Priscila Bezerra Torres

Caracterização química e atividades biológicas de algumas espécies
nativas de *Gracilaria* de importância econômica

Chemical characterization and biological activities of some native
species of *Gracilaria* with economic importance

São Paulo

2017

Priscila Bezerra Torres

Caracterização química e atividades biológicas de algumas espécies
nativas de *Gracilaria* de importância econômica

Chemical characterization and biological activities of some native
species of *Gracilaria* with economic importance

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

Orientadora: Déborah Yara Alves Cursino
dos Santos.

Coorientadora: Fanly Fungyi Chow Ho

VERSÃO CORRIGIDA

O original encontra-se disponível no Instituto de Biociências da USP

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Torres, Priscila Bezerra

Caracterização química e atividades biológicas de algumas espécies nativas de *Gracilaria* de importância econômica
288 páginas

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

1. *Gracilaria*. 2. Caracterização química. 3. Atividades biológicas. 4. Aminoácidos tipo micospolina. 5. Polissacarídeos sulfatados. 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 Déborah Yara A. C. dos Santos

Orientadora

Aos meus pais e ao meu irmão,
por serem a luz que me guia e a alegria que me habita.

(Tirinha de autoria de Alexandre Beck em Armandinho)

AGRADECIMENTOS

À Deborah, minha querida orientadora. Muito obrigada por me ajudar a crescer como profissional e como pessoa ao longo destes 10 anos. Foram anos incríveis!

À Fungyi por ser coorientadora deste projeto. Sua ajuda foi imensurável! Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Marcelo José Pena Ferreira pela ajuda imensurável com os aminoácidos tipo micosporina. Obrigada pelas horas de ensinamentos e de boas conversas!

À Dr.^a Paula Novaes por ter me ajudado em muitas etapas deste projeto em especial nos ensaios bioestimulantes de alface. Sou muito grata por tudo!

À técnica Mourisa por todos estes anos de apoio e muita risada. Muito obrigada!

À técnica Aline por me ajudar com os métodos de análises dos aminoácidos tipo micosporina. Muito grata pelos dias na frente do LC.

Aos técnicos Leandro, Willian e Rosário pela boa conversa e por estarem sempre presentes quando precisei.

À Prof.^a Dr.^a Cláudia Maria Furlan pela ajuda nestes 10 anos de Fitoquímica e pelo empréstimo dos reagentes para os ensaios dos antioxidantes. Muito grata!

Aos queridos Prof. Dr. Antônio Salatino e Prof.^a Dr.^a Maria Luiza Salatino por ter me inspirado como exemplos de pesquisadores em todos estes anos.

Ao Prof. Dr. Miguel Nosedá por ter me recebido tão bem na Universidade Federal do Paraná e pela ajuda imensurável neste projeto.

À Dr.^a Luciana Garcia Ferreira (Universidade Federal do Paraná) pela ajuda na identificação dos polissacarídeos sulfatados. Muito grata.

À Prof.^a Dr.^a Paulete Romoff (Universidade Presbiteriana Mackenzie) pelo empréstimo das colunas de fase normal Zorbax RX-Sil que permitiram a identificação e isolamento dos aminoácidos tipo micosporina.

À Prof.^a Dr.^a Lucimar Barbosa da Motta (Universidade Paulista) pela ajuda com o ensaio da inibição da atividade da enzima transcriptase reversa do HIV. Muito grata.

À Dr.^a Beatriz Nogueira Torrano da Silva pelas identificações das algas e pela toda atenção recebida. Muito obrigada.

À Prof.^a Eliane Marinho-Soriano (Universidade do Rio Grande do Norte) pelo fornecimento das algas: *Gracilaria domingensis*, *Gracilaria birdiae* e *Gracilaria caudata*. Muito grata pela colaboração.

Às amigas e aos amigos que fizeram ou fazem parte do Laboratório de Fitoquímica. Muito grata por todos estes anos de aprendizado e muitas alegrias. Em especial quero agradecer à Kátia Pereira, Fernanda Resende, Anary Egydio e Dalila Sedano.

Às amigas e aos amigos do Laboratório de Algas Marinhas (LAM): Alexandre Souza, Lígia Ostrock, Ana Amorim, Cintia Iha, Talissa Harb, Fábio Nauer e claro as queridas Luska e Vanessa. Muito obrigada.

Às amigas e aos amigos da Universidade Federal do Paraná: Ester Mazepa, Estela Muchiuti, Bárbara Malburg, Fran Colodi, Jenifer Mota, Rafael Ramires e Amanda Oliveira.

À CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) pela permissão de uso das instalações para apoio na coleta da alga *Gracilaria domingensis* em Ilhéus.

Às agências de fomento por financiarem a pesquisa: FAPESP, CAPES e CNPq. Em especial a CNPq pela bolsa de doutorado concedida.

À minha querida Univesidade de São Paulo, ao Instituto de Biociências e ao departamento de Botânica.

Às queridas Adne e Carol por serem exemplos para mim, aprendi muito com vocês duas.

Aos meus queridos amigos cujas amizades foram além do laboratório: Lice, Cris, Miguelito, Carmencita, Lucas, Ci, Anselmo, Wilton e Jana. Vocês me fazem tão bem!

À Jana Pires por tudo que passamos juntas: alguns momentos tristes, mas infinitas risadas. Foi assim que você se tornou uma grande amiga. Obrigada!

À família da Jana Pires principalmente Dona Marizete pela hospedagem, pelo carinho e ajuda na coleta da alga *Gracilaria domingensis* em Ilhéus.

À Alice Nagai por me levantar todas as vezes que cai e por ser a perfeita definição do que é amizade. Lice, muito obrigada!

Não posso deixar de agradecer as minhas queridas amigas Bruna Pimentel, Sarah, Daniele Serra e Alexia e meus queridos amigos de sempre Marcelo e Wesley.

À Kakao e suas multiplicações: Taz, Tibé e Lipe. Bolas de pelos cheias de amor e ternura.

À minha família querida pelo apoio! Em especial, à Isa por escolher a gente como família, minhas avós: Joana (*In memoriam*) e Antonia, minhas tias: Socorro e Célia e meus tios: Pedro (*In memoriam*), Zé de Souza (*In memoriam*) e João. Amo vocês!

Obrigada a todos. Em cada página deste trabalho há um pouquinho de vocês!

ÍNDICE

Introdução Geral	9
Objetivos	24
Capítulo I: Otimização do método de extração para a análise dos constituintes majoritários de <i>Gracilaria caudata</i> (Rhodophyta: Gracilariales)	29
Capítulo II: Caracterização química dos principais constituintes de <i>Gracilaria caudata</i> e <i>Gracilaria domingensis</i> (Gracilariales, Rhodophyta)	49
Capítulo III: Potencial bioativo e isolamento biomonitorado de substâncias presentes em extratos de <i>Gracilaria caudata</i> e <i>Gracilaria domingensis</i> (Gracilariales, Rhodophyta)	110
Capítulo IV: Extratos de <i>Gracilaria caudata</i> e <i>Gracilaria domingensis</i> (Gracilariales, Rhodophyta) estimulam o crescimento de <i>Lactuca sativa in vitro</i>	150
Capítulo V: Capacidades antioxidantes <i>in vitro</i> de aminoácidos tipo micosporina (MAAs): um estudo comparativo	173
Capítulo VI: Potenciais nutricional e biológico de espécies nativas de <i>Gracilaria</i> Greville (Gracilariales, Rhodophyta)	208
Discussão Geral e Conclusões	249
Resumo Geral	254
General Abstract	256
Apêndice I	258
Apêndice II	278

INTRODUÇÃO GERAL

1. Biologia geral de espécies de *Gracilaria* Greville

O gênero *Gracilaria* pertence ao filo Rhodophyta (ou algas vermelhas). Este gênero pertence à classe Florideophyceae, ordem Gracilariales e a família Gracilariaceae. Foi descrito por Greville em 1830, incluindo somente quatro espécies (Greville 1830). Atualmente, *Gracilaria* abrange 186 espécies sendo um dos maiores gêneros do filo, juntamente com *Polysiphonia* Greville e *Ceramium* Roth (Brodie & Zuccarello 2006; Guiry 2016).

A maior parte das espécies de *Gracilaria* são algas de regiões tropicais, principalmente águas mais quentes. No entanto, o gênero é cosmopolita e possui representantes em quase todo mundo incluindo regiões temperadas. Geralmente são algas que vivem no médio-litoral e no infra-litoral, frequentemente até 10 m de profundidade, porém já foram encontradas em maiores profundidades até 25 m (Perez & Barbaroux 1996). Espécies desse gênero crescem fixadas por um apressório ao substrato, vivendo parcialmente cobertas ou ancoradas diretamente na areia.

Os talos são geralmente cilíndricos, porém algumas espécies apresentam talos achatados como, por exemplo, *Gracilaria eucheumatoides* Harvey, chegando a ser folhosos como em *Gracilaria textorii* (Suringar) De Toni (Lewmanomont 1996). Os talos podem ser desde eretos a prostrados. As maiores espécies podem alcançar 60 cm de comprimento (Guiry 2016). A coloração dessas algas pode ser amarronzada, amarelada, esverdeada até mesmo enegrecida, porém tons avermelhados são predominantes. De maneira geral, as variações morfológicas são também intraespecífica e dependentes de vários fatores, ou seja, são algas com uma grande plasticidade fenotípica, o que dificulta bastante a identificação taxonômica das espécies (Yarish et al. 2012).

O ciclo de vida do gênero está esquematizado na figura 1. Como pode ser visto é trifásico do tipo *Polysiphonia*, incluindo as fases de vida de carposporófito (2n), tetraesporófito (2n) e gametófito (n). Os gametófitos e tetraesporófitos são idênticos morfológicamente e distintos dos carposporófitos que vivem sobre os gametófitos femininos (Kain & Destombe 1995). Os gametas femininos são fecundados *in situ* e o zigoto formado gera o carposporófito que por sua vez produz os carpósporos (2n). Cada carpósporos pode se desenvolver em um tetraesporófito que, por meio de meiose, produz os tetrásporos (n) os quais, por sua vez, se

desenvolvem nos gametófitos (Kain & Destombe 1995). *Gracilaria* também podem se propagar vegetativamente, pois fragmentos do talo soltos podem gerar um novo indivíduo.

Figura 1. Ciclo de vida simplificado de espécies *Gracilaria*. Em destaque, um talo do gametófito feminino com carposporófitos desenvolvidos. Figura modificada de Kain (1991).

Espécies de *Gracilaria* toleram grandes variações ambientais e condições consideradas adversas para maioria das algas. Algumas espécies suportam uma ampla diferença de salinidade, podendo ser encontradas em baías e estuários; outras toleram altos níveis de turbidez, sobrevivendo com quantidades reduzidas de luz. Quando fora da água, em ambientes úmidos, podem suportar muitas horas (Perez & Barbaroux 1996).

2. Importância econômica e usos tradicionais de *Gracilaria*

Espécies de *Gracilaria* são algas bem exploradas pelos seres humanos e, conseqüentemente, são de grande importância econômica. O uso mais antigo remonta à pré-história há mais de 14000 anos a.C. com indício da exploração, como alimento ou remédio, de, provavelmente, *Gracilaria chilensis* C. J. Bird, McLachlan & E. C. Oliveira pelos primeiros habitantes de Monte Verde no Chile (Dillehay et al. 2008; Guillemín et al. 2014). Na China, a exploração de espécies de *Gracilaria* também é relatada como bem antiga, sendo usadas diretamente na alimentação, além de relatos de uso como material ligante para melhorar a fixação da cal na

pintura de paredes (Tseng 1981). Acredita-se que a partir da China o uso destas algas se difundiu para os outros países orientais. No entanto, a popularização do uso de *Gracilaria* no ocidente se deu apenas com a maior exploração do ágar nessas espécies.

O ágar é o ficocoloide conhecido mais antigo. Acredita-se que sua descoberta data do século XVII pelos japoneses, 200 anos antes dos outros dois ficocoloides, carragenanas e alginatos, serem descobertos (Armisen & Galatas 2009).

A exploração do ágar inicialmente era feita apenas da alga vermelha *Gelidium amansii* (J. V. Lamouroux) J. V. Lamouroux, porém, a exploração excessiva acarretou na procura por substitutas (Armisen 1995). Devido, principalmente, as altas taxas de crescimento, as espécies de *Gracilaria* despertaram imediato interesse. No entanto, o ágar extraído diretamente é de baixa qualidade. Somente com a descoberta da hidrólise alcalina, processo pelo qual o teor de sulfato dos polissacarídeos é reduzido, houve uma melhora na qualidade do ágar obtido destas espécies (Armisen 1995), possibilitando a disseminação do uso de *Gracilaria* para este fim. Atualmente, mais de 80% da produção do ágar é obtida de espécies do gênero (Santelices 2014). Os principais países que cultivam estas algas em larga escala são China, Chile, Filipinas, Indonésia e Vietnã (Santelices 2014).

O ágar obtido de *Gracilaria* é bastante usado pela indústria alimentícia na produção de sobremesas processadas, tais como doces diversos, iogurtes, pudins e geleias (Armisen & Galatas 2009). Na culinária ocidental, o ágar tem sido bastante difundido em dietas para emagrecimento e em substituição a gelatina de origem animal, principalmente, na culinária vegana. Em países orientais, o uso do ágar é corriqueiro, presente nas produções de doces tradicionais como *Annin tofu* na China e Japão e *Ais kacang* na Malásia, Singapura e Brunei. Na culinária japonesa, o ágar (ou *kanten*, nome popular), além dos doces tradicionais, como o *Anmitsu* e o *Yokan*, está presente desde sopas, salgadinhos, até pratos típicos, como o *Tokoroten*. Nas Filipinas, o ágar (ou *gulaman*, nome popular), além de tomar parte de sobremesas tradicionais, como o *Halo-halo*, está presente em um tipo de bebida bem popular, o *sago't gulaman*.

Gracilaria também é usada diretamente na culinária, principalmente, no Japão, sudeste asiático, Havaí e no Caribe. É bastante consumida fresca em saladas, sopas ou fazem partes de pratos típicos. No Havaí, por exemplo, são conhecidas como *ogo* ou *limu*, sendo *Gracilaria parvispora* I. A. Abbott a mais utilizada, fazendo parte da tradicional salada de peixe conhecida como *Poke* (Jensen 2004). No Japão são conhecidas como *ogonori*, acompanham vários pratos como o *sashimi* e são consumidas, principalmente, como saladas. Na Jamaica são conhecidas

como “*musgo irlandês*”¹ e são utilizadas no preparo de uma bebida típica de mesmo nome (Gordon 2016).

Muitas espécies de *Gracilaria* são usadas na medicina popular. Na Índia, por exemplo, *Gracilaria edulis* (S. G. Gmelin) P. C. Silva (= *Gracilaria lichenoides*) é utilizada como emoliente para peles e têm propriedades anti-hipotensiva, espasmolítica e diurética (Khare 2007). Umali-Stuart (2003), numa compilação feita sobre plantas medicinais das Filipinas, relatou *Gracilaria bursa-pastoris* (S. G. Gmelin) P. C. Silva e *G. edulis* sendo usadas como emplastos para tratamentos de feridas e articulações inchadas de joelhos. Além disso, o extrato aquoso obtido por decocção é usado para diarreia e no tratamento de constipação intestinal, para problemas no sistema urinário, problemas pulmonares e no tratamento de menorrágia e vaginite. Já na China, segundo Kwok Chu (2009), são usadas principalmente *G. bursa-pastoris*, *G. edulis* e *Gracilaria gigas* Harvey. O extrato aquoso dessas espécies também obtido por decocção é indicado no tratamento de constipação intestinal, tuberculose, tumor na tireoide, edema, massa abdominal, beribéri, inchaço no testículos e nos nódulos linfáticos. Em alguns países da América Central, *Gracilaria* é conhecida por ter propriedades afrodisíacas (Smith et al. 1984).

Outras aplicações de espécies de *Gracilaria* que vêm ganhando importância incluem a alimentação de animais, como peixes e gastrópodes (Santelices 2014), e o uso em cosméticos, como xampus, sabonetes, cremes, entre outros.

3. Estudos de bioatividades e composição química de *Gracilaria*

As espécies de *Gracilaria*, por apresentarem um amplo uso e uma alta biodiversidade, como visto anteriormente, sempre foram alvo de estudos para avaliação do potencial biológico. Para um quadro geral deste potencial biológico foi realizado um levantamento bibliográfico abrangendo o período entre 1980 a 2016. Foram levantados 385 artigos produzidos neste período. É possível observar que o interesse pelo potencial biológico destas algas teve um aumento significativo recentemente (Fig. 2). Como pode ser visto, em um curto período de tempo, entre 2005 a 2013, houve um aumento de 9 para 49 artigos publicados anualmente, já nos anos seguintes, houve uma tendência a estabilização com média de 43 artigos anuais (Fig. 2).

¹ Originalmente na Irlanda trata-se da alga vermelha *Chondrus crispus* Stackhouse

Figura 2. Número de artigos publicados por ano com estudos referentes às atividades biológicas de espécies de *Gracilaria*. A lista dessas referências estão no Apêndice I.

Algas do gênero já foram submetidas a diferentes bioensaios que se encaixam em dois grupos: um referente a bioensaios relacionados a saúde humana e outro referente a bioatividades diversas. Neste último caso, inclui-se bioatividades como anti-incrustantes, aglutinantes, inseticidas, além de efeitos na agricultura e aquicultura, sendo estas duas últimas bioatividades as mais amplamente estudadas (Fig. 3).

Algas marinhas são, há muito tempo, utilizadas na agricultura. Efeitos positivos como aumento na produtividade e na resistência a diferentes estresses biótico e abiótico são alguns dos benefícios que estes organismos podem exercer sobre a planta do cultivo (Battacharyya et al. 2015). Algas pardas são as mais usadas para este fim, principalmente, *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis e *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenfuss. No entanto, os estudos com espécies de *Gracilaria* também têm relatado efeitos positivos sobre a planta alvo, principalmente, no que se refere a melhoria na produtividade e no desenvolvimento. Chitra & Sreeja (2013) verificaram que o extrato aquoso de *Gracilaria corticata* (J. Agardh) J. Agardh promoveu um aumento no comprimento da raiz, do caule e no número de folhas no feijão-mungo (*Vigna radiata* L.). Já Singh et al. (2016) relataram que o fluido algáceo (“seaweed sap”) de *G. edulis* promoveu uma melhora na produtividade do grão de milho (*Zea mays* L.).

