas, temperatura, estresse por aquecimento ou congelamento, choques osmóticos devido à precipitação, principalmente em poças de maré, e intensidade de luz. Essas condições, que já são estressantes para os seres vivos que habitam costões rochosos, podem ser exacerbadas pelas mudanças climáticas globais, podendo gerar a morte desses organismos (Collén et al., 2007; Stengel, 2014). Portanto, adaptações e aclimações dos seres vivos para o estresse são particularmente importantes para sobrevivência de organismos sésseis como as macroalgas (Collén et al., 2007).

A radiação solar que atinge a superfície terrestre consiste principalmente de radiação ultravioleta (UV), radiação fotossinteticamente ativa (PAR) e radiação infravermelha (IR). Os efeitos danosos da radiação UV para os organismos são causadas principalmente pelos raios UVA (315 - 400 nm) e UVB (280 - 315 nm) (Polo et al., 2014). Altas quantidades de UVA atingem a superfície da terra e servem para reparar processos danosos causados pela radiação UVB. Muitos desses danos são causados quando essa radiação é absorvida pelos ácidos nucleicos e proteínas, causando fotoxidação e alterações em moléculas que podem alterar processos metabólicos vitais como transcrição, duplicação e tradução (Lão & Glaser, 1996; Buma et al., 2000). Podem causar também alterações celulares e fisiológicas em processos como fotossíntese e crescimento de plantas, absorção de nitrato em diatomáceas, locomoção de protistas e no crescimento de macroalgas (Dohler & Biermann, 1987; Wood, 1987; Tevini & Teramura, 1989; Håder et al., 2007).

Mudanças sazonais dos fatores abióticos como radiação solar ou UV, temperatura e disponibilidade de nutrientes têm sido referidas como fatores

responsáveis pela alteração de processos bioquímicos e/ou fisiológicos como a produção de compostos oxidantes e antioxidantes, taxas fotossintetizantes, níveis de pigmentos e de metabólitos primários e secundários, essas alterações ocorrem como mecanismo do organismo de proteger a sua maquinaria vital e reestabelecer a homeostase sem que essas alterações interfiram no seu crescimento e desenvolvimento (Kain, 1989; Demmig-Adams & Adams, 1992; Franklin & Forster, 1997; Hader & Figueroa, 1997; Cruces et al., 2012).

O limite superior de distribuição para algumas macroalgas do mediolitoral é principalmente controlada por estressores abióticos (Davison & Pearson, 1996). Portanto, em muitos casos o estresse abiótico é decisivo e não é completamente conhecido como ele influencia as macroalgas. Desta forma, a importância e como esses estressores atuam sobre as macroalgas da zona do mediolitoral ainda é pouco conhecido (Collén et al., 2007).

O excesso de luz desempenha importante papel como estressor para as macroalgas e tem ganhado bastante destaque entre os estudos fisiológicos, pois esse fator pode reduzir a atividade fotossintetizante de algas marinhas durante curtos (diariamente) e longos (sazonalmente) períodos. Tal fator abiótico pode causar dano direto aos pigmentos fotossintetizantes, além de danificar complexos proteicos que são responsáveis pelo processo de fotoaclimação (Davison & Pearson, 1996; Figueroa et al., 1997; Figueroa et al., 2003; Bischof et al., 2006). Os pigmentos são a primeira linha de defesa em organismos fotossintetizantes e, por isso, sofrem efeitos sob o estresse de altas irradiâncias (Jordan, 2002). De forma geral, caracteriza-se por um processo degradativo dos pigmentos, que é ocasionado pelo dano fotooxidativo. A degradação disponibiliza componentes orgânicos (fontes de carbono) e inorgânicos (fontes nitrogenadas) que podem ser translocados para formação de novos compostos que permitirão a manutenção e defesa das células (Foyer & Shigeoka, 2011). Excesso luz pode ocasionar também a redução dos níveis de proteínas totais em macroalgas. As proteínas são conhecidas por estarem associadas a cenários de estresse em plantas terrestres, sendo constantemente produzidas, acumuladas e consumidas, pois o mecanismo adotado pelas plantas para lidar com o estresse oxidativo é através do reparo

de proteínas oxidadas, estabilização ou remoção de proteínas danificadas (Beardall et al., 2009).

Os estudos com abordagem fisiológica de espécies de macroalgas representam um primeiro passo na investigação dos mecanismos de sobrevivência desses organismos frente às variações dos fatores abióticos. E podem adicionalmente proporcionar informações da composição nutricional das espécies para possíveis aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica (Benson et al., 1983; Darcy- Vrillon, 1993).

O presente estudo teve como objetivo avaliar variações no desempenho fisiológico de três espécies de macroalgas marinhas do nordeste do Brasil durante as estações seca e chuvosa, mediante a análise qualitativa e quantitativa de pigmentos fotossintetizantes, proteínas solúveis totais e potencial antioxidante.

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1 Área de estudo e coleta do material

A Praia do Morro de Pernambuco (14°47'00"S, 39°02'00"W), situada no litoral sul da Bahia, Município de Ilhéus, nordeste do Brasil, possui totais pluviométricos anuais entre 600 e 3.000 mm. De acordo com Molion & Bernardo (2002), a região apresenta período de chuvas mais intensas durante os meses de abril a junho, com picos em maio, enquanto que o mais seco é registrado entre os meses de outubro a dezembro.

Dados climatológicos dos dois anos de coleta na localidade (2013 e 2014) são apresentados na Figura 1, incluindo precipitação obtida da estação meteorológica da Universidade Livre do Mar e da Mata, situada no Município de Ilhéus, e índice de radiação ultravioleta (IUV) coletados do Instituto de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (INEMA- <http://www.inema.ba.gov.br/>). Estes dados permitiram subsidiar possíveis relações entre os resultados obtidos neste estudo e as condições ambientais especificadas em cada período.

As algas *Sargassum vulgare* C. Agardh, *Palisada flagellifera* (J. Agardh) K.W. Nam e *Ulva fasciata* Delile foram coletadas durante a maré baixa, de 1 a 5 de novembro de 2013 (estação de seca) e em 16 de maio de 2014 (estação

chuvosa) e transportadas para o Laboratório de Ecotoxicologia da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC, Ilhéus). No laboratório, as algas foram triadas e limpas para retirada de macroepífitos, pesadas e divididas em diferentes amostras de acordo com a biomassa necessária para cada um dos parâmetros analisados sempre com $n = 5$. As amostras foram mantidas em baixa temperatura (-4°C) e transportadas em caixas térmicas com gelo até o Laboratório de Algas Marinhas Edison José de Paula (LAM) do Instituto de Biociências da USP. Uma vez no LAM, o material foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em ultrafreezer (-80°C) até o momento das análises.

5.2.2 Quantificação de pigmentos fotossintetizantes e proteínas solúveis totais

As análises do conteúdo de pigmentos fotossintetizantes e de proteínas solúveis totais foram realizadas a partir de amostras de 70 mg de massa fresca (MF) de alga, através da mensuração das respectivas absorbâncias em espectrofotômetro UV-visível Hewlett Packard, modelo 8452A (EUA), utilizando cubeta de quartzo de 1 cm de percurso óptico. Os detalhes metodológicos encontram-se no subitem 2.3.1 descrito no Capítulo 2 - Metodologia Geral.

5.2.3 Avaliação do potencial antioxidante e espectro UV de absorção

O potencial antioxidante foi avaliado a partir dos mesmos seis diferentes ensaios descritos no item 2.2.3 do Capítulo 2: sequestro do radical DPPH, sequestro do radical ABTS, co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico, poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), poder antioxidante pela quelação de metais e quantificação de substâncias redutoras pelo método Folin-Ciocalteu, com as modificações necessárias para os estudos fisiológicos descritas no item 2.3.2 também do Capítulo 2.

5.2.3.1. Espectros de absorção UV

Os extratos metanólicos resultantes da extração para aferir o potencial antioxidante foram também analisados qualitativamente em espectrofotômetro de microplacas UV-vis EPOCH (Biotek, EUA) na faixa do UV que compreende os comprimentos de onda entre 200 e 400 nm. O método encontra-se descrito no item 2.3.3 do Capítulo 2 - Metodologia Geral.

5.2.4 Análises estatísticas

Os conjuntos de dados para cada um dos parâmetros estudados foram testados quanto à normalidade através do teste de Kolmogorov–Smirnov & Lilliefors e homocedasticidade pelo teste de Bartlett ($p < 0,05$). Cada um dos parâmetros registrados foi avaliado individualmente para cada espécie utilizando análise de variância (ANOVA) unifatorial e o teste *post-hoc* Newman Keuls utilizando o software Statistica v.13.

5.3. Resultados

5.3.1 Dados climatológicos

Os dados climáticos mostraram uma variação significativa dos índices de radiação UV (IUV) para os anos de 2013 e 2014 entre os meses de janeiro, agosto, setembro, outubro e dezembro (Fig. 1). No entanto, o padrão de baixo IUV entre abril até agosto e aumento do IUV nos demais meses se manteve igual para ambos anos. Foi possível observar uma redução desse índice na primeira metade do ano com os menores valores registrados no mês de junho, que coincidiu com o maior volume de chuvas, principalmente para o ano de 2013 (Fig. 1).

Os anos de 2013 e 2014 apresentaram uma dinâmica de chuvas coerente com o esperado para a região. É possível observar que o mês de novembro de 2013 enquadrou-se entre os meses com menor volume de chuva para o mesmo ano (Fig. 1), sendo considerada como a estação seca para este estudo. O mês de maio de 2014, considerado como a estação chuvosa neste estudo, está dentro dos meses de maior volume de chuvas para o mesmo ano (Fig.1).

Figura 1. Dados climáticos para dinâmicas de chuvas (média em mm de chuva mensais), representado pelas barras cinzas e pretas, e índice de radiação UV (IUV), representado pelas linhas azul e vermelha, referentes aos anos de 2013 e 2014 para o Município de Ilhéus, Bahia. A seta azul corresponde ao período de seca deste estudo e a seta vermelha ao período chuvoso deste estudo. Asteriscos representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os anos de 2013 e 2014 para o IUV nos respectivos meses do ano.

5.3.2 Quantificação de pigmentos fotossintetizantes e proteínas solúveis totais

Os dados de ficobiliproteínas de *P. flagellifera* mostraram diferenças significativas entre as estações seca e chuvosa apenas para ficocianina (Fig. 2). A ficoeritrina foi o pigmento que apresentou as maiores quantidades para as duas estações coletadas $518,74 \pm 64,39 \mu\text{g.g MF}^{-1}$ (seca) e $601,35 \pm 94,96 \mu\text{g.g MF}^{-1}$ (chuvosa), seguido da ficocianina com concentrações de $211,57 \pm 39,46 \mu\text{g.g MF}^{-1}$ (seca) e $288,64 \pm 53,53 \mu\text{g.g MF}^{-1}$ (chuvosa) e por último a aloficocianina com valores de $133,60 \pm 9,10 \mu\text{g.g MF}^{-1}$ (seca) e $159,01 \pm 21,21 \mu\text{g.g MF}^{-1}$ (chuvosa) (Fig. 2).

Figura 2. Teor de ficobiliproteínas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina) da alga vermelha *P. flagellifera* coletada na Praia do Morro de Pernambuco nas estações seca e chuvosa. As barras correspondem à média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$). Letras distintas representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Os resultados dos teores de clorofilas e carotenoides para *S. vulgare*, *P. flagellifera* e *U. fasciata* estão apresentados na Figura 3. Para *S. vulgare* os resultados para quantificação de clorofilas *a* e *c* e carotenoides não mostraram diferenças significativas entre as estações seca e chuvosa (Fig. 3A).

Palisada flagellifera apresentou variação tanto para a clorofila *a* quanto para os carotenoides entre as estações seca e chuvosa (Fig. 3B), com maiores teores desses pigmentos durante a estação seca, com valores de $75,60 \pm 12,10 \mu\text{g.g MF}^{-1}$ e $27,19 \pm 4,35 \mu\text{g.g MF}^{-1}$, respectivamente.

Os teores de clorofilas e carotenoides também variaram entre as estações para *U. fasciata* (Fig. 3C), com valores de clorofila *a* de $2.890,24 \pm 851,69 \mu\text{g.g MF}^{-1}$ para a estação seca e $6.440,41 \pm 1.276,11 \mu\text{g.g MF}^{-1}$ na estação chuvosa. O teor de clorofila *b* também variou entre as estações, com valores de $3.946,50 \pm 1.384,14 \mu\text{g.g MF}^{-1}$ (seca) e $10.145,89 \pm 2.129,07 \mu\text{g.g MF}^{-1}$ (chuvosa), assim como os carotenoides que apresentaram valores de $11.496,53 \pm 2.388,31 \mu\text{g.g MF}^{-1}$ (seca) e $21.280 \pm 2.592,47 \mu\text{g.g MF}^{-1}$ (chuvosa) (Fig. 3C).

Figura 3. Quantificação de clorofilas e carotenoides de (A) *S. vulgare*, (B) *P. flagellifera* e (C) *U. fasciata* coletadas na Praia do Morro de Pernambuco em duas estações, seca e chuvosa. As barras correspondem à média $\pm$ desvio padrão ($n=5$). Letras minúsculas, maiúsculas e em itálico distintas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o teor de cada pigmento referente as estações seca e chuvosa.

A quantidade de proteínas solúveis totais apresentou variação significativa entre as estações coletadas apenas para *S. vulgare*, com aumento na estação de seca ($875,53 \pm 74,51 \mu\text{g.g MF}^{-1}$) e valores menores para chuvosa ($1.540,61 \pm 239,56 \mu\text{g.g MF}^{-1}$) (Fig. 4A). A alga vermelha *P. flagellifera* não apresentou diferenças no teor de proteínas solúveis totais entre as estações coletadas, com valores de $1.414,39 \pm 99,55 \mu\text{g.g MF}^{-1}$ (seca) e

$1.419,36 \pm 129,08 \mu\text{g.g MF}^{-1}$ (chuvosa) (Fig. 4B). A mesma resposta foi observada para *U. fasciata*, na qual não houve variação no teor de proteínas entre as estações (Fig. 4C).

Figura 4. Quantificação de proteínas solúveis totais de (A) *S. vulgare*, (B) *P. flagellifera* e (C) *U. fasciata* coletadas na Praia do Morro de Pernambuco em duas estações, seca e chuvosa. As barras correspondem à média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$). Letras distintas representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

5.3.3 Avaliação do potencial antioxidante

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, as diferentes espécies apresentaram variações no potencial antioxidante entre as estações para os ensaios avaliados. No entanto, as respostas não seguem um padrão claro para o mesmo ensaio entre as estações e as espécies.

Tabela 1. Porcentagem do potencial antioxidante dos diferentes ensaios testados nos extratos metanólicos das três espécies estudadas em duas épocas, seca e chuvosa. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n=5). As letras distintas representam diferença estatística ($p < 0,05$) comparando ambas as estações para a mesma espécie e único ensaio antioxidante. As letras em vermelho representam os maiores potenciais antioxidantes para cada ensaio e para cada espécie.

Ensaio antioxidante	<i>Sargassum vulgare</i>		<i>P. flagellifera</i>		<i>U. fasciata</i>	
	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa
DPPH (%)	82,05 $\pm$ 1,40 ^a	74,11 $\pm$ 13,86 ^a	26,92 $\pm$ 6,29 ^a	13,86 $\pm$ 1,75 ^b	34,93 $\pm$ 3,82 ^a	16,61 $\pm$ 4,49 ^b
ABTS (%)	88,45 $\pm$ 8,51 ^a	100,90 $\pm$ 2,00 ^b	51,34 $\pm$ 14,15 ^a	39,93 $\pm$ 7,62 ^a	66,42 $\pm$ 7,03 ^a	55,71 $\pm$ 8,75 ^a
β -CAR (%)	67,40 $\pm$ 3,91 ^a	73,07 $\pm$ 2,64 ^b	65,17 $\pm$ 4,08 ^a	50,91 $\pm$ 4,25 ^b	49,82 $\pm$ 1,71 ^a	60,45 $\pm$ 4,66 ^b
FRAP (mg.g ⁻¹ ET)	229,50 $\pm$ 14,88 ^a	225,60 $\pm$ 14,29 ^a	96,09 $\pm$ 5,98 ^a	109,10 $\pm$ 3,38 ^b	120,50 $\pm$ 1,47 ^a	117,00 $\pm$ 1,47 ^b
Quelante (%)	13,57 $\pm$ 4,40 ^a	17,68 $\pm$ 1,88 ^a	12,54 $\pm$ 3,00 ^a	12,23 $\pm$ 1,46 ^a	14,24 $\pm$ 3,48 ^a	24,28 $\pm$ 2,64 ^b
Folin-Ciocalteu (mg.g ⁻¹ EAG)	32,93 $\pm$ 9,96 ^a	60,29 $\pm$ 5,33 ^b	7,79 $\pm$ 1,25 ^a	9,20 $\pm$ 0,80 ^a	12,29 $\pm$ 1,89 ^a	9,78 $\pm$ 2,08 ^a

Foi observada variação do potencial antioxidante de *S. vulgare* entre as estações seca e chuvosa para os ensaios sequestro do radical ABTS, β -caroteno e Folin-Ciocalteu, com maior potencial antioxidante durante a estação chuvosa (Tabela 1). Dentre esses ensaios com variação significativa entre as estações, os extratos de *S. vulgare* apresentaram alto potencial antioxidante para o ensaio de sequestro do radical ABTS em ambas as estações, com valores de 88,45 $\pm$ 8,51% (seca) e 100,9 $\pm$ 2,00% (chuvosa), assim como para o ensaio de co-oxidação do β -caroteno com valores de 67,40 $\pm$ 3,91% (seca) e 73,07 $\pm$ 2,64% (chuvosa) e para o ensaio redutor do Folin-Ciocalteu com

valores $32,93 \pm 9,96 \text{ mg.g}^{-1}$ EAG (seca) e $60,29 \pm 5,33 \text{ mg.g}^{-1}$ EAG (chuvosa) (Tabela 1).

Para os ensaios antioxidantes de *P. flagellifera* que foram significativos entre as estações, frente ao ensaio de sequestro do DPPH e co-oxidação do β -caroteno o potencial antioxidante foi maior para a estação seca, enquanto que o oposto foi observado para FRAP. Os demais ensaios não apresentaram diferença significativa (Tabela 1). *Palisada flagellifera* apresentou variação dos potenciais antioxidantes para os ensaios do DPPH, β -caroteno e FRAP. Para ensaio do DPPH e β -caroteno os maiores valores foram observados durante a estação seca, $26,92 \pm 6,29\%$ e $65,17 \pm 4,08\%$, respectivamente. Para o ensaio de FRAP houve a inversão dessa resposta, com menor atividade na estação seca ($96,09 \pm 5,98\%$) do que na estação chuvosa ($109,10 \pm 3,38\%$) (Tabela 1).

Os extratos fisiológicos de *U. fasciata* apresentaram diferenças significativas entre as estações para os ensaios de sequestro do radical DPPH, do β -caroteno, do FRAP e de quelante (Tabela 1). *Ulva fasciata* apresentou maior potencial antioxidante observado para os ensaios do DPPH, co-oxidação do β -caroteno, FRAP e quelante de metais. Os demais ensaios não apresentaram variação entre as estações seca e chuvosa (Tabela 1). Os maiores potenciais foram observados durante a estação seca para os ensaios DPPH e FRAP, com maiores valores de $34,93 \pm 3,82\%$ (DPPH) e $120,50 \pm 1,47 \text{ mg.g}^{-1}$ ET (FRAP), oposto aos ensaios de β -caroteno e quelante, com maiores potenciais durante a estação chuvosa, com valores de $60,45 \pm 4,66\%$ (β -caroteno) e $24,28 \pm 2,64\%$ (quelante) (Tabela 1).

A Tabela 2 mostra os valores de EC_{50} calculados para os extratos nos ensaios de sequestro dos radicais DPPH e ABTS, β -caroteno e quelante. O menor EC_{50} observado para *S. vulgare* foi de $1,44 \text{ mg.mL}^{-1}$ observado para a estação seca e o maior de $6,23 \text{ mg.mL}^{-1}$ para o ensaio de sequestro do DPPH durante a estação chuvosa (Tabela 2). Os valores de EC_{50} são inversamente proporcionais ao potencial antioxidante, portanto, quanto menor for o valor desse parâmetro maior será o potencial antioxidante.

O menor valor de EC_{50} de *P. flagellifera* foi de 8,81 mg.mL⁻¹ (seca) para o ensaio de co-oxidação do β -caroteno e o maior valor foi de 39,08 mg.mL⁻¹ (chuvosa) o ensaio de sequestro do radical ABTS (Tabela 2).

Os maiores e menores valores de EC_{50} foram observados para o ensaio de sequestro do radical DPPH para *U. fasciata*, com menor valor observado durante a estação seca (8,99 mg.mL⁻¹) e com maior valor para a estação chuvosa (30,33 mg.mL⁻¹) (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração efetiva para atingir 50% do potencial antioxidante (EC_{50}) dos ensaios antioxidantes testados expresso em mg.mL⁻¹ e equivalente de padrão para os extratos das macroalgas *S. vulgare*, *P. flagellifera* e *U. fasciata* em duas estações de coleta (seca e chuvosa).

Ensaio	<i>Sargassum vulgare</i>		<i>Palisada flagellifera</i> EC_{50} (mg.mL ⁻¹)		<i>Ulva fasciata</i>	
	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa
DPPH	5,38	6,23	*	*	8,99	30,33
ABTS	1,44	3,27	26	39,08	17,74	14,45
β -caroteno	4,63	2,69	8,81	19,9	12,36	20,65
Quelante	*	*	*	*	*	*

* Não foi possível calcular o EC_{50}

Os espectros de absorção na faixa do UV dos extratos de *S. vulgare*, *P. flagellifera* e *U. fasciata* nas duas estações de coleta são apresentados na Figura 5. Os perfis dos espectros de absorção UV foram distintos entre as espécies, sugerindo que a constituição química desses extratos também variou de acordo com as espécies (Fig. 5).

Sargassum vulgare não apresentou variação qualitativa no perfil geral de constituição dos extratos entre as estações seca e chuvosa (Fig. 5A). Foi possível observar que os extratos mostraram dois picos de absorção, nas faixas de 230-240 nm e 280-290 nm. O valores de áreas embaixo da curva dos extratos de *S. vulgare* não apresentaram diferença significativa entre as estações (Tabela 3).

Para a alga vermelha *P. flagellifera* foi possível notar que houve variação quantitativa entre os espectros de absorção UV (Fig. 5B) de ambas estações, com picos de absorção entre a faixa de 330 a 340 nm. Esse perfil foi

corroborado pela maior área embaixo da curva na estação seca ($173,9 \pm 16,36$) em relação à estação chuvosa ($141,6 \pm 8,54$) (Tabela 3).

Os extratos da alga verde *U. fasciata* apresentaram as maiores magnitudes de absorção e foi possível notar a presença de vários picos em pelos menos três regiões do espectro UV (Fig. 5C). No entanto, não houve variação quantitativa entre as áreas embaixo da curva de ambas estações (Tabela 3).

Figura 5. Espectro de absorção UV (200-400 nm) dos extratos metanólicos de (A) *S. vulgare*, (B) *P. flagellifera* e (C) *U. fasciata* durante as estações seca (linhas cinza claro) e chuvosa (linhas cinza escuro).

Tabela 3. Área embaixo da curva dos espectros de absorção UV dos extratos metanólicos de *S. vulgare*., *P. flagellifera* e *U. fasciata* coletadas no Morro de Pernambuco em duas estações (seca e chuvosa). Letras distintas representam diferenças significativas pelo Test *t* ($p < 0,05$).

	Seca	Chuvosa
<i>S. vulgare</i>	186,2 ± 16,28 ^a	203,5 ± 30,34 ^a
<i>P. flagellifera</i>	173,9 ± 16,36 ^a	141,6 ± 8,54 ^b
<i>U. fasciata</i>	311,0 ± 25,81 ^a	275,6 ± 27,80 ^a

5.4. Discussão

Os dados climatológicos para o Município de Ilhéus, onde foi realizado o presente estudo, apresentaram o padrão esperado para a dinâmica de chuvas previstas para essa ecorregião, como classificado por Köppen – Geiger (1936) com os meses de abril a julho com maior pluviosidade (época chuvosa) e meses de agosto a novembro caracterizados por menor pluviosidade (época seca). No entanto, os volumes de chuva observados para a época chuvosa do ano de 2014 foram menores quando comparados com o ano de 2013 para a mesma época, sugerindo que eventos climáticos podem ter influenciado na dinâmica de chuvas durante esse ano. O fenômeno climático mundial de El Niño pode interferir principalmente no regime de chuvas dos trópicos e dependendo da intensidade do mesmo, podem causar secas severas que reduzem o volume de chuvas principalmente do Norte e Nordeste do Brasil (Molion & Bernardo, 2000). De acordo com Silva et al. (2015) baseado em dados disponibilizados pela NASA, o evento de El Niño 2014 – 2016 foi considerado o mais intenso desde 1997 – 1998 e influenciou intensamente áreas tropicais do globo, causando a redução das chuvas no norte e nordeste do Brasil.

Os índices de radiação ultravioleta (IUV) podem ser influenciados pelo aumento da umidade e nebulosidade (Côrrea, 2003; Silva, 2008). E os IUVs para o Município de Ilhéus seguiram um padrão anual coerente, com as maiores incidências nos meses de outubro a março, que corresponde à época

com menores níveis de precipitação. E as menores incidências de UV foram observadas entre os meses de abril a agosto meses, com mais chuva e com menor incidência de luz nos trópicos, além do aumento da nebulosidade nesta época (Silva, 2008).

Desta forma, os dados de precipitação e IUV para o Município de Ilhéus mostraram uma distribuição coerente com o descrito para essa região entre os anos de 2013 e 2014, porém o ano de 2014 apresentou valores menores do que esperado para precipitação e esse fato pode ter influenciado as respostas fisiológicas (teor de pigmentos e antioxidantes) das macroalgas estudadas.

A constituição pigmentar de *S. vulgare* não apresentou diferença significativa para o teor de pigmentos entre as estações seca e chuvosa, enquanto que para *P. flagellifera* foram observadas variações para o teor de clorofila *a*, carotenoides e ficobiliproteínas, porém a amplitude dessa variação foi pequena e esse comportamento pode indicar uma boa aclimação desses pigmentos frente aos fatores abióticos em que essas espécies encontram-se submetidas na área de estudo.

Por outro lado, *U. fasciata* apresentou uma diminuição de clorofila *a* na estação seca quando comparada à chuvosa. Essa resposta pode estar relacionada com a alta incidência de radiação UV observada durante essa estação, que diferente das duas outras espécies influenciou o desempenho fotossintetizante da alga verde. As algas de gênero *Ulva* habitam o mediolitoral superior e estão sob forte influência da radiação UV, temperatura e dessecação e, muitas vezes, podem desenvolver adaptações para combater essa condição estressante como verificado no trabalho de Bischof et al. (2002).

Bischof et al. (2002) avaliaram o efeito da forte irradiância solar e UV em algas do gênero *Ulva* e observaram adaptações ecológicas nas frondes dessas macroalgas como o branqueamento das lâminas superiores para proteção das lâminas inferiores dos danos da radiação. De acordo com esses autores, foram observadas ainda alterações nos pigmentos e também para as proteínas fotossintetizantes sob altas irradiâncias.

Foi observada uma grande quantidade de carotenoides em *U. fasciata*, que variou durante as estações seca e chuvosa. Esses pigmentos acessórios

exercem função de fotoproteção sob condições de alta irradiância tanto em plantas terrestres quanto em algas verdes (Demmig-Adams & Adam, 1996).

A ausência ou discreta variação na composição pigmentar e de proteínas para as espécies estudadas representa um interessante resultado tanto do ponto de vista fisiológico, por indicar a possível aclimação dos pigmentos nesses organismos, quanto do ponto de vista aplicado. A ausência de variação na constituição proteica das algas estudadas pode tornar esses organismos candidatos como uma interessante fonte nutricional de proteínas.

O potencial antioxidante é um dos parâmetros que permite fazer inferências sobre condições oxidativas do metabolismo e, desta forma, podem fornecer informações sobre a aclimação celular e tolerância ao estresse oxidativo (Miller-Morey & Van Dolah, 2004; Ross & Van Alstyne, 2007).

O perfil antioxidativo das algas estudadas mostrou ser eficiente do ponto de vista fisiológico. *Sargassum vulgare* apresentou alto potencial antioxidante para a estação chuvosa, em três dos seis ensaios testados. Assim como *P. flagellifera*, que também apresentou potencial antioxidante em três dos seis ensaios. *Ulva fasciata* apresentou respostas antioxidativas que variaram entre as estações para quatro dos seis ensaios. A ampla e diversificada resposta antioxidativa, suportada pela pequena degradação observada na constituição pigmentar e de proteínas dessas algas, sugerem que o sistema de defesa antioxidante foi eficiente contra a influência dos fatores abióticos.

A alta resposta antioxidativa da alga *S. vulgare*, principalmente para estação chuvosa, foi suportada pelos conjuntos de dados climáticos e dos espectros de absorção UV dos extratos. Esse resultado pode ser explicado pelas características fitoquímicas desse grupo de algas. De acordo com Zubia et al. (2007), Wang et al. (2009), Devi et al. (2011) e Rajauria et al. (2013), o alto potencial observado para algas pardas é devido à produção de substâncias redutoras como os polifenóis que parecem ser a primeira linha de defesa para esse grupo.

A alta proteção contra a oxidação lipídica do β -caroteno dos extratos metanólicos de *S. vulgare* para estação chuvosa foram semelhantes ao observado no estudo de Anaelle et al. (2013), com extratos hexano-metanol da

alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. Os autores discutiram que o ensaio de oxidação do β -caroteno é mais específico para classes de substâncias mais lipofílicas e atribuem a atividade a substâncias apolares como lipídios que podem estar presente nesses extratos.

A alga vermelha *P. flagellifera* apresentou alto potencial antioxidante frente ao ensaio de oxidação do β -caroteno, moderada atividade frente ao sequestro dos radicais DPPH e ABTS, e fraco potencial redutor frente aos ensaios FRAP e Folin-Ciocalteu. Entretanto, comparando-se os resultados obtidos pelo espectro de absorção UV desses extratos, sugere-se que o potencial antioxidante observado para essa espécie pode estar relacionado ao grupo majoritário de substâncias que absorvem na faixa dos 330-340 nm e, segundo a literatura, pode-se tratar do grupo dos aminoácidos tipo micosporinas (Moisan & Mitchell, 2001).

Ulva fasciata apresentou baixo potencial antioxidante quando comparada com as outras macroalgas do presente trabalho, mesmo sendo a espécie que mais está exposta aos fatores abióticos (radiação solar e UV, dessecação e temperatura) no costão rochoso. Resultados semelhante foram observados por Choo et al. (2004) para alga verde *Ulva linza* Linnaeus (como *Enteromorpha ahlneri* Bliding). Os autores justificaram que esse baixo potencial antioxidante é uma estratégia de sobrevivência para essa espécie, pois aparentemente, por ser efêmera, realoca seus recursos para competição com herbívoros ao invés de investir em defesas antioxidantes.

A ausência ou pouca degradação dos pigmentos fotossintetizantes das macroalgas estudadas pode ter relação com o processo fisiológico de aclimação que em conjunto com um sistema antioxidante eficiente garantiu a sobrevivência e bom desenvolvimento dessas macroalgas frente a mudanças nos fatores climáticos na região de Ilhéus durante os anos de 2013 e 2014, período no qual a região nordeste do país pareceu sofrer intensa influência do fenômeno El niño (Silva et al, 2015).

Referências

- Airanthi, M. K., Hosokawa, M. & Miyashita, K. 2011. Comparative antioxidant activity of edible Japanese brown seaweeds. *J. Food Sci.*, 76(1): C104-C111.
- Anaëlle, T., Leon, E. S., Laurent, V., Elena, I., Mendiola, J. A., Stéphane, C., Luc, M. & Valérie, S. P. 2013. Green improved processes to extract bioactive phenolic compounds from brown macroalgae using *Sargassum muticum* as model. *Talanta*, 104: 44-52.
- Aráoz, R. & Häder, D. P. 1997. Ultraviolet radiation induces both degradation and synthesis of phycobilisomes in *Nostoc* sp.: a spectroscopic and biochemical approach. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 23(4): 301-313.
- Beardall, J., Sobrino, C. & Stojkovic, S. 2009. Interactions between the impacts of ultraviolet radiation, elevated CO₂ and nutrient limitation on marine primary producers. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 8(9): 1257–1265.
- Benson, R. C. Jr., Kinsey, J. H., Cortese, D. A., Farrow, G. M. & Utz, D. C. 1983. Treatment of transitional cell carcinoma of the bladder with hematoporphyrin derivative phototherapy. *J. Urol.*, 130: 1090–1094.
- Blankenship, R. E. 2002. Molecular Mechanisms of Photosynthesis. 1 ed. Oxford Blackwell Science. 336 p.
- Bradford, M. M. A. 1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anali. Biochem.*, 72: 248-254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. L. W. T. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.*, 28(1): 25-30.
- Boehm, M., Romero, E., Reisinger, V., Yu, J., Komenda, J., Eichacker, L. A., Dekker, J. P. & Nixon, P. J. 2011. Investigating the early stages of photosystem II assembly in *Synechocystis* sp. PCC 6803 isolation of CP47 and CP43 complex. *J. Biol. Chem.*, 286(17): 14812-14819.
- Bischof, K., Kräbs, G., Wiencke, C. & Hanelt, D. 2002. Solar ultraviolet radiation affects the activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase and

- the composition of photosynthetic and xanthophylls cycle pigments in the intertidal green alga *Ulva lactuca* L. *Planta*, 215: 502–509.
- Bischof, K., Gómez, I., Molis, M., Hanelt, D., Karsten, U., Lüder, U., Roleda, M. Y., Zacher, K. & Wiencke, C. 2006. Ultraviolet radiation shapes seaweed communities. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 5: 141-166.
- Buma, A. G. J., Van Oijen, W. H. & Van De Poll, M. J. W. 2000. On the high sensitivity of the marine prymnessiophyte *Emiliania huxleyi* to ultraviolet-B. *J. Appl. Phycol.*, 131: 296–303.
- Choo, K. S., Snoeijs, P. & Pedersen, M. 2004. Oxidative stress tolerance in the filamentous green algae *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahlnieriana*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 298: 111–123.
- Collén, J., Guisle-Marsollier, I., Léger, J. J. & Boyen, C. 2007. Response of the transcriptome of the intertidal red seaweed *Chondrus crispus* to controlled and natural stresses. *New Phytologist*, 176(1): 45-55.
- Cruces, E., Huovinen, P. & Gómez, I. 2012. Stress proteins and auxiliary anti-stress compounds in intertidal macroalgae. *Latin Amer. J. Aqua. Res.*, 40(4): 822.
- Darcy-Vrillon, B. 1993. Nutritional aspects of the developing use of marine macroalgae for the human industry. *Intl. J. Food Sci. Nutri.*, 44: 23-35.
- Davison, I. & Pearson, G. 1996. Stress tolerance in intertidal seaweeds. *J. Phycol.*, 32: 197–211.
- Demmig-Adams, B. & Adams Iii, W. W. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Ann. Rev. Plant Bio.*, 43(1): 599-626.
- Devi, G. K., Manivannan, K., Thirumaran, G., Rajathi, F. A. A. & Anantharaman, P. 2011. *In vitro* antioxidant activities of selected seaweeds from Southeast coast of India. *Asian Pacific J. Tropic. Med.*, 4(3): 205-211.
- Dohler, G. & Biermann, I. 1987. Effect of UV-B irradiance on the response of ¹⁵N-nitrate uptake of *Lauderia annulada* and *Synedra planctonica*. *J.*

Plankton Res., 9: 881–890.

- Dotulong, V., Widjanarko, S. B. & Yunianta, L. P. 2013. Antioxidant activity of three-marine algae methanol extract collected from North Sulawesi waters, *Indo. Int. J. Sci. Engine. Investiga.*, 2(23): 26-30.
- Duarte-Almeida, J. M., Santos, R. D., Genovese, M. I. & Lajolo, F. M. 2006. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. *Ciê. Tecnol. Alim.*, 26(2): 446-452.
- Figuerola, F. L., Salles, S. & Aguilera, J. 1997. Effects of solar radiation on photoinhibition and pigmentation in the red alga *Porphyra leucosticta*. *Oceanog. Lit. Rev.*, 10(44): 1174.
- Figuerola, F. L., Conde-Alvarez, R. & Gómez, I. 2003. Relations between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated chlorophyll fluorescence and oxygen evolution in macroalgae under different light conditions. *Photosy. Res.*, 75(3): 259-275.
- Franklin, L. A. & Forster, R. M. 1997. Review the changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. *Euro. J. Phycol.*, 32(03): 207-232.
- Foyer, C. H. & Shigeoka, S. 2011. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physio.*, 155(1): 93-100.
- Ganesan, K. , Kumar, K. S. & Rao, S. P. V. 2011. Comparative assessment of antioxidant activity in three edible species of green seaweed, *Enteromorpha* from Okha, Northeast coast of India. *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.*, 12: 73-78.
- Häder, D. P. & Figuerola, F. L. 1997. Photoecophysiology of marine macroalgae. *Photochem. Photobio.*, 66(1): 1-14.
- Häder, D. P.; Kumar, H. D.; Smith, R. C. & Worrest, R. C. 2007. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *J. Photochem. Photobiol.* 46: 53–68.

- Heldt, H. W. & Hedt, F. 2005. Plant biochemistry. 3 ed. San Diego, CA: Elsevier Academic Press. 656p.
- Henley, W. J. & Dunton, K. H. 1995. A seasonal comparison of carbon, nitrogen, and pigment content in *Laminaria solidungula* and *L. saccharina* (Phaeophyta) in the Alaskan Arctic. *J. Phycol.*, 31: 325–331.
- Inskeep, W. P. & Bloom, P. R. 1985. Extinction coefficients of chlorophyll *a* and *b* in N, N-dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiol.*, 77: 483–485.
- Jordan, B. R. 2002. Review: Molecular response of plant cells to UV-B stress. *Func. Plant Biol.*, 29(8): 909-916.
- Kain, J. 1989. The seasons in the subtidal. *Br. Phycol J.*, 24:203–215.
- Kursar, T. A., van derMeer, J. & Alberte, R. S. 1983. Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*: I. Biochemical analyses if pigment mutations. *Plant Physiol.*, 73: 353–360.
- Lão, K. & Glaser, A. N. 1996. Ultraviolet-B photodestruction of light-harvesting complex. *Proc. of Nat. Acad. of Sci. of the Unitd. Stat. of Amer.*, 93: 5258–5263.
- Lüning, K. 1990. Seaweeds: Their Environment, Biogeography, and Ecophysiology. Wiley-Interscience Publication, New York. p. 527.
- Matanjan, P., Mohamed, S., Mustapha, N. M. & Muhammad, K. 2009. Nutrient content of tropical edible seaweeds, *Eucheuma cottonii*, *Caulerpa lentillifera* and *Sargassum polycystum*. *J. App. Phycol.*, 21(1): 75-80.
- Min, B., McClung, A.M. & Chen, M.-H., 2011. Phytochemicals and antioxidant capacities in rice brans of different color. *J. Food Sci.*, 76(1): 117–26.
- Miller-Morey, J.S. & Van Dolah, F.M. 2004. Differential responses of stress proteins, antioxidant enzymes, and photosynthetic efficiency to physiological stresses in the Florida red tide dinoflagellate, *Karenia brevis*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 138: 493–505.
- Molion, L. C. B & Bernanrdo, S.O. 2000. Dinâmica das Chuvas no Nordeste Brasileiro. Disponível em: <http://www.cbmet.com/cbm-files/12->

7ea5f627d14a9f9a88cc694cf707236f.pdf%20,%20acessado%20em%2020/01/2013. Acesso em: 20 de junho de 2016.

- Polo, L. K., de L. Felix, M. R., Kreusch, M., Pereira, D. T., Costa, G. B., Simioni, C., Ouriques, L. C., Chow, F., Ramlov, F., Maraschin, M., Bouzon, Z. L. & Schmidt, É. C. 2014. Photoacclimation responses of the brown macroalga *Sargassum cymosum* to the combined influence of UV radiation and salinity: cytochemical and ultrastructural organization and photosynthetic performance. *Photochem. Photobiol.*, 90: 560–573.
- Rajauria, G., Jaiswal, A. K., Abu-Gannam, N. I. S. S. R. E. E. N. & Gupta, S. 2013. Antimicrobial, antioxidant and free radical-scavenging capacity of brown seaweed *Himanthalia elongata* from western coast of Ireland. *J. Food Biochem.*, 37(3): 322-335.
- Raven, P. H., Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. 2007. *Biologia Vegetal*. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 856p.
- Ross, C. & Van Alstyne, K.L. 2007. Intraspecific variation in stress-induced hydrogen peroxide scavenging by the ulvoid macroalga *Ulva lactuca*. *J. Phycol.*, 43: 466–474.
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Pérez-Jiménez, J. & Saura-Calixto, F. D. 2006. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 4p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 125) Disponível em:< http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/cot_125.pdf>
- Schmidt, E. C., Scariot, L. A., Rover, T. & Bouzon, Z. L. 2009. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. *Micron.*, 40: 860–869.
- Silva, D. A., Sander, C., Júnior, A. C. R. A. & Wankler, F. L. 2015. Análise dos ciclos de precipitação na região de Boa Vista- RR nos anos de 1910 A 2014. *Rev. Geo. Acad.*, 9(2): 34-49.