Estudos em aquicultura com *Gracilaria* têm relatado resultados promissores com camarões, principalmente *Litopenaeus vannamei* (popularmente camarão-de-patas-brancas), e peixes diversos, sendo verificada melhoria no sistema imunológico destes animais. Wongprasert et al. (2013) estudando o efeito do extrato aquoso de *Gracilaria fisheri* (B. M. Xia & I. A. Abbott) I. A. Abbott, J. Zhang & B. M. Xia frente ao camarão *Penaeus monodon* verificaram uma melhora no sistema imune deste animal. Já Bansemir et al. (2006) analisaram o efeito do extrato diclorometânico de *Gracilaria cornea* J. Agardh sobre bactérias patogênicas de peixes, obtendo resultado bastante promissor.

Os bioensaios referentes a saúde humana incluem atividades antimicrobianas (bactérias, fungos, protozoários e vírus), antioxidantes, antitumorais, antinociceptivas, além de atividades frente a diversas doenças, neurológicas, imunológicas, gastrointestinais e doenças crônicas não transmissíveis (cardiovasculares, diabetes e obesidade). Dentre estas atividades, as antibacterianas e antioxidantes são as mais estudadas (Fig. 3).

A maior parte dos ensaios com atividade antibacteriana para estas algas é determinada por testes de inibição de crescimento por difusão e têm apresentado alguns resultados promissores. Por exemplo, os extratos butanólico e propanólico de *G. edulis* foram ativos frente a bactérias patogênicas resistentes a antibióticos, no caso *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Ravikumar et al. 2002).

As atividades antioxidantes foram, na maioria, avaliadas *in vitro* frente aos ensaios do radical DPPH e do reagente Folin-Ciocalteu. No entanto, analisando os resultados de estudos abrangentes como de Zhang et al. (2006) com diversas algas chinesas, Zubia et al. (2007) com algas mexicanas e Lee & Kim (2015) estudando algas coreanas, as espécies de *Gracilaria* não se destacam, apresentando capacidade antioxidante de moderada a fraca quando comparadas a outras algas vermelhas. Uma exceção é o trabalho de Francavilla et al. (2013) que, estudando os extratos hexânico, de acetato de etila e metanólico de *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) M. Steentoft, L. M. Irvine & W. F. Farnham, encontraram resultados próximos ao padrão de referência (BHT, do inglês *Butylated Hydroxytoluene*) para amostras coletadas no verão, sugerindo uma sazonalidade do potencial antioxidante pelo menos para esta alga.

No levantamento bibliográfico também foi possível verificar que, das 186 espécies do gênero, somente 46 espécies de *Gracilaria* já foram avaliadas para algum ensaio biológico, ou seja, somente cerca de 25% das espécies (Tabela 1). Além disso, há uma grande variação no número de espécies avaliadas para cada ensaio específico. O ensaio antioxidante, por exemplo, apresenta o maior número de espécies avaliadas, com 28 diferentes espécies de *Gracilaria*, ou seja, cerca de 15% do total das espécies do gênero (Tabela 1). Já para o ensaio referente a

aplicações na agricultura, somente 9 espécies de *Gracilaria* foram testadas, ou seja, menos de 5% do total das espécies do gênero (Tabela 1). A espécie mais estudada é *G. corticata*, tendo sido avaliada para 18% do total das bioatividades já realizadas com espécies do gênero. *Gracilaria edulis* é a segunda melhor avaliada, com 13% (Tabela 1). Assim, apesar de haver um grande aumento no interesse pelo estudo de bioatividades para o gênero nos últimos anos (Fig. 2), faltam informações para a maioria da espécies.

Figura 3. Número de artigos publicados por atividades biológicas avaliadas em espécies de *Gracilaria* entre 1980 a 2016. DCNT = Doenças Crônicas Não Transmissíveis, que incluem doenças cardiovasculares, diabetes e obesidade. A lista dessas referências estão no Apêndice I.

Tabela 1. Espécies de *Gracilaria* avaliadas quanto ao potencial biológico e número de artigos publicados entre 1980 – 2006 com cada abordagem. Saúde humana: Ab = Antibacteriano, Ac = Anticoagulante, Af = Antifúngico, An = Antinociceptivo, Ao = Antioxidante, Ap = Antiprotzoário, At = Antitumoral, Av = Antiviral, D = Doenças Crônicas Não Transmissíveis, G = Problema gastrointestinal, I = Doenças Imunológicas, N = Doenças Neurológicas e O = Outras. Ensaios diversos: A = Agricultura, Ai = Anti-incrustantes, Ag = Aglutinantes, Aq = Aquicultura e Is = Inseticida. A lista dessas referências estão no Apêndice I.

Algas	Saúde humana													Ensaios diversos				
	Ab	Ac	Af	An	Ao	Ap	At	Av	D	G	I	N	O	A	Ai	Ag	Aq	Is
<i>Gracilaria aculeata</i>	1		1			1												
<i>Gracilaria arcuata</i>		1																
<i>Gracilaria birdiae</i>	1	1			4					2	1							
<i>Gracilaria blodgettii</i>	2		1								1		1	1		1		
<i>Gracilaria bursa-pastoris</i>	2				3	1	1	1					1			2	1	
<i>Gracilaria canaliculata</i>	4		1		1					1							1	1
<i>Gracilaria caudata</i>	1	1	1	2	2	5	1			2	2							
<i>Gracilaria cearensis</i>					1			1								1		
<i>Gracilaria cervicornis</i>	2	1	1		1	4							1			1		
<i>Gracilaria changii</i>	6		4		3		2		3	1	1					1		1
<i>Gracilaria chilensis</i>					1						1			1				
<i>Gracilaria chondracantha</i>																1		
<i>Gracilaria compressa</i>												1						
<i>Gracilaria cornea</i>		1		1	2	1					2	2	2			1	1	1
<i>Gracilaria corticata</i>	23	1	14		20	5	9	3	2			2	7	8	2	1	7	2
<i>Gracilaria curtissiae</i>																1		
<i>Gracilaria cylindrica</i>	1				1		1								1	1		
<i>Gracilaria damaecornis</i>						3												
<i>Gracilaria debilis</i>	1	2	1	1	3													
<i>Gracilaria dendroides</i>	1													1				
<i>Gracilaria domigensis</i>	3		1		2			1					1			1		
<i>Gracilaria dura</i>	1		1		1						1						1	

Continuação da Tabela 1

<i>Gracilaria edulis</i>	16	1	5		9	2	7		2		1	2	3		16	3		4	1
<i>Gracilaria eucheumatoides</i>																1			
<i>Gracilaria firma</i>					1														1
<i>Gracilaria fisheri</i>	1				1													5	
<i>Gracilaria foliifera</i>	3	1			5		1						2				2		
<i>Gracilaria gigas</i>									1										
<i>Gracilaria gracilis</i>	4		3		6	2	2		1			1	1		1			1	
<i>Gracilaria mammillaris</i>		1																	
<i>Gracilaria manilaensis</i>			1		2		1												
<i>Gracilaria marcialana</i>	1																		
<i>Gracilaria multipartita</i>	3		2		1						1								
<i>Gracilaria ornata</i>	1												1						1
<i>Gracilaria pacifica</i>								1											
<i>Gracilaria parvispora</i>					1														
<i>Gracilaria pudumadamensis</i>					1														
<i>Gracilaria salicornia</i>	4		1		8	2	3	1			1	1			1	1	1	1	1
<i>Gracilaria subsecundata</i>	1																		
<i>Gracilaria tenuistipitata</i>					3		4	1	2		2						1	8	
<i>Gracilaria textorii</i>		1			3		3	2	2			2	1		2		1	1	
<i>Gracilaria tikvahiae</i>					2										1		3		
<i>Gracilaria veleroae</i>	1																		
<i>Gracilaria venezuelensis</i>													1				1		
<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	2				4	1	1		2				1						
<i>Gracilaria verrucosa</i>	12	2	1		10	3	9	1	5		7	2	3		2		10	3	
<i>Gracilaria viridis</i>						1													
<i>n.i.</i>	4		1		1	3		4	3		1	1	1		14			1	2
<i>Espécie por ensaio*</i>	25	11	15	3	28	12	13	8	8	4	11	7	13		9	4	18	11	8

*Não inclui *n.i.* e *Gracilaria verrucosa*

De modo geral, o levantamento bibliográfico também permitiu verificar que a maior parte dos artigos para espécies de *Gracilaria* avalia apenas os extratos ou frações. Poucos artigos apresentam identificações ou fazem isolamento das substâncias responsáveis pelas atividades. Um dos poucos exemplos é o estudo de Sakthivel et al. (2016) no qual os autores chegaram ao diterpeno fitol de *G. edulis* através do isolamento biomonitorado utilizando ensaio antiproliferativo frente a células de adenocarcinoma pulmonar (A549). Sheeja et al. (2016) chegaram a resultados semelhantes estudando a mesma alga, porém utilizando linhagens de células cancerígenas de mama (MCF-7). Trabalhos voltados aos ensaios relacionados a saúde humana foram os que mais apresentaram identificações dos constituintes ligados a atividade, como, por exemplo, as oxilipinas que apresentaram atividades anti-inflamatórias (Dang et al. 2008; Lee et al. 2009) e polissacarídeos sulfatados com atividades imunoestimulantes (Vanderlei et al. 2011).

Os polissacarídeos sulfatados representam 11% dos artigos de bioatividades para o gênero. Várias atividades já foram verificadas para estas substâncias (Fig. 4). As principais incluem atividades imunológicas, como anti-inflamatórias verificada por Chaves et al. (2012) estudando *Gracilaria caudata* J. Agardh, antioxidantes, como Souza et al. (2012) estudando *Gracilaria birdiae* E. M. Plastino & E. C. Oliveira, e antivirais, como Mazumder et al. (2002) estudando *G. corticata* frente ao vírus das herpes simples tipo 1 e 2.

Figura 4. Número de artigos publicados com atividades biológicas avaliadas para os polissacarídeos sulfatados de espécies de *Gracilaria* entre 1980 a 2016. A lista dessas referências estão no Apêndice I.

A maior parte da química do gênero é voltada justamente para os polissacarídeos sulfatados. Poucos artigos tratam de caracterização química ou isolamento de metabólitos secundários. Na literatura foram encontrados apenas 4 artigos referentes a caracterização química geral, sendo um artigo com *Gracilaria foliifera* (Forsskål) Børgesen (Hayee-Memon et al. 1991) e três artigos com *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss (Nylund et al. 2011; Santos et al. 2015; Xu et al. 2015). No geral, estes autores encontraram ácidos fenólicos, ácidos graxos, ácidos dicarboxílicos, alcanos, álcoois, aldeídos, diterpenos, esteróis, monoacilgliceróis e oxilipinas. Outros trabalhos dando ênfase apenas a um tipo de metabólito têm verificado a presença de aminoácidos tipo micosporina (Cardozo et al. 2006), carotenoides (Guaratini et al. 2009) e bromofenóis (Whitfield et al. 1999).

Como dito anteriormente, espécies de *Gracilaria* vêm ganhando atenção por causa do potencial biológico, no entanto há necessidade de mais estudos de caracterização química e

isolamento de substâncias associados com a avaliação do potencial biológico com estas espécies.

4. Considerações sobre *Gracilaria* no Brasil

Segundo Costa (2013), no Brasil são descritas em torno de 25 espécies do gênero *Gracilaria* presente desde da costa litorânea do Maranhão até ao Rio Grande do Sul (Fig. 5). Algumas espécies apresentam uma distribuição ampla com registro em praticamente todo litoral, como, por exemplo, *G. caudata* que não está presente apenas no Maranhão e *Gracilaria domingensis* (Kützing) Sonder ex Dickie ausente apenas no Piauí. Outras espécies, no entanto, têm ocorrência bem restrita como o caso de *Gracilaria flabelliformis* (P. Crouan & H. Crouan) Fredericq & Gurgel descrita apenas no Rio de Janeiro e no Espírito Santo.

Figura 5. Mapa da ocorrência das espécies de *Gracilaria* no litoral brasileiro com base em Costa (2013). Em amarelo, estados com ocorrência de espécies desse gênero.

O litoral nordestino é onde os bancos naturais apresentam a maior abundância dessas espécies. Foi a partir de 1970 que estes bancos começaram a ser explorados de uma forma predatória por comunidades locais em busca, principalmente, de espécies de *Gracilaria* que eram comercializadas para a exploração do ágar (Marinho-Soriano 2016). A exploração excessiva e os baixos preços da alga, decorrente do alto teor de impureza, resultou em um declínio nesta atividade a partir do anos 1990 (Marinho-Soriano 2016). Ainda hoje, estes bancos naturais continuam sendo explorados envolvendo, principalmente, mulheres, idosos e crianças, visando incrementar a renda familiar. As principais espécies exploradas são *G. birdiae*, *Gracilaria cervicornis* (Turner) J. Agardh, *G. caudata* e *G. domingensis* (Marinho-Soriano 2016).

O governo brasileiro desde 2001 tem incentivado alguns projetos de cultivo artesanal, afim de evitar a superexploração dos costões e aumentar o valor da renda familiar. O desenvolvimento desses cultivos leva a melhoria na homogeneidade do produto, por garantir que praticamente só uma espécie de alga seja coletada, e também no processamento da alga. Nesses locais, geralmente a alga cultivada é a *G. birdiae*.

Atualmente, existem algumas associações de cultivadoras de algas estabelecidas no Ceará e no Rio Grande do Norte, compostas e gerenciadas, essencialmente, por mulheres (Tabela 2). Além da exploração dos ficocoloides, outros usos têm sido incentivados, como na alimentação direta, na produção de artesanatos e de cosméticos (Rebouças, 2013).

Com o exposto, fica evidente que as espécies de *Gracilaria* desempenham um importante papel social e econômico para estas comunidades envolvidas no cultivo de algas no nordeste do Brasil. Dessa forma, estudos relacionados a estas espécies são de grande interesse para estas populações, pois podem fornecer informações que levem a melhoria do cultivo, melhoria na forma de exploração do recurso, ou mesmo agregar mais valor a este material.

Tabela 2. Estado sede e principais associações de cultivadoras e cultivadores de algas marinhas no Brasil.

Associações	Estado
Associação das Maricultoras de Rio do Fogo (AMAR)	RN
Associação de Beneficiamento de Algas	RN
Associação de Maricultura e Beneficiamento de Algas de Pitangui (AMBAP)	RN
Associação dos Cultivadores e Cultivadoras de Algas de Maceió (Acalma)	CE
Associação dos Produtores de Algas de Flecheiras e Guajiru (APAFG)	CE
Mulheres de Corpo & Alga	CE

Com relação as espécies brasileiras, os trabalhos referentes ao potencial biológico de *Gracilaria* representam 8% do total dos artigos publicados em nível mundial. São avaliadas principalmente atividades antimicrobianas (bactérias, fungos, vírus e protozoários) e antioxidantes (Fig. 6). Entre as atividades antimicrobianas foram avaliadas principalmente as atividades antibacterianas, com resultados de não atividade para a maior parte. No que se refere as atividades antivirais, somente um único trabalho com o extrato de *G. domingensis* (diclorometano: metanol 50%) foi publicado, sendo este ativo frente ao vírus da herpes simples 2 resistente ao aciclovir (Soares & Robaina 2012).

Para a atividade antioxidante, merece destaque o trabalho de Souza et al. (2011) estudando *G. birdiae* e *G. cornea* no qual foi identificado o ácido gálico que apresenta uma capacidade antioxidante bem relatada na literatura.

As algas melhores avaliadas são justamente as mais exploradas nos bancos naturais: *G. birdiae* (18%), *G. caudata* (18%) e *G. domingensis* (18%). Cerca de 50% dos trabalhos tratam apenas do polissacarídeo sulfatado, enquanto os demais, na maioria, avalia apenas extratos ou frações. Quanto a composição química os artigos publicados geralmente são pontuais a respeito de uma determinada classe química como Cardozo et al. (2011) estudando aminoácidos tipo micosporina, Guaratini et al. (2012) estudando ácidos graxos e carotenoides e Guimarães et al. (2007) estudando heterosídeos.

Figura 6. Número de artigos por atividades biológicas avaliadas para espécies brasileiras de *Gracilaria* entre 1980 a 2016. A lista dessas referências estão no Apêndice I.

Assim, os trabalhos de potencial biológico e constituição química das espécies brasileiras são, na maioria, voltados para os polissacarídeos sulfatados, havendo poucos relatos sobre a composição química geral dessas espécies. Com o exposto, foram escolhidas para o presente trabalho as algas *G. birdiae*, *G. caudata* e *G. domingensis*.

As algas *G. birdiae* e *G. caudata* possuem talos cilíndricos. São bem semelhantes entre si tanto morfológica como molecularmente (Costa 2013), sendo dificilmente diferenciadas em campo. *Gracilaria birdiae* apresenta uma distribuição mais restrita, estando presente no nordeste (Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte) e no sudeste apenas no Espírito Santo. *Gracilaria caudata* está presente em quase todo litoral brasileiro exceto nos estados mais ao norte do país.

A alga *G. domingensis* apresenta o talo achatado, com grande variabilidade morfológica, sendo comum as variantes cromáticas no costão. Assim, como *G. caudata* apresenta uma ampla distribuição no litoral brasileiro, não há registro apenas no Piauí.

OBJETIVOS

Sob a perspectiva de espécies de *Gracilaria* apresentarem um bom potencial biológico e haver poucos trabalhos de caracterização química, principalmente com espécies brasileiras, propusemos investigar os componentes químicos majoritários, avaliar o potencial biológico e nutricional de algumas macroalgas vermelhas da família Gracilariaceae que já são exploradas economicamente por comunidades litorâneas nordestinas para obtenção de ágar, afim de agregar valor a estas espécies.

Os objetivos específicos foram divididos em duas partes, correspondendo aos capítulos que compõe este trabalho:

Parte I:

- 1) Otimização de protocolos de extração dos constituintes majoritários (Capítulo I).
- 2) Determinação dos constituintes majoritários (Capítulo II).
- 3) Avaliação do potencial biológico (Capítulos III, IV e V).

Parte II:

- 4) Avaliação do potencial nutricional e biológico incluindo uma amostra de alga comercializada (Capítulo VI).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armisen R (1995) World-wide use and importance of *Gracilaria*. *Journal of Applied Phycology* 7:231–243.
- Armisen R, Galatas F (2009) Agar. In: Phillips GO, Williams PA (eds) *Handbook of hydrocolloids*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, pp 21–40.
- Bansemir A, Blume M, Schröder S, Lindequist U (2006) Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture* 252:79–84.
- Battacharyya D, Babgohari MZ, Rathor P, Prithiviraj B (2015) Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae* 196:39–48.
- Brodie J, Zuccarello G (2006) Systematics of the Species Rich Algae. In: Hodkinson TR. (ed) *Reconstructing the Tree of Life Taxonomy and Systematics of Species Rich Taxa*. CRC Press, pp 323–336.
- Cardozo KHM, Carvalho VM, Pinto E, Colepicolo P (2006) Fragmentation of mycosporine-like amino acids by hydrogen/deuterium exchange and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM* 20:253–258.
- Cardozo KHM, Marques LG, Carvalho VM, et al. (2011) Analyses of photoprotective compounds in red algae from the Brazilian coast. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21:202–208.
- Chaves LDS, Nicolau LAD, Silva RO, et al. (2012) Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 35:1–8.
- Chitra G, Sreeja PS (2013) A Comparative Study on the Effect of Seaweed Liquid Fertilizers on the Growth and Yield of *Vigna radiata* (L.). *Nature Environment and Pollution Technology an International Quarterly Scientific Journal* 12:359–362.
- Costa E da SE (2013) *Algas gracilarióides (Gracilariaceae, Rhodophyta) na costa brasileira: uma abordagem morfológica e molecular*. Universidade de São Paulo: Tese (Doutorado em Ciências). 153p.
- Dang HT, Lee HJ, Yoo ES, et al. (2008) Anti-inflammatory constituents of the red alga *Gracilaria verrucosa* and their synthetic analogues. *Journal of Natural Products* 71:232–40.
- Dillehay TD, Ramírez C, Pino M, et al. (2008) Monte Verde: seaweed, food, medicine, and the peopling of South America. *Science* 320:784–786.
- Francavilla M, Franchi M, Monteleone M, Caroppo C (2013) The red seaweed *Gracilaria gracilis* as a multi products source. *Marine Drugs* 11:3754–76.
- Gordon A (2016) Case study: Improving the quality and viability of a traditional beverage—Irish Moss. In: Gordon A (ed) *Food safety and quality systems in developing countries*. Nikki Levy, Kingston, Jamaica, pp 47–74

- Greville RK (1830) *Algae Britannicae: Or, Descriptions of the Marine and Other Inarticulated Plants of the British Islands, Belonging to the Order Algae*. MacLachlan & Stewart, Edinburgh
- Guaratini T, Cardozo KHM, Pinto E, Colepicolo P (2009) Comparison of diode array and electrochemical detection in the C30 reverse phase HPLC analysis of algae carotenoids. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 20:1609–1616.
- Guaratini T, Lopes NP, Marinho-Soriano E, et al. (2012) Antioxidant activity and chemical composition of the non polar fraction of *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie and *Gracilaria birdiae* (Plastino & Oliveira). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22:724–729.
- Guillemin ML, Valero M, Faugeton S, et al. (2014) Tracing the trans-pacific evolutionary history of a domesticated seaweed (*Gracilaria chilensis*) with archaeological and genetic data. *PLOS ONE* 9:1–17.
- Guimarães M, Viana AG, Rabello Duarte ME, et al. (2007) Low-molecular-mass carbohydrates and soluble polysaccharides of green and red morphs of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Botanica Marina* 50:314–317.
- Guiry MD (2016) AlgaeBase. In: M. D. Guiry & G. M. Guiry (eds) *World-wide electronic publication, National University of Ireland*. Disponível em: <http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=14>.
- Hayee-Memon A, Shameel M, Ahmad M, et al. (1991) Phytochemical Studies on *Gracilaria foliifera* (Gigartinales, Rhodophyta). *Botanica Marina* 34:107–112.
- Jensen MN (2004) Cultivating Edible Seaweed in Hawaii: New technique helps local farmers. *Arizona Land and People* 49:10–11.
- Kain JM (1991) Cultivation of attached seaweeds. In: Guiry MD, Blunden G (eds) *Seaweeds resources in Europe: uses and potential*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, pp 309–378.
- Kain JM, Destombe C (1995) A review of the life-history, reproduction and phenology of *Gracilaria*. *Journal of Applied Phycology* 7:269–281.
- Khare CP (2007) *Indian Medicinal Plants: An Illustrated Dictionary*. Springer-Verlag New York. 900p.
- Kwok Chu JH (2009) *Gracilaria*, agar agar. In: *Complementary and Alternative Healing University*. Disponível em: <http://alternativehealing.org/ginkgo.htm>.
- Lee H-JJ, Dang H-TT, Kang G-JJ, et al. (2009) Two enone fatty acids isolated from *Gracilaria verrucosa* suppress the production of inflammatory mediators by down-regulating NF- κ B and STAT1 activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Archives of Pharmacol Research* 32:453–62.
- Lee J-H, Kim G-H (2015) Evaluation of antioxidant activity of marine algae-extracts from Korea. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 24:227–240.

- Lewmanomont K (1996) An overview of the regional study on Taxonomy and ecology of *Gracilaria*. In: FAO/NACA (ed) *Report on a Regional Study and Workshop on the Taxonomy, Ecology and Processing of Economically Important Red Seaweeds*. FAO, Bangkok (Thailand). Regional Office for Asia and the Pacific; Network of Aquaculture Centers in Asia-Pacific, Bangkok (Thailand), Bangkok, pp 215–224.
- Marinho-Soriano E (2016) Historical context of commercial exploitation of seaweeds in Brazil. *Journal of Applied Phycology*.
- Mazumder S, Ghosal PPK, Pujol CA, et al. (2002) Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *International Journal of Biological Macromolecules* 31:87–95.
- Nylund GM, Weinberger F, Rempt M, Pohnert G (2011) Metabolomic assessment of induced and activated chemical defence in the invasive red alga *Gracilaria vermiculophylla*. *PLOS ONE* 6:1–12.
- Perez R, Barbaroux O (1996) Cultivation and uses of *Gracilaria*. In: FAO/NACA (ed) *Report on a Regional Study and Workshop on the Taxonomy, Ecology and Processing of Economically Important Red Seaweeds*. FAO, Bangkok (Thailand). Regional Office for Asia and the Pacific; Network of Aquaculture Centers in Asia-Pacific, Bangkok (Thailand), Bangkok, pp 225–244.
- Ravikumar S, Anburajan L, Ramanathan G, Kaliaperumal N (2002) Screening of seaweed extracts against antibiotic resistant post operative infectious pathogens. *Seaweed Research and Utilization* 24:95–99.
- Rebouças RF da C (2013) *Estudo do teor de lipídios e avaliação dos resíduos das algas marinhas: Gracilaria caudata, Gracilaria birdiae, Gracilaria domingensis para preparação de biodiesel e biofertilizante*. Universidade do Estado do Rio Grande do Norte: Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais). 79p.
- Sakthivel R, Muniasamy S, Archunan G, Devi KP (2016) *Gracilaria edulis* exhibit antiproliferative activity against human lung adenocarcinoma cell line A549 without causing adverse toxic effect in vitro and in vivo. *Food Function* 7:1155–1165.
- Santelices B (2014) Cultured aquatic species information programme: *Gracilaria* spp. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department*. Disponível em: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Gracilaria_spp/en
- Santos SAO, Vilela C, Freire CSR, et al. (2015) Chlorophyta and Rhodophyta macroalgae: a source of health promoting phytochemicals. *Food Chemistry* 183:122–128.
- Sheeja L, Lakshmi D, Bharadwaj S, Parveen KS (2016) Anticancer activity of phytol purified from *Gracilaria edulis* against human breast cancer cell line (MCF-7). *International Journal of Current Science* 19:36–46.
- Singh S, Singh MK, Pal SK, et al. (2016) Sustainable enhancement in yield and quality of rain-fed maize through *Gracilaria edulis* and *Kappaphycus alvarezii* seaweed sap. *Journal of Applied Phycology* 28:2099–2112.

- Smith AH, Nichols K, McLachlan J (1984) Cultivation of seamoss (*Gracilaria*) in St. Lucia, West Indies. In: Bird CJ, Ragan MA (eds) *Eleventh International Seaweed Symposium: Proceedings of the Eleventh International Seaweed Symposium, held in Qingdao, People's Republic of China, June 19–25, 1983*. DR W. Junk Publishers, pp 249–251.
- Soares A, Robaina M (2012) Antiviral activity of extracts from Brazilian seaweeds against herpes simplex virus. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 22:714–723.
- Souza BWS, Cerqueira MA, Bourbon AI, et al. (2012) Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Food Hydrocolloids* 27:287–292.
- Souza BWS, Cerqueira MA, Martins JT, et al. (2011) Antioxidant potential of two red seaweeds from the Brazilian coasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:5589–5594.
- Tseng CK (1981) Commercial cultivation. In: Lobban CS, Wynne MJ (eds) *The Biology of Seaweeds*. Blackwell Science Ltd., pp 726–741.
- Umali-Stuart G (2003) Gulaman. In: *Philippine Medicinal Plants*. Disponível em: <<http://www.stuartxchange.com/Pili.html>>.
- Vanderlei E de SO, De Araújo IWF, Quinderé ALG, et al. (2011) The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Inflammation Research* 60:1121–1130.
- Whitfield FB, Helidoniotis F, Shaw KJ, Svoronos D (1999) Distribution of bromophenols in species of marine algae from eastern Australia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:2367–2373.
- Wongprasert K, Rudtanatip T, Praiboon J (2013) Immunostimulatory activity of sulfated galactans isolated from the red seaweed *Gracilaria fisheri* and development of resistance against white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. *Fish & shellfish immunology* 36:52–60.
- Xu T, Sutour S, Casabianca H, et al. (2015) Rapid screening of chemical compositions of *Gracilaria dura* and *Hypnea mucisformis* (Rhodophyta) from Corsican Lagoon. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients* 2:8–8.
- Yarish C, Redmond S, Kim JK (2012) *Gracilaria culture handbook for New England*. University of Connecticut Sea Grant. Disponível em: <http://digitalcommons.uconn.edu/wracklines/72>.
- Zhang W-W, Duan X-J, Huang H-L, et al. (2006) Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from *Symphyocladia latiuscula* (Rhodomelaceae). *Journal of Applied Phycology* 19:97–108.
- Zubia M, Robledo D, Freile-Pelegrin Y (2007) Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Applied Phycology* 19:449–458.

RESUMO

Poucas são as metodologias de extração e análise de componentes químicos desenvolvidas diretamente para algas marinhas. O objetivo deste trabalho foi conhecer melhor a matriz do material algáceo *Gracilaria caudata* J. Agardh e propor um protocolo eficiente de extração e análise dos constituintes majoritários. O material vegetal foi seco e submetido a extração seriada, sendo testadas duas formas de maceração, a quente e a temperatura ambiente. A composição dos extratos apolares foi avaliada através de Cromatografia à Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), enquanto os extratos polares foram avaliados em espectrofotometria de UV/visível e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD). Os ensaios de DPPH e Folin-Ciocalteu foram utilizados para a avaliação do potencial antioxidante dos extratos polares. Aminoácidos tipo micosporina foram característicos dos extratos polares, enquanto ácido hexadecanoico, *n*-heptadecano, fitona e colesterol foram majoritários nos extratos apolares. De maneira geral, não foram observadas diferenças qualitativas entre as formas de extração. Em termos quantitativos, a maceração a quente foi mais eficiente. Sais halogenados foram importantes interferentes para os extratos polares, correspondendo a cerca de 60% do rendimento total para esses extratos. Dessa forma, concluímos que a maceração a quente pode ser usada eficientemente para a análise do perfil químico *G. caudata*, não prejudicando a detecção e a identificação dos componentes majoritários e minimizando o tempo de trabalho.

Palavras chaves: *Gracilaria caudata*, extração seriada, maceração a quente, CG-EM, CLAE-DAD, aminoácido tipo micosporina, ácido hexadecanoico.

ABSTRACT

Methods for extraction and analysis of chemical compounds developed directly for marine algae are uncommon. The main goals of this study were to improve the knowledge about the matrix of algal material in *Gracilaria caudata* J. Agardh and propose an efficient protocol for extracting and analyzing its major constituents. The plant material was dried and subjected to serial extraction with two forms of maceration, hot and room temperature maceration. Apolar extracts were evaluated by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS), while polar extracts were evaluated in UV/visible spectrophotometry and High Performance Liquid Chromatography with a Diode Array Detector (HPLC-DAD). The DPPH and Folin-Ciocalteu tests were used to evaluate the antioxidant potential of the polar extracts. Mycosporine-like Amino Acids (MAAs) were representative of the polar extracts, while hexadecanoic acid, *n*-heptane, phytone and cholesterol were major compounds in apolar extracts. In general, no qualitative differences were observed between the extraction forms. However, hot maceration was more efficient in quantitative terms. Halogenated salts were important interferers for polar extracts, corresponding to around 60% of the total yield for those extracts. In conclusion, hot maceration can be used efficiently for the analysis of the chemical profile of *G. caudata*, not impairing the detection and identification of major components and minimizing the working time.

Keywords: Rhodophyta, *Gracilaria caudata*, serial extraction, hot maceration, GC-MS, HPLC-DAD, mycosporine-like amino acids, hexadecanoic acid.

1. INTRODUÇÃO

Produtos naturais são geralmente metabólitos secundários produzidos por organismos terrestres e aquáticos. Apesar da pesquisa em produtos naturais terrestres ser mais intensa do que em produtos naturais marinhos, nos últimos anos tem havido um aumento significativo na quantidade de metabólitos secundários isolados de organismos marinhos, devido às melhorias nas técnicas de análises e de coleta desses organismos (Hu et al. 2011). Dentre as algas marinhas, o Filo Rhodophyta vem ganhando papel de destaque. Segundo Leal et al. (2013), entre 1962 e 2012, 53% dos metabólitos secundários isolados em algas foram provenientes deste filo. Além disso, Blunt et al. (2010) verificaram que entre as algas marinhas avaliadas, justamente Rhodophyta apresenta o maior número de substâncias com propriedades físico-químicas desejáveis para potencial uso farmacêutico.

Contudo, antes de serem analisados ou mesmo isolados, os produtos naturais precisam ser extraídos das matrizes vegetais, as quais possuem características físico-químicas diversas entre os organismos. A maioria dos protocolos empregados na obtenção de produtos naturais de origem vegetal foi estabelecida para plantas terrestres. Poucas são as metodologias de extração desenvolvidas para algas marinhas, que se constituem por matrizes únicas e diferentes daquelas de plantas terrestres.

Plantas terrestres são ricas em ceras, substâncias fenólicas (por exemplo, ligninas, taninos e flavonoides), terpenoides, fitoesteroides e óleos voláteis que variam em termos qualitativos e quantitativos entre diferentes *taxa* (Croteau et al. 2000). Segundo Azmir et al. (2013), essas diferenças podem levar a adequações metodológicas de extração e análise mesmo entre diferentes espécies de mesmo gênero. Em algas marinhas, por sua vez, muitas dessas classes de substâncias estão ausentes (p. ex. – ceras e ligninas) ou, quando presentes, muitas vezes diferem nos padrões de substituição e/ou substituintes (Maschek & Baker 2008). Assim, estudos de adequações metodológicas nas etapas iniciais de extração são necessários com matrizes algáceas antes de começar as análises e os isolamentos dos metabólitos.

Eahamban & Antonisamy (2012), estudando o efeito da temperatura na eficiência da obtenção de extratos da macroalga vermelha *Gracilaria corticata* (J. Agardh) J. Agardh, verificaram que a extração a quente em Soxhlet foi mais vantajosa que a maceração a temperatura ambiente. Entretanto, como estes autores usaram solventes diferentes para as duas formas de extração, não é possível concluir o real efeito da temperatura. Outros estudos têm dado enfoque na padronização de métodos visando a extração de substâncias específicas. Tartarotti & Sommaruga (2002) avaliaram métodos de extração de aminoácidos tipo micosporina (MAAs, do inglês *Mycosporine-like Amino Acids*), um dos principais metabólitos

secundários presentes em rodófitas, e Torres et al. (2014) padronizaram métodos de extração de carotenoides e clorofila *a* usando a macroalga vermelha *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* Zhang & Xia.

Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram conhecer melhor a matriz algácea da macroalga vermelha *Gracilaria caudata* J. Agardh, padronizar protocolos de extração e análise dos constituintes majoritários para esta alga e, com isso, estabelecer a metodologia que será realizada, posteriormente, para a caracterização química desta espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta do material e preparação dos extratos

Gracilaria caudata foi coletada na Praia Martin de Sá no município de Caraguatatuba no Estado de São Paulo em abril de 2013 (Fig. 1). O material foi triado e lavado em água corrente para retirada de excesso de sal, restos de areias, epífitos, epibiontes e fauna acompanhante. Em seguida, foi lavado com água destilada e seco em estufa (40 °C). A alga foi identificada pela Dr.^a Beatriz Nogueira Torrano da Silva por meio de *DNA BarCode*.

Figura 1. Detalhe do local da coleta na Praia Martin de Sá no município de Caraguatatuba no estado de São Paulo (Imagens do Google Maps®). Em destaque, a alga *Gracilaria caudata* J. Agardh. Foto: Priscila Bezerra Torres.

O material seco foi triturado até pó fino com auxílio de nitrogênio líquido e dividido em réplicas de 1 g ($n = 3$). Cada uma das subamostras foi submetida a maceração seriada em 10 mL de solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano, metanol e metanol 80%) com diferentes temperaturas (ambiente e 60 °C). Para a maceração a quente, após 2 h o sobrenadante foi transferido para novo recipiente e ao resíduo (material vegetal) foi adicionado o próximo solvente. Já na maceração a temperatura ambiente, a troca do solvente foi realizada a cada dois dias. Em seguida, os extratos dos dois tipos de maceração foram secos em $N_{2(g)}$ e/ou liofilizados.

Após seco, os extratos metanólicos e hidrometanólicos 80% foram ressuspensos em metanol (100 mg/mL) e centrifugados (10000 RPM por 10 min a temperatura ambiente) para a retirada de sais. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, novamente secos e armazenados, assim como os precipitados formados.

Ao final, cada tipo de maceração resultou nos seguintes extratos e precipitados: hexânico, diclorometânico, metanólico, hidrometanólico 80%, precipitado do metanólico e precipitado do hidrometanólico 80%.