- Singleton, V. & Rossi, J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Ame. J. Enol. Viticul.*, 16: 144–158.
- Stengel, D., Conde-Alvarez, R., Connan, S., Nitschke, U., Arenas, F., Abreu, H., Bonomi-Barufi, J., Chow, F., Robledo, D., Malta, E.J., Mata, M., Konotchick, T., Nassar, C., Perez-Ruzafa, A., López, D., Marquardt, R., Vaz-Pinto, F., Celis-Plá, P.S.M., Hermoso, M., Ruiz, E., Ordoñez, G., Flores, P., Zanolta, M., Bañares-España, E., Altamirano, M., Korbee, N., Bischof, K. & Figueroa, F.L. 2014. Short-term effects of CO₂, nutrient and temperature impacts on three marine macroalgae under solar radiation. *Aquat. Biol.*, 22: 159-176.
- Telfer, A., Pascal, A. & Gall, A. 2008. Carotenoids in photosynthesis. In Britton, G., Liaaen- Jensen, S., Pfander, H.(Eds.). *Carotenoids*, Volume 4: Natural Functions. Birkhäuser Basel. p. 265-308.
- Tevini, M. & Teramura, A. H. 1989. UV-B effects on terrestrial plants. *J. Photochemis. Photobiol.*, 50: 479–487.
- Torres, P. B. 2012. Análise de pigmentos fotossintetizantes e substâncias fenólicas em *Gracilariopsis tenuifrons* (C.J. Bird & E.C. Oliveira) Fredericq & Hommersand em diferentes intensidades de luz. 104f. Dissertação (Mestrado em Botânica) Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Torres, P. B., Chow, F., Furlan, C. M., Mandelli, F., Mercadante, A. & Santos, D. Y. A. C. 2014. Standardization of a protocol to extract and analyze chlorophyll a and carotenoids in *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang and Xia (Rhodophyta). *Braz. J. Oceanog.*, 62(1): 57-63.
- Tyagi, R.D., Couillard, D. & Tran, F.T. 1991. Comparative study of bacterial leaching of metals from sewage sludge in continuous stirred tank and air-lift reactors. *Proc. Biochem. (Oxford)*, 26: 47–54.
- Tyagi, R.D., Blais, J.F. & Boulanger, B. 1992. Simultaneous municipal sludge digestion and metal leaching. *J. Environ. Sci. Health Part A: Environ. Sci. Eng.*, A28: 1361–1379.

- Wang, T., Jonsdottir, R. & Olafsdottir, G. 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chem.*, 116: 240–248.
- Wood, W. 1987. Effect of solar ultraviolet radiation on the kelp *Ecklonia radiata*. *Mar. Biol.*, 96: 143–150.
- Yang, H., Dong, Y., Du, H., Shi, H., Peng, Y. & Li, X. 2011. Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(4): 3444–3455.
- Zubia, M., Robledo, D. & Pelegrin, Y. F. 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *J. Appl. Phycol.*, 19: 449-458.

Caracterização lipídica de três espécies de macroalgas marinhas do nordeste do Brasil em duas estações do ano

Resumo

A composição lipídica fornece informações nutricionais que podem ser de grande importância, como o teor de ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs). Essas substâncias possuem reconhecida importância no combate a doenças vasculares, câncer e diabetes. As macroalgas apresentam baixo teor lipídico, de 1 a 5% em relação ao peso seco, porém produzem AGPIs que são essenciais e não produzidos por humanos e animais. O presente trabalho foi realizado na National University of Ireland como parte do doutorado sanduíche e consistiu na avaliação dos perfis lipídicos de três espécies brasileiras de macroalgas *Sargassum vulgare* (Ochrophyta), *Palisada flagellifera* (Rhodophyta) e *Ulva fasciata* (Chlorophyta), coletadas no litoral sul da Bahia em duas estações (seca e chuvosa). Os resultados mostraram que *S. vulgare* e *U. fasciata* não representam ricas fontes de AGPIs e que *P. flagellifera* foi a mais promissora, com conteúdo de AGPIs entre $16,08 \pm 0,30\%$ (estação seca) e $14,78 \pm 0,43\%$ (estação chuvosa). O teor de AGPIs variou entre as estações para *P. flagellifera*, confirmando que esse grupo de ácidos graxos pode ser influenciado por mudanças nas condições ambientais. As três espécies apresentaram constituição semelhante para as classes lipídicas, os glicolipídios foram majoritários, $> 50\%$ do total de ácidos graxos para as três espécies, seguidos dos fosfolipídios e lipídios neutros. Diante do perfil lipídico das algas estudadas foi possível perceber que *P. flagellifera* foi considerada uma fonte potencial de AGPIs essenciais que pode representar um interessante recurso do ponto de vista nutracêutico.

Palavras-chave: lipídios, biotecnologia, extratos, macroalgas, nutracêutico.

Abstract

The lipid composition provides nutritional information that may be of great importance, such as the content of polyunsaturated fatty acids (PUFAs). These substances are recognized as important in combat against vascular diseases, cancer and diabetes. Macroalgae have low lipid content, 1 to 5% of dry weight, but produce essential PUFAs not produced by humans and animals. The present work was carried out at the National University of Ireland as part of the sandwich doctorate and consisted in the evaluation of the lipid profiles of three Brazilian macroalgae, *Sargassum vulgare* (Ochrophyta) *Palisada flagellifera* (Rhodophyta) and *Ulva fasciata* (Chlorophyta) collected in the south coast of Bahia in two seasons (dry and rainy). The results showed that *S. vulgare* and *U. fasciata* do not represent rich sources of PUFAs and *P. flagellifera* was the most promising, with PUFAs content between $16.08 \pm 0.30\%$ (dry season) and $14.78 \pm 0.43\%$ (rainy season). The PUFA content varied between season of *P. flagellifera*, confirming that this group of fatty acids can be influenced by changes in environmental conditions. The three species showed similar constitution for the lipidic classes, the glycolipids were majority, > 50% of total fatty acids for three species, followed by phospholipids and neutral lipids. In view of the lipid profile of the studied algae, it was observed that *P. flagellifera* was considered a potential source of essential PUFAs that may represent an interesting nutraceutical resource.

Key words: Biotechnology, extracts, lipids, nutraceutical, seaweeds

6.1. Introdução

Macroalgas marinhas são conhecidas pelo seu alto valor nutricional e dietético, devido à presença de vitaminas, minerais, proteínas, fibras e ácidos graxos essenciais (Ortiz et al., 2006). As algas vermelhas e pardas têm o seu uso bastante difundido na culinária chinesa, japonesa e coreana, sendo utilizadas em saladas, biscoitos, sopas e como condimentos para carnes. A utilização das macroalgas nesses países data desde a antiguidade (Aguilera-Morales et al., 2005; Dawczynski et al., 2007).

A distribuição dos lipídios em vegetais pode ser dividida de acordo com a sua função desempenhada no metabolismo desses organismos, tais como: componentes estruturais de membrana formados pelas classes dos glicolipídios e fosfolipídios e componentes de estoque de energia, que são os triacilgliceróis, também conhecidos como lipídios neutros (Buchanan, 2015).

Lipídios encontrados em macroalgas (1 – 3% de massa seca) contêm grande proporção de ácidos graxos essenciais, particularmente, os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (CL-AGPIs) n-3, o que demonstra a importância nutricional que têm esses organismos (Kumar et al., 2011). O interesse por conhecer mais sobre os perfis de CL-AGPIs tem aumentado, devido a esse grupo de ácidos graxos possuírem importância médica. Estudos comprovaram que a inserção de AGPIs na alimentação diária tem reduzido o risco de doenças cardíacas, câncer, distúrbios mentais e depressão, além de manter sadio o sistema nervoso (Simopoulos, 2002; 2008).

As macroalgas são fonte de CL-AGPIs, e as algas vermelhas e pardas contêm ácido araquidônico (ARA; 20:4, n-6) e/ou ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5, n-3) como principais constituintes de CL-AGPIs. Por outro lado, esses constituintes em algas verdes são baixos, apresentando principalmente ácidos graxos saturados (AGSs) como ácido palmítico (AP; 16:0) (Fleurence et al., 1994; van Ginneken et al., 2011; Pereira et al., 2012). Para entender o potencial das macroalgas como recurso de CL-AGPIs é interessante conhecer o perfil dos ácidos graxos, bem como conhecer variações espaciais e temporais na composição dessas substâncias nas macroalgas (Colombo et al., 2006).

O perfil de ácidos graxos é altamente variável entre os grupos de macroalgas e já foram constatadas variações sazonais, principalmente para a composição de EPA. Essas informações foram corroboradas pelo trabalho de Schmid et al. (2014), que avaliaram o perfil de ácidos graxos de 16 espécies de macroalgas irlandesas. Os autores observaram os maiores percentuais de ácidos graxos totais para a alga parda *Pelvetia canaliculata* (Linnaeus) Dacaisne & Thuret ($6,4 \pm 0,3\%$) e os menores para a alga vermelha *Porphyra dioica* J. Brodie & L. M. Irvine ($0,8 \pm 0,2\%$) e constataram que houve variação na composição de EPA para da alga vermelha *Palmaria palmata* (Linnaeus) F. Weber & D. Mohr, que foi considerada uma promissora fonte de PUFA's.

Avaliar composição química das macroalgas é bastante interessante, pois esses organismos podem ser uma possível fonte com importância nutricional, e têm sido foco de alguns trabalhos como o realizado por Balboa et al. (2016) que avaliaram a composição de proteínas, minerais, vitaminas e lipídios da alga parda *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt, em que o teor de ácidos graxos totais variou entre 1,6 e 3,2%. Os autores concluíram que a avaliação de constituintes químicos é o primeiro passo para a valorização da biomassa algal como suplemento alimentar ou fertilizantes.

Macroalgas de clima temperado são comumente ricos em AGPIs, com alta razão entre os ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 e alto grau de instauração quando comparadas com algas de clima tropical. Alguns trabalhos apontam para uma variação sazonal quantitativa no perfil dos ácidos graxos e ácidos graxos totais, porém essa informação nem sempre é consistente (Kim et al., 1996; Nelson et al., 2002; Ives et al., 2004; Venkatesalu et al., 2012; Kendel et al., 2013).

A família ômega-6 produz eicosanoides que causam inflamações e são cancerígenos, aumentando o risco de situações como câncer, morte súbita, doenças cardíacas, vasoconstrição, aumento da pressão arterial, elevação da taxa de triglicerídeos, artrite, depressão, entre outras doenças inflamatórias. Por outro lado, os ácidos graxos ômega-3 possuem conhecida ação antiinflamatória, antitrombótica e antiarrítmica e reduzem os lipídios do sangue, tendo propriedades vasodilatadoras. Esses efeitos benéficos foram demonstrados na prevenção de doenças cardíacas, da hipertensão, do diabetes tipo 2, da artrite reumatoide, entre outras (Fagundes, 2002). As

doenças degenerativas como diabetes e artrite e o câncer estão relacionadas, em parte, à desproporção atual da concentração dos ácidos ômega-6 e ômega-3 que constituem nossa alimentação, ou seja, uma grande concentração de ômega-6 e uma escassez de ômega-3 (Fagundes, 2002).

Investigar o potencial das macroalgas tropicais em relação à sua composição lipídica faz-se relevante, pois elas ainda são pouco exploradas e o conhecimento sobre o seu potencial nutricional ainda é escasso quando comparado com algas de águas frias. Por isso, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar o perfil de ácidos graxos totais e a sua composição em extratos lipídicos de três espécies tropicais do litoral nordeste do Brasil, e comparar a composição quantitativa e qualitativa durante dois períodos sazonais, estação de seca e estação chuvosa.

6.2. Materiais e métodos

6.2.1. Coleta e preparo das amostras

Cerca de 500 g de material fresco de *Sargassum vulgare* C. Agardh (Ochrophyta), *Palisada flagellifera* (J. Agardh) K.W. Nam (Rhodophyta) e *Ulva fasciata* Delile (Chlorophyta) foram coletadas entre os anos de 2013 e 2014 durante as estações seca e chuvosa. As amostras foram congeladas, liofilizadas (Liobras, Brasil) e trituradas manualmente até a obtenção de um fino pó. O material triturado foi dividido em dois blocos para os procedimentos: (A) transmetilação direta e (B) extração lipídica.

6.2.2 Transmetilação direta e quantificação de ácidos graxos totais a partir da biomassa liofilizada, extrato lipídico e classes lipídicas

Os ácidos graxos nunca são encontrados sob a forma livre nas membranas vegetais. São comumente encontrados na forma esterificada do glicerol e, por conta disso, é necessário realizar a transmetilação para obtenção de éster metílico de ácidos graxos (EMAGs) e conseguir detectá-los através das técnicas de cromatografia gasosa (Ohlrogge & Browse, 1995).

A extração de ácidos graxos foi feita seguindo o método de descrito por Guihéneuf et al. (2015) e está descrito no item 2.4 do Capítulo 2 - Metodologia Geral. Todas as amostras foram vaporizadas com N₂ gasoso para evitar a

degradação dos ácidos graxos. Em tubos fechados, a extração dos EMAGs foi processada durante 90 minutos na temperatura entre 80- 90°C em banho seco sob agitação contínua. Após transmetilação direta, 1 mL de água ultrapura e 2 mL de hexano foram adicionados ao tubo, agitados e centrifugados a 1000 g por 2 minutos. A fase superior foi coletada e transferida para frascos de vidro do tipo *vials* que seguiram para as análises de cromatografia gasosa.

As análises de EMAGs foram feitas em cromatógrafo gasoso (Agilent Technologies, EUA) modelo 7890A GC/5975 com detector seletivo de massa e equipado com um detector de ionização de chamas e uma coluna capilar de sílica fundida (DB-WAXETR 0,25 mm x 30m x 0,25 µm, Agilent Technologies, EUA). Alíquotas de 2 µL de cada amostra foram injetadas no modo de separação seriada (razão 20:1), usando um auto injetor Agilent série 7683B. O hidrogênio foi usado como veículo para o gás. O injetor e o detector possuíam temperatura de 250°C e 300°C, respectivamente. A temperatura foi programada para 140°C por 1 min e aumentada de 140 para 200°C em uma taxa de 15°C por min e, por último, de 200 a 250°C em uma taxa de 2°C por min. O tempo total de corrida para cada amostra foi de 30 min. A identificação dos EMAGs foi feita através da comparação com padrões comerciais de EMAG, Supelco™ 37 Componente EMAG Mix, 47885-U, Supelco, EUA) e EMAG óleo de peixe (Menhaden Oil, catalogue no. 47116, Supelco, EUA). A quantificação dos ácidos graxos totais e do 20:5 n-3 (EPA) foram feitas comparando-se com o padrão interno, ácido pentadecanoico (15:0, 99 %, Alfa Aesar, UK). Os resultados foram expressos em percentual de ácidos graxos totais.

Foi dada ênfase ao perfil dos ácidos graxos essenciais (18:2 n-6 e 18:3 n-3) e aos que possuem importância para saúde humana (e.g. 20:5 n-3; Yokoyama et al., 2007) como forma de avaliar o potencial nutricional dessas espécies.

6.2.3 Análise estatística

O conjunto de dados foi analisado utilizando-se o software Statistica v.13, estes foram testados quanto à normalidade através do teste de Kolmogorov–Smirnov & Lilliefors e homocedasticidade pelo teste de Bartlett ($p < 0,05$). Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o conteúdo de ácidos graxos

totais e a composição de ácidos graxos para cada espécie entre as estações seca e chuvosa foram determinadas utilizando o teste Teste *t* para as amostras independentes. As análises enfatizaram as diferenças entre as estações para os ácidos graxos majoritários.

6.3. Resultados

6.3.1 Ácidos graxos totais

O teor total de ácidos graxos apresentou diferenças significativas entre os dois períodos estudados (seca e chuvosa) para as algas *S. vulgare* e *U. fasciata* (Fig. 2). Não foi observada variação para os extratos da alga *P. flagellifera*. *Sargassum vulgare* apresentou os maiores percentuais na estação seca, sendo $5,50 \pm 1,27\%$ de massa seca liofilizada (MSL). A alga *U. fasciata* apresentou os maiores percentuais $3,82 \pm 0,42\%$ de MSL também para estação seca, no entanto, não apresentou diferença com a teor da estação chuvosa. Comparando o teor total de ácidos graxos, a espécie que apresentou o maior percentual foi *S. vulgare* na época de seca e o menor teor foi observado para a alga *U. fasciata* na estação chuvosa (Fig. 1).

Figura 2. Teor de ácidos graxos totais (% de MSL) de três espécies de macroalgas, *S. vulgare*, *P. flagellifera* e *U. fasciata* coletadas durante as épocas de seca e chuvosa. As barras representam as médias $\pm$ desvio padrão

(n = 5). Letras representam significância entre os tratamentos seca/chuvosa para a respectiva espécie ($p < 0,05$).

6.3.2 Perfil de ácidos graxos para cada espécie

Sargassum vulgare (Ochrophyta)

O perfil de ácidos graxos de *S. vulgare* apresentou uma composição de ácidos graxos saturados (AGS) de $48,77 \pm 0,18\%$ MSL para a estação seca e $43,70 \pm 4,59\%$ MSL para a estação chuvosa (Tabela 1). Entre os AGS, o ácido palmítico (C16:0) foi o mais abundante para essa espécie e não apresentou variação entre as estações coletadas, com $41,15 \pm 0,49\%$ durante a estação seca e $35,47 \pm 11,54\%$ durante a estação chuvosa. O ácido mirístico (C14:0) foi o segundo maior AGS e apresentou $5,54 \pm 0,13\%$ durante a estação seca e $5,87 \pm 1,14\%$ para estação chuvosa (Tabela 1).

Os teores de ácidos graxos moniinsaturados (AGMI) para *S. vulgare* foram de $22,57 \pm 0,27\%$ (seca) e de $25,60 \pm 1,33\%$ (chuvosa). O ácido oleico (C18:1 n-9) foi dominante para essa espécie e apresentou variação sazonal, com percentuais de $11,51 \pm 0,81\%$ (seca) e $14,98 \pm 3,69\%$ (chuvosa) (Tabela 1).

Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) apresentaram percentuais semelhantes aos dos AGMI, com valores de $24,79 \pm 0,27\%$ (seca) e $27,49 \pm 2,28\%$ (chuvosa). O ácido araquidônico (ARA, C20:4 n-6) foi o majoritário para essa espécie e não apresentou variação entre as estações coletadas, com percentuais de $9,74 \pm 0,50\%$ (seca) e $10,17 \pm 6,50\%$ (chuvosa) (Tabela 1). Outros AGPI essenciais foram abundantes para essa espécie, o ácido linoleico (C18:2 n-6) e o ácido alfa linolênico (C18:3 n-3) apresentaram respectivamente percentuais de $4,52 \pm 0,21\%$ e $5,30 \pm 0,55\%$ para a estação seca e de $5,73 \pm 1,57\%$ e $4,21 \pm 1,06\%$ para a estação chuvosa. *Sargassum vulgare* apresentou baixos valores do AGPI ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 n-3), com percentuais de $2,08 \pm 0,17\%$ (seca) e $1,82 \pm 0,33\%$ (chuvosa) (Tabela 1). Variação entre as estações seca e chuvosa foram observadas para o ácido linoleico (C18:2 n-6), o ácido alfa linolênico (C18:3 n-3) e o ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 n-3) nessa espécie (Tabela 1).

Os ácidos graxos não identificados somaram $3,87 \pm 0,55\%$ (seca) e $3,26 \pm 0,91\%$ (chuvosa) (Tabela 1).

A razão entre os ácidos graxos da família do ômega-6/ômega-3 (n-6/n-3) para *S. vulgare* apresentou percentuais de 1,57% (seca) e 2,79% (chuvosa), com menores valores para a estação seca (Tabela 1).

As classes lipídicas não apresentaram variação entre as estações seca e chuvosa para *S. vulgare*. (Fig. 3). Os glicolipídios (GL) e fosfolipídios (FL) representaram as principais classes constituintes para essa espécie. Os glicolipídios apresentaram percentual entre $62,1 \pm 6,3\%$ (seca) e $58,4 \pm 5,9\%$ (chuvosa) e os fosfolipídios percentuais entre $25,3 \pm 4,4\%$ (seca) e $25,5 \pm 5,0\%$ (chuvosa). Os valores para lipídios neutros (LN) variaram entre $12,7 \pm 3,2\%$ (seca) e $16,1 \pm 7,9\%$ (chuvosa) (Fig. 3).

Tabela 1. Composição de ácidos graxos de *S. vulgare*, *P. flagellifera* e *U. fasciata* coletadas na Praia do Morro de Pernambuco, Bahia, em duas estações (seca e chuvosa). Letras distintas representam diferença significativa entre os tratamentos seca/chuvosa para a respectiva espécie ($p < 0,05$).

Ésteres metílicos de ácidos graxos (% EMAG)	<i>Sargassum vulgare</i>		<i>Palisada flagellifera</i>		<i>Ulva fasciata</i>	
	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa	Seca	Chuvosa
AGS						
C14:0	5,54 ± 0,13 ^a	5,87 ± 1,14 ^a	6,41 ± 0,03 ^a	6,40 ± 0,19 ^a	0,74 ± 0,07	0,72 ± 0,06
C16:0	41,15 ± 0,49 ^a	35,47 ± 11,54 ^a	37,63 ± 0,40 ^a	38,72 ± 0,67 ^a	44,97 ± 3,37 ^a	48,99 ± 3,84 ^b
C17:0	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,31 ± 0,03	0,26 ± 0,02	0,40 ± 0,03	0,49 ± 0,04
C18:0	1,14 ± 0,05	1,31 ± 0,31	1,13 ± 0,06	0,76 ± 0,04	0,71 ± 0,09	0,76 ± 0,10
C20:0	0,35 ± 0,07	0,40 ± 0,13	0,22 ± 0,05	0,13 ± 0,04	0,17 ± 0,12	0,38 ± 0,13
C22:0	0,59 ± 0,04	0,64 ± 0,14	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1,99 ± 0,25	2,00 ± 0,28
C24:0	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,31 ± 0,02	0,19 ± 0,10
Soma AGS (%)	48,77 ± 0,18	43,70 ± 4,59	45,71 ± 0,15	46,27 ± 0,26	49,28 ± 1,16	53,52 ± 1,33
AGMI						
C14:1	0,75 ± 0,09	0,76 ± 0,18	0,71 ± 0,08	0,61 ± 0,10	0,60 ± 0,14	0,76 ± 0,29
C15:1	2,61 ± 0,13	2,76 ± 0,63	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,02	2,50 ± 0,21	3,14 ± 0,38
C16:1 n-7	4,56 ± 0,09	3,87 ± 1,97	1,37 ± 0,08	1,11 ± 0,08	2,41 ± 0,06	3,05 ± 0,21
C17:1	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,36 ± 0,04	0,28 ± 0,04	0,79 ± 0,15	0,99 ± 0,30
C18:1 n-9	11,51 ± 0,81 ^a	14,98 ± 3,69 ^a	7,68 ± 0,16 ^a	7,96 ± 0,29 ^a	2,37 ± 0,09	1,97 ± 0,12
C18:1 n-7	0,78 ± 0,09	0,61 ± 0,16	1,21 ± 0,03	1,17 ± 0,05	8,24 ± 0,19 ^a	8,88 ± 0,35 ^b
C20:1 n-9	1,06 ± 0,07	1,13 ± 0,25	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,15 ± 0,09	0,15 ± 0,05
C22:1 n-9	1,30 ± 0,24	1,49 ± 0,40	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,16 ± 0,03	0,05 ± 0,07
Soma AGMI (%)	22,57 ± 0,27	25,60 ± 1,33	11,45 ± 0,05	11,27 ± 0,10	17,22 ± 0,06	18,99 ± 0,13
AGPI						
C16:3	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,39 ± 0,03	0,35 ± 0,05
C16:4	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	3,07 ± 0,84	2,40 ± 1,00
C16:2	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,11 ± 0,07	0,11 ± 0,10
C18:2 n-6	4,52 ± 0,21 ^a	5,73 ± 1,57 ^b	1,68 ± 0,06	1,28 ± 0,05	5,94 ± 0,66 ^a	4,62 ± 0,62 ^b
C18:3 n-6	0,47 ± 0,04	0,67 ± 0,13	0,45 ± 0,02	0,41 ± 0,03	0,82 ± 0,13	0,53 ± 0,15
C18:3 n-3	5,30 ± 0,55 ^a	4,21 ± 1,06 ^b	2,57 ± 0,11	0,81 ± 0,14	7,79 ± 1,45 ^a	6,05 ± 1,62 ^b
C18:4 n-3	0,75 ± 1,03	0,12 ± 0,12	1,54 ± 0,16	0,59 ± 0,08	5,36 ± 1,39 ^a	3,79 ± 1,50 ^b
C20:2	0,20 ± 0,18	0,47 ± 0,21	0,31 ± 0,26	0,31 ± 0,24	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
C20:3 n-6	0,31 ± 0,42	3,31 ± 5,33	0,60 ± 0,01	0,56 ± 0,04	0,23 ± 0,04	0,11 ± 0,10
C20:4 n-6	9,74 ± 0,50 ^a	10,17 ± 6,50 ^a	16,17 ± 0,25 ^a	20,64 ± 0,48 ^b	0,52 ± 0,18	0,51 ± 0,10
C20:4 n-3	0,41 ± 0,14	0,50 ± 0,11	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0,33 ± 0,05	0,23 ± 0,13
C20:5 n-3	2,08 ± 0,17 ^a	1,82 ± 0,33 ^b	16,08 ± 0,30 ^a	14,78 ± 0,43 ^b	0,65 ± 0,09	0,47 ± 0,08
C22:5 n-3	0,59 ± 0,34	0,34 ± 0,24	0,58 ± 0,68	0,73 ± 0,47	2,09 ± 0,21	1,22 ± 0,40
C22:6 n-3	0,42 ± 0,43	0,15 ± 0,14	0,60 ± 0,21	0,51 ± 0,42	0,38 ± 0,42	0,20 ± 0,03
Soma AGPI (%)	24,79 ± 0,27	27,49 ± 2,28	40,59 ± 0,19	40,62 ± 0,19	27,68 ± 0,51	20,60 ± 0,57
Soma n-3	9,56 ± 1,92	7,14 ± 1,61	21,37 ± 6,65	17,42 ± 6,31	16,59 ± 3,12	11,96 ± 2,40
Soma n-6	15,03 ± 0,21	19,88 ± 3,02	18,90 ± 0,11	22,89 ± 0,22	7,51 ± 0,28	5,77 ± 0,25
razão n-6/n-3	1,57	2,79	0,88	1,31	0,45	0,48
AG não identificados	3,87 ± 0,55	3,26 ± 0,91	2,25 ± 0,14	1,85 ± 0,09	5,82 ± 0,66	6,89 ± 0,85

n.d. = não detectado

Figura 3. Classes lipídicas (% ácidos graxos) obtidas para *S. vulgare* comparando estação seca com chuvosa. Letras distintas representam diferença significativa entre os tratamentos seca/chuvosa para a respectiva espécie ($p < 0,05$). LN = Lipídios neutros, GL = glicolipídios e FL = fosfolipídios.

Palisada flagellifera (Rhodophyta)

O perfil de ácidos graxos de *P. flagellifera* apresentou maiores percentuais de AGS e AGPI para a composição de ácidos graxos (Tabela 1) e esses valores não variaram entre as estações seca ($45,71 \pm 0,15\%$ AGS; $40,59 \pm 0,19\%$ AGPI) e chuvosa ($46,27 \pm 0,26\%$ AGS; $40,62 \pm 0,19\%$ AGPI). Os AGMI apresentaram os menores percentuais e também não houve variação entre as estações seca ($11,45 \pm 0,05\%$) e chuvosa ($11,27 \pm 0,10\%$) (Tabela 1).

O ácido palmítico (C16:0) foi o majoritário para a alga vermelha entre os AGS e não apresentaram diferenças significativas entre as estações seca e chuvosa, $37,63 \pm 0,40\%$ (seca) e $38,72 \pm 0,67\%$ (chuvosa) (Tabela 1). O ácido mirístico (C14:0) também foi majoritário, porém em menores quantidades, $6,41 \pm 0,03\%$ (seca) e $6,40 \pm 0,19\%$ (chuvosa), sem variação entre as estações coletadas (Tabela 1).

A quantidade de AGMI total foi menor em relação à composição global e o principal representante foi o ácido oleico (C18:1 n-9), com percentuais de $7,68 \pm 0,16\%$ (seca) e $7,96 \pm 0,29\%$ (chuvosa) (Tabela 1).

Os AGPI majoritários para alga vermelha *P. flagellifera* foram os ácidos araquidônico (ARA, C20:4 n-6) e eicosapentaenoico (EPA, C20:5 n-3), com variações significativas entre as estações coletadas (Tabela 1). Os percentuais de ARA para a estação seca foi de $16,17 \pm 0,25\%$ e durante a estação chuvosa foi de $20,64 \pm 0,48\%$ (Tabela 1). O teor de EPA apresentou percentuais de $16,08 \pm 0,30\%$ durante a estação seca e $14,78 \pm 0,43\%$ durante a estação chuvosa (Tabela 1). Os outros AGPI como C18:2 n-6, C18:3 n-3, C18:4 n-3, C20:2 n-6 e C20:3 n-6 estavam presentes, porém em quantidades menores na constituição de AGPI de *P. flagellifera*.

Os ácidos graxos não identificados somaram $2,25 \pm 0,14\%$ (seca) e $1,85 \pm 0,09\%$ (chuvosa) (Tabela 1).

A razão entre os ácidos graxos da família do ômega-6/ômega-3 (n-6/n-3) para *P. flagellifera* apresentou percentuais de 0,88% para a estação de seca e de 1,31% para a estação chuvosa, com menores valores para estação seca (Tabela 1).

As classes lipídicas não apresentaram variação entre as estações seca e chuvosa para *P. flagellifera* (Fig. 4). Os glicolipídios (GL) foram os majoritários, com valores de $68,3 \pm 2,7\%$ (seca) e $69,3 \pm 3,0\%$ (chuvosa), seguido dos fosfolipídios (FL) com valores de $22,2 \pm 2,7\%$ (seca) e $19,2 \pm 2,1\%$ e em menor quantidade os lipídios neutros (LN) com $9,4 \pm 2,5\%$ para a estação seca e $11,5 \pm 2,0\%$ para chuvosa (Fig. 4).

Figura 4. Classes lipídicas (% ácidos graxos) obtidas para *P. flagellifera* comparando estação seca com chuvosa. Letras distintas representam diferença significativa entre os tratamentos seca/chuvosa para a respectiva espécie ($p < 0,05$). LN = Lipídios neutros, GL = glicolipídios e FL = fosfolipídios.

Ulva fasciata (Chlorophyta)

O perfil de ácidos graxos totais de *U. fasciata* apresentou altos teores de AGS, que não apresentaram variação entre a estação seca ($49,28 \pm 1,16\%$) e chuvosa ($53,52 \pm 1,33\%$) (Tabela 1). O ácido palmítico (C16:0) e o ácido behênico (C22:0) foram os majoritários entre os AGS para essa espécie, apenas para o ácido palmítico houve variação entre a estação seca e chuvosa. O ácido palmítico apresentou percentual de $44,97 \pm 3,37\%$ (seca) e $48,99 \pm 3,84\%$ (chuvosa). O ácido behênico apresentou percentual de $1,99 \pm 0,25\%$ (seca) e $2,00 \pm 0,28\%$ (chuvosa) (Tabela 1).

O percentual de AGMI não apresentou variação entre as estações seca ($17,22 \pm 0,06\%$) e chuvosa ($18,99 \pm 0,13\%$) (Tabela 1). O ácido oleico (C18:1 n-7) foi o majoritário para essa classe de ácidos graxos, apresentando variação entre as estações seca ($8,24 \pm 0,19\%$) e chuvosa ($8,88 \pm 0,35\%$).

Os AGPI apresentaram variação do seu percentual entre as estações coletadas, com $27,68 \pm 0,13\%$ para a estação seca e $20,60 \pm 0,57\%$ para a estação chuvosa (Tabela 1). Os ácidos C18:2 n-6 (linoleico), C18:3 n-3 (alfa linolênico), C18:4 n-3 (estearidônico) foram os majoritários para essa espécie, dos quais apresentaram variação entre as estações seca e chuvosa (Tabela 1). O ácido linoleico apresentou percentual de $5,94 \pm 0,66\%$ (seca) e $4,62 \pm 0,62\%$ (chuvosa), o ácido alfa linolênico apresentou $7,79 \pm 1,45\%$ (seca) e $6,05 \pm 1,62\%$ (chuvosa) e foi o majoritário para a classe de AGPI e o ácido estearidônico apresentou $5,36 \pm 1,39\%$ (seca) e $3,79 \pm 1,50\%$ (chuvosa) (Tabela 1).

Os ácidos graxos não identificados somaram $5,82 \pm 0,66\%$ (seca) e $6,86 \pm 0,85\%$ (chuvosa) (Tabela 1).

Devido à falta de réplica durante a estação chuvosa, não foi possível avaliar as diferenças significativas entre as estações seca e chuvosa das classes lipídicas para essa espécie. No entanto, foi possível observar que a composição das classes lipídicas de *U. fasciata* foi primariamente representada

pelos glicolipídios (GL), com valores de $57,3 \pm 9,3\%$ (seca) e $47,2\%$ (chuvosa), seguido dos fosfolipídios (FL) com valores de $23,9 \pm 4,2\%$ (seca) e $24,6\%$ e em menor proporção os lipídios neutros (LN) com $9,4 \pm 2,5\%$ para estação seca e $11,5 \pm 2,0\%$ para chuvosa (Fig. 5).

Figura 5: Classes lipídicas (% ácidos graxos) obtidas para *U. fasciata*. Não houve réplicas para testar as diferenças significativas entre estações seca e chuvosa. LN = Lipídios neutros, GL = glicolipídios e FL = fosfolipídios.

6.4. Discussão

O teor de ácidos graxos totais observado para as espécies estudadas no presente estudo variou de 1,23 – 5,50 % da MSL, e esse resultado é superior ao encontrado na literatura, que descreve macroalgas comumente apresentando cerca de 1 - 3% da massa seca de ácidos graxos em sua constituição (Ortiz et al., 2006; Cofrades et al., 2008).

Foi possível observar perfis lipídicos completamente distintos entre as espécies estudadas e dados semelhantes foram encontrados na literatura. Os trabalhos afirmam que os perfis de ácidos graxos são específicos para cada grupo taxonômico, podendo ser uma ferramenta para estudos de quimiotaxonomia (Hanson et al., 2010; Galloway et al., 2012; Pereira et al., 2012; Schmid et al., 2014).

Houve variação sazonal para o teor total de ácidos graxos para *S. vulgare* e *U. fasciata*, com os maiores valores observados durante a estação seca para ambas as espécies. De acordo com Schmid et al. (2014), principalmente os AGPI são afetados por mudanças nos fatores abióticos, tais como temperatura, salinidade, luz e nutrientes, podendo essa ser uma explicação para a variação entre as estações seca e chuvosa do presente estudo.

Macroalgas não são consideradas potenciais fontes de lipídios quando comparadas com vegetais terrestres como a soja ou o girassol, ou até mesmo microalgas, porém os ácidos graxos encontrados em macroalgas, principalmente os poliinsaturados de cadeia longa como o ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3), são encontrados em altas proporções em algumas espécies e possuem importância do ponto de vista nutricional e médico (Fleurence et al., 1994; Sánchez- Machado, 2004; Schmid et al., 2014).

Foi observado alto percentual da soma de AGS ($48,77 \pm 0,18\%$ seca e $43,70 \pm 4,59\%$ chuvosa), sendo os ácidos mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0) os majoritários dentro do grupo dos AGS. Esses resultados são consistentes com os encontrados em literatura, comprovando que a constituição lipídica possui relação com o grupo taxonômico (Terasaki et al., 2009; Pereira et al., 2012; Schmid et al., 2013). Outra explicação é o fato das espécies do presente estudo ser de uma zona tropical, caracterizada por apresentar águas quentes durante todo o ano. Narayan et al. (2004) descrevem que a alta quantidade de AGS está diretamente relacionada à temperatura da água em espécies tropicais de *S. vulgare*.

Os principais AGMI foram o palmitoleico (C16:1 n-7) e o oleico (C18:1 n-9) e esses resultados foram consistentes com o encontrado na literatura (Terasaki et al., 2009; Pereira et al., 2012; Schmid et al., 2013).

O C20:4 n-3 (ácido araquidônico, ARA) foi o ácido graxo majoritário entre os poliinsaturados para *S. vulgare*, com percentuais de 9,74% e 10,17%. Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho descrito por Schmid et al. (2014), no qual os autores descrevem que algas pardas são comumente fonte desse ácido graxo. O teor de C20:5 n-3 (EPA) para essa espécie foi considerado baixo ($1,82 \pm 0,33\%$ seca e $2,08 \pm 0,17\%$ chuvosa) quando comparado com o trabalho de Pereira et al. (2012), em que o percentual de

EPA para a mesma espécie foi de $8,60 \pm 0,12\%$. Os autores afirmam que os níveis desse ácido graxo costumam ser altos em algas pardas.

Os valores de ARA para *S. vulgare* foram maiores que os valores de EPA. ARA são precursores na síntese de EPA e por isso esse ácido graxo possui importância médica e nutricional. Resultados semelhantes ao encontrado no presente trabalho foram observados por Narayan et al. (2004), que afirmaram que os perfis de ácidos graxos são afetados por mudanças nas condições climáticas ou localização geográfica.

Guihéneuf et al. (2010) associaram as variações nos teores de ARA, EPA e docosahexaenoico (DHA) à oxidação geradas por excesso de radiação UV.

A razão ômega-6/ômega-3 de *S. vulgare* foram as maiores observadas entre as três espécies, com valores de 1,57% (seca) e 2,79% (chuvosa), porém ainda encontra-se no limite recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), cuja razão de ingestão diária na dieta deve ser menor que 10 (Matanjan et al., 2009). Os valores da razão entre ômega-6/ômega-3 flutuam entre 0 e 2 em macroalgas (Schimid et al., 2014).

Os AGS representaram o maior percentual para *S. vulgare*, com valores de $45,71 \pm 0,15\%$ (seca) e $46,27 \pm 0,26\%$ (chuvosa). Resultados semelhantes foram observados no trabalho de Schmid et al. (2014) que observaram percentual de AGS de 46% para alga vermelha *Ceramium virgatum* Roth.

Entre os AGMIs os principais representantes foram ácido linoleico, com percentuais de $7,68 \pm 0,16\%$ (seca) e $7,96 \pm 0,29\%$ (chuvosa). Esse resultado foi semelhante o encontrado por Pereira et al. (2012) para a alga vermelha *Asparagopsis armata* Harvey coletada em Portugal.

Foi possível observar que o principal constituinte de AGPIs de *P. flagellifera* trata-se do C20:5 n-3 (EPA), que apresentou variação entre as estações seca ($16,08 \pm 0,30\%$) e chuvosa ($14,78 \pm 0,43\%$) para essa espécie. Entre as três espécies estudadas, *P. flagellifera* representou um recurso potencial na produção de AGPIs essenciais. De acordo com Pereira et al. (2012), esse parece ser um perfil comum para representantes do filo Rhodophyta.

Palisada flagellifera apresentou baixos valores para a razão ômega-6/ômega-3 0,88 (seca) e 1,31 (chuvosa) e, por isso, a utilização dessa macroalga é interessante sob o ponto de vista nutracêutico.

Ulva fasciata apresentou altos teores de AGS, $49,28 \pm 1,16\%$ (seca) e $53,52 \pm 1,33\%$ (chuvosa), com resultados semelhantes aos observados nos trabalhos para *Ulva* sp. descritos por Ortiz et al. (2006), Kumar et al. (2011) e Pereira et al. (2012). Macroalgas de águas tropicais têm apresentado maiores quantidades de AGS e AGMI e menores de AGPI de acordo com Khotimchenko (2003).

Ulva fasciata apresentou alta quantidade de AGMI e alta proporção de ácido oleico. Resultados semelhantes foram observados nos trabalhos de Kumar et al. (2011) e Yaich et al. (2011), que sugeriram ser esta uma característica dos representantes de Chlorophyta. Essa espécie apresentou também AGPI importantes como o ácido linoleico (C18:2 n-2), $5,94 \pm 0,66\%$ (seca) e $4,62 \pm 0,62\%$ (chuvosa), e o ácido linolênico (C18:3 n-3), $7,79 \pm 1,45\%$ (seca) e $6,05 \pm 1,62\%$ (chuvosa). Resultados semelhantes foram observados nos trabalhos de Ortiz et al. (2006) e Yaich et al. (2011) e esses autores abordaram a importância para nutrição humana e de peixes que esse gênero pode representar, já que animais não são capazes de sintetizar ácidos graxos da família C18.

A razão entre o ômega-6/ômega-3 de *U. fasciata* apresentou valores de 0,45 e 0,48, mostrando que essa macroalga também representa um interessante recurso nutracêutico ou como alimento funcional.

As classes lipídicas para as três espécies não apresentaram variação em seus teores de classes lipídicas entre as estações seca e chuvosa e a constituição foi semelhante entre os três grupos de algas estudados. A composição das classes lipídicas foi classificada em ordem decrescente por GL > FL > LN. De acordo com Gosch et al. (2012) esse é um padrão comum apresentado pelas macroalgas, com glicolipídios (GL) representando mais da metade do percentual de lipídios totais, seguido dos fosfolipídios (FL), triacilgliceróis, esteróis, pigmentos, e por último, em menores percentuais os lipídios de reserva energética, também conhecidos como lipídios neutros (LN).

Os glicolipídios são componentes da maquinaria fotossintetizante e são ricos em ômega-3 e AGPIs, tais como os ácidos SDA, EPA e linoleico. Esses

ácidos desempenham papel importante na fotossíntese, principalmente EPA e SDA em macroalgas, pois se ligam à cauda do fitol da molécula de clorofila a aumentando a atividade fotossintetizante desses organismos (Honya et al., 1994; Kim et al., 1996; Zhukova & Titlyanov, 2006; Gerasimenko et al., 2010; Nomura et al., 2013).

Desta forma, investir na produção de glicolipídios e fosfolipídios, consideradas classes lipídicas estruturais, talvez seja uma estratégia das macroalgas como forma de proteger o seu aparato fotossintetizante frente a estresses ambientais, pois os AGPIs presentes nessas classes possuem função de defesa contra o estresse oxidativo (Miyashita et al., 2013).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que algas de origem tropical são ricas em AGS quando comparadas com algas de águas temperadas, e as altas temperaturas das águas tropicais e a radiação UV parecem ter influência direta sobre essa composição (Narayan et al., 2004; Guihéneuf et al., 2010).

Sargassum vulgare e *U. fasciata* não representam potenciais fontes de AGPIs. Por outro lado, a alga *P. flagellifera* representou o maior recurso de EPA para este estudo, e o teor desse ácido graxo variou entre as estações seca e chuvosa. Essa variação pode estar relacionada a mudanças nos fatores ambientais.

Quanto à composição das classes lipídicas, as três espécies investem na produção de lipídios com funções estruturais (GL e FL) como forma de garantir processos metabólicos vitais como a fotossíntese. Enquanto que algas de clima temperado investem na produção de lipídios neutros e degradação de glicolipídios sob a baixa oferta de nutriente no ambiente (Alonso et al. 2000; Khozin-Goldberg & Cohen, 2006).

Os benefícios dos AGPIs para saúde humana já estão bem documentados na literatura e eles possuem estreita relação com a prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes e câncer, principalmente os AGPIs da família do ômega-3, podendo *P. flagellifera* representar um recurso alternativo para nutrição humana e animal como a produção de alimentos funcionais ou rações animais.