2.2. Teor de halogênios dos precipitados dos extratos metanólicos e hidrometanólico 80%

A partir dos precipitados obtidos dos extratos metanólicos e hidrometanólico 80% foi estimado o teor de halogênios através de turbidimetria adaptando o Método de Mohr para microplacas de 96 poços. Neste método, os íons halogenados da amostra reagem com o nitrato de prata formando um precipitado. Para fazer o reagente turbidimétrico, 50 mg de gelatina animal foram dissolvidos em 1 mL de água ultrapura fervente. Em seguida, foram adicionados 800 mg de nitrato de prata e 50 mL de água ultrapura, e a solução homogeneizada.

Para realização do ensaio, os precipitados obtidos dos extratos em metanol e em metanol 80% foram dissolvidos em água ultrapura na concentração de 1 mg/mL. Em cada poço utilizado da microplaca foram adicionados 125 μ L de água ultrapura, 25 μ L da amostra ou solução padrão e 25 μ L do reagente turbidimétrico. Para o branco, 25 μ L de água ultrapura substituíram a amostra na reação. A microplaca foi incubada a temperatura ambiente por 15 min e as absorbâncias lidas a 405 nm. A curva padrão foi realizada com cloreto de sódio (0 a 1000 μ g/mL) e os valores expressos em % (g de equivalente de cloreto de sódio x 100/massa do extrato).

2.3. Espectrofotometria de UV/visível

Os extratos metanólicos e hidrometanólico 80% foram dissolvidos em metanol 80% (5 mg/mL) e submetidos a uma varredura entre 200 - 750 nm em espectrofotômetro de UV/visível (UV-1650 PC, Shimadzu) em cubetas de quartzo de percurso óptico de 1 cm. Foram calculadas as áreas sob as curvas pelo método dos trapézios, afim de se comparar eficiência de extração das macerações a quente e a frio.

2.4. Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

Os extratos hexânico e diclorometânico (1 mg/mL em hexano) foram analisados em Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) (Agilent 6890N/5975) na seguinte programação de análise: $T_0 = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 6 min, $15\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até $225\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, permanecendo nesta temperatura por 9 min. A coluna empregada foi a DB-5HT (30 m x 0,32 mm x 0,1 μm). O gás de arraste utilizado foi o hélio com fluxo de 1 mL/min. A temperatura do injetor foi de $320\text{ }^{\circ}\text{C}$. A temperatura da fonte do espectrômetro de massas foi de $230\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura do quadrupolo de $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, voltagem da eletromultiplicadora (EM) de 70 eV e amplitude de detecção de massa foi de 40 - 1000 unidades de massa atômica com 2,64 scan/s. O teor relativo de cada componente principal foi calculado a partir da área total dos picos no cromatograma, excluindo-se os componentes com áreas menores do que 1%. A identificação dos componentes foi feita através da comparação do espectro de massas obtido ao do banco de dados NIST/NBS e confirmado com a literatura.

2.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de Diodo (CLAE-DAD)

Os extratos metanólicos e hidrometanólico 80% (20 mg/mL em metanol 80%) foram analisados através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de Diodo (CLAE-DAD) no cromatógrafo da marca Agilent 1260. Foi empregada uma coluna de fase normal Zorbax RX-SIL (250 mm x 4,6 mm x 5 μm). A fase móvel foi modificada de Hartmann et al. (2015), consiste de um gradiente de acetonitrila: acetato de amônio (5 mM) (9:1; v/v) (A) e acetonitrila: acetato de amônio (5 mM) (1:1; v/v) (B), com a seguinte programação: 20% A (0 min), aumentando para 55% A até 15 min, descendo para 20% A até 16 min e ficando constante até 21 min. Fluxo constante de 1 mL/min. Temperatura da coluna = $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Detecção em 225, 270, 320, 330 e 360 nm. Este método foi utilizado para análises dos metabólitos gerais e MAAs. Os MAAs foram identificados por padrões e quantificados por uma curva padrão feita com porphyrina 334 (0 - 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; $R^2 > 0,99$).

2.6. Capacidades antioxidantes

Os extratos diclorometânico e hexânico não foram avaliados quanto ao potencial antioxidante devido aos baixos rendimentos. Já os extratos metanólico e hidrometanólico 80% foram avaliados através dos ensaios do radical DPPH conforme descrito em Furlan et al. (2015) e do reagente Folin-Ciocalteu adaptado para microplaca de 96 poços com base no método de Waterman & Mole (1994). Para isso, foram solubilizados em metanol 80% na concentração de 20 mg/mL. Os protocolos foram realizados em microplacas de 96 poços e as leituras de absorbância realizadas em espectrofotômetro de UV/visível para microplacas (Synergy™ H1). Ácido gálico foi o controle positivo.

Para a atividade sequestradora do radical DPPH, uma alíquota de 20 µL dos extratos foi adicionada a 200 µL de uma solução metanólica do radical DPPH (0,08 mg/mL) (Sigma-Aldrich). Para o controle negativo, os extratos foram substituídos por igual volume de metanol 80%. Após 20 min, as absorbâncias foram lidas a 515 nm. A atividade sequestradora do extrato foi expressa em porcentagem, como segue: $\% \text{ atividade} = [(A_{\text{negativo}} - A_{\text{extrato}}) \times 100] / A_{\text{negativo}}$, onde: A_{negativo} (absorbância do controle negativo) e A_{extrato} (absorbância do extrato).

No ensaio com o reagente de Folin-Ciocalteu, uma alíquota de 20 µL dos extratos foi adicionada a 200 µL de água ultrapura e 20 µL do reagente Folin-Ciocalteu (Dinâmica®). Entre 5-8 min, foi adicionado a essa mistura 60 µL de uma solução saturada de carbonato de sódio (250 mg/mL utilizada após formação de um precipitado). Após 30 min, as absorbâncias foram lidas a 760 nm. Através de uma curva de calibração de ácido gálico (0 - 120 µg/mL), os valores foram calculados em equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extrato.

2.7. Análises estatísticas

Todos os dados foram obtidos em réplicas ($n = 3$), submetidos a teste de normalidade de Anderson-Darling e de homocedasticidade de Brown-Forsythe e transformados quando não houve homocedasticidade ou normalidade. Comparações entre os tipos de macerações foram feitas por ANOVA unifatorial e, quando houve diferenças, foram submetidas ao teste *a posteriori* de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP (desvio padrão). O software para processamentos dos dados, obtenção dos gráficos e análises estatísticas foi o GraphPad 6®.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Interferentes e rendimentos dos extratos

Após a secagem e ressuspensão em metanol dos extratos metanólico e hidrometanólico 80% de *G. caudata* foi observada a formação de um precipitado branco cristalino (Fig. 2). A análise desse precipitado mostrou ser constituído por pelo menos 80% de sais equivalentes a cloreto de sódio. Essa observação foi confirmada independente do solvente usado na extração ou do tipo de maceração, ou seja, se a temperatura ambiente ou a quente (Fig. 3).

Figura 2. Precipitado (seta) formado a partir da ressuspensão em metanol (100 mg/mL) do extrato metanólico seco.

Na literatura é bem conhecido que organismos marinhos, incluindo as algas, podem acumular alto teor de sais nos seus corpos, principalmente, cloreto de sódio e cloreto de potássio (Brownlee et al. 2012). No caso de algas, essa característica é explorada comercialmente como substituinte ao uso do sal comercial na alimentação (Brownlee et al. 2012).

Durante o processo de extração do material algáceo em metanol ou metanol 80% houve extração destes sais, além de outros metabólitos, sem a formação de precipitado. No entanto, ao ressuspender este extrato seco em um volume menor de solvente (ex. 100 mg/mL), a quantidade de sal presente acabou saturando o solvente e o sal precipitou. Dessa forma, esta pode ser uma técnica adotada para precipitação de sais por metanol bastante eficaz.

A possibilidade de separação do sal de um extrato através da sua diluição em volumes reduzidos de solvente metanólicos se mostrou bastante interessante, pois a presença destes sais oferece uma grande dificuldade em se trabalhar com extratos de organismos, ricos nessas

substâncias. Estes sais, quando presentes, são interferentes importantes, podendo subestimar ou superestimar resultados de alguns ensaios biológicos. Em ensaios de fitotoxicidade, por exemplo, o cloreto de sódio pode atuar de diferentes formas sobre o desenvolvimento da planta testada dificultando a interpretação dos resultados (Parida & Das 2005). Cloreto de sódio pode também reduzir a reatividade de anticorpos e, assim, subestimar os resultados de imuniensaios (Pace 2009).

Figura 3. Teor de sais equivalentes ao cloreto de sódio (%) dos precipitados formados nos extratos metanólico e hidrometanólico 80% de *Gracilaria caudata* obtidos por maceração a temperatura ambiente e a quente. Valores expressos em médias $\pm$ DP ($n = 3$). As letras iguais indicam que não houve diferenças significativas entre as macerações (ANOVA unifatorial; $p < 0.05$).

O precipitado formado representou cerca de 60% dos extratos metanólico e hidrometanólico 80%, independentemente do tipo de maceração (Fig. 4). Esse resultado reforça a importância da retirada destes sais dos extratos, pois como a massa em relação ao rendimento do extrato original é considerável, poderia subestimar o resultado de rendimento, além de influenciar resultados de bioatividade e dificultar o isolamento biomonitorado. Após a precipitação dos sais nos extratos alcoólicos foram calculados os rendimentos de todos os extratos (Fig. 5). Os maiores rendimentos foram obtidos para os extratos mais polares. Os extratos metanólicos, para as duas formas de macerações, renderam em torno de 3% e os obtidos

em metanol 80% renderam cerca de 2%. Já os extratos mais apolares, hexânico e diclorometânico, renderam menos de 1% (Fig. 5). Ao se comparar a maceração a quente e a maceração a temperatura ambiente, com um mesmo solvente, não houve diferenças significativas (Fig. 5).

Dessa forma, podemos sugerir que a matriz vegetal é constituída principalmente por componentes mais polares. Este resultado é similar a muitos trabalhos utilizando distintas matrizes vegetais como, por exemplo, Kokabi et al. (2013) estudando diferentes grupos de algas.

Figura 4. Porcentagens correspondentes ao precipitado e a parte solúvel em metanol dos extratos metanólicos e hidrometanólico 80% após a ressuspensão dos extratos.

Figura 5. Rendimento em relação a massa seca dos extratos de *Gracilaria caudata* obtidos através de maceração a quente e a temperatura ambiente para os extratos hexânico, diclorometânico, metanólico e hidrometanólico 80%. Valores expressos em médias $\pm$ DP ($n = 3$). Letras diferentes sobre a barra significam que as médias diferem significativamente entre si (Anova unifatorial e *posteriori* de Tukey; $p < 0,05$).

3.2. Análise química dos extratos metanólico e hidrometanólico 80%

Em espectrofotômetro de UV/visível, os extratos em metanol apresentaram absorbâncias menores do que os extratos hidrometanólico 80% (Fig. 6). Além disso, a maceração a quente foi mais eficiente, principalmente para os extratos em hidrometanólico 80%, pois apresentou absorbâncias e valor de área sob a curva significativamente maiores (Fig. 6).

No geral, os extratos apresentaram cinco picos de absorção, em 225 nm, 270 nm, 330 nm, 401 nm e 665 nm, visíveis, principalmente, no extrato em metanol 80% a quente. Essas bandas máximas de absorção podem evidenciar a presença de distintas substâncias: clorofila *a* (máxima absorção em 400 e 665 nm), aminoácidos tipo micosporina (máxima absorção entre 310 a 360 nm) (Barre et al. 2014), substâncias fenólicas (máxima absorção em 270 nm) e acetogeninas (máxima absorção em 225 nm). A maior intensidade dessas bandas de absorção máxima no extrato em metanol 80% sugere que, em termos quantitativos, este solvente foi mais eficiente na obtenção de substâncias que absorvem na região estudada (200-750 nm).

Os resultados em espectrofotômetro de UV/visível evidenciaram três bandas de absorção importantes em termos de caracterização química e busca por produtos naturais: 225

nm, 270 nm e 330 nm e, por isso, esses comprimentos de onda foram adotados para análises em CLAE-DAD.

Análises em espectrofotômetro de UV/visível, apesar de serem mais simples, servem como análises exploratórias iniciais dos extratos em termos quantitativos e qualitativos.

Figura 6. Espectro de varredura entre 200 – 750 nm obtido em espectrofotômetro de UV/visível dos extratos metanólico e hidrometanólico 80% de *Gracilaria caudata* comparando maceração a quente e a temperatura ambiente. Médias das absorbâncias para cada extrato padronizadas para a concentração de 5 mg/mL. Na tabela, área sob a curva para cada extrato. Valores expressos em médias ± DP (n = 3). Letras diferentes significam que as médias diferem significativamente entre si (Anova unifatorial e *posteriori* de Tukey; p < 0,05).

Nas análises em CLAE-DAD, os extratos em metanol e metanol 80% apresentaram perfis cromatográficos similares. Nos primeiros 6 min estão presentes os picos de substâncias que absorvem fortemente em 225 e/ou 270 nm e nos minutos seguintes os picos que de substâncias que absorvem fortemente em torno de 330 nm, identificados como aminoácidos tipo micosporina (MAAs) (Fig. 7).

MAAs são característicos de algas gracilarioides (Sinha et al. 2000; Cardozo et al. 2011). Essas substâncias são altamente polares e absorvem fortemente entre 310 a 360 nm. Os

MAAs encontrados em *G. caudata* foram identificados como porphyra 334, chinorina, palitina, palitinol e asterina 330 (Fig. 7), composição similar a outras Gracilariaceae (Torres et al. 2016), incluindo a amostra de *Gracilaria caudata* (= *Hydropuntia caudata*) analisada por Marques (2015).

Figura 7. Perfil cromatográfico representativo dos extratos metanólico e hidrometanólico 80% de *Gracilaria caudata*. Em destaque, substâncias com absorção máxima em 225 e/ou 270 nm e os aminoácidos tipo micospolina com absorção máxima em torno de 330 nm (porphyra 334, chinorina, palitina, palitinol e asterina 330). O cromatograma representa a sobreposição dos picos obtidos em 225, 270 e 330 nm.

Em termos qualitativos, não houve diferenças entre as amostras extraídas a quente ou a temperatura ambiente em um mesmo tipo de solvente comparando os cromatogramas obtidos em 270 nm e 330 nm. Em termos quantitativos diferenças significativas entre as duas formas de extração foram obtidas somente para as substâncias detectadas no cromatograma processado em 270 nm do extrato hidrometanólico 80%. (Fig. 8). Os MAAs, detectados no cromatograma processado em 330 nm, foram melhores extraídos em metanol 80% e não houve diferenças significativas em macerar a quente e a temperatura ambiente (Fig. 8).

Figura 8. Comparação quantitativa entre a maceração a quente e a temperatura ambiente para os extratos metanólico e hidrometanólico 80% de *Gracilaria caudata* para as substâncias com absorção máxima em 270 nm e 330 nm (aminoácidos tipo micosporina). Valores expressos em médias $\pm$ DP ($n = 3$). Letras diferentes sobre a barra significam que as médias diferem significativamente entre si (Anova unifatorial e *posteriori* de Tukey; $p < 0,05$).

Analisando os MAAs isoladamente, observamos que porphyrina 334 foi o componente majoritário tanto no extrato metanólico como no hidrometanólico 80%, sendo porém melhor extraído na maceração a quente em metanol 80% (Fig. 9). Palitinol não foi detectado no extrato obtido com metanol. Marques (2015), estudando a mesma espécie de alga, verificou que porphyrina 334 também foi majoritário.

Com o exposto, os resultados indicam que estas substâncias, aminoácidos tipo micosporina, são melhores extraídas a quente e na presença de solventes hidroalcoólicos, como já sugerido por Tartarotti & Sommaruga (2002) que já haviam verificado que esses MAAs são melhores extraídos em metanol 25% e a quente (45 °C) do que em metanol e a frio (4 °C).

Figura 9. Comparação quantitativa entre a maceração a quente e a temperatura ambiente para as diferentes aminoácidos tipo micospolina nos extratos metanólico e hidrometanólico 80% de *Gracilaria caudata*. Valores expressos em médias $\pm$ DP ($n = 3$). Letras diferentes sobre a barra significam que as médias diferem significativamente entre si (Anova unifatorial e *posteriori* de Tukey; $p < 0,05$). P334 = Porphyra 334; Ch = Chinorina; PI = Palitina; P = Palitinol; A330 = Asterina 330.

3.3. Análise química dos extratos hexânico e diclorometânico

Os extratos hexânico e diclorometânico apresentaram oito picos majoritários nas análises em CG-EM, dos quais quatro não foram possíveis de serem identificados. Foram identificados: *n*-heptadecano, fitona, ácido hexadecanoico e colesterol (Tabela 1). O ácido hexadecanoico ou palmítico é o principal ácido graxo encontrado para várias algas gracilarioides, incluindo *G. caudata*, *Gracilaria birdiae* E. M. Plastino & E. C. Oliveira e *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie (Gressler et al. 2010; Tomaz et al. 2012). O alceno *n*-heptadecano também vem sendo identificado como um dos principais alcanos nesse grupo. A cetona 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, conhecida por fitona, está, provavelmente, relacionada com o metabolismo de clorofila (Alves et al. 2001), já que a estrutura é muito similar ao fitol e vem sendo identificada em diversas espécies de organismos fotossintetizantes. Já o colesterol é um esteroide comum em algas vermelhas (Govindan et al. 1993). Dessa forma, as substâncias majoritárias dos extratos de *G. caudata* estão em conformidade com a literatura.

Tabela 1. Substâncias encontradas nos extratos hexânico e diclorometânico de *Gracilaria caudata*. n.i. = não identificado. TR = tempo de retenção.