Referências

- Aguilera-Morales, M., Casas-Valdez, M., Carrillo-Dominguez, S., Gonzáles-Acosta, B. & Pérez-Gil, F. 2005. Chemical composition and microbiological assays of marine algae *Enteromorpha* spp. as a potential food source. *J. Food Comp. Anal.*, 18: 79–88.
- Alonso, D. L., Belarbi, E. H., Fernandez-Sevilla, J. M., Rodriguez-Ruiz, J. & Grima, E. M. 2000. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochem.*, 54 (5): 461–471.
- Balboa, E. M., Gallego-Fábrega, C., Moure, A. & Domínguez, H. 2016. Study of the seasonal variation on proximate composition of oven-dried *Sargassum muticum* biomass collected in Vigo Ria, Spain. *Journal of Applied Phycology*, 28(3): 1943-1953.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W. & Jones, R. L. (Eds.). 2015. Biochemistry and molecular biology of plants. John Wiley & Sons. 337 – 400p.
- Colombo, M. L., Rise, P., Giavarini, F., De Angelis, L., Galli, C. & Bolis, C.L. 2006. Marine macroalgae as sources of polyunsaturated fatty acids. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 61: 67–72.
- Cofrades, S., López-López, I., Solas, M. T., Bravo, L. & Jiménez-Colmenero, F. 2008. Influence of different types and proportions of added edible seaweeds on characteristics of low-salt gel/emulsion meat systems. *Meat Sci.*, 79(4): 767-776.
- Dawczynski, C., Schubert, R. & Jahreis, G. 2007. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chem.*, 103: 891–899.
- Fagundes, L. A. 2002. Ômega-3 & ômega-6: o equilíbrio dos ácidos gordurosos essenciais na prevenção de doenças. Porto Alegre: Fundação de Radioterapia do Rio Grande do Sul. 111 p.
- Fleurence, J., Gutbier, G., Mabeau, S. & Leray, C. 1994. Fatty-acids from 11 marine macroalgae of the French Brittany coast. *J. Appl. Phycol.*, 6: 527–532.
- Galloway, A. W. E., Britton-Simmons, K. H., Duggins, D. O., Gabrielson, P. W. & Brett, M. T. 2012. Fatty acid signatures differentiate marine macrophytes at ordinal and family ranks. *J. Phycol.*, 48: 956–965.

- Gerasimenko, N. I., Skriptsova, A. V. & Moiseenko, O. P. 2010. Seasonal changes in the content of lipids, fatty acids, and pigments in brown alga *Costaria costata*. *Russian J. Plant Physiol.*, 57: 205–211.
- Gosch, B. J., Magnusson, M., Paul, N. A. & De Nys, R. 2012. Total lipid and fatty acid composition of seaweeds for the selection of species for oil-based biofuel and bioproducts. *GCB Bioenergy*, 4: 919–930.
- Guihéneuf, F., Fouqueray, M., Mimouni, V., Ulmann, L., Jacquette, B. & Tremblin, G. 2010. Effect of UV stress on the fatty acid and lipid class composition in two marine microalgae *Pavlova lutheri* (Pavlovophyceae) and *Odontella aurita* (Bacillariophyceae). *J. Appl. Phycol.*, 22(5): 629–638.
- Hanson, C. E., Hyndes, G. A. & Wang, S. F. 2010. Differentiation of benthic marine primary producers using stable isotopes and fatty acids: implications to food web studies. *Aquat. Bot.*, 93: 114–122.
- Honya, M., Kinoshita, T., Ishikawa, M., Mori, H. & Nisizawa, K. 1994. Seasonal variation in the lipid content of cultured *Laminaria japonica*: Fatty acids, sterols, b-carotene and tocopherol. *Journal of Applied Phycology*, 6: 25–29.
- Khotimchenko, S. V. 2003. Fatty acids of species in the genus *Codium*. *Bot. Mar.*, 46: 456–460.
- Khotimchenko, S. V. 2005. Lipids from the marine alga *Gracilaria verrucosa*. *Chem. Nat. Comp.*, 41(3): 285–288.
- Khozin-Goldberg, I. & Cohen, Z. 2006. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus Subterraneus*. *Phytochem.*, 67(7): 696–701.
- Ivea, L., Blaina, M. & Najdek, M. 2004. Seasonal variations in fatty acid composition of *Caulerpa taxifolia* (M. Vahl.) C. Ag. in the northern Adriatic Sea (Malinska, Croatia). *Bot. Mar.*, 47: 209–214.
- Kendel, M., Couzinet-Mossion, A., Viau, M., Fleurence, J., Barnathan, G. & Wielgosz-Collin, G. 2013. Seasonal composition of lipids, fatty acids, and sterols in the edible red alga *Grateloupia turuturu*. *J. Appl. Phycol.*, 25:425–432.
- Kim, M. K., Dubacq, J.P., Thomas, J. C. & Giraud, G. 1996. Seasonal variations of triacylglycerols and fatty acids in *Fucus serratus*. *Phytochem.*, 43: 49–55.

- Kumar, M., Kumari, P., Trivedi, N., Shukla, M. K., Gupta, V., Reddy, C. R. K. & Jha, B. 2011. Minerals, PUFAs and antioxidant properties of some tropical seaweeds from Saurashtra coast of India. *J. App. Phycol.*, 23(5): 797-810.
- Matanjan, P., Mohamed, S., Mustapha, N. M. & Muhammad, K. 2009. Nutrient content of tropical edible seaweeds, *Eucheuma cottonii*, *Caulerpa lentillifera* and *Sargassum polycystum*. *J. Appl. Phycol.*, 21: 75–80.
- Miyashita, K., Mikami, N. & Hosokawa, M. 2013. Chemical and nutritional characteristics of brown seaweed lipids: A review. *J. Funct. Foods*, 5(4): 1507-1517.
- Nelson, M. M., Phleger, C. F. & Nichols, P. D. 2002. Seasonal lipid composition in macroalgae of the northeastern Pacific Ocean. *Bot Mar.*, 45: 58–65.
- Narayan, B., Miyashita, K. & Hosakawa, M. 2005. Comparative evaluation of fatty acid composition of different *Sargassum* (Fucales, Phaeophyta) species harvested from temperate and tropical waters. *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, 13(4): 53-70.
- Nomura, M., Kamogawa, H., Susanto, E., Kawagoe, C., Yasui, H., Saga, N., Hosokawa, M. & Miyashita, K. 2013. Seasonal variations of total lipids, fatty acid composition, and fucoxanthin contents of *Sargassum horneri* (Turner) and *Cystoseira hakodatensis* (Yendo) from North seashore of Japan. *J. Appl. Phycol.*, 25: 1159–1169.
- Ohlrogge, J. & Browse, J. 1995. Lipid biosynthesis. *The Plant Cell*, 7(7): 957.
- Ortiz, J., Romero, N., Robert, P., Araya, J., Lopez-Hernández, J., Bozzo, C., et al. 2006. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. *Food Chem.*, 99: 98–104.
- Pereira, H., Barreira, L., Figueiredo, F., Custodio, L., Vizetto-Duarte, C., Polo, C., Resek, E., Engelen, A. & Varela, J. 2012. Polyunsaturated fatty acids of marine macroalgae: potential for nutritional and pharmaceutical applications. *Mar Drugs*, 10: 1920–1935.
- Sánchez-Machado, D. I., López-Cervantes, J., López-Hernández, J. & Paseiro-Losada, P. 2004. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chem.*, 85(3): 439-444.
- Terasaki, M., Hirose, A., Narayan, B., Baba, Y., Kawagoe, C., Yasui, H., Naotsune, S., Masashi, H. & Miyashita, K. 2009. Evaluation of recoverable

- functional lipid components of several brown seaweeds (Phaeophyta) from Japan with special reference to fucoxanthin and fucosterol contents. *J. Phycol.*, 45(4): 974-980.
- Schmid, M., Guihéneuf, F. & Stengel, D. B. 2014. Fatty acid contents and profiles of 16 macroalgae collected from the Irish Coast at two seasons. *J. App. Phyco.*, 26(1): 451-463.
- Simopoulos, A. P. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother.*, 56: 365–379.
- Simopoulos, A. P. 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp. Biol. Med.*, 233: 674–688.
- van Ginneken, V. J. T., Helsper, J., de Visser, W., van Keulen, H. & Brandenburg, W. A. 2011. Polyunsaturated fatty acids in various macroalgal species from north Atlantic and tropical seas. *Lipids Health Dis* 10. doi:10.1186/1476-511x-10-104
- Venkatesalu, V., Sundaramoorthy, P., Anantharaj, M., Chandrasekaran, M. & Senthilkumar, A. 2012. Seasonal variation on fatty acid composition of some marine macroalgae from Gulf of Mannar Marine Biosphere Reserve, Southeast coast of India. *Indian J. Geo-Mar. Sci.*, 41: 442–450.
- Yaich, H., Garna, H., Besbes, S., Paquot, M., Blecker, C. & Attia, H. 2011. Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. *Food Chem.*, 128(4): 895-901.
- Yokoyama, M., Origasa, H., Matsuzaki, M., Matsuzawa, Y., Saito, Y., Ishikawa, Y., Oikawa, S., Sasaki, J., Hishida, H., Itakura, H., Kita, T., Kitabatake, A., Nakaya, N., Sakata, T., Shimada, K., Shirato, K. & Investigators, J. 2007. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open label, blinded endpoint analysis. *Lancet*, 369: 1090–1098.
- Zhukova, N. V. & Titlyanov, E. A. 2006. Effect of light intensity on the fatty acid composition of dinoflagellates symbiotic with hermatypic corals. *Bot. Mar.*, 49: 339–346.

Conclusões Gerais

Conforme proposto, os resultados apresentados sob a forma de **capítulos 3, 4, 5 e 6** cumpriram os objetivos propostos pela tese.

- Os estudos que abordem o potencial das macroalgas de forma mais ampla, com a reunião de várias vertentes de bioatividade e fisiologia ainda são poucos no Brasil frente à grande diversidade de espécies que o país possui. O presente trabalho teve grande importância, pois contribuiu para o reconhecimento do patrimônio químico das espécies de macroalgas brasileiras.
- Observamos, principalmente para a alga *S. vulgare* alta atividade antiviral frente à enzima transcriptase reversa para extratos aquosos quentes, e ausência de citotoxicidade para todos os extratos testados. De acordo com a literatura, os polissacarídeos produzidos por macroalgas parecem desempenhar papel determinante sobre essa bioatividade. As espécies deste estudo se mostraram eficientes e interessantes fontes na busca por novas substâncias com potenciais antivirais.
- Todas as espécies estudadas apresentaram um interessante conjunto de defesas antioxidantes. *Sargassum vulgare* e *P. flagellifera* parecem adotar mecanismos com características de redução dos radicais livres e, de acordo com a literatura, essa característica é amplamente relacionada com a presença de substâncias fenólicas, principalmente em algas pardas. O presente trabalho contribuiu significativamente para o reconhecimento do potencial químico das macroalgas estudadas, pois realizou a caracterização do perfil antioxidativo e mostrou que as

macroalgas podem ser interessantes fontes naturais de antioxidantes com relevância do ponto de vista biotecnológico e farmacêutico.

- Observamos, através dos estudos fisiológicos, que as espécies estudadas parecem ter desenvolvido estratégias eficientes de aclimação, pois foi observada pequena amplitude ou ausência na degradação de seus pigmentos fotossintetizantes e proteínas, que foram aliados a uma boa resposta antioxidativa.
- Caracterizamos o perfil lipídico dessas espécies e foi possível observar que apesar das macroalgas não apresentarem alto teor lipídico (1 a 5% de massa seca), principalmente as algas vermelhas produzem grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) considerados essenciais que possuem importância médica e nutricional.
- Por fim, esse trabalho apresenta subsídios para prospecção de novos compostos potenciais provindos de macroalgas com aplicabilidade nas áreas farmacêuticas, indústria química e agrícola aumentando as perspectivas da utilização das macroalgas.

Anexos

Anexo 1 – Teste preliminares com algas de Itanhaém

O material utilizado neste estudo precisava ser transportado do Estado da Bahia para o Laboratório de Algas Marinhas “Édison José de Paula” em São Paulo. Adicionalmente, certas dúvidas deviam ser definidas antes de iniciar efetivamente os trabalhos relacionadas diretamente com os objetivos propostos neste estudo. Assim, no dia 1 de março de 2013 foram coletados *Sargassum vulgare*, *Palisada flagellifera* e *Ulva fasciata* na Praia de Cibratel em Itanhaém (24°13'31"S, 46°51'7"W), litoral sul de São Paulo. O local escolhido foi devido à proximidade e logística de coleta.

O material triado e limpo foi separado em cinco subamostras para cada espécie e seco de três formas distintas: (a) ar condicionado por cinco dias, (b) estufa a 40°C por 3 dias até massa constante e (c) sílica gel. A partir dessas amostras foram avaliados os seguintes aspectos:

- a) rendimento de massa fresca (MF) para massa seca (MS);
- b) rendimento dos extratos sob diferentes solventes de extração (hexano, metanol, água a temperatura ambiente e água a 40°C);
- c) potencial antioxidante dos extratos metanólicos de cada um dos tratamentos de secagem.

Anexo 1a – Rendimento de massa fresca para massa seca

Este teste permitiria estimar a redução na quantidade de massa após as respectivas secagens do material, de forma a conhecer, aproximadamente, a quantidade de biomassa úmida necessária no momento de coleta.

Aproximadamente 240 mg MF foram secos em estufa por 48 h, ar condicionado por cinco dias e em sílica gel, considerando $n = 5$ para cada uma das espécies e para cada tipo de secagem. O teor de umidade foi maior em *P. flagellifera* do que em *U. fasciata*, correspondendo a rendimentos algáceos distintos, sendo que para *U. fasciata* o rendimento foi aproximadamente o dobro do que *P. flagellifera* (Tabela A.1).

Sabendo-se que aproximadamente a quantidade de água que cada uma das espécies contém, foi possível ter uma ideia de quanta biomassa de alga deveria ser coletada para se obter uma biomassa final de 10 kg de alga seca. A partir dos resultados obtidos, a secagem em ar condicionado se mostrou mais eficiente na retirada da umidade como pode ser observado na Tabela A.1. Porém, um fator limitante foi o tempo maior de secagem e, por isso, como forma de reduzir a etapa de secagem e transporte do material optou-se por desidratar as amostras coletadas em estufa na temperatura de 40°C. Essa maior desidratação das amostras pode alterar de forma significativa a preservação e atividade de substâncias de interesse bioativo.

Tabela A.1. Valores de massa fresca (MF), massa seca (MS), percentual de umidade e percentual de rendimento algáceo de amostras de *Ulva fasciata* e *Palisada flagellifera* processadas com dois tipos de secagem (estufa 40°C e ar condicionado). Os valores representam as médias $\pm$ desvio padrão (DP) (n = 5).

Tratamento	MF (mg)	MS (mg)	Umidade (%)	Rendimento (%)
<i>Ulva fasciata</i>				
Estufa 40°C	240,0	59,7	75,13	24,88
	240,0	66,0	72,50	27,50
	240,0	068,3	71,54	28,46
	240,0	63,1	73,71	26,29
	240,2	68,1	71,65	28,35
Média $\pm$ DP			72,90 $\pm$ 1,51	27,10 $\pm$ 1,51
Ar condicionado	240,0	77,8	67,58	32,42
	240,1	72,0	70,01	29,99
	240,1	77,9	67,56	32,44
	240,3	76,6	68,12	31,88
	240,2	77,5	67,74	32,26
Média $\pm$ DP			68,20 $\pm$ 1,04	31,80 $\pm$ 1,04
<i>Palisada flagellifera</i>				
Estufa 40°C	240,0	30,7	87,21	12,79
	240,0	30,8	87,17	12,83
	240,2	31,8	86,76	13,24
	240,2	34,9	85,47	14,53
	240,3	31,8	86,77	13,23
Média $\pm$ DP			86,67 $\pm$ 0,71	13,33 $\pm$ 0,71
Ar condicionado	240,0	46,2	80,75	19,25
	240,4	41,0	82,95	17,05
	240,0	43,6	81,83	18,17
	240,1	45,8	80,92	19,08
	240,2	41,1	82,89	17,11
Média $\pm$ DP			81,87 $\pm$ 1,04	18,13 $\pm$ 1,04

Anexo 1b – Rendimento dos extratos sob diferentes solventes de extração (hexano, metanol, água a temperatura ambiente e água a 100°C)

O rendimento dos extratos de cada uma das espécies sob diferentes solventes de extração foi estimado a partir de 240 mg MS ($n = 5$), secos a 40°C e extraídos por maceração em hexano, metanol, água em temperatura ambiente (25°C) e água quente a 100°C. Cada extração foi realizada por três vezes a cada 24 h, exceto a extração em água quente a 100°C que foi realizada por três vezes a cada 1 h. A proporção de extração seguiu a Tabela A.2.

Tabela A.2. Massas, volumes e solventes utilizados para obtenção dos extratos das macroalgas.

Espécie	MS (g)	Vol. solvente (mL)	Solventes
<i>Ulva fasciata</i>	5	100	Hexano
<i>Palisada flagellifera</i>	3	60	Metanol
<i>Sargassum vulgare</i>	5	100	Aquoso frio
			Aquoso quente

O produto sobrenadante da extração do mesmo solvente foi filtrado e reunido como um único extrato. Os extratos hexânicos e metanólicos foram concentrados por rotaevaporação a 40°C e, posteriormente, os extratos foram completamente secos em banho-maria apenas para as frações hexânicas e liofilizados para as demais frações. O cálculo do rendimento dos extratos brutos foi feito a partir da massa seca inicial utilizada para extração através da fórmula: **Rendimento extrato = Massa seca/ Massa extrato bruto x 100**; segundo resultados mostrados na Tabela A.3.

A partir desses resultados foi possível identificar que o rendimento do extrato hexânico foi bastante reduzido (Tabela A.3), menor que 1,8%. Portanto, subsequentes extrações foram realizadas apenas em metanol e aquoso a frio e a quente.

Tabela A.3. Rendimentos de extrato nos diferentes solventes.

Espécie	Extrato	Rendimento (%)
<i>Ulva fasciata</i>	Hexânico	1,32
	Metanólico	9,02
	Aq. Frio	19,86
	Aq. Quente	17,66
<i>Palisada flagellifera</i>	Hexânico	1,71
	Metanólico	12,92
	Aq. Frio	15,94
	Aq. Quente	18,33
<i>Sargassum vulgare</i>	Hexânico	1,57
	Metanólico	13,87
	Aq. Frio	14,24
	Aq. Quente	5,62

Anexo 1c – Potencial antioxidante dos extratos metanólicos provenientes de dois tipos de secagem

A ação antioxidante pelo ensaio do DPPH dos extratos metanólicos foi testada a partir de uma concentração inicial de extrato bruto de 15 mg.mL⁻¹ e diluições para alcançar as concentrações de 30, 50 e 100% de extrato bruto no respectivo ensaio. O material seco em estufa ou ar condicionado foi triturado em nitrogênio líquido e extraído em 1 mL de metanol por 3 h. De acordo com os resultados obtidos foi possível observar variação do potencial antioxidante entre os métodos de secagem para as duas espécies testadas (Fig. A.1). Os extratos provenientes da secagem em estufa apresentaram um potencial antioxidante maior do que as amostras secas em ar condicionado para ambas as espécies. Esses resultados em conjunto com os dados de percentual de umidade foram definitivos para escolha do método de secagem e transporte do material do litoral da Bahia até o laboratório em São Paulo.

Figura A.1. Teste do potencial antioxidante frente o ensaio do sequestro do radical DPPH para amostras de *Ulva fasciata* e *Palisada flagellifera* submetidas a dois tipos distintos de secagem: estufa a 40°C e ar condicionado. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$). Letras minúsculas representam o conjunto de tratamentos comparados e letras maiúsculas representam outro conjunto de tratamentos comparados. Letras distintas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Adicionalmente, foi testada a estabilidade do reagente de DPPH, pois a grande maioria dos protocolos sugere utilizar a solução de DPPH no mesmo dia da análise. O teste de estabilidade do reagente DPPH foi realizado com o objetivo de se avaliar se seria possível reutilizar a solução reativa após alguns dias de preparo e sem o comprometimento nas respostas do ensaio. Assim, o teste foi realizado durante sete dias, sendo a solução mantida em frasco âmbar a 4°C. As leituras das absorbâncias foram realizadas em triplicata no comprimento de onda de 517 nm diariamente durante uma semana.

Os resultados observados na Figura A.2 indicam que é possível utilizar a solução reativa do DPPH por até cinco dias após o preparo se mantida nas condições de armazenamento mencionadas acima. Esse resultado indica primeiramente que se armazenado de forma correta o reagente não é tão instável e pode ser utilizado alguns dias após o preparo, essa é uma medida bastante interessante, pois esse é um reagente de alto custo.

Figura A.2. Absorbância da solução reativa de DPPH para avaliação da estabilidade da solução realizado durante uma semana. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). Letras distintas representam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Anexo 2 – Identificação das amostras através de marcadores moleculares

Contexto e Metodologia específica

O objetivo desta etapa, inicialmente não contemplada nesta Tese, foi a identificação segura das amostras, dentro das ferramentas que existem hoje em biologia molecular e bancos públicos de dados. A técnica de DNA Barcoding atende a esta finalidade (Hebert et al., 2003). Seu uso foi proposto por Saunders (2005) e sua aplicação vem sendo investigada desde então.

A efetiva aplicabilidade deste método depende de quatro fatores principais:

- i. os avanços no conhecimento dos marcadores moleculares, principalmente com sua aplicação em grupos distintos de algas, disponíveis na literatura, a fim de se conhecer as limitações e o alcance do método;
- ii. a existência de um banco de dados público, abastecido com sequências do grupo de organismos que se deseja investigar;

- iii. a existência de condições físicas especializadas envolvendo reagentes, equipamentos e infra-estrutura apropriados;
- iv. a expertise de pesquisadores da área (Biologia Molecular e Taxonomia), visando a correta interpretação dos dados obtidos.

Portanto, para esta etapa, contamos com a colaboração da Dra. Valéria Cassano, Dra. Beatriz N. Torrano-Silva, Dra. Lígia Ayres-Ostrock e do MSc. Fabio Nauer. O apoio físico foi concedido pela seção de Biologia Molecular do Laboratório de Algas Marinhas Edison José de Paula (IB-USP), sob a tutoria da Dra. Mariana C. de Oliveira. Utilizamos o banco de dados de sequências para os marcadores moleculares do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), através da plataforma BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Os marcadores e a metodologia seguida foram aplicados como segue: COI-5P para *Palisada* (Saunders, 2005); ITS-2 para *Sargassum* (Mattio & Payri, 2010); e *tufA* para *Ulva* (Saunders & Kucera 2010).

Utilizamos uma abordagem integrativa para a identificação destas três espécies, incluindo os referidos marcadores moleculares e também a morfologia dos talos. Adicionalmente, as sequências que produzimos de *Palisada*, *Sargassum* e *Ulva* poderão ser utilizadas em futuros estudos comparativos entre materiais do Brasil e de outras partes do mundo.

Resultados e Discussão

Palisada (COI-5P)

As sequências têm 664 pares de base de comprimento e são idênticas entre si.

A comparação com o banco de dados aponta semelhança de 97% com as sequências de *P. flagellifera* das Ilhas Canárias. A localidade tipo para a espécie é Indonésia (Gil-Rodríguez et al., 2010). Infelizmente, ainda não foram depositadas sequências brasileiras desta espécie para este marcador no banco de dados.

P. flagellifera é amplamente distribuída no litoral brasileiro (Fujii & Senties (2005), como *Chondrophycus flagelliferus*), incluindo o Estado da

Bahia. Apesar disto, a morfologia e anatomia das amostras confere com o que é conhecido para *P. flagellifera* para o Brasil (Fuji et al., 2006; Gil- Rodríguez et al., 2010).

Assim, com base em evidências moleculares e morfológicas, adotaremos a nomenclatura de *P. flagellifera* para as amostras deste trabalho.

Sargassum (ITS-2)

As sequências têm 623 pares de base de comprimento e são idênticas entre si.

A comparação com o banco de dados aponta semelhança de 100% com as sequências de *Sargassum vulgare* da Itália. O local Tipo da espécie é Israel (Guiry & Guiry, 2016). Existe uma semelhança de 99% para outras espécies que até o momento não foram descritas para o Brasil (como *S. vachellianum* Greville, *S. spinuligerum* Sonder, *S. swartzii* C. Agardh).

Ainda não existem sequências brasileiras de *Sargassum* no GenBank. Apesar disto, a comparação com as sequências de Coimbra (2006), revela 100% de identidade com as quatro espécies investigadas na costa brasileira: *S. cymosum* C. Agardh, *S. furcatum* Kützinger, *S. stenophyllum* J. Agardh e *S. vulgare* C. Agardh. Este dado ilustra a questão da dificuldade de distinção ou mesmo de delimitação entre diferentes espécies deste gênero e, como se vê, há muito ainda a ser investigado e desenvolvido para a identificação molecular de *Sargassum*.

Considerando os dados moleculares disponíveis até o momento, além da semelhança morfológica das amostras com o que é conhecido para *S. vulgare* no Brasil (Fortes Xavier, 2001), esta é a identificação que seguimos para a espécie utilizada em nosso trabalho.

Ulva (*rbcL*)

A sequência tem 504 pares de base de comprimento.

A comparação com o banco de dados aponta semelhança de 100% com as sequências de várias espécies de *Ulva*, incluindo *U. fasciata* Delile, *U. taeniata* (Setchell) Setchell & N.L.Gardner, *U. ohnoi* M.Hiraoka & S.Shimada, *U. lactuca* Linnaeus e *U. reticulata* Forsskål. Ainda não existem sequências de *rbcL* de *Ulva fasciata* do litoral brasileiro disponíveis nos bancos de dados. Por

outro lado, há sequências dessa espécie disponíveis para todos os oceanos. A localidade tipo da espécie é o Egito (Guiry & Guiry, 2016). A morfologia dos talos remete ao que se conhece por *U. fasciata* para o Brasil (Joly, 1957; 1965).

Adotamos o nome de *U. fasciata* para material coletado. Adicionalmente, acreditamos que as sequências que produzimos contribuirão para o conhecimento molecular de *Ulva* em trabalhos futuros para o material da costa do Brasil.

Composição das sequências obtidas

Palisada flagellifera (COI-5P, 664 pb)

TAC TTT AT A T T T A A T T T T T G G T G C T T T T G C T G G T A T A C T A G G A G G T T G T A T G T
C A A T G C T A A T T C G T A T G G A A T T A G C A C A A C C A G G T A A C C A C T T A C T T T T A G
G T A A T C A T C A A G T T T A T A A T G T T T T A A T A A C T G C A C A T G C T T T T T T A A T G A T T
T T T T T A T G G T T A T G C C A G T A A T G A T T G G T G G T T T T G G T A A T T G A T T T G T A C
C G A T T A T G A T A G G T A G T C C A G A T A T G G C A T T T C C A A G A T T A A A T A A C A T T T C
A T T T T G A C T T T T A C C T C C T T C G T T A T G C T T A T T A C T T T T A T C T T C A A T T G T A G
A A G T T G G T A C T G G T A C T G G T T G A A C T G T T T A C C C T C C A T T A A G T T C A A T A C A
A A G T C A T T C T G G A G C T T C C G T A G A T T T A G C T A T T T T T A G T T T G C A T T T A T C T
G G A G C T T C T T C G A T T T T A G G T G C T A T A A A T T T T A T T T C T A C A A T T T T A A A T A T
G C G T A A T C C A G G A C A A A C T T T T T A T A G A A T T C C T T T A T T T G T T T G A T C A A T T T
T T G T A A C T G C A T T T T T A T T A T T A T T A G C T G T A C C A G T T T T A G C A G G T G C G A T
T A C T A T G T T A T T A A C T G A C A G A A T T T T A A T A C T T C A T T T T T T G A T C C T T C A G
G A G G A G G A G A T C C T G T T T T A T A T C A A C A T T T A T T T

Sargassum vulgare (ITS-2, 623 pb)

A G C G A A A T G C G A T A C G T C T T G C G A C T T G C A G A A T C T C G T G A A T C A T C G A A A
C T T C G A A C G C A T C T T G C G C T C C C G G G A T A T G C C T G G G A G C A T G C T T G T C G
G G G A G G A G G A G G C G A A A C T C G C C C A C A G C T T T G G G T T C G A T C T C G A C C
T C A A G G C G G T G G A G C G G A A T C T G A G T G T T C C G G G A G C G G T A G T G T G G T
G T G T A T T T C T G T A C A T A C T G C C T G T T C G T C C C C T G A G T C C A C C C A A A C C T A
G A G A G C T A C C G A T T G T C C G G A C T T C T A T T G T C T T T G C G G C G C T G G A G A C A
G G T C T A C C T T G C G T C C T C C G G A A G A T G C G T T G T T G A C C T A C C C C C T C T C
G C G G G G C G G G G A C A C C G A C A A G T C G C C G G G G A T G T G G G C G G G T G A C C T

TGAGGCGTCGCTGGAGGCAAGTTCACCTTGCGTCCTCCGGAGGATCCGTT
 GTTGACGGCGCCCATATCACGGGGCGGGGACACGACGGGTGCGCGGG
 GATGTGCGCGGGTGGTCTTGAGGCTTGGGACGGTAGGCAGTCTCGAGAG
 TGCCGGTGAGAGGCCGGTAATTATGATTATGCCATACCCCGATCAAGCA
 AGAAGACCCGCTGAATTTAAGCATATAC

Ulva fasciata (*rbcL*, 504 pb)

TGTTGCTGCTGAATCATCAACAGGTAAGTGGACAAGTGTATGGACTGATGG
 TTTAACATCTTTAGATCGTTATAAAGGTCGTTGTTACGATATTGAACCATTA
 GGAGAAGATGATCAATATATTGCTTATATTGCTTACCCTTTAGACTTATTTG
 AAGAAGGATCAGTTACAACTTATTTACTTCAATTGTAGGTAACGTTTTTGG
 TTTTAAAGCTTTACGTGCTTTACGTTTAGAAGATTTACGTATTCCACCAGCT
 TATGTTAAACATTCCAAGGTCCACCTCATGGTATTCAGGTTGAACGTGAT
 AAATTAACAAATATGGTCGTGGTTTATTAGGTTGTACAATTAACCAAAAT
 TAGGTCTTTCAGCTAAAACTACGGACGTGCTGTTTATGAATGTTTACGAG
 GTGGTCTTGATTTTACAAAAGACGATGAAAACGTAACTCACAACCTTTTAT
 GCGTTGGCGTGACCGTTTCTTATTTACTGCTGAAGCAAT

Referências

- Coimbra, C.S. 2006. Inferências filogenéticas na ordem Fucales (Phaeophyceae), com ênfase no gênero *Sargassum* C. Agardh do Atlântico Sul. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.
- Fortes Xavier, A.C.M. 2001. O Gênero *Sargassum* C. Agardh (Phaeophyta, Fucales) no Litoral Brasileiro. 2001. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.
- Fujii, M.T. & Senties, G.A. 2005. Taxonomia do complexo *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) do Brasil, com ênfase nas espécies dos estados de São Paulo e do Espírito Santo. In: Abel Senties G. & Kurt Dreckman. (Org.). Monografias Ficológicas. Mexico: Universidad Autonoma Metropolitana, 2: 69-135.
- Fujii, M.T., Guimarães, S.M.P.B., Gurgel, C.F. & Fredericq, S. 2006. Characterization and phylogenetic affinities of the red alga *Chondrophycus flagelliferus* (Rhodomelaceae, Ceramiales) from Brazil on the basis of morphological and molecular evidence. *Phycologia*, 45: 432-441.

- Gil-Rodríguez, M.C., Senties, A., Díaz-Larrea, J., Cassano, V. & Fujii, M.T. 2009. *Laurencia marilzae* sp. nov. (Ceramiales, Rhodophyta) from the Canary Islands, Spain, based on morphological and molecular evidence. *J. Phycol.*, 45: 264-271.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2016. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; consultado em 05 de Julho de 2016.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & deWaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270: 313-321.
- Joly, A.B. 1957. Contribuição ao conhecimento da flora ficológica marinha da Baía de Santos e arredores. *Bol. Fac. Fil. Ciênc. e Letr. Univ. S. Paulo (Botânica)*, 217: 1-199.
- Joly, A.B. 1965. Flora marinha do litoral norte do Estado de São Paulo e regiões circunvizinhas. *Bolm. Fac. Ciên. Letr. Univ. S. Paulo*, 294: 1-393.
- Mattio, L. & Payri, C. 2010. Assessment of five markers as potential barcodes for identifying *Sargassum* subgenus *Sargassum* species (Phaeophyceae, Fucales). *Cryptogam. Algal.*, 31(4): 467-485.
- Saunders, G.W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 360: 1879-1888.
- Saunders, G.W. & Kucera, H. 2010. Na evaluation of *rbcL*, *tufA*, UPA, LSU and ITS as DNA barcode markers for the marine green macroalgae. *Cryptogam. Algal.*, 31(4): 487-528.

Anexo 3 – Potencial antioxidante expresso em percentual atividade antioxidante e equivalentes de padrão para diferentes concentrações de extrato bruto

A avaliação do potencial antioxidante foi feita a partir de cinco diferentes concentrações de extrato bruto 25, 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Essas concentrações foram escolhidas principalmente para o cálculo da concentração efetiva (EC_{50}).

Todos os resultados expressos em percentual do potencial antioxidante e equivalente de padrão (ácido gálico e trolox) para todas as espécies, concentrações e diferentes ensaios foram expressos nas tabelas abaixo.

Tabela A.1. Percentual do potencial antioxidante para *Sargassum vulgare* em cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante de sequestro do radical DPPH durante as estações seca e chuvosa.

DPPH (% potencial antioxidante)					
Concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	<i>Sargassum vulgare</i>				
	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	0,1 $\pm$ 0,00	3,45 $\pm$ 1,75	9,33 $\pm$ 1,18	14,92 $\pm$ 1,74	18,14 $\pm$ 3,50
Aq. Frio	13,08 $\pm$ 1,26	11,80 $\pm$ 3,89	16,00 $\pm$ 3,54	11,91 $\pm$ 1,92	12,31 $\pm$ 1,23
Aq. Quente	6,86 $\pm$ 1,87	5,42 $\pm$ 1,88	4,19 $\pm$ 0,97	1,96 $\pm$ 1,14	1,60 $\pm$ 1,36
Estação chuvosa					
MeOH	19,52 $\pm$ 0,65	23,54 $\pm$ 1,90	21,97 $\pm$ 2,36	27,74 $\pm$ 4,57	26,47 $\pm$ 4,11
Aq. Frio	20,67 $\pm$ 3,24	23,83 $\pm$ 0,80	30,01 $\pm$ 3,91	32,99 $\pm$ 1,57	37,00 $\pm$ 1,69
Aq. Frio	30,19 $\pm$ 5,04	39,80 $\pm$ 5,32	50,49 $\pm$ 7,24	57,54 $\pm$ 4,81	64,82 $\pm$ 4,24

Tabela A.2. Percentual do potencial antioxidante para *Palisada flagellifera* em cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante de sequestro do radical DPPH durante as estações seca e chuvosa.

DPPH (% potencial antioxidante)					
Concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	<i>Palisada flagellifera</i>				
	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	17,93 $\pm$ 1,82	23,65 $\pm$ 1,32	29,15 $\pm$ 0,83	32,35 $\pm$ 2,36	38,68 $\pm$ 1,64
Aq. Frio	23,22 $\pm$ 0,89	26,09 $\pm$ 3,07	23,46 $\pm$ 1,78	22,64 $\pm$ 4,64	16,60 $\pm$ 1,54
Aq. Quente	0,13 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,00
Estação chuvosa					
MeOH	17,39 $\pm$ 1,82	21,76 $\pm$ 1,32	24,02 $\pm$ 0,83	26,07 $\pm$ 2,36	28,41 $\pm$ 1,64
Aq. Frio	17,31 $\pm$ 2,52	17,87 $\pm$ 1,00	18,49 $\pm$ 1,61	18,56 $\pm$ 2,26	19,36 $\pm$ 1,52
Aq. Frio	14,12 $\pm$ 3,17	17,47 $\pm$ 4,08	15,48 $\pm$ 3,29	19,52 $\pm$ 1,71	19,84 $\pm$ 1,61

Tabela A.3. Percentual do potencial antioxidante para *Ulva fasciata* em cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante de sequestro do radical DPPH durante as estações seca e chuvosa.

DPPH (% potencial antioxidante)					
Concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	<i>Ulva fasciata</i>				
	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	21,86 $\pm$ 1,85	25,58 $\pm$ 2,82	31,79 $\pm$ 1,70	35,91 $\pm$ 2,83	42,19 $\pm$ 4,06
Aq. Frio	0,13 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,00	2,63 $\pm$ 1,08	3,45 $\pm$ 1,79	0,95 $\pm$ 1,26
Aq. Quente	0,13 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,00
Estação chuvosa					
MeOH	17,85 $\pm$ 1,63	18,72 $\pm$ 2,81	16,65 $\pm$ 1,78	18,32 $\pm$ 4,74	19,44 $\pm$ 6,13
Aq. Frio	19,68 $\pm$ 2,58	19,39 $\pm$ 1,36	19,84 $\pm$ 1,09	18,67 $\pm$ 2,01	19,20 $\pm$ 1,20
Aq. Frio	15,40 $\pm$ 1,52	16,97 $\pm$ 1,98	16,49 $\pm$ 1,03	18,72 $\pm$ 2,21	16,89 $\pm$ 2,02

Tabela A.4. Potencial antioxidante expresso em mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato seco para *Sargassum vulgare* para cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante de sequestro do radical DPPH durante as estações seca e chuvosa.

DPPH (mg.g ⁻¹ Eq. Ácido gálico)					
Concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	<i>Sargassum vulgare</i>				
	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	1,29 $\pm$ 0,28	1,73 $\pm$ 0,27	1,68 $\pm$ 0,41
Aq. Frio	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Aq. Quente	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Estação chuvosa					
MeOH	7,43 $\pm$ 0,61	7,05 $\pm$ 0,89	3,35 $\pm$ 0,55	2,72 $\pm$ 0,72	1,91 $\pm$ 0,47
Aq. Frio	10,60 $\pm$ 3,04	4,13 $\pm$ 0,25	5,82 $\pm$ 0,92	4,13 $\pm$ 0,25	3,60 $\pm$ 0,20
Aq. Frio	18,61 $\pm$ 4,74	15,68 $\pm$ 2,50	9,87 $\pm$ 1,70	7,32 $\pm$ 0,75	5,30 $\pm$ 1,63

Tabela A.5. Potencial antioxidante expresso em mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato seco para *Palisada flagellifera* para cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante de sequestro do radical DPPH durante as estações seca e chuvosa.

DPPH (mg.g ⁻¹ Eq. Ácido gálico)					
Concentrações (µg.mL ⁻¹)	<i>Palisada flagellifera</i>				
	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	13,22 ± 1,71	9,29 ± 0,62	5,94 ± 0,20	4,46 ± 0,37	4,09 ± 0,19
Aq. Frio	18,19 ± 0,84	10,44 ± 1,44	4,60 ± 0,42	2,94 ± 0,73	1,50 ± 0,18
Aq. Quente	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Estação chuvosa					
MeOH	4,62 ± 0,19	4,94 ± 0,37	5,50 ± 0,20	9,22 ± 0,62	6,26 ± 1,71
Aq. Frio	7,68 ± 2,37	6,63 ± 0,47	3,41 ± 0,38	2,33 ± 0,35	2,07 ± 0,18
Aq. Frio	4,68 ± 2,98	6,88 ± 1,92	3,19 ± 0,77	2,92 ± 0,27	2,49 ± 0,19

Tabela A.6. Potencial antioxidante expresso em mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato seco para *Ulva fasciata* para cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante de sequestro do radical DPPH durante as estações seca e chuvosa.

DPPH (mg.g ⁻¹ Eq. Ácido gálico)					
Concentrações (µg.mL ⁻¹)	<i>Ulva fasciata</i>				
	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	16,91 ± 1,72	10,20 ± 1,33	6,56 ± 0,40	5,02 ± 0,44	4,50 ± 0,48
Aq. Frio	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Aq. Quente	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Estação chuvosa					
MeOH	5,36 ± 1,53	7,28 ± 1,32	3,50 ± 0,42	3,21 ± 0,74	2,82 ± 0,72
Aq. Frio	9,73 ± 2,42	7,23 ± 0,64	3,70 ± 0,26	2,31 ± 0,31	1,83 ± 0,14
Aq. Frio	5,76 ± 1,43	6,01 ± 0,93	2,77 ± 0,24	2,26 ± 0,35	1,67 ± 0,24

Tabela A.7. Potencial antioxidante expresso em mg equivalentes de trolox por grama de extrato seco para *Sargassum vulgare* para cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante de sequestro do radical DPPH durante as estações seca e chuvosa.

DPPH (mg.g ⁻¹ Equivalente de trolox)					
Concentrações (µg.mL ⁻¹)	<i>Sargassum vulgare</i>				
	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	60,50 ± 6,51	41,03 ± 4,91	28,73 ± 1,65	24,35 ± 1,62	20,51 ± 2,45
Aq. Frio	26,17 ± 7,08	17,17 ± 10,86	3,86 ± 4,95	8,05 ± 1,79	5,85 ± 0,95
Aq. Quente	24,00 ± 16,18	19,03 ± 5,25	11,22 ± 1,35	10,05 ± 1,44	8,12 ± 1,24
Estação chuvosa					
MeOH	128,43 ± 3,65	84,05 ± 5,31	41,00 ± 3,30	30,24 ± 4,26	21,90 ± 2,87
Aq. Frio	147,30 ± 18,10	97,21 ± 2,26	55,70 ± 5,46	38,62 ± 1,46	31,93 ± 1,18
Aq. Frio	42,08 ± 9,71	57,64 ± 4,47	79,81 ± 10,12	135,48 ± 14,87	195,02 ± 28,19

Tabela A.8. Potencial antioxidante expresso em mg equivalentes de trolox por grama de extrato seco para *Palisada flagellifera* para cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante de sequestro do radical DPPH durante as estações seca e chuvosa.