TR* (min)	Substância proposta	Principais fragmentos (m/z) e abundância relativa	Similaridade* (%)
12,17	<i>n</i> -heptadecano	41 (25), 43 (52,9), 44 (100), 55 (18,8), 56 (14), 57 (79,2), 69 (10), 70 (10,2), 71 (56,6), 85 (37,3)	>90
13,74	Substância 1 (n.i.)	41 (55,4), 43 (66,7), 44 (53), 55 (56,9), 57 (62,1), 68 (100), 69 (63,2), 81 (47,8), 82 (78,8), 95 (72,5)	-
13,79	Fitona	41 (28,4), 43 (100), 44 (69,8), 55 (32,6), 57 (36), 58 (78,4), 59 (36,4), 69 (24,6), 71 (47,5), 85 (25,3)	>90
15,10	Substância 2 (n.i.)	41 (63,9), 43 (43,1), 44 (39,5), 55 (100), 67 (39,3), 69 (69,3), 83 (51), 84 (42,8), 88 (56,7), 97 (38,4)	-
15,32	Ácido hexadecanoico	41 (20), 43 (27,4), 55 (23,2), 57 (16,9), 69 (13,7), 70 (14,6), 73 (15,6), 88 (100), 89 (16,1), 101 (54,6)	>90
16,97	Substância 3 (n.i.)	41 (59,6), 43 (43,5), 55 (100), 69 (73,1), 83 (51,3), 84 (37,8), 88 (50,3), 96 (36,4), 97 (45,4), 101 (38,4)	-
23,92	Colesterol	43 (100), 55 (81,3), 67 (65,1), 79 (65,3), 81 (67,2), 91 (66,4), 95 (71,8), 105 (76,8), 107 (74,8), 145 (74,7)	>90
26,86	Substância 4 (n.i.)	43 (71,6), 44 (100), 57 (74,9), 68 (76,6), 69 (57,5), 81 (57,7), 82 (73,7), 95 (67,3), 123 (54,7), 207 (83,9)	-

*Reflete o resultado obtido na biblioteca NIST

Não houve diferenças qualitativas entre os extratos obtidos por maceração a quente ou a temperatura ambiente para ambos solventes (Tabela 2). Os extratos hexânicos apresentaram seis componentes majoritários. O ácido hexadecanoico foi o principal metabólito para este extrato, sendo o maior teor relativo obtido para maceração a temperatura ambiente (79%), contra 49,5% na maceração a quente. Já o teor relativo para o colesterol foi maior quando macerado a quente. Os extratos em diclorometano apresentaram cinco componentes majoritários, sendo *n*-heptadecano o principal para a maceração a temperatura ambiente e ácido hexadecanoico para a maceração a quente.

Para o teor de ácido hexadecanoico, o hexano a temperatura ambiente foi mais eficiente que a extração a quente, por outro lado, o diclorometano à temperatura ambiente foi menos eficiente na extração dessa substância. Ao final, houve uma compensação entre as extrações para esta substância, não sendo possível afirmar qual o tipo de extração mais eficiente. Em

termos quantitativos, é possível afirmar que colesterol foi melhor extraído a quente e o *n*-heptadecano melhor extraído a temperatura ambiente. Para as outras substâncias parece ser indiferente o tipo de maceração.

Tabela 2. Abundâncias relativas das substâncias presentes nos extratos hexânico e diclorometânico comparando maceração a quente e a temperatura ambiente em *Gracilaria caudata*. Valores expressos em médias $\pm$ DP ($n = 3$). Letras diferentes para uma mesma substância significam que as médias diferem significativamente entre si (Anova unifatorial e *posteriori* de Tukey; $p < 0,05$).

Substância	Hexânico		Diclorometânico	
	Ambiente	Quente	Ambiente	Quente
<i>n</i> -heptadecano	-	-	$42,3 \pm 11,9^C$	$12,0 \pm 3,0^{DEF}$
Substância 1 (n.i.)	$4,3 \pm 1,2^{EF}$	$7,2 \pm 0,7^F$	$6,5 \pm 6,5^F$	$9,1 \pm 10,4^F$
Fitona	-	-	$25,8 \pm 7,5^D$	$13,2 \pm 5,5^{DEF}$
Substância 2 (n.i.)	$4,5 \pm 1,7^F$	$4,0 \pm 0,4^F$	-	-
Ácido hexadecanoico	$79,0 \pm 5,3^A$	$49,5 \pm 6,0^{BC}$	$15,1 \pm 0,9^{DEF}$	$59,7 \pm 11,5^B$
Substância 3 (n.i.)	$8,1 \pm 3,3^F$	$3,3 \pm 1,6^F$	-	-
Colesterol	$2,7 \pm 0,1^F$	$23,3 \pm 5,2^{DE}$	$10,3 \pm 2,8^{EF}$	$5,9 \pm 2,0^F$
Substância 4 (n.i.)	$1,4 \pm 0,3^F$	$12,8 \pm 1,9^{DEF}$	-	-

3.4. Avaliação das capacidades antioxidantes

Comparando-se a eficiência dos extratos frente ao ensaio do DPPH, não foram observadas diferenças entre extrair a quente ou a temperatura ambiente (Fig. 10). No entanto, no ensaio utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu foi verificada uma diferença significativa entre macerar a quente e a temperatura ambiente para o extrato hidrometanólico 80% (Fig. 10). O maior potencial antioxidante do extrato hidrometanólico 80% extraído a quente está, provavelmente, relacionado a maior eficiência da extração de algumas substâncias, como visto anteriormente (Fig. 6).

O aumento da capacidade antioxidante de extratos obtidos a quente já foi relatado em alguns trabalhos (Soong & Barlow 2004). Entretanto, dependendo da temperatura usada, também é comum a redução destas atividades indicando degradação das substâncias (Moure et al. 2001). Dessa forma, parece que a temperatura usada para maceração no presente trabalho

foi adequada, ou pelo menos, não levou a degradação de substâncias potencialmente antioxidantes.

Figura 10. Capacidades antioxidantes frente ao ensaio do radical DPPH e ao ensaio do reagente do Folin-Ciocalteu para os diferentes extratos de *Gracilaria caudata*. Valores expressos em médias $\pm$ DP ($n = 3$). Letras diferentes sobre a barra significam que as médias diferem significativamente entre si (Anova unifatorial e *posteriori* de Tukey; $p < 0,05$).

4. CONCLUSÃO

A matriz vegetal de *G. caudata* é constituída, principalmente, por componentes mais polares como MAAs. Os componentes majoritários dos extratos mais apolares, possíveis de serem identificados, foram ácido hexadecanoico, *n*-heptadecano, colesterol e fitona. No geral, os constituintes presentes nessa matriz vegetal, além do potencial antioxidante dos extratos polares, parecem não ser afetados pela temperatura de maceração. Dessa forma, sugerimos que a maceração a quente é mais vantajosa em relação a maceração a temperatura ambiente, reduzindo o tempo de extração. Cabe ressaltar que o presente trabalho demonstrou a importância da remoção dos sais dos extratos polares obtidos a partir de algas, já que o alto teor de sal pode interferir nos rendimentos e nas análises de bioatividade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves C, Pio C, Duarte A (2001) Composition of extractable organic matter of air particles from rural and urban Portuguese areas. *Atmospheric Environment* 35:5485–5496.

- Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, et al. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering* 117:426–436.
- Barre S La, Roullier C, Boustie J (2014) Mycosporine-Like Amino Acids (MAAs) in biological photosystems. In: Barre S La, Kornprobst J-M (eds) *Outstanding marine molecules*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp 333–360.
- Blunt JW, Copp BR, Munro MHG, et al. (2010) Marine natural products. *Natural product reports* 20:1–48.
- Brownlee I, Fairclough A, Hall A, Paxman J (2012) The potential health benefits of seaweed and seaweed extract. In: Pomin VH (ed) *Seaweed: ecology, nutrient composition and medicinal uses*. Nova Science Pub Inc, New York, pp 119–136.
- Cardozo KHM, Marques LG, Carvalho VM, et al. (2011) Analyses of photoprotective compounds in red algae from the Brazilian coast. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21:202–208.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG (2000) Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan B, Gruissem W, Jones R (eds) *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, pp 1250–1318.
- Eahamban K, Antonisamy JM (2012) Preliminary Phytochemical, UV-VIS, HPLC and Anti-bacterial Studies on *Gracilaria corticata* J. Ag. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2:S568--S574.
- Furlan CM, Santos KP, Sedano-Partida MD, et al. (2015) Flavonoids and antioxidant potential of nine Argentinian species of *Croton* (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Botanica* 38:693–702.
- Govindan M, Hodge JD, Brown KA., Nunez-Smith M (1993) Distribution of cholesterol in Caribbean marine algae. *Steroids* 58:178–180.
- Gressler V, Yokoya NNS, Fujii MTM, et al. (2010) Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. *Food Chemistry* 120:585–590.
- Hartmann A, Becker K, Karsten U, et al. (2015) Analysis of mycosporine-like amino acids in selected algae and cyanobacteria by hydrophilic interaction liquid chromatography and a novel MAA from the red alga *Catenella repens*. *Marine Drugs* 13:6291–6305.
- Hu G, Yuan J, Sun L, et al. (2011) Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. *Marine drugs* 9:514–525.
- Kokabi, Maryam; Yousefzadi, Morteza; Ali ahmadi A, Feghhi, Mohamad Amin; Keshavarz M (2013) Antioxidant activity of extracts of selected algae from the Persian Gulf, Iran. *Journal of the Persian Gulf (Marine Science)* 4:6–11.
- Leal MC, Munro MHG, Blunt JW, et al. (2013) Biogeography and biodiscovery hotspots of macroalgal marine natural products. *Natural Product Reports* 30:1380–90.
- Maschek JA, Baker BJ (2008) The chemistry of algal secondary metabolism. In: Amsler CD (ed) *Algal chemical ecology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 1–24.

- Marques LG (2015) *Aminoácidos tipo micosporina: novas metodologias e distribuição em macroalgas da costa brasileira*. Universidade de São Paulo: Tese (Doutorado em Bioquímica). 164p.
- Moure A, Cruz JM, Franco D, et al (2001) Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* 72:145–171.
- Pace GE (2009) Optimization of immunohistochemical reactions. In: Taylor CR, Rudbeck L (eds) *Immunohistochemical staining methods*, 6th ed. pp 109–14
- Parida AK, Das AB (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60:324–349.
- Sinha RP, Klisch M, Groniger A, Häder DP (2000) Mycosporine-like amino acids in the marine red alga *Gracilaria cornea* - effects of UV and heat. *Environmental and Experimental Botany* 43:33–43.
- Soong Y, Barlow PJ (2004) Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry* 88:411–417.
- Tartarotti B, Sommaruga R (2002) The effect of different methanol concentrations and temperatures on the extraction of mycosporine-like amino acids (MAAs) in algae and zooplankton. *Archives of Hydrobiology* 154:691–703.
- Tomaz ACDA, Miranda GEC De, Souza MDFV, Cunha EVL (2012) Analysis and characterization of methyl esters of fatty acids of some *Gracilaria* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 44:303–306.
- Torres PB, Chow F, Ferreira MJP, dos Santos DYAC (2016) Mycosporine-like amino acids from *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta) and its variation under high light. *Journal of Applied Phycology* 28:2035–2040.
- Torres PB, Chow F, Furlan CM, et al. (2014) Standardization of a protocol to extract and analyze chlorophyll *a* and carotenoids in *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui*. Zhang and Xia (Rhodophyta). *Brazilian Journal of Oceanography* 62:57–63.
- Waterman PG, Mole S (1994) Extraction and chemical quantification. In: *Analysis of phenolic plant metabolites*, 1st ed. Wiley-Blackwell, pp 333–360.

CAPÍTULO II

Caracterização química dos principais constituintes de *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta)

RESUMO

Espécies de *Gracilaria* Greville são de grande importância econômica, porém poucas possuem algum estudo com detalhes sobre a composição química. No presente trabalho foi avaliado o perfil químico de *Gracilaria caudata* J. Agardh e *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie, duas macroalgas que ocorrem no litoral brasileiro. As algas apresentaram, no geral, uma composição química semelhante, com as mesmas classes principais de metabólitos, a saber, alcanos, ácidos graxos livres, açúcares livres, ácidos sulfônicos, aminoácidos livres, esteróis, heterosídeos, lipídios polares, monoacilgliceróis, polissacarídeos sulfatados, aminoácidos tipo micosporina e sais halogenados. Ésteres de ácidos graxos, ácidos carboxílicos aromáticos, fitol e o derivado fitona, diidroactinidiolideo também foram detectados em pequenas quantidades. Os resultados desse trabalho, junto com dados da literatura, sugerem grande diversidade química para espécies de *Gracilaria*, ampliando o conhecimento disponível para Rhodophyta.

Palavras-chaves: Rhodophyta, *Gracilaria*, caracterização química, CG-EM, CLAE-DAD, polissacarídeos sulfatados, aminoácidos tipo micosporina.

ABSTRACT

Species of *Gracilaria* Greville are known by their large economic importance. However, there are few species with a description of detailed chemical characterization. In the present study, the chemical profile of *Gracilaria caudata* J. Agardh and *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie, two macroalgae occurring in the Brazilian coast, were evaluated. In general the chemical profiles of both algae, *G. caudata* and *G. domingensis* were similar and presented the same major classes of metabolites such as alkanes, free fatty acids, free sugars, sulfonic acids, free amino acids, sterols, heterosides, polar lipids, monoacylglycerols, sulphated polysaccharides, mycosporine-like amino acids and halogenated salts. Esters of fatty acids, aromatic carboxylic acids, phytol and phytone derivative dihydroactinidiolide were also detected in small amounts. The results of this study, along with literature data, suggest a great chemical diversity for *Gracilaria* species, increasing the knowledge available for Rhodophyta.

Keywords: Rhodophyta, *Gracilaria*, chemical characterization, GC-MS, HPLC-DAD, sulfated polysaccharides, mycosporine-like amino acids.

1. INTRODUÇÃO

Apesar do vasto litoral do Brasil, a exploração de algas marinhas não é tradicional no país. Possivelmente, em decorrência disso, abordagens fitoquímicas também não são tão frequentes, acarretando em pouco conhecimento sobre a química das algas brasileiras. Segundo a revisão sobre produtos naturais de algas marinhas publicada por Leal et al. (2013), apenas cerca de 1% das substâncias em algas marinhas foram isoladas por grupos de pesquisas brasileiros.

Entre os metabólitos isolados em algas marinhas, mais da metade são provenientes de Rhodophyta (1962-2012) (Leal et al. 2013). As Rodófitas têm apresentado uma diversidade química única, com esqueletos de carbono bem distintos daqueles encontrados em plantas terrestres como, os bromofenóis (Liu et al. 2011) e os aminoácidos tipo micosporina (MAAs, do inglês *Mycosporine-like Amino Acids*) (Karsten et al. 1998). Neste filo, as classes químicas predominantes são terpenos e acetogeninas (Maschek & Baker 2008). Metabólitos halogenados são comuns, sendo que cerca de 90% destes metabólitos descritos em algas são provenientes de Rhodophyta. Algas do complexo *Laurencia* (Rhodomelaceae, Ceramiales) são as mais estudadas, sendo responsáveis por boa parte dos metabólitos isolados neste filo (Maschek & Baker 2008).

Espécies de *Gracilaria* Greville são de grande importância econômica dentro do Filo Rhodophyta, sendo a principal fonte do ficocoloide ágar. Além disso, também são exploradas em menor intensidade para uso direto na alimentação (Armisen 1997; Santelices 2014). Apesar da importância das espécies desse gênero, poucos estudos fitoquímicos estão disponíveis para elas. A maior parte da química do gênero é voltada para os polissacarídeos sulfatados, devido, principalmente, a importância do ágar. Outros metabólitos como proteínas, carboidratos, fibras, pigmentos (carotenoides, clorofila *a* e ficobiliproteínas) e ácidos graxos também são estudados com frequência, principalmente, em estudos com abordagens fisiológicas, ecológicas e nutricionais. Excetuando estes tipos de estudos, que são mais voltados para metabolismo primário, poucos artigos são voltados para a caracterização química ou isolamento de metabólitos secundários.

Das cerca de 186 espécies de *Gracilaria* (Guiry 2016) apenas 21 possuem algum estudo fitoquímico com identificações de substâncias, divulgados em cerca de 72 artigos publicados no período de 1970 a 2016 (Tabela 1), sendo a maior parte com ênfase em uma classe específica. Um exemplo é o trabalho de Cardozo et al. (2011) estudando MAAs. As algas mais relatadas são *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss e *Gracilaria edulis* (S. G. Gmelin) P. C. Silva, & E. C. Oliveira. *Gracilaria verrucosa*, entretanto, apontada em um total de 16 trabalhos, merece um olhar mais cuidadoso visto ser, atualmente, referida como *Gracilariopsis longissima*

(S.G.Gmelin) Steentoft, L.M.Irvine & Farnham, no entanto devido a problemas de identificação pode se referir a distintas espécies de *Gracilaria* (Steentoft et al. 1995; Skriptsova & Choi 2009). No geral, faltam estudos fitoquímicos para maior parte das espécies de *Gracilaria*. Estes tipos de estudos são essenciais para diferentes áreas, pois trazem informações básicas sobre a química dessas espécies, além de possibilitarem a descoberta de novas substâncias ou possíveis aproveitamentos para aquelas já conhecidas.

Dessa forma, a importância econômica de *Gracilaria*, associada aos poucos estudos químicos no gênero incentivaram o desenvolvimento do presente trabalho que teve como objetivo avaliar as classes químicas e os principais metabólitos de duas macroalgas que ocorrem no Brasil, *Gracilaria caudata* J. Agardh e *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie.

Tabela 1. Número de estudos fitoquímicos no período de 1970 – 2016 por espécies de *Gracilaria*. “*Gracilaria verrucosa*” atualmente é um *taxon* inválido. *n.i.* = espécie não identificada.