DPPH (mg.g ⁻¹ Equivalente de trolox)					
Concentrações (µg.mL ⁻¹)	<i>Palisada flagellifera</i>				
	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	162,92 ± 10,18	97,44 ± 3,71	56,40 ± 1,17	40,57 ± 2,19	34,85 ± 1,15
Aq. Frio	192,49 ± 4,97	104,27 ± 8,59	48,45 ± 2,49	31,53 ± 4,32	19,43 ± 1,08
Aq. Quente	68,68 ± 14,96	27,13 ± 5,71	11,63 ± 2,24	6,04 ± 4,02	3,19 ± 1,64
Estação chuvosa					
MeOH	121,44 ± 10,18	96,99 ± 3,70	53,80 ± 1,17	43,45 ± 2,19	38,03 ± 1,15
Aq. Frio	22,87 ± 1,06	27,92 ± 2,10	41,36 ± 2,25	81,60 ± 2,81	129,91 ± 14,11
Aq. Frio	25,34 ± 1,12	31,41 ± 1,59	40,06 ± 4,59	83,09 ± 11,41	112,08 ± 17,75

Tabela A.9. Potencial antioxidante expresso em mg equivalentes de trolox por grama de extrato seco para *Ulva fasciata* para cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante de sequestro do radical DPPH durante as estações seca e chuvosa.

DPPH (mg.g ⁻¹ Equivalente de trolox)					
Concentrações (µg.mL ⁻¹)	<i>Ulva fasciata</i>				
	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	184,91 ± 10,35	102,84 ± 7,89	60,08 ± 2,38	43,89 ± 2,63	37,30 ± 2,83
Aq. Frio	55,30 ± 8,06	31,66 ± 2,45	18,61 ± 2,11	13,67 ± 1,67	9,23 ± 1,79
Aq. Quente	52,92 ± 4,65	28,99 ± 6,72	14,75 ± 0,67	8,17 ± 0,52	5,77 ± 0,74
Estação chuvosa					
MeOH	116,09 ± 9,11	85,47 ± 7,87	41,91 ± 2,42	33,14 ± 4,42	27,29 ± 4,28
Aq. Frio	21,42 ± 0,84	27,79 ± 7,88	43,06 ± 1,53	85,17 ± 3,81	142,10 ± 14,42
Aq. Frio	20,47 ± 1,41	27,49 ± 2,06	37,53 ± 1,44	77,89 ± 5,55	118,47 ± 8,52

Tabela A.10. Potencial antioxidante expresso em mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato seco para *Sargassum vulgare* para cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante da quantificação de substâncias redutoras Folin Ciocalteu durante as estações seca e chuvosa.

Folin Ciocalteu (mg.g ⁻¹ Eq. Ácido gálico)					
Concentrações (µg.mL ⁻¹)	<i>Sargassum vulgare</i>				
	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	14,90 ± 1,14	13,93 ± 2,31	12,32 ± 1,24	11,21 ± 1,23	10,79 ± 1,49
Aq. Frio	14,22 ± 1,17	14,31 ± 1,16	13,34 ± 1,42	12,59 ± 1,02	13,30 ± 0,97
Aq. Quente	22,19 ± 1,76	20,03 ± 1,25	21,31 ± 1,63	20,25 ± 0,93	19,03 ± 0,96
Estação chuvosa					
MeOH	27,64 ± 11,52	18,86 ± 7,57	13,51 ± 4,41	14,17 ± 7,34	9,64 ± 4,47
Aq. Frio	19,22 ± 1,16	18,86 ± 1,19	18,07 ± 0,42	17,22 ± 0,73	18,06 ± 1,31
Aq. Frio	49,88 ± 3,80	45,14 ± 2,51	43,04 ± 2,84	39,61 ± 4,46	38,92 ± 2,08

Tabela A.11. Potencial antioxidante expresso em mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato seco para *Palisada flagellifera* para cinco diferentes

concentrações no ensaio antioxidante da quantificação de substâncias redutoras Folin-Ciocalteu durante as estações seca e chuvosa.

Folin-Ciocalteu (mg.g ⁻¹ Eq. Ácido gálico)					
Concentrações (µg.mL ⁻¹)	<i>Palisada flagellifera</i>				
	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	7,27 ± 4,96	14,05 ± 1,76	5,61 ± 1,26	7,11 ± 1,93	6,46 ± 3,43
Aq. Frio	6,42 ± 0,55	8,12 ± 0,58	8,28 ± 0,38	7,96 ± 0,24	8,13 ± 0,41
Aq. Quente	4,73 ± 0,55	4,69 ± 0,48	4,97 ± 0,64	4,77 ± 0,62	4,72 ± 0,81
Estação chuvosa					
MeOH	20,93 ± 2,75	15,07 ± 3,53	11,57 ± 3,11	10,52 ± 3,78	8,71 ± 4,14
Aq. Frio	6,06 ± 2,81	5,57 ± 1,30	5,57 ± 0,74	4,35 ± 0,49	4,78 ± 0,63
Aq. Frio	9,73 ± 1,83	7,73 ± 1,75	5,43 ± 0,71	5,57 ± 1,42	4,34 ± 0,29

Tabela A.12. Potencial antioxidante expresso em mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato seco para *Ulva fasciata* para cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante da quantificação de substâncias redutoras Folin-Ciocalteu durante as estações seca e chuvosa.

Folin-Ciocalteu (mg.g ⁻¹ Eq. Ácido gálico)					
Concentrações (µg.mL ⁻¹)	<i>Ulva fasciata</i>				
	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	7,86 ± 1,60	6,77 ± 1,65	5,44 ± 1,11	5,71 ± 1,14	5,44 ± 1,30
Aq. Frio	4,64 ± 1,85	4,35 ± 0,75	3,91 ± 0,56	4,13 ± 0,44	4,25 ± 0,22
Aq. Quente	0,40 ± 0,35	1,30 ± 0,55	1,79 ± 0,62	1,89 ± 0,29	2,55 ± 0,27
Estação chuvosa					
MeOH	23,22 ± 11,38	9,23 ± 6,32	8,16 ± 5,18	4,99 ± 1,75	4,53 ± 2,34
Aq. Frio	7,06 ± 2,09	3,49 ± 0,75	3,53 ± 0,27	2,89 ± 0,29	3,00 ± 0,80
Aq. Frio	7,56 ± 2,01	6,90 ± 2,76	3,34 ± 0,68	3,35 ± 0,39	3,29 ± 0,99

Tabela A.13. Potencial antioxidante expresso em mg equivalentes de trolox por grama de extrato seco para *Sargassum vulgare* para cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante quantificação de substâncias redutoras do Folin-Ciocalteu durante as estações seca e chuvosa.

Folin-Ciocalteu (mg.g⁻¹ Equivalente de trolox)

<i>Sargassum vulgare</i>					
Concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	60,50 $\pm$ 6,51	41,03 $\pm$ 4,91	28,73 $\pm$ 1,65	24,35 $\pm$ 1,62	20,51 $\pm$ 2,45
Aq. Frio	105,62 $\pm$ 7,62	100,67 $\pm$ 7,97	107,65 $\pm$ 11,15	118,66 $\pm$ 9,10	124,80 $\pm$ 9,18
Aq. Quente	150,39 $\pm$ 7,55	160,47 $\pm$ 7,31	169,88 $\pm$ 12,76	163,35 $\pm$ 9,76	187,02 $\pm$ 13,76
Estação chuvosa					
MeOH	63,46 $\pm$ 23,50	87,10 $\pm$ 15,75	107,16 $\pm$ 35,09	149,44 $\pm$ 60,16	218,80 $\pm$ 91,57
Aq. Frio	151,94 $\pm$ 9,24	149,44 $\pm$ 9,46	143,40 $\pm$ 3,34	136,75 $\pm$ 5,84	143,44 $\pm$ 10,43
Aq. Frio	395,54 $\pm$ 30,20	358,29 $\pm$ 19,97	341,82 $\pm$ 22,62	314,60 $\pm$ 35,44	309,18 $\pm$ 16,57

Tabela A.14. Potencial antioxidante expresso em mg equivalentes de trolox por grama de extrato seco para *Palisada flagellifera* para cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante quantificação de substâncias redutoras do Folin-Ciocalteu durante as estações seca e chuvosa.

Folin Ciocalteu (mg.g^{-1} Equivalente de trolox)

<i>Palisada flagellifera</i>					
Concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	52,17 $\pm$ 26,86	57,87 $\pm$ 15,07	47,25 $\pm$ 9,88	123,47 $\pm$ 13,76	67,80 $\pm$ 43,95
Aq. Frio	65,24 $\pm$ 3,21	64,48 $\pm$ 1,93	68,10 $\pm$ 3,04	70,34 $\pm$ 4,59	63,90 $\pm$ 4,31
Aq. Quente	38,60 $\pm$ 6,38	39,55 $\pm$ 4,88	42,28 $\pm$ 5,01	43,53 $\pm$ 3,77	50,66 $\pm$ 4,31
Estação chuvosa					
MeOH	69,13 $\pm$ 32,95	83,46 $\pm$ 30,06	91,77 $\pm$ 24,71	119,32 $\pm$ 28,05	165,51 $\pm$ 21,87
Aq. Frio	47,35 $\pm$ 22,37	43,86 $\pm$ 10,36	44,10 $\pm$ 5,93	34,48 $\pm$ 3,95	37,94 $\pm$ 5,04
Aq. Frio	76,47 $\pm$ 14,55	61,07 $\pm$ 13,92	42,95 $\pm$ 5,71	44,18 $\pm$ 11,34	34,42 $\pm$ 2,37

Tabela A.15. Potencial antioxidante expresso em mg equivalentes de trolox por grama de extrato seco para *Ulva fasciata* para cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante quantificação de substâncias redutoras do Folin-Ciocalteu durante as estações seca e chuvosa.

Folin-Ciocalteu (mg.g^{-1} Equivalente de trolox)

<i>Ulva fasciata</i>					
Concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	25	50	100	150	200
Estação seca					

MeOH	75,15 ± 12,51	59,75 ± 12,95	45,92 ± 8,67	46,94 ± 8,97	48,36 ± 5,04
Aq. Frio	34,96 ± 1,76	34,59 ± 3,50	34,01 ± 4,41	40,88 ± 5,92	49,99 ± 14,50
Aq. Quente	21,64 ± 2,18	17,04 ± 2,32	17,46 ± 4,87	17,05 ± 4,31	16,90 ± 2,76
Estação chuvosa					
MeOH	35,95 ± 18,60	39,55 ± 13,98	64,62 ± 42,21	72,99 ± 50,28	183,71 ± 9,49
Aq. Frio	55,29 ± 16,64	27,31 ± 6,03	27,89 ± 2,15	22,89 ± 2,32	23,79 ± 6,36
Aq. Frio	59,26 ± 15,97	54,45 ± 21,98	26,40 ± 5,44	26,53 ± 3,13	26,10 ± 7,90

Tabela A.16. Potencial antioxidante expresso em mg equivalentes de trolox por grama de extrato seco para *Sargassum vulgare* para cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante quantificação de substâncias redutoras do FRAP durante as estações seca e chuvosa.

FRAP (mg.g⁻¹ Equivalente de trolox)					
Concentrações (µg.mL⁻¹)	<i>Sargassum vulgare</i>				
	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	22,79 ± 12,79	17,44 ± 9,92	14,87 ± 8,43	14,52 ± 8,29	17,86 ± 1,17
Aq. Frio	18,41 ± 10,31	13,50 ± 7,51	7,33 ± 4,18	6,23 ± 3,53	6,77 ± 0,77
Aq. Quente	32,60 ± 18,36	21,71 ± 12,24	15,88 ± 9,02	13,65 ± 7,71	15,39 ± 1,44
Estação chuvosa					
MeOH	5,58 ± 1,49	4,82 ± 1,23	4,70 ± 1,72	4,36 ± 1,76	4,12 ± 1,34
Aq. Frio	7,56 ± 0,52	5,90 ± 0,30	4,90 ± 0,30	4,29 ± 0,23	4,19 ± 0,14
Aq. Frio	17,34 ± 0,90	14,29 ± 0,46	12,12 ± 0,64	10,46 ± 0,46	9,72 ± 0,65

Tabela A.17. Potencial antioxidante expresso em mg equivalentes de trolox por grama de extrato seco para *Palisada flagellifera* para cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante quantificação de substâncias redutoras do FRAP durante as estações seca e chuvosa.

FRAP (mg.g⁻¹ Equivalente de trolox)					
Concentrações (µg.mL⁻¹)	<i>Palisada flagellifera</i>				
	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	25,70 ± 2,38	19,50 ± 4,27	14,92 ± 3,45	13,52 ± 3,01	12,24 ± 2,63
Aq. Frio	0 ± 0,00	12,34 ± 0,53	9,95 ± 0,37	8,50 ± 0,21	7,35 ± 0,43

Aq. Quente	0 ± 0,00	15,29 ± 0,56	10,62 ± 0,50	6,91 ± 0,20	5,09 ± 0,20
Estação chuvosa					
MeOH	6,97 ± 1,90	6,59 ± 2,18	5,05 ± 2,20	4,92 ± 1,92	4,63 ± 2,15
Aq. Frio	3,87 ± 0,43	3,17 ± 0,26	2,68 ± 0,12	2,36 ± 0,16	2,18 ± 0,16
Aq. Frio	3,54 ± 0,24	3,12 ± 0,30	2,87 ± 0,11	2,12 ± 0,22	1,70 ± 0,18

Tabela A.18. Potencial antioxidante expresso em mg equivalentes de trolox por grama de extrato seco para *Ulva fasciata* para cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante quantificação de substâncias redutoras do FRAP durante as estações seca e chuvosa.

FRAP (mg.g⁻¹ Equivalente de trolox)					
Concentrações (µg.mL⁻¹)	<i>Ulva fasciata</i>				
	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	0 ± 0,00	12,40 ± 0,94	8,97 ± 1,47	7,77 ± 1,69	7,44 ± 1,76
Aq. Frio	0 ± 0,00	1,98 ± 4,98	7,70 ± 0,89	5,94 ± 0,67	5,43 ± 0,58
Aq. Quente	0 ± 0,00	0 ± 0,00	5,85 ± 0,56	5,71 ± 0,59	4,23 ± 0,34
Estação chuvosa					
MeOH	2,76 ± 1,20	2,34 ± 1,04	2,50 ± 1,15	2,36 ± 1,04	2,44 ± 1,05
Aq. Frio	2,68 ± 0,20	1,71 ± 0,10	1,01 ± 0,13	0,90 ± 0,03	0,92 ± 0,16
Aq. Frio	4,21 ± 0,24	3,45 ± 0,30	2,79 ± 0,11	2,05 ± 0,22	1,68 ± 0,18

Tabela A.19. Potencial antioxidante expresso em mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato seco para *Sargassum vulgare* para cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante quantificação de substâncias redutoras do FRAP durante as estações seca e chuvosa.

FRAP (mg.g⁻¹ Eq. Ácido gálico)					
Concentrações (µg.mL⁻¹)	<i>Sargassum vulgare</i>				
	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Aq. Frio	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Aq. Quente	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Estação chuvosa					

MeOH	0,69 ± 0,20	0,79 ± 0,29	0,93 ± 0,40	0,91 ± 0,41	0,88 ± 0,31
Aq. Frio	1,09 ± 0,12	1,04 ± 0,07	0,20 ± 0,46	0,90 ± 0,05	0,90 ± 0,03
Aq. Frio	3,41 ± 0,21	3,03 ± 0,11	2,69 ± 0,15	2,36 ± 0,11	2,21 ± 0,15

Tabela A.20. Potencial antioxidante expresso em mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato seco para *Palisada flagellifera* para cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante quantificação de substâncias redutoras do FRAP durante as estações seca e chuvosa.

FRAP (mg.g ⁻¹ Eq. Ácido gálico)					
<i>Palisada flagellifera</i>					
Concentrações (µg.mL ⁻¹)	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Aq. Frio	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Aq. Quente	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Estação chuvosa					
MeOH	0,54 ± 0,28	0,94 ± 0,51	0,93 ± 0,52	1,01 ± 0,45	1,01 ± 0,50
Aq. Frio	0,34 ± 0,00	0,39 ± 0,061	0,00 ± 0,00	0,42 ± 0,03	0,41 ± 0,03
Aq. Frio	0,34 ± 0,00	0,48 ± 0,07	0,50 ± 0,02	0,38 ± 0,05	0,31 ± 0,04

Tabela A.21. Potencial antioxidante expresso em mg equivalentes de ác. gálico por grama de extrato seco para *Ulva fasciata* para cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante quantificação de substâncias redutoras do FRAP durante as estações seca e chuvosa.

FRAP (mg.g ⁻¹ Eq. Ácido gálico)					
<i>Ulva fasciata</i>					
Concentrações (µg.mL ⁻¹)	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Aq. Frio	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Aq. Quente	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Estação chuvosa					

MeOH	0,34 ± 0,00	0,20 ± 0,06	0,28 ± 0,24	0,36 ± 0,24	0,43 ± 0,25
Aq. Frio	0,12 ± 0,03	0,10 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,12 ± 0,03
Aq. Frio	0,34 ± 0,00	0,48 ± 0,07	0,5 ± 0,02	0,38 ± 0,054	0,315 ± 0,04

Tabela A.22. Potencial antioxidante expresso em % de potencial antioxidante para *Sargassum vulgare* para cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante quelante de metais durante as estações seca e chuvosa.

Quelante de metais (% potencial antioxidante)

Concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	<i>Sargassum vulgare</i>				
	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	15,41 ± 3,39	13,46 ± 2,53	10,00 ± 7,47	4,86 ± 17,59	2,20 ± 2,99
Aq. Frio	18,35 ± 11,92	14,09 ± 10,76	9,15 ± 5,51	13,21 ± 6,38	13,51 ± 7,64
Aq. Quente	9,77 ± 1,17	11,82 ± 4,74	12,02 ± 1,07	18,15 ± 6,75	17,53 ± 1,56
Estação chuvosa					
MeOH	4,6 ± 3,16	3,42 ± 3,33	0 ± 9,11	0 ± 11,07	0,792 ± 0,02
Aq. Frio	15,23 ± 12,69	14,74 ± 8,15	12,34 ± 5,50	20,07 ± 12,61	12,17 ± 2,62
Aq. Frio	15,01 ± 8,75	16,53 ± 10,90	18,75 ± 2,81	25,56 ± 11,40	28,51 ± 1,73

Tabela A.23. Potencial antioxidante expresso em % de potencial antioxidante para *Palisada flagellifera* para cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante quelante de metais durante as estações seca e chuvosa.

Quelante de metais (% potencial antioxidante)

Concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	<i>Palisada flagellifera</i>				
	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	28,30 ± 6,60	29,72 ± 4,78	40,05 ± 8,14	45,13 ± 4,47	44,62 ± 5,34
Aq. Frio	10,57 ± 2,06	8,53 ± 0,82	7,24 ± 1,91	8,45 ± 1,57	7,93 ± 1,20
Aq. Quente	7,44 ± 2,27	18,91 ± 1,55	4,63 ± 1,15	7,48 ± 0,00	24,09 ± 0,00
Estação chuvosa					
MeOH	0 ± 1,00	0 ± 3,81	0,12 ± 5,22	0 ± 16,62	0,81 ± 0,05
Aq. Frio	14,74 ± 8,24	14,09 ± 8,26	13,54 ± 4,75	17,28 ± 10,52	13,84 ± 6,44
Aq. Frio	24,71 ± 11,52	16,01 ± 6,77	19,52 ± 10,15	15,58 ± 1,69	14,46 ± 1,16

Tabela A.24. Potencial antioxidante expresso em % de potencial antioxidante para *Ulva fasciata* para cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante quelante de metais durante as estações seca e chuvosa

Quelante de metais (% potencial antioxidante)					
Concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	<i>Ulva fasciata</i>				
	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	19,75 $\pm$ 4,11	17,50 $\pm$ 6,09	18,90 $\pm$ 24,35	24,84 $\pm$ 9,59	28,28 $\pm$ 6,68
Aq. Frio	6,78 $\pm$ 2,20	7,07 $\pm$ 3,10	11,48 $\pm$ 4,40	10,00 $\pm$ 3,48	12,95 $\pm$ 2,02
Aq. Quente	19,82 $\pm$ 11,27	17,58 $\pm$ 11,49	9,35 $\pm$ 2,91	6,51 $\pm$ 2,94	6,49 $\pm$ 0,68
Estação chuvosa					
MeOH	6,50 $\pm$ 0,40	13,32 $\pm$ 1,53	18,8 $\pm$ 6,62	28,82 $\pm$ 3,25	39,83 $\pm$ 3,10
Aq. Frio	16,96 $\pm$ 6,01	17,50 $\pm$ 12,05	17,55 $\pm$ 10,23	24,31 $\pm$ 7,78	18,18 $\pm$ 6,39
Aq. Frio	23,54 $\pm$ 11,24	19,20 $\pm$ 8,92	17,50 $\pm$ 6,87	18,93 $\pm$ 9,61	15,51 $\pm$ 1,88

Tabela A.25. Potencial antioxidante expresso em mg equivalentes de ác. gálico por grama de extrato seco para *Sargassum vulgare* para cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante quelante de metais durante as estações seca e chuvosa

Quelante de metais (mg.g ⁻¹ Eq. Ácido gálico)					
Concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	<i>Sargassum vulgare</i>				
	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	15,41 $\pm$ 3,39	13,46 $\pm$ 2,53	10,00 $\pm$ 7,47	4,86 $\pm$ 17,59	2,20 $\pm$ 2,99
Aq. Frio	18,35 $\pm$ 11,92	14,09 $\pm$ 10,76	9,15 $\pm$ 5,51	13,21 $\pm$ 6,38	13,51 $\pm$ 7,64
Aq. Quente	9,77 $\pm$ 1,17	11,82 $\pm$ 4,74	12,02 $\pm$ 1,07	18,15 $\pm$ 6,75	17,53 $\pm$ 1,56
Estação chuvosa					
MeOH	4,6 $\pm$ 3,16	3,42 $\pm$ 3,33	0 $\pm$ 9,11	0 $\pm$ 11,07	0,792 $\pm$ 0,02
Aq. Frio	15,23 $\pm$ 12,69	14,74 $\pm$ 8,15	12,34 $\pm$ 5,50	20,07 $\pm$ 12,61	12,17 $\pm$ 2,62
Aq. Frio	15,01 $\pm$ 8,75	16,53 $\pm$ 10,90	18,75 $\pm$ 2,81	25,56 $\pm$ 11,40	28,51 $\pm$ 1,73