Espécies	Período					Total	Referências
	1970-1990	1991-2001	2002-2006	2007-2011	2012-2016		
<i>Gracilaria birdiae</i>				2	2	4	Cardozo et al. 2011; Souza et al. 2011; Guaratini et al. 2012; Tomaz et al. 2012
<i>Gracilaria bursa-pastoris</i>				1		1	Percot et al. 2009
<i>Gracilaria caudata</i>					1	1	Tomaz et al. 2012
<i>Gracilaria cervicornis</i>					1	1	Tomaz et al. 2012
<i>Gracilaria changii</i>		1	1		1	3	Karsten et al. 1998; Sajiki & Yonekubo 2002; Johari et al. 2013
<i>Gracilaria chilensis</i>			2	1	1	4	Gómez et al. 2005; Lion et al. 2006; Weinberger et al. 2011; Rempt et al. 2012
<i>Gracilaria conferta</i>				1		1	Figueroa et al. 2010
<i>Gracilaria cornea</i>		1		1	1	3	Sinha et al. 2000; Souza et al. 2011; Figueroa et al. 2012
<i>Gracilaria corticata</i>					3	3	Kumari et al. 2014; Kailas & Nair 2015; Rahelivao et al. 2015
<i>Gracilaria debilis</i>					1	1	Kumari et al. 2014
<i>Gracilaria domingensis</i>				2	3	5	Guimarães et al. 2007; Cardozo et al. 2011; Guaratini et al. 2012; Tomaz et al. 2012; Guder et al. 2014
<i>Gracilaria dura</i>					4	4	Upta et al. 2013; Kumari et al. 2014; Kumari et al. 2015; Xu et al. 2015
<i>Gracilaria edulis</i>	2	3			2	7	Gregson et al. 1979; Das et al. 1989; Das & Srinivas 1992a; Das & Srinivas 1992b; Whitfield et al. 1999; Sakthivel et al. 2016; Sheeja 2016
<i>Gracilaria foliifera</i>	1	1		1	1	4	Premuzic et al. 1982; Hayee-Memon et al. 1991; Alarif et al. 2010; Kailas & Nair 2015
<i>Gracilaria gigas</i>				1		1	Hsu et al. 2007
<i>Gracilaria longa</i>		1				1	Pollesello et al. 1992
<i>Gracilaria salicornia</i>		1			2	3	Karsten et al. 1998; Nasir et al. 2011; Kumari et al. 2014
<i>Gracilaria secundata</i>		1				1	Whitfield et al. 1999

Continuação da Tabela 1

<i>Gracilaria tenuistipitata</i>		1	4		5	Collén et al. 2004; Cardozo et al. 2008; Hsu et al. 2008; Barufi et al. 2011; Cardozo et al. 2011
<i>Gracilaria texorii</i>				1	1	Kumari et al. 2014
<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	2	2	2	8	14	Kajiwara et al. 1993; Sajiki & Kakimi 1998; Sajiki & Yonekubo 2002; Sun et al. 2006; Illijas et al. 2008; Nylund et al. 2011; Rempt et al. 2012; Rybin et al. 2013; Farvin & Jacobsen 2013; Barbosa et al. 2015; Santos et al. 2015; Hammann et al. 2016; Honda et al. 2016; Wang et al. 2016
“ <i>Gracilaria verrucosa</i> ”	6	2	4	6	16	Doyle & Patterson 1972; Fusetani & Hashimoto 1984; Kinoshita et al. 1986; Son 1988; Araki et al. 1989; Son 1990; Noguchi et al. 1994; Imbs et al. 2001; Khotimchenko 2002; Dang et al. 2003; Shueb & Jaspars 2003; Khotimchenko & Vas’kovsky 2004; Aydoğmuş et al. 2008; Dang et al. 2008; Lee et al. 2009; Dang et al. 2010
<i>n.i.</i>		1		1	2	Wilcox et al. 2001; Wilcox et al. 2007
<i>Total de artigos</i>	9	13	9	20	21	72

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta do material

As macroalgas vermelhas estudadas foram coletadas na zona entremarés em duas praias no nordeste brasileiro em 2013. *Gracilaria caudata* foi coletada na Praia de Mãe Luiza (Natal – Rio Grande Norte) pela Prof.^a Dr.^a Eliane Marinho-Soriano (Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN) (Fig. 1) que também realizou a identificação. *Gracilaria domingensis* foi coletada, independente das variantes de cores (esverdeada ou avermelhada), na Praia Morro de Pernambuco (Ilhéus – Bahia), tendo sua identificação confirmada pela Dr.^a Beatriz Nogueira Torrano da Silva por meio de *DNA BarCode* (Fig. 2). Os materiais coletados foram lavados em água corrente para retirada de restos de areia, epífitos, epibiontes e fauna acompanhante e excesso de sal, secos ao sol para transporte e no laboratório secos em estufa (temperatura < 40 °C) por 7 dias.

Figura 1. Local de coleta de *Gracilaria caudata* em Natal (RN) (A) na Praia de Mãe Luiza (B). Aspecto geral da alga (C) e detalhes dos talos cilíndricos (D). Foto dos Mapas: Google Maps®. Fotos das algas: cortesia da Prof.^a Dr.^a Eliane Marinho-Soriano.

Figura 2. Local de coleta de *Gracilaria domingensis* em Ilhéus (BA) (A) no Morro de Pernambuco (B). Aspecto geral da alga (C) e detalhes dos talos achatados das duas variantes de cores (esverdeada e avermelhada) (D). Foto dos Mapas: Google Maps®. Fotos das algas: Priscila Bezerra Torres

2.2. Método de extração, particionamento e fracionamento

Os materiais algáceos secos (350 g de *G. caudata* e 1000 g de *G. domingensis*) foram pulverizados e submetidos a maceração seriada à quente (50 ± 5 °C) por 8 h com solventes de ordem crescente de polaridade (10%, w/v): hexano, diclorometano, metanol e metanol 80%. Em seguida, os solventes foram evaporados em rotaevaporador (temperatura < 50 °C). O extrato aquoso foi obtido a partir de uma porção do resíduo final por maceração em água (50 ± 5 °C) (5%, w/v) por 8 h e depois liofilizado.

Os procedimentos para obtenção das fases de partição e frações estão esquematizados na figura 3. Os extratos brutos obtidos em metanol e metanol 80% foram ressuspensos em metanol utilizando o menor volume possível de solvente para solubilizar todo o extrato e visualizar o precipitado. Estes precipitados, independente da origem, foram reunidos, formando a fração chamada precipitado. Os sobrenadantes foram mantidos separados, rotaevaporados e liofilizados, caracterizando os extratos metanólico e hidrometanólico 80%.

Figura 3. Fluxograma para obtenção dos extratos, fases de partição e frações para caracterização química de *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*. As fases de partição foram obtidas de todos os extratos brutos (destaque da caixa em cinza), exceto o aquoso. No caso dos extratos metanólico e hidrometanólico 80%, esta partição foi feita após a separação dos precipitados. Extratos brutos: H = hexânico, D = diclorometânico, M = metanólico, M80 = hidrometanólico 80% e A = Aquoso. CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. CCD = Cromatografia em Camada Delgada.

Os extratos brutos hexânico, diclorometânico, metanólico e hidrometanólico 80% foram particionados entre diclorometano e metanol 50% obtendo-se, para cada um deles, uma fase de partição diclorometânica (chamada de fase de partição apolar - a partir do diclorometano) e uma fase de partição metanólica (chamada de fase de partição polar - a partir do metanol 50%). As fases de partição obtidas foram fracionadas, dependendo da massa do extrato e da sua

composição química, em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência semipreparativa (CLAE – semipreparativa), coluna cromatográfica de sílica (fase reversa) ou Cromatografia em Camada Delgada preparativa (CCD-preparativa).

2.3. Análises químicas das amostras

De maneira geral, as amostras obtidas no item 2.2 (extratos brutos, fases de partição e frações), exceto o extrato aquoso, tiveram seus constituintes majoritários determinados em Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia à Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de Diodo (CLAE-DAD).

2.3.1. Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Alíquotas das fases de partição dos extratos hexânico e diclorometânico de concentrações conhecidas foram aplicadas em placa cromatográfica de silicagel (60 F - Merck). A fase móvel para a cromatografia foi constituída de uma mistura de hexano: éter dietílico: ácido acético (80:20:1, v/v) (Bartz et al. 2007). A placa foi revelada com vapor de iodo em câmara fechada. Foram usados como padrões ácido linoleico (Sigma-Aldrich), triaciglicerol e colesterol a partir da gema de ovo de galinha (Robyt & White 1987).

2.3.2. Análises químicas em Cromatografia à Gas acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

Alíquotas dos extratos (exceto o aquoso), fases de partição e frações foram derivatizadas por reação com 50 µL de N, O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) em 50 µL de piridina por 30 min a 80 °C. Em seguida, as amostras foram analisadas em CG-EM (Agilent 6890N/5975) na seguinte programação de análise: $T_0 = 100$ °C por 6 min, 15 °C/min até 225 °C, 5 °C/min até 300 °C, mantido isotérmico por 9 min. A coluna empregada foi a HP-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm). O gás de arraste utilizado foi o hélio com fluxo de 1 mL/min. A temperatura de injeção foi de 300 °C. O espectrômetro de massas foi ajustado com os seguintes parâmetros: temperatura da fonte = 230 °C, temperatura do quadrupolo = 150 °C, voltagem da eletromultiplicadora (EM) = 70 eV, amplitude de detecção de massa = 40 a 1000 unidades de massa atômica com 2,64 scan/s. O teor relativo de cada componente principal foi calculado a partir da área total, sendo excluídos os componentes com áreas inferiores a 1%. A identificação dos componentes foi feita através do banco de dados NIST/NBS (aceitos índice de similaridade > 900) e através de comparação com dados da literatura.

2.3.3. Análises químicas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de Diodo (CLAE-DAD)

Extratos brutos, frações e fases de partição exceto os extratos aquosos foram analisados em CLAE-DAD em cromatógrafo da marca Agilent 1260. Foi empregada a coluna de fase normal Zorbax RX-SIL (250 mm x 4,6 mm x 5 µm). A fase móvel utilizada foi um gradiente de acetonitrila: acetato de amônio (5 mM) (9:1; v/v) (A) e acetonitrila: acetato de amônio (5 mM) (1:1; v/v) (B), com a seguinte programação: 20% A (0 min), aumentando para 55% A até 15 min e descendo para 20% A até 16 min e ficando constante até 21 min. Fluxo: 1 mL/min (modificado de Hartmann et al. 2015). Temperatura da coluna = 30 °C. Detecção em 225, 270, 320, 330 e 360 nm. Os MAAs, substâncias majoritárias, foram identificados conforme o item 2.4.

2.4. Identificação e isolamento dos aminoácidos tipo micosporina (MAAs)

A fase de partição polar obtida a partir do extrato metanólico de *G. domingensis* (Fig. 3) foi submetida ao isolamento dos MAAs.

Primeiramente, esta fase de partição foi submetida a fracionamento em CLAE-semipreparativa em cromatógrafo da marca Agilent 1200 series. Foi utilizada uma coluna de fase normal Zorbax RX-SIL (9,4 mm × 250 mm × 5 µm) a 30 °C e fase móvel isocrática composta de 32% de ácido acético 0,2% e 68% de acetonitrila por 20 min. O fluxo foi de 4 mL/min e as substâncias monitoradas nos comprimentos de onda de 225, 270 e 330 nm. Foram coletadas três frações: fração 1 enriquecida com os MAAs porphyra 334 e chinorina, fração 2 enriquecida com os MAAs palitina e palitinol e fração 3 enriquecida com os MAAs asterina 330 e palitinol. As frações coletadas foram novamente submetidas a CLAE-semipreparativa com as mesmas condições anteriores, porém utilizando fases móveis específicas para o isolamento de cada MAA:

- Fração 1: método isocrático com 20% de uma mistura de acetonitrila: metanol: água (80:10:10) (pH 2.2 ajustado com ácido trifluoroacético - TFA) e 80% de acetonitrila por 10 min. Obteve-se chinorina e porphyra 334.

- Frações 2 e 3: gradiente formado por ácido acético 0,2% (A) e acetonitrila (B) sendo de 0 a 15 min a variação de A indo de 20% para 55%, depois até os 16 min voltando para 20% de A. Obteve-se asterina 330, palitina e palitinol.

Os MAAs foram identificados por meio das seguintes técnicas: CLAE-DAD acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-DAD-EM) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono—

^{13}C) e de Próton (RMN – ^1H) com auxílio do Prof. Dr. Marcelo José Pena Ferreira (Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - IB-USP). As análises de CLAE-DAD-EM e RMN foram realizadas na central analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP).

A CLAE-DAD-EM foi realizada em um cromatógrafo da marca Shimadzu (controladora: CBM-20A, bombas: LC-20AD, detector: SPD-20A, forno: CTO-20A e auto-injetor: SIL 20AC) e espectrômetro de massas modelo Amazon Speed ETD (Bruker). Foi empregada a coluna de fase normal Zorbax RX-SIL (250 mm x 4,6 mm x 5 μm) com fase móvel conforme o item 2.3.3. A fonte de ionização do espectrofotômetro de massas foi por *electrospray* (modo positivo) e o analisador do tipo *Ion trap*. Os parâmetros foram os seguintes: capilar: 4500 V, nebulizador: 27 psi, gás de desolvatação: nitrogênio (7 L/h) e temperatura de secagem: 300 °C.

As análises de RMN foram realizadas no equipamento Bruker Avance III. Alíquotas das substâncias isoladas chinorina, palitina e porphyrina 334 foram dissolvidas em água deuterada (>10 mg/mL) e transferidas para tubos de 5 mm. A frequência base para ^1H foi 500,13 MHz e para o núcleo de ^{13}C , 125,77 MHz.

2.5. Análises químicas dos extratos aquosos

2.5.1. Teor proteico e de carbono

Alíquotas dos extratos aquosos foram submetidas a análises elementares no analisador Perkin-Elmer (CHN 2400 series II) na Central Analítica do IQ-USP. Foram obtidos os valores em porcentagem de carbono e de nitrogênio. O conteúdo de proteína foi estimado usando o fator de correção 6,25 sobre a porcentagem de nitrogênio obtida conforme FAO (2003).

2.5.2. Teor de enxofre

O valor de enxofre para os polissacarídeos sulfatados foi obtido por turbidimetria utilizando cloreto de bário com metodologia adaptada para espectrofotômetro de microplacas (Elisa) (Synergy™ H1) a partir de Yoshimura (2006).

Os extratos aquosos a serem avaliadas foram dissolvidos a 10 mg/mL em ácido clorídrico (0,5 N). Uma parte destes extratos foram hidrolisados em banho seco a 100 °C por 2 h. Após esfriar, o conteúdo foi transferido para microtubos, os quais foram centrifugados a 14000 RPM por 3 min em temperatura ambiente. O resíduo foi descartado e o sobrenadante foi usado para análise. Outra parte da amostra não foi aquecida e passou pelas etapas seguinte. Na

amostra hidrolisada é aferido o teor de enxofre total, enquanto na amostra não hidrolisada é aferido o teor de enxofre não esterificado.

O reagente turbidimétrico foi preparado dissolvendo 50 mg de gelatina de origem animal em pó em 10 mL de água ultrapura fervente. A esta solução foram adicionados 500 mg de cloreto de bário, 500 mg de cloreto e sódio e mais 20 mL de água ultrapura. O volume final da solução foi ajustado para 50 mL.

Em microplaca de 96 poços, foram adicionados, em cada poço, 50 µL do reagente turbidimétrico, 125 µL de água ultrapura e 25 µL da amostra hidrolisada ou não hidrolisada. Em seguida, a placa ficou agitando por 5 min a 200 RPM em temperatura ambiente e depois ficou em repouso por 15 min. A leitura de absorbância da placa foi realizada a 405 nm. Para o controle negativo, o volume da amostra foi substituído por ácido clorídrico (0,5 N). A curva padrão foi feita com sulfato de sódio diluído em diferentes concentrações entre 0 a 1000 µg/mL, através da qual foram calculados os teores de enxofre para amostra hidrolisada e não hidrolisada. O valor do teor de enxofre do polissacarídeo (TS) foi calculado descontando o valor obtido com a amostra não hidrolisada (N) do valor obtido com a amostra hidrolisada (H): $TS (\%) = H (\%) - N (\%)$. O grau de substituição dos polissacarídeos por grupos sulfatos (GS) foi estimado conforme Melo et al. (2002) a partir das porcentagens de enxofre (TS) e de carbono (C) utilizando a seguinte fórmula: $GS (\%) = 4,5 \times TS (\%) / C (\%)$.

2.5.3. Análises de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*) foram realizadas utilizando espectrofotômetro Bruker Alpha FTIR, com os espectros obtidos na faixa de 400 a 4000/cm.

As amostras foram submetidas a duas técnicas de RMN monodimensionais: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN- ^{13}C) e Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN - 1H). Para isso, alíquotas do extrato aquoso foram dissolvidas em água deuterada (40 mg/mL para RMN de ^{13}C e 10 mg/mL para RMN de 1H) e transferidas para tubos de 5 mm. Em seguida, as amostras foram analisadas no espectrômetro BRUKER (modelo DRX 400). A frequência base para 1H foi 400,13 MHz e para o núcleo de ^{13}C , 100,63 MHz. A temperatura foi de 70 °C. O padrão interno usado foi acetona (deslocamento químico: 30,2 e 2,224 para ^{13}C e 1H , respectivamente).

As ambas análises (FTIR e RMN) foram realizadas na Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob a orientação do Prof. Dr. Miguel Nosedá e da Dr.^a Luciana Garcia Ferreira.

2.6. Análises químicas dos precipitados

Análises elementares de alíquotas dos precipitados foram realizadas conforme o item 2.5.1. Além disso, os teores de íons halogenados e equivalentes de cloreto de sódio foram estimados por turbidimetria em microplacas de 96 poços. Este ensaio foi adaptado a partir do método de Mohr. O reagente turbidimétrico consiste de uma solução composta por 50 mg de gelatina de origem animal em pó dissolvido em 1 mL de água ultrapura fervente, 800 mg de nitrato de prata e 50 mL de água ultrapura. Em cada poço foram adicionados 125 µL de água ultrapura, 25 µL do reagente turbidimétrico e 25 µL da amostra a 1 mg/mL dissolvida em água ultrapura. Após 15 min, a absorbância das soluções foi obtida à 405 nm em espectrofotômetro para microplacas (Elisa) (Synergy™ H1). O controle negativo foi feito com água ultrapura e a curva padrão com cloreto de sódio (0 a 1000 µg/mL) substituindo o volume da amostra.

2.7. Processamento dos dados e Heatmap

O software para processamento dos dados e obtenção dos gráficos foi o GraphPad 7®. O Heatmap foi construído a partir das quantidades dos metabólitos primários e secundários principais, normalizando de 0 - 100 os valores obtidos de uma determinada classe química independente do solvente usado para o extrato. As estruturas moleculares foram representadas no software Accelrys Draw 4.1®.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Rendimentos dos extratos brutos

O rendimento dos extratos, em porcentagem relativa a massa seca, para ambas as algas foram semelhantes (Tabela 2). A soma dos extratos de *G. caudata* rendeu 51,83% e para *G. domingensis* rendeu 56,23%. Os extratos mais abundantes foram os aquosos, 36,03% para *G. caudata* e 34,40% para *G. domingensis*, enquanto os extratos mais apolares, obtidos com hexano e diclorometano, foram os que menos renderam, com valores menores que 1%. Rendimentos intermediários foram obtidos para os extratos metanólicos e hidrometanólicos 80%. Para *G. caudata* os rendimentos foram 3,21% e 1,01%, respectivamente, menores que os obtidos para *G. domingensis* (6,52% e 2,91%, respectivamente). Os precipitados separados dos extratos metanólicos e hidrometanólicos 80%, após as análises químicas, foram reunidos e renderam em torno de 11% para as duas algas (Tabela 2).

Tabela 2. Rendimentos totais (% em relação a massa seca) dos extratos de *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*.

Extrato	<i>Gracilaria caudata</i>	<i>Gracilaria domingensis</i>
Hexânico	0,24	0,42
Diclorometânico	0,31	0,31
Metanólico	3,21	6,52
Hidrometanólico 80%	1,01	2,91
Precipitado *	11,00	11,70
Aquoso	36,03	34,40
<i>Total</i>	51,83	56,23

*Precipitado obtido dos extratos metanólico e hidrometanólico 80%.

3.2. Principais classes químicas

As principais classes químicas dos extratos brutos estão resumidas nas figuras 4 e 5. Os extratos hexânico e diclorometânico, mais apolares, foram melhores avaliados via CG-EM e CCD. A CCD revelou a presença clara de ácidos graxos livres, triacilgliceróis e lipídios polares (Fig. 4). Lipídios polares, geralmente fosfolipídios e glicolipídios, são componentes comuns de membranas (Khotimchenko et al. 1990) e foram encontrados nos extratos avaliados das duas algas. Triacilgliceróis foram verificados apenas em *G. domingensis*. As análises em CG-EM evidenciaram como principais classes dos extratos hexânico e diclorometânico os ácidos graxos livres, os esteróis e os alcanos. Porém, em *G. domingensis* os monoacilgliceróis também foram encontrados (Fig. 5).

Figura 4. Caracterização das principais classes lipídicas em *Gracilaria caudata* (A) e *Gracilaria domingensis* (B) com referência aos padrões (1 = padrão da gema de Ovo e 2 = padrão de ácido linoleico) (C). HA e HP são referentes ao extrato hexânico (HA = fase de partição apolar e HP = fase de partição polar); DA e DP são referentes ao extrato diclorometânico (DA = fase de partição apolar e DP = fase de partição polar). Revelação da placa com vapor de iodo. Fase móvel: hexano: éter dietílico: ácido acético (80:20:1, v/v).

Os extratos metanólicos e hidrometanólicos 80% foram avaliados quimicamente via CG-EM e CLAE-DAD. Nesses extratos obtidos das duas espécies de *Gracilaria* analisadas, os MAAs foram os principais componentes detectados através de CLAE-DAD. No entanto, a maior parte das substâncias destes extratos foram identificadas por CG-EM. No geral, os extratos metanólicos e hidrometanólicos 80%, além de MAAs, apresentaram ácidos sulfônicos, monossacarídeos e heterosídeos. Aminoácidos livres foram proeminentes nos extratos metanólicos 80% e os ácidos tricarboxílicos foram expressivos apenas em *G. domingensis* (Fig. 5).

Os extratos aquosos apresentaram como componentes majoritários polissacarídeos sulfatados. Os precipitados obtidos dos extratos metanólicos e hidrometanólicos 80% apresentaram alto teor de íons halogenados indicando a grande presença de sais halogenados, como cloreto de sódio.

Em resumo, é possível afirmar que *G. caudata* e *G. domingensis* apresentam, no geral, uma composição química semelhante, compartilhando as mesmas classes principais de metabólitos, sendo elas: alcanos, ácidos graxos livres, ácidos sulfônicos, aminoácidos livres,

esteróis, heterosídeos, lipídios polares, monoacilgliceróis, monossacarídeos, polissacarídeos sulfatados, MAAs e sais halogenados.

Figura 5. Heatmap com as abundâncias relativas das principais classes dos metabólitos identificados nos diferentes extratos de *Gracilaria caudata* (A) e *Gracilaria domingensis* (B). Dentro de uma mesma classe química, as cores, do branco para preto, representam do menos ao mais abundante numa escala de 0-100. Extratos brutos: H = hexânico, D = diclorometânico, M = metanólico e M80 = hidrometanólico 80%.

3.3. Composição das classes químicas

A composição química de cada uma das classes anteriormente mencionadas será discutida a seguir. Foram identificadas 50 substâncias no total. As abundâncias relativas de cada uma das substâncias sugeridas estão nas tabelas 3, 5 e 7.

Tabela 3. Abundância relativa (% da área total) dos principais metabólitos presentes no extratos de *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis* identificados por cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) (Espectros de massas estão no Apêndice II). Extratos brutos: H = hexânico, D = diclorometânico, M = metanólico e M80 = hidrometanólico 80%.

Substância proposta*	<i>Gracilaria caudata</i>				<i>Gracilaria domingensis</i>			
	H	D	M	M80	H	D	M	M80
<i>Ácidos carboxílicos aromáticos</i>								
Ácido benzoico						<1		
Ácido fenilacético	<1	<1				<1		
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico			<1					
<i>Ácidos graxos livres</i>								
Ácido araquidônico	<1	<1			1,3			
Ácido esteárico	1,2	<1			<1	1,4		
Ácido mirístico	4,2	3,6			11,2	10,1	<1	<1
Ácido oleico	<1	<1	<1	<1	2,0		<1	<1
Ácido palmítico	79,6	84,1	18,4	8,5	50,6	66,3	8,3	5,8
Ácido palmitoléico	<1	<1	<1				<1	<1
Ácido pentadecanoico	<1	<1	<1		<1			
<i>Ácidos dicarboxílicos</i>								
Ácido adípico			<1					
Ácido azelaico	<1	<1						
Ácido glutárico			<1					
Ácido pimélico			<1					
Ácido succínico	<1	<1	<1				<1	
<i>Ácidos tricarboxílicos</i>								
Ácido cítrico								1,3
<i>Ácidos sulfônicos</i>								
Ácido isetiônico			11,9	16,9			3,8	7,5
<i>Alcaloides</i>								
<i>N</i> -(2-feniletil)-acetamida	<1	<1						
<i>Alcanos</i>								
<i>n</i> -Heptadecano	1,4	<1			1,6	1,0		

Continuação da Tabela 3

<i>Aminoácidos e derivados</i>								
Ácido aspártico							<1	
Ácido piroglutâmico							<1	1,5
Asparagina							<1	
β-Alanina			<1					
Glicina				<1			<1	
Glutamina			<1	1,21	<1	<1	<1	1,7
Lisina							<1	
Ornitina			<1	1,21			<1	1,2
Prolina							<1	
Serina							<1	
Treonina							<1	
Valina			<1				<1	
<i>Ésteres de ácidos graxos</i>								
Hexadecanoato de metila	<1	<1	<1	<1			<1	<1
Hexadecanoato de etila	<1	<1						
Tetradecanoato de metila	<1	<1						
Monomiristina						<1	<1	
Monopalmitina	<1	<1	<1	<1	2,4	2,5	<1	<1
<i>Esteróis</i>								
Colesterol	4,2	4,1	1,0		28,1	2,9	<1	<1
β-Sitosterol	<1	<1						
<i>Monossacarídeos</i>								
Ácido treonico			1,2	2,3	<1		<1	1,1
Ácido glicérico			<1	<1			<1	
L-Treonolactona			<1	1,4				
Xilulose			<1					
<i>Outros</i>								
Glicerol			1,2		<1	1,56	<1	
Heterosídeos	<1	<1	58,2	56,2	1,2	<1	76,9	68,2
<i>Terpenóides</i>								
Diidroactinidiolideo	<1							
Fitol					<1	<1	<1	<1
Fitona	<1	<1	<1	<1				
<i>Vitaminas</i>								
Ácido pantoténico			<1					
Niacina			<1					
Niacinamida					<1	<1		
<i>Total identificado</i>	56	60	77	80	100	58	75	76

*As identificações foram feitas pela comparação dos espectros de massas com o banco de dados da biblioteca NIST, considerando probabilidades acima de 900, e confirmados com a literatura.

3.3.1. Ácidos carboxílicos aromáticos

Os ácidos carboxílicos aromáticos foram encontrados nos extratos em quantidades inferiores a 1% (Tabela 3). Estas substâncias se caracterizam por apresentarem pelo menos um anel benzênico e uma carboxila funcional. Nesta classe o ácido fenilacético foi comum nas duas espécies analisadas, enquanto o ácido benzoico foi detectado apenas em *G. domingensis* e o ácido *p*-hidroxibenzoico apenas em *G. caudata* (Fig. 6) (Tabela 3).

Figura 6. Estruturas moleculares dos ácidos carboxílicos aromáticos identificados em *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*.

O ácido fenilacético é encontrado naturalmente em diversos grupos de organismos. É uma auxina (hormônio vegetal) ativa em plantas terrestres e já foi detectado em diferentes algas marinhas como, por exemplo, nas macroalgas pardas *Colpomenia peregrina* Sauvageau e *Scytosiphon lomentaria* (Lyngbye) Link (Kamenarska et al. 2006) e nas macroalgas vermelhas *Bostrychia radicans* (Montagne) Montagne (De Oliveira et al. 2012) e *Bostrychia tenella* (J. V. Lamouroux) J. Agardh (De Felício et al. 2010). Entretanto, até onde conseguimos apurar, este parece ser o primeiro relato para espécies de *Gracilaria*.

Esta substância parece atuar como regulador de crescimento em cultivos *in vitro* da macroalga vermelha *Pyropia tenera* (Kjellman) N. Kikuchi, M. Miyata, M. S. Hwang & H. G. Choi (= *Porphyra tenera*) (Fries & Iwasaki 1976), da macroalga parda *Fucus spiralis* Linnaeus (Fries 1977) e da macroalga verde *Ulva compressa* Linnaeus (= *Enteromorpha compressa*) (Fries & Åberg 1978), sugerindo seu papel como regulador de crescimento não só em plantas terrestres, como também em algas marinhas. Quanto à via de biossíntese do ácido fenilacético, há evidências que seja formado a partir do aminoácido aromático fenilalanina (Cook et al. 2016).

Os ácidos benzoico e *p*-hidroxibenzoico fazem parte da família dos ácidos benzoicos que, por definição, engloba o ácido benzoico propriamente dito e todos derivados C₆-C₁ (Widhalm & Dudareva 2015). A maioria destas substâncias é fenólica, ou seja, apresenta um grupo fenol (pelo menos um anel aromático de 6 átomos de carbonos ligado a uma hidroxila funcional) como no ácido *p*-hidroxibenzoico. A via de biossíntese dos ácidos benzoicos toma parte na via do chiquimato.

Na literatura foram encontrados somente três trabalhos com *Gracilaria* que identificaram as substâncias aromáticas. Xu et al. (2015) estudando *Gracilaria dura* (C. Agardh) J. Agardh encontraram os ácidos benzoicos, ácido vanílico e ácido *p*-hidroxibenzoico, além do álcool aromático tirosol, pertencente ao grupo dos álcoois fenéticos. Farvin & Jacobsen (2013) encontraram uma série de ácidos benzoicos: ácido gálico, ácido gentísico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido protocatecuico, ácido salicílico, ácido siríngico e ácido vanílico em *G. vermiculophylla*, além de traços de ácido clorogênico. Já Souza et al. (2011) estudando *Gracilaria birdiae* E. M. Plastino & E. C. Oliveira e *Gracilaria cornea* J. Agardh encontraram ácido gálico.

3.3.2. Ácidos graxos livres

Ácidos graxos são ácidos monocarboxílicos (uma única carboxila) que apresentam uma cadeia de carbono alifática saturada ou insaturada. Geralmente, são encontrados esterificados constituindo membranas celulares, lipídios de reserva e, em plantas terrestres, na cutícula e no súber. No entanto, ácidos graxos livres podem ser encontrados naturalmente como precursores na biossíntese ou acumulado como consequência da peroxidação lipídica quando a planta passa por um algum tipo de estresse, como dessecação, por exemplo (Barclay & McKersie 1994).

Os ácidos graxos livres foram encontrados em todos os extratos analisados, perfazendo a classe mais abundante quantitativamente nos extratos mais apolares. No geral, há predomínio de ácidos graxos saturados, a saber, ácidos mirístico, pentadecanoico, palmítico e esteárico (Fig. 7) (Tabela 3).

O ácido mirístico (ácido tetradecanoico - C₁₄:0) foi encontrado apenas nos extratos mais apolares. Em *G. caudata* este ácido graxo correspondeu a 4,2% do extrato hexânico e 3,5% do diclorometânico, enquanto em *G. domingensis*, estes valores foram de 11,2% e 20,2%, respectivamente. O ácido palmítico (ácido hexadecanoico - C₁₆:0) foi o principal ácido graxo, presente em todos os extratos avaliados. Em *G. caudata*, os extratos obtidos com hexano, diclorometano, metanol e metanol 80% apresentaram, respectivamente, 79,6%, 84,1%, 18,4% e 8,5% deste ácido graxo. Quantidades inferiores foram encontradas em *G. domingensis*, sendo

50,6%, 66,3%, 8,3% e 5,8% para os extratos hexânico, diclorometânico, metanólico e hidrometanólico 80%, respectivamente. Os ácidos esteárico (ácido octadecanoico - C18:0) e pentadecanoico (C15:0) foram minoritários, aparecendo no máximo em torno de 1% nos extratos apolares.

Os principais ácidos graxos insaturados foram os ácidos palmitoleico (C16:1; *n*-7), oleico (C18:1; *n*-9) e araquidônico (C20:4; *n*-6). Todos foram encontrados em concentrações inferiores a 1% em *G. caudata*; já em *G. domingensis* o ácido oleico e ácido araquidônico foram encontrados nos extratos hexânicos com 1,3% e 2%, respectivamente.

Trabalhos semelhantes ao presente estudo, por exemplo, Santos et al. (2015) estudando *G. vermiculophylla* e Xu et al. (2015) estudando *G. dura*, também encontraram majoritariamente ácidos graxos saturados, principalmente, o ácido palmítico, e baixas concentrações de ácidos graxos insaturados. Os resultados obtidos foram bastante similares a estudos com algas frescas ou liofilizadas, como o de Gressler et al. (2010) estudando *G. domingensis* e *G. birdiae*. Entretanto, os teores encontrados de ácidos graxos insaturados foram maiores na literatura.

Figura 7. Estruturas moleculares dos principais ácidos graxos identificados em *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*.

3.3.3. Ácidos dicarboxílicos e tricarboxílicos

Os ácidos dicarboxílicos e tricarboxílicos encontram-se bem distribuídos nos extratos, tendo sido detectados tanto nos extratos mais polares (metanólicos e hidrometanólicos 80%), como nos extratos mais apolares (hexânicos e diclorometânico) (Fig. 8) (Tabela 3). Na maioria, estão

presentes em quantidades inferiores a 1% nos extratos, exceto o ácido cítrico, uma das substâncias majoritárias do extrato hidrometanólico 80% de *G. domingensis*.

O ácido cítrico está presente em todos os organismos aeróbios em decorrência do ciclo de Krebs, ou ciclo do ácido cítrico. No entanto, apenas algumas plantas o acumulam naturalmente, destacando-se as frutas cítricas, como limão e laranja. Trata-se de um ácido tricarboxílico, ou seja, que possui três carboxilas funcionais. É amplamente utilizado na indústria alimentícia como regulador de acidez em bebidas e gerador de sabor ácido em alimentos (Roehr 1998). Em algas marinhas há poucos relatos do ácido cítrico como um dos componentes principais. Nylund et al. (2011) relataram a presença deste ácido em *G. vermiculophylla* em quantidades superiores a 1%, semelhante ao obtido para *G. domingensis* no presente trabalho.

Os ácidos dicarboxílicos são substâncias com duas carboxilas funcionais, sendo, muitos deles, importantes na indústria, como, por exemplo, o ácido azelaico amplamente empregado para combate de acne (Cornils & Lappe 2000). Foram identificados os ácidos adípico, azelaico, glutárico, pimélico e succínico, todos em quantidades inferiores a 1%. Estas substâncias foram detectadas somente em *G. caudata*, exceto o ácido succínico presente também em *G. domingensis*.

Ácidos dicarboxílicos já foram identificados em diferentes algas vermelhas. Aqui serão enfatizados apenas os estudos envolvendo espécies de *Gracilaria*. Xu et al. (2015), estudando *G. dura*, identificaram alguns ácidos dicarboxílicos como os ácidos azelaico, adípico e succínico, também detectados no presente trabalho, além dos ácidos subérico, sebácico, undecanedioico e alfa-hidroxi-glutárico, estes últimos não encontrados em *G. caudata* e *G. domingensis*. Santos et al. (2015), estudando *G. vermiculophylla*, identificaram apenas ácido azelaico e ácido sebácico.

Várias funções são atribuídas aos ácidos dicarboxílicos. Spoel & Dong (2012) verificaram que o ácido azelaico está envolvido no sistema de defesa de plantas terrestres. O ácido glutárico aparece como um intermediário na biossíntese de alguns aminoácidos (Gholson et al. 1959), enquanto, o ácido succínico como um intermediário do ciclo de Krebs (González & González 2012) e o ácido pimélico como precursor da vitamina biotina (Zoeller et al. 2012). No entanto, como são raros os estudos sobre a função destas substâncias em algas marinhas, pouco se sabe sobre a função destes ácidos dicarboxílicos nestes organismos (González & González 2012).

3.3.4. Ácidos sulfônicos

Os extratos metanólicos e hidrometanólicos 80% de ambas algas, *G. caudata* e *G. domingensis*, foram ricos em ácido isetiônico (Fig. 8). Os extratos metanólico e hidrometanólico 80% de *G. caudata* apresentaram 11,9% e 16,9%, respectivamente, enquanto os de *G. domingensis* apresentaram 3,8% e 7,5% (Tabela 3). Como os extratos obtidos com metanol e metanol 80% apresentaram bom rendimento (Tabela 1), o ácido isetiônico trata-se de uns dos principais metabólitos identificados nestas algas.

O ácido isetiônico é um ácido sulfônico encontrado em vários animais, inclusive no ser humano. Em organismos fotossintetizantes, foi identificado pela primeira vez na alga vermelha *Gayliella flaccida* (Harvey ex Kützinger) T. O. Cho & L. J. McIvor (= *Ceramium flaccidum*) (Barrow et al. 1993). Desde então, já foi encontrado em diferentes algas vermelhas como *Chondrus crispus* Stackhouse, *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamouroux e *Gracilariopsis lemaneiformis* (Bory de Saint-Vincent) E. Y. Dawson (Holst et al. 1994; Broberg et al. 1998). Em *Gracilaria*, o primeiro relato foi por Upta et al. (2013) estudando *G. dura*.