Tabela A.26. Potencial antioxidante expresso em mg equivalentes de ác. gálico por grama de extrato seco para *Palisada flafellifera* para cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante quelante de metais durante as estações seca e chuvosa

Quelante de metais (mg.g ⁻¹ Eq. Ácido gálico)					
Concentrações (µg.mL ⁻¹)	<i>Palisada flagellifera</i>				
	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	28,30 ± 6,60	29,72 ± 4,78	40,05 ± 8,14	45,13 ± 4,47	44,62 ± 5,34
Aq. Frio	10,57 ± 2,06	8,53 ± 0,82	7,24 ± 1,91	8,45 ± 1,57	7,93 ± 1,20
Aq. Quente	7,44 ± 2,27	18,91 ± 1,55	4,63 ± 1,15	7,48 ± 0,00	24,09 ± 0,00
Estação chuvosa					
MeOH	0 ± 1,00	0 ± 3,81	0,12 ± 5,22	0 ± 16,62	0,81 ± 0,05
Aq. Frio	14,74 ± 8,24	14,09 ± 8,26	13,54 ± 4,75	17,28 ± 10,52	13,84 ± 6,44
Aq. Frio	24,71 ± 11,52	16,01 ± 6,77	19,52 ± 10,15	15,58 ± 1,69	14,46 ± 1,16

Tabela A.27. Potencial antioxidante expresso em mg equivalentes de ác. gálico por grama de extrato seco para *Ulva fasciata* para cinco diferentes concentrações no ensaio antioxidante quelante de metais durante as estações seca e chuvosa

Quelante de metais (mg.g ⁻¹ Eq. Ácido gálico)					
Concentrações (µg.mL ⁻¹)	<i>Ulva fasciata</i>				
	25	50	100	150	200
Estação seca					
MeOH	19,75 ± 4,11	17,50 ± 6,09	18,90 ± 24,35	24,84 ± 9,59	28,28 ± 6,68
Aq. Frio	6,78 ± 2,20	7,07 ± 3,10	11,48 ± 4,40	10,00 ± 3,48	12,95 ± 2,02
Aq. Quente	19,82 ± 11,27	17,58 ± 11,49	9,35 ± 2,91	6,51 ± 2,94	6,49 ± 0,68
Estação chuvosa					
MeOH	6,50 ± 0,40	13,32 ± 1,53	18,8 ± 6,62	28,82 ± 3,25	39,83 ± 3,10
Aq. Frio	16,96 ± 6,01	17,50 ± 12,05	17,55 ± 10,23	24,31 ± 7,78	18,18 ± 6,39
Aq. Frio	23,54 ± 11,24	19,20 ± 8,92	17,50 ± 6,87	18,93 ± 9,61	15,51 ± 1,88

Anexo 4 – Potencial antioxidante expresso em percentual atividade antioxidante e equivalentes de padrão para diferentes concentrações de extratos para fisiologia.

O potencial antioxidante dos extratos foi testado em seis diferentes concentrações: 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 mg.mL⁻¹ para *S. vulgare* e nas concentrações de 0, 4, 8, 12, 16 e 20 mg.mL⁻¹ para *P. flagellifera* e *U. fasciata*. Essas concentrações foram escolhidas principalmente para o cálculo da concentração efetiva (EC₅₀).

Todos os resultados expressos em percentual do potencial antioxidante e equivalente de padrão (ácido gálico e trolox) para todas as espécies, concentrações e diferentes ensaios foram expressos nas tabelas abaixo:

Tabela A.1. Potencial antioxidante expresso em % pontencial antioxidante, mg equivalentes de ác. gálico ou Trolox por grama de massa fresca para *Sargassum vulgare*, *Palisada flagellifera* e *Ulva fasciata* para seis diferentes concentrações no ensaio antioxidante sequestro do radical DPPH durante as estações seca e chuvosa.

Sequestro do radical DPPH													
% Potencial antioxidante					Eq. ác. gálico (mg.g MF ⁻¹)				Eq. Trolox (mg.g MF ⁻¹)				
Sargassum vulgare													
Seca		Chuvosa			Seca		Chuvosa		Seca		Chuvosa		
Concentração (mg.mL ⁻¹)	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	
2	18,65	4,79	25,05	8,71	69,62	12,13	106,91	113,93	1298,08	743,14	1689,02	678,48	
4	31,54	4,86	39,99	6,36	118,97	31,52	265,70	83,13	1234,67	187,68	2634,70	495,03	
6	41,39	4,40	52,56	12,75	121,95	19,01	210,53	83,34	1077,03	113,24	1779,97	496,33	
8	49,43	2,96	58,58	11,64	117,51	9,62	155,02	50,75	962,91	57,27	1273,97	302,22	
10	68,52	3,39	63,11	11,32	143,55	8,79	128,12	37,02	1065,36	52,35	1026,08	220,44	
12	82,05	1,40	79,76	4,51	148,90	3,02	142,68	11,81	1062,14	17,98	1003,09	141,40	
Palisada flagellifera													
Seca		Chuvosa			Seca		Chuvosa		Seca		Chuvosa		
Concentração (mg.mL ⁻¹)	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	
4	4,41	1,57	9,33	1,47	0,00	0,00	0,00	0,00	186,81	60,51	349,38	57,32	
8	8,65	1,85	5,22	1,45	0,00	0,00	0,00	0,00	175,15	35,70	94797,84	28,30	
10	10,57	2,43	7,66	1,31	0,00	0,00	0,00	0,00	169,85	37,61	113739,72	20,45	
12	12,85	1,96	9,45	1,49	0,00	0,00	0,00	0,00	170,96	25,24	118007,02	19,33	
16	11,17	5,20	12,12	1,70	0,00	0,00	0,00	0,00	111,96	50,18	114516,06	16,59	
20	26,92	6,29	13,86	1,75	0,00	0,00	0,00	0,00	211,26	48,59	105175,62	13,63	
Ulva fasciata													
Seca		Chuvosa			Seca		Chuvosa		Seca		Chuvosa		
Concentração (mg.mL ⁻¹)	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	
4	3,46	3,86	8,16	4,92	0,00	0,00	0,00	0,00	408,83	228,88	211,89	171,96	
8	19,15	3,68	7,35	3,94	19,32	11,93	0,00	0,00	378,13	71,02	163,54	120,96	
10	23,46	4,60	10,28	4,67	26,62	11,93	0,00	0,00	369,02	71,06	121,91	44,58	
12	24,32	3,67	13,26	2,85	24,06	7,93	0,00	0,00	318,66	47,25	165,07	52,86	
16	29,66	8,30	15,27	6,76	26,70	13,46	0,00	0,00	290,55	80,14	111,73	36,30	
20	34,93	3,82	19,61	4,49	28,19	4,96	0,00	0,00	273,13	29,54	149,95	34,96	

Tabela A.2. Potencial antioxidante expresso em % pontencial antioxidante, mg equivalentes de ác. gálico ou Trolox por grama de massa fresca para *Sargassum vulgare*, *Palisada flagellifera* e *Ulva fasciata* para seis diferentes concentrações no ensaio antioxidante sequestro do radical ABTS durante as estações seca e chuvosa.

Sequestro do radical ABTS												
% Potencial antioxidante					Eq. ác. gálico (mg.g MF ⁻¹)				Eq. Trolox (mg.g MF ⁻¹)			
Sargassum vulgare												
Seca		Chuvosa			Seca		Chuvosa		Seca		Chuvosa	
Concentração (mg.mL ⁻¹)	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
2	15,05	1,36	72,22	4,71	0,16	0,02	30,03	1,42	0,43	0,09	67,32	1,42
4	62,08	2,74	86,13	6,39	0,23	0,06	10,08	0,35	0,77	0,22	28,72	0,35
6	77,43	9,99	91,99	7,99	0,22	0,03	6,09	0,64	0,77	0,13	18,52	0,64
8	88,45	8,51	100,87	1,99	0,20	0,02	4,10	0,41	0,71	0,09	13,42	0,41
10	99,22	2,75	101,73	0,22	0,22	0,02	3,67	0,13	0,79	0,07	12,99	0,13
12	101,49	0,54	101,49	0,54	0,24	0,00	3,62	0,03	0,85	0,01	12,94	0,03
Palisada flagellifera												
Seca		Chuvosa			Seca		Chuvosa		Seca		Chuvosa	
Concentração (mg.mL ⁻¹)	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,19	0,05	35,09	0,34
8	7,33	3,23	6,47	3,54	0,07	0,01	16,44	0,34	0,17	0,04	17,20	0,17
10	16,62	4,89	13,63	3,51	0,06	0,01	7,88	0,17	0,17	0,05	11,11	0,26
12	26,59	8,95	24,47	8,06	0,05	0,01	4,90	0,26	0,16	0,05	8,18	0,26
16	33,92	11,18	30,82	10,54	0,05	0,01	3,52	0,26	0,23	0,06	7,96	0,18
20	51,35	14,15	39,94	7,63	0,07	0,02	3,30	0,18	0,22	0,06	7,92	0,12
Ulva fasciata												
Seca		Chuvosa			Seca		Chuvosa		Seca		Chuvosa	
Concentração (mg.mL ⁻¹)	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,26	0,03	34,83	0,29
8	11,12	2,02	9,13	2,97	0,09	0,01	16,19	0,29	0,25	0,03	16,70	0,13
10	26,10	3,38	23,85	2,59	0,08	0,01	7,38	0,13	0,24	0,03	10,73	0,16
12	39,57	4,67	36,47	4,91	0,07	0,01	4,51	0,16	0,23	0,02	7,78	0,13
16	52,25	5,43	47,62	5,40	0,07	0,01	3,11	0,13	0,29	0,03	7,58	0,21
20	66,43	7,03	55,71	8,75	0,08	0,01	2,92	0,21	0,29	0,01	7,49	0,19

Tabela A.3. Potencial antioxidante expresso em % potencial de proteção do β -caroteno de *Sargassum vulgare*, *Palisada flagellifera* e *Ulva fasciata* para seis diferentes concentrações no ensaio co-oxidação do β -caroteno durante as estações seca e chuvosa.

Co-oxidação β -caroteno				
% Potencial proteção				
<i>Sargassum vulgare</i>				
Seca		Chuvosa		
Concentração (mg.mL ⁻¹)	Média	Desvio	Média	Desvio
2	27,75	5,53	40,41	7,81
4	50,06	8,14	61,34	3,75
6	53,29	7,66	66,86	3,74
8	57,12	7,31	68,86	5,25
10	66,52	4,50	68,54	5,86
12	67,40	3,91	73,07	2,64
<i>Palisada flagellifera</i>				
Seca		Chuvosa		
Concentração (mg.mL ⁻¹)	Média	Desvio	Média	Desvio
4	26,83	2,09	26,83	2,09
8	38,45	4,48	29,53	2,34
10	49,35	8,22	35,44	5,41
12	51,04	7,46	43,98	5,29
16	53,67	6,86	47,37	4,60
20	65,17	4,08	50,91	4,25
<i>Ulva fasciata</i>				
Seca		Chuvosa		
Concentração (mg.mL ⁻¹)	Média	Desvio	Média	Desvio
4	23,56	2,18	23,56	2,18
8	35,43	4,31	27,84	3,68
10	42,18	2,37	34,28	2,36
12	44,48	4,13	49,18	13,44
16	47,95	3,47	56,73	1,62
20	49,82	1,72	60,45	4,66

Tabela A.3. Potencial antioxidante expresso mg equivalentes de ác. gálico ou Trolox por grama de massa fresca para *Sargassum vulgare*, *Palisada flagellifera* e *Ulva fasciata* para seis diferentes concentrações no ensaio antioxidante poder redutor do ferro (FRAP) durante as estações seca e chuvosa.

Poder redutor do Ferro (FRAP)									
Eq. ác. gálico (mg.g MF ⁻¹)					Eq. Trolox (mg.g MF ⁻¹)				
<i>Sargassum vulgare</i>									
Seca		Chuvosa			Seca		Chuvosa		
Concentração (mg.mL ⁻¹)	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	
2	130,47	12,80	229,13	16,71	426,78	56,19	858,14	73,34	
4	83,81	26,12	63,80	6,28	294,91	114,64	206,23	27,54	
6	69,34	21,14	51,34	7,37	255,72	92,80	176,16	32,33	
8	60,10	15,28	48,58	5,45	227,31	67,07	176,33	23,91	
10	72,85	27,82	60,37	6,42	283,28	122,13	228,08	28,17	
12	84,75	33,94	64,12	10,05	229,53	14,88	225,62	14,29	
<i>Palisada flagellifera</i>									
Seca		Chuvosa			Seca		Chuvosa		
Concentração (mg.mL ⁻¹)	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
8	68,79	4,67	68,92	3,71	228,98	20,50	228,72	16,27	
10	41,58	3,50	40,25	1,91	146,05	15,36	139,79	8,39	
12	30,69	2,37	31,24	2,19	110,40	10,42	112,53	9,61	
16	26,05	1,36	21,25	7,84	96,09	5,98	74,81	34,42	
20	30,17	2,61	34,33	5,04	117,83	9,24	132,25	22,11	
<i>Ulva fasciata</i>									
Seca		Chuvosa			Seca		Chuvosa		
Concentração (mg.mL ⁻¹)	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
8	75,60	6,27	73,64	6,27	258,88	27,53	249,42	27,53	
10	47,00	4,62	46,11	4,62	169,81	20,27	165,47	20,27	
12	36,26	4,12	34,77	4,12	134,85	18,09	128,03	18,09	
16	32,92	5,34	32,83	5,34	126,24	23,43	125,67	23,43	
20	35,90	5,89	35,16	5,89	120,47	1,48	117,02	1,48	

Tabela A.4. Potencial antioxidante expresso em % quelante de metais e mg equivalentes de ác. gálico por grama de massa fresca para *Sargassum vulgare*, *Palisada flagellifera* e *Ulva fasciata* para seis diferentes concentrações no ensaio antioxidante poder redutor do ferro (FRAP) durante as estações seca e chuvosa

Quelante de metais									
% quelante de metais					Eq. ác. gálico (mg.g MF ⁻¹)				
<i>Sargassum vulgare</i>									
Seca		Chuvosa			Seca		Chuvosa		
Concentração (mg.mL ⁻¹)	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	
2	11,09	2,53	9,27	3,32	0,00	0,00	0,00	0,00	
4	21,74	2,53	9,67	1,34	0,00	0,00	0,00	0,00	
6	17,20	2,53	11,94	0,69	0,00	0,00	0,00	0,00	
8	16,66	1,53	10,58	1,32	0,00	0,00	0,00	0,00	
10	11,59	2,32	10,34	1,20	0,00	0,00	0,00	0,00	
12	11,57	2,73	17,68	1,89	0,00	0,00	0,00	0,00	
<i>Palisada flagellifera</i>									
Seca		Chuvosa			Seca		Chuvosa		
Concentração (mg.mL ⁻¹)	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	
4	13,17	3,92	4,95	4,30	0,00	0,00	0,00	0,00	
8	11,40	2,19	3,33	0,83	0,00	0,00	0,00	0,00	
10	10,10	1,64	5,50	3,17	0,00	0,00	0,00	0,00	
12	11,80	2,09	7,79	1,08	0,00	0,00	0,00	0,00	
16	10,84	1,38	10,73	2,39	0,00	0,00	0,00	0,00	
20	12,54	3,00	12,23	1,47	0,00	0,00	0,00	0,00	
<i>Ulva fasciata</i>									
Seca		Chuvosa			Seca		Chuvosa		
Concentração (mg.mL ⁻¹)	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	
4	17,54	2,53	12,37	6,79	0,00	0,00	0,00	0,00	
8	20,73	2,94	17,96	4,84	0,00	0,00	0,00	0,00	
10	19,36	3,90	20,15	1,35	0,00	0,00	0,00	0,00	
12	14,32	1,97	23,90	2,57	0,00	0,00	0,00	0,00	
16	12,11	3,48	22,58	2,70	0,00	0,00	0,00	0,00	
20	14,24	3,48	24,28	2,65	0,00	0,00	0,00	0,00	

Tabela A.5. Potencial antioxidante expresso mg equivalentes de ác. gálico ou Trolox por grama de massa fresca para *Sargassum vulgare*, *Palisada flagellifera* e *Ulva fasciata* para seis diferentes concentrações no ensaio antioxidante quantificação de substâncias redutoras pelo Folin-Ciocalteu durante as estações seca e chuvosa.

Quantificação de substâncias redutoras Folin-Ciocalteu									
Eq. ác. gálico (mg.g MF ⁻¹)					Eq. Trolox (mg.g MF ⁻¹)				
<i>Sargassum vulgare</i>									
Seca					Chuvosa				
Concentração (mg.mL ⁻¹)	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	
2	33,07	20,44	56,92	14,50	206,50	170,43	212,98	120,94	
4	32,81	15,53	47,81	9,92	239,03	129,51	267,89	82,77	
6	31,34	15,60	42,92	8,40	238,29	130,12	270,68	70,06	
8	32,88	13,83	42,61	9,63	256,91	115,37	289,90	80,31	
10	36,70	12,06	50,20	10,11	288,72	100,54	353,22	84,27	
12	36,70	12,06	60,29	5,33	288,72	100,54	394,16	104,03	
<i>Palisada flagellifera</i>									
Seca					Chuvosa				
Concentração (mg.mL ⁻¹)	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
8	0,00	0,99	9,53	1,89	0,00	8,24	0,00	15,77	
10	3,48	0,97	8,38	0,60	11,72	8,06	4,50	5,01	
12	5,61	0,77	7,14	0,47	35,20	6,44	15,96	3,95	
16	5,56	0,92	7,67	0,47	37,74	7,67	31,26	3,88	
20	7,79	1,25	9,20	0,80	56,30	10,40	44,00	6,69	
<i>Ulva fasciata</i>									
Seca					Chuvosa				
Concentração (mg.mL ⁻¹)	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	Média	Desvio	
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
8	3,36	3,37	16,27	2,37	0,00	28,13	4,88	19,74	
10	11,06	2,19	12,43	3,29	74,89	18,29	38,23	27,48	
12	9,82	1,28	10,22	1,55	70,35	10,67	41,58	12,96	
16	7,26	7,71	8,47	1,67	51,88	64,34	37,96	13,92	
20	12,29	1,89	9,78	2,08	93,85	15,73	48,86	17,36	

Anexo 5 – Comprovante de submissão do artigo

O artigo Antiviral and citotoxic activities of crude extracts from Brazilian seaweeds *Sargassum vulgare* C. Agardh, *Palisada flagellifera* (J. Agardh) K.W. Nam e *Ulva fasciata* Delile referente ao capítulo 3 desta tese foi submetido para avaliação na revista científica Journal Applied Phycology. Abaixo o comprovante de submissão.

Journal of Applied Phycology

**Antiviral and citotoxic activities of crude extracts from Brazilian seaweeds *Sargassum vulgare* C. Agardh, *Palisada flagellifera* (J. Agardh) K.W. Nam e *Ulva fasciata* Delile
–Manuscript Draft–**

Manuscript Number:	JAPH-D-16-00397
Full Title:	Antiviral and citotoxic activities of crude extracts from Brazilian seaweeds <i>Sargassum vulgare</i> C. Agardh, <i>Palisada flagellifera</i> (J. Agardh) K.W. Nam e <i>Ulva fasciata</i> Delile
Article Type:	Original Research
Keywords:	antiviral activity; crude extracts; cytotoxicity; RT-HIV; natural products; seaweeds.
Corresponding Author:	Janaina Pires Santos, M.D Universidade de Sao Paulo São Paulo, BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade de Sao Paulo
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Janaina Pires Santos, M.D
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Janaina Pires Santos, M.D Priscila Bezerra Torres, M.D Lucimar Motta, Dr Fungyi Chow, Dr
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	
Abstract:	The treatment of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1, the agent of AIDS) is a major challenge to antiviral therapeutic process. Many difficulties are associated with the treatment including drug toxicity, virus resistance and high costs. Therefore, researches for new natural products from macroalgae for new potential bioproducts due to the recognized biological activity can minimize these limitations in the treatment of AIDS. Methanolic and aqueous crude extracts of marine algae <i>Sargassum vulgare</i> (Ochrophyta), <i>Palisada flagellifera</i> (Rhodophyta) and <i>Ulva fasciata</i> (Chlorophyta) collected from rocky shores of northeastern Brazil were evaluated for antiviral activity by inhibiting the enzyme reverse transcriptase (RT-HIV). The results showed that extracts of red and green algae did not show relevant activities ($\leq 50\%$) for inhibition of RT-HIV for any of the extracts but the hot aqueous extracts of brown seaweed <i>Sargassum vulgare</i> which is mainly composed of polysaccharides showed strong activity inhibiting RT-HIV ($\geq 90\%$) and IC ₅₀ between 12.39 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (dry season) and 28.47 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (rainy season) showing that there is a seasonal variation for this response. The low cytotoxicity of CC ₅₀ > 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ extracts ensures that the studied species and especially those who had high antiviral activity are potential resources in the search for new chemicals.