Não há estudos da via de biossíntese destas substâncias em algas marinhas. Em animais, o ácido isetiônico é biossintetizado a partir de taurina via o aminoácido cisteína. Tanto em animais como nas algas, ainda é bem controversa a função deste metabólito. Simon-Colin et al. (2004) observaram redução deste ácido na alga vermelha *Grateloupia doryphora* (Montagne) M. Howe submetida a aumento da salinidade; já em um outro trabalho o ácido isetiônico foi tóxico e impediu a fixação das larvas do cirripédio *Balanus amphitrite* no substrato (Hellio et al. 2004). Estes achados podem sugerir algum envolvimento dessa substância com processos de defesa nessas algas.

3.3.5. Alcaloides

Os extratos hexânico e diclorometânico de *G. caudata* apresentaram o alcaloide *N*-(2-feniletil)-acetamida em pequenas quantidades (Fig. 8) (Tabela 3). Este alcaloide é pertencente a classe das feniletilaminas nomeada graças ao esqueleto estrutural básico de mesmo nome, formado por um grupo fenil ligado a uma amina via um grupo etila. Esta classe de alcaloides é uma das mais comuns em algas marinhas, sendo encontrada em algas pardas, algas verdes e, principalmente, em algas vermelhas (Güven et al. 2010).

Pouco se sabe sobre a função destes alcaloides para os organismos marinhos. Entretanto, seus efeitos são bem conhecidos sobre os seres humanos. Dentro desta classe estão importantes substâncias que atuam sobre o sistema nervoso central como, as anfetaminas, além de substâncias alucinógenas, como, por exemplo, a mescalina.

A *N*-(2-feniletil)-acetamida já foi encontrada em diferentes organismos como plantas terrestres e fungos (Maskey et al. 2003). Dentro das macroalgas, foi identificada pela primeira vez na macroalga vermelha *Gracilaria* “*verrucosa*” (Aydoğmuş et al. 2008) e isolada em *G. lemaneiformis* (= *Gracilaria lemaneiformis*) (Lu et al. 2011). Ainda que comum em algas vermelhas, no presente estudo este alcaloide foi detectado somente em *G. caudata*.

3.3.6. Alcanos

Alcanos são hidrocarbonetos de estruturas acíclicas e saturadas. São comuns em diferentes organismos, como plantas terrestres, animais, micro e macroalgas. Seu estudo em organismos marinhos remonta do começo do século XX com objetivo de entender a formação do petróleo (mistura complexa de hidrocarbonetos). Pesquisadores daquela época inicialmente chegaram a acreditar que o petróleo era produzido por estes organismos (Tornabene 1981).

Algas vermelhas possuem, preferencialmente, o alcano *n*-heptadecano, molécula de cadeia ímpar com 17 átomos de carbonos (Fig. 8) (Youngblood et al. 1971). No presente trabalho, este mesmo alcano foi identificado nos extratos mais apolares, obtidos com hexano e diclorometano, das duas algas em quantidades, no geral, superiores a 1%. Quantidade inferior a 1% foi detectada somente no extrato obtido com diclorometano de *G. caudata* (Tabela 3). *n*-Heptadecano também foi detectado em *G. birdiae*, *G. caudata*, *Gracilaria cervicornis* (Turner) J. Agardh e *G. domingensis* estudadas por Tomaz et al. (2012), *G. vermiculophylla* estudada por Santos et al. (2015) e *G. dura* por Xu et al. (2015).

Não há estudos a respeito da biossíntese destas substâncias em rodófitas. Schirmer et al. (2010), estudando cianobactérias ricas em *n*-heptadecano, sugeriram que a biossíntese destas substâncias em algas é similar ao processo de biossíntese descrito para plantas terrestres. Ácidos graxos são convertidos a aldeídos que, subsequentemente, sofrem descarboxilação formando os alcanos. A função destas substâncias para organismos marinhos ainda permanece um mistério. Youngblood et al. (1971), estudando algumas algas verdes e pardas, descobriram um acúmulo de hidrocarbonetos insaturados nos tecidos reprodutivos e nos tecidos jovens, quando comparado aos tecidos mais maduros.

Figura 8. Estruturas moleculares dos ácidos dicarboxílicos, ácido tricarboxílico, ácido sulfônico, alcano e alcaloide identificados em *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*.

3.3.7. Aminoácidos e derivados

Aminoácidos são substâncias que apresentam uma carboxila e uma amina. São classificados em dois tipos: os proteicos, que são constituintes de proteínas e os não-proteicos, que não apresentam uma função na síntese dessas macromoléculas. Aminoácidos dos dois tipos participam de várias funções biológicas no metabolismo primário e secundário (Coruzzi et al. 2015).

Foram identificados diferentes aminoácidos nos extratos das duas algas, principalmente, naqueles polares (Fig. 9) (Tabela 3). A maior diversidade de aminoácidos foi encontrada no extrato metanólico de *G. domingensis*. A maior parte dos aminoácidos identificados em *G. caudata* e *G. domingensis* são proteicos: ácido aspártico, asparagina, glutamina, glicina, lisina, prolina, serina, treonina e valina, sendo glutamina o único presente em quantidades superiores

a 1%. A glutamina é uma importante fonte de amina para biossíntese de outras moléculas nitrogenadas (Coruzzi et al. 2015).

Os aminoácidos β -alanina e ornitina, também presentes nas algas estudadas, não são aminoácidos proteicos. A ornitina é precursora de alcaloides e poliaminas em plantas (Nepal et al. 2010). Esse aminoácido é importante em animais no ciclo da ureia para desintoxicação de NH_3 . Diferentes áreas da medicina e nutrição fazem proveito dos efeitos positivos de ornitina sobre o metabolismo humano, utilizando-o como suplemento para aumentar a performance de atletas, além da aplicação no tratamento de doenças hepáticas (Hayasaka et al. 2011). A presença desse aminoácido também já foi descrita em *G. vermiculophylla* (Nylund et al. 2011).

O aminoácido β -alanina é um precursor do ácido pantoténico (vitamina B₅), um constituinte da coenzima A e, portanto, essencial para o funcionamento do ciclo do ácido cítrico. No presente estudo, esse aminoácido só foi detectado em *G. caudata* em concentrações inferiores a 1%.

O ácido piroglutâmico é um derivado do aminoácido ácido glutâmico e está presente em diferentes grupos de organismos, como plantas terrestres, bactérias e seres humanos. Entretanto, pouco se sabe da função desse metabólito (Kumar & Bachhawat 2012). O ácido piroglutâmico foi encontrado apenas nos extratos polares de *G. domingensis*, atingindo cerca de 1,5% no extrato hidrometanólico 80%. Este aminoácido também já foi encontrado em *G. vermiculophylla* (Nylund et al. 2011).

Figura 9. Estruturas moleculares dos aminoácidos identificados em *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*.

3.3.8. Aminoácidos tipo micosporina (MAAs)

Os MAAs são substâncias nitrogenadas, altamente polares e com alto coeficiente de extinção molar na região do ultravioleta (Carreto & Carignan 2011). Apresentam um esqueleto básico formado por uma unidade de ciclo-hexenimina, comuns em organismos marinhos, ou de ciclo-hexenona, mais comuns em fungos. No entanto, quando presentes nesses últimos organismos são comumente chamados apenas micosporinas.

Em ambas as algas foram identificados cinco aminoácidos tipo micosporina, a saber, asterina 330, chinorina, palitina, palitinol e porphyra 334, principalmente com base nos dados de espectrofotometria de UV/vis e espectrometria de massas (Tabela 4), em conformidade com Cardozo et al. (2008).

Tabela 4. Parâmetros utilizados para as identificações dos aminoácidos tipo micosporina nos extratos de *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*.

Estrutura molecular	Substância proposta	λ_{max} (nm)	$[M+H]^+$
Asterina 330	330	289
Chinorina	332	333
Palitina	320	245
Palitinol	332	303
Porphyra 334	334	347

A identificação dos MAAs chinorina, palitina e porphyra 334 foram confirmadas por RMN – ^{13}C e RMN – ^1H (Tabela 5) sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo José Pena Ferreira (Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo – IB-USP). Os resultados obtidos foram compatíveis com a literatura para chinorina (Oyamada et al. 2008; Barre et al. 2014), palitina (Takano et al. 1978; Tsujino & Yabe 1978) e porphyra 334 (Hirata et al. 1979; Takano et al. 1979).

O sinal em torno de 160 ppm em RMN – ^{13}C para o C1 indica que os três MAAs apresentam um núcleo de ciclo-hexenimina, ou seja, são imino-MAAs. Os sinais referentes as posições na molécula H1', H2', H3' e H4' em RMN – ^1H e C1', C2', C3' e C4' em RMN – ^{13}C são os principais sinais que permitem a diferenciação entre os MAAs analisados. Como esperado, estes sinais foram ausentes nos espectros para palitina. Os sinais para a posição 4' referente a uma metila foram detectados apenas nos espectros para porphyra 334, assim permitindo a diferenciação entre este MAA e chinorina.

Os resultados quantitativos para os MAAs estão na tabela 6. Os extratos metanólicos e hidrometanólicos 80% foram os mais ricos, porém os extratos hexânico e diclorometânico de *G. domingensis* apresentaram traços destas substâncias. Porphyra 334 foi o mais abundante em todos os extratos analisados, seguido de chinorina, exceto para o extrato metanólico de *G. caudata*, no qual a palitina foi o segundo mais expressivo. No geral, palitina foi a terceira mais abundante, acompanhada de asterina 330, sendo o palitinol o MAA menos abundante. *Gracilaria caudata* apresentou menor teor de MAAs totais, com cerca de 1% dos extratos mais polares; já em *G. domingensis* este valor foi bem superior correspondendo no extrato metanólico a 7,77% e no hidrometanólico 80% a 9,55%.

A composição de MAAs por massa seca das duas algas analisadas está também descrita na Tabela 6. *G. caudata* contém 394,31 $\mu\text{g/g}$ de MAAs totais por massa seca, sendo porphyra 334 a majoritária, seguida de palitina, chinorina, asterina 330 e palitinol. *Gracilaria domingensis*, mais rica nestas substâncias, apresentou 7839,64 $\mu\text{g/g}$ de MAAs por massa seca, sendo porphyra 334 também a majoritária, seguida de chinorina, palitina, palitinol e, em menor quantidade, asterina 330. Em ambas as algas, esta classe de substância representou menos de 1% da massa seca total da alga.

Tabela 5. Deslocamentos químicos (ppm) determinados a partir dos espectros de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN – ^{13}C) e de hidrogênio (RMN – ^1H) para os aminoácidos tipo micosporina: chinorina, palitina e porphyr 334.

Posição	Chinorina		Palitina		Porphyr 334	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1		160,4		161,53	2,67 (d, 17,5) 2,73 (d, 17,5)	160,4 3
2		125,5				125,5
3		158,9				158,8 7
4	2,84	33,2	2,60 (d, 17,5) 2,75 (d, 17,5)	33,46		33,19
5		71,0		71,22		70,9
6	2,68	32,8	2,58 (d, 17,5) 2,86 (d, 17,5)	35,69	2,65 (d, 17,5) 2,81 (d, 17,5)	32,76
7		70,99	3,48 (s)	67,31	3,48 (s)	67,33
8	3,59 (s)	60,42	3,56 (s)	58,88	3,60 (s)	59,30
9	3,96 (s)	51,79	3,95 (s)	47,0	3,95 (s)	46,61
10		176,69		174,58		174,5
1'		62,47			3,99 (d)	64,32
2'		176,69				174,5/ 176,9
3'	3,89 (d, 4,0)	64,32			4,21 (dq, 5,5 e 4,5)	68,11
4'					1,16 (d, 6,5)	19,33

Tabela 6. Composição de aminoácidos tipo micoporina (MAAs) dos extratos (%) e da massa seca da alga ($\mu\text{g/g}$) de *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*. H= extrato hexânico, D= extrato diclorometânico, M= extrato metanólico, M80= extrato hidrometanólico 80% e T= valor de MAAs por massa seca da alga.

MAAs	<i>Gracilaria caudata</i>					<i>Gracilaria domingensis</i>				
	H (%)	D (%)	M (%)	M80 (%)	T ($\mu\text{g/g}$)	H (%)	D (%)	M (%)	M80 (%)	T ($\mu\text{g/g}$)
Porphyra 334	-	-	0,35	0,47	151,3	0,04	0,01	5,50	6,72	5535,9
Chinorina	-	-	0,16	0,28	73,5	0,02	-	1,61	2,32	1726,3
Palitina	-	-	0,34	0,23	130,1	-	-	0,54	0,43	473,0
Palitinol	-	-	0,03	0,01	11,4	-	-	0,06	0,05	51,9
Asterina 330	-	-	0,07	0,05	27,8	-	-	0,06	0,06	52,3
<i>Total</i>	-	-	0,96	1,05	394,3	0,07	0,01	7,77	9,55	7839,6

Cardozo et al. (2011), analisando *G. domingensis*, também identificaram porphyra 334 como majoritária, seguida de chinorina e palitina, porém não encontraram asterina 330 e palitinol. Já Marques (2015), também analisando *G. domingensis*, encontrou resultados similares ao do presente trabalho, acrescidos dos isômeros paliteno e usujireno. Para *G. caudata*, o único trabalho encontrado foi o de Marques (2015). Da mesma forma que para *G. domingensis*, a presença dos isômeros paliteno e usujireno foi a única diferença entre o presente trabalho e o referido acima.

Poucos estudos foram feitos com análise de MAAs em Gracilariaceae. Torres et al. (2016), em um levantamento dos dados disponíveis para a família, observaram que, em *Gracilaria*, porphyra 334 e chinorina estão presentes em todas espécies analisadas, sendo palitina, asterina 330 e palitinol bem menos comuns. Este último foi relatado somente por Cardozo et al. (2011) para *Gracilaria tenuistipitata* C. F. Chang & B. M. e agora relatado para as duas espécies aqui estudadas. Usujireno e paliteno também não são comuns em Gracilariaceae. Torres et al. (2016), quando da revisão, tiveram conhecimento da ocorrência de paliteno somente em *G. changii*. Entretanto, com os dados de Marques (2015) temos para *G. caudata* e *G. domingensis* a presença de paliteno e usujireno.

3.3.9. Ésteres de ácidos graxos

Os ésteres de ácidos graxos são formados pela esterificação de moléculas de álcool por moléculas de ácidos graxos, como por exemplo os glicerolípídios, biossintetizados a partir do álcool glicerol. Dois monoacilgliceróis foram identificados nas duas algas analisadas, monopalmitina e monomiristina (Tabela 3) (Fig. 10).

Monopalmitina é um éster de glicerol com uma das suas hidroxilas esterificada por uma molécula de ácido palmítico, já na monomiristina o glicerol está esterificado por uma molécula de ácido mirístico, ambos ácidos graxos saturados.

Em *G. caudata* apenas a monopalmitina está presente, em quantidades inferiores a 1%. Já em *G. domingensis* estão presentes ambos os monoacilgliceróis, sendo a monopalmitina em torno de 2,5% nos extratos apolares (hexânico e diclorometânico) e em quantidades inferiores a 1% nos extratos polares (metanólicos e hidrometanólicos 80%), enquanto a monomiristina foi encontrada apenas em quantidades inferiores a 1%. Monoacilgliceróis já foram identificados anteriormente em *G. vermiculophylla* por Santos et al. (2015), sendo a monopalmitina o principal.

Monoacilgliceróis são substâncias que ocorrem naturalmente em diferentes grupos de organismos. Em plantas terrestres são encontrados em pequenas quantidades nas sementes, além de serem descritos com alguma função na síntese de cutina e suberina (Beisson et al. 2012). No entanto, não há estudos que descrevam a função desta classe lipídica em algas marinhas.

Além dos monoacilgliceróis, foram encontrados um tipo de éster de ácido graxo incomum. Trata-se dos ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos livres (Tabela 3). Foram identificados ésteres do ácido palmítico (hexadecanoato de metila e hexadecanoato de etila) e do ácido mirístico (tetradecanoato de metila), presentes em quantidades inferiores a 1% (Fig. 10). *G. caudata* apresentou os três ésteres, já *G. domingensis* apresentou apenas o hexadecanoato de metila.

Há relatos na literatura da ocorrência natural desses ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos em alguns organismos, como, por exemplo, em sementes de *Jatropha curcas* (Annarao et al. 2008), na microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Herrera-Valencia et al. 2012), diferentes microrganismos (fungos e bactérias) (Saerens et al. 2006) e frutas diversas. Neste último caso, são relatados principalmente ésteres etílicos, sendo esses componentes um dos responsáveis pelo sabor/odor dessas frutas. O octanoato de etila é uma substância bastante comercializada (Jiang & Song 2010). Em macroalgas vermelhas, De Oliveira et al. (2012) isolaram hexadecanoato de metila e 9-octadecenoato de metila de *Bostrychia radicans*, enquanto De Felício et al. (2010) isolaram de *Bostrychia tenella* o hexadecanoato de metila. Estudos são necessários para melhor compreender a função destas substâncias e a sua via de biossíntese.

Figura 10. Estruturas moleculares dos ésteres de ácidos graxos identificados em *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*.

3.3.10. Esteróis

Esteróis são um subgrupo de esteroides e apresentam um esqueleto básico tetracíclico dito ciclopentanoperidrofenantreno com uma cadeia lateral ligada ao carbono C17 do esqueleto, diferindo dos outros esteroides por apresentarem uma hidroxila (OH) no carbono 3 do anel A.

Essas substâncias estão presentes em quase todos eucariotos e são biologicamente importantes, principalmente, por estabilizar membranas e serem precursores de hormônios vegetal e animal. Geralmente são classificadas pelo número de carbono na sua estrutura, podendo ser C₂₇, C₂₈ ou C₂₉.

O principal esterol identificado nas algas estudadas foi o colesterol (C₂₇), tendo sido encontrado traços de β -sitosterol (C₂₉) em *G. caudata* (Fig. 11) (Tabela 3). *G. domingensis* apresentou maior teor de colesterol no extrato obtido com hexano (cerca de 28%), além de cerca de 3% no extrato diclorometânico. Em *G. caudata* os dois extratos mais apolares apresentaram cerca de 4% de colesterol. A presença de colesterol e seus derivados em *G. caudata* já havia sido verificada por Tomaz et al. (2012). Entretanto, esses autores não detectaram colesterol em *G. domingensis*, tendo observado somente a presença de um derivado.

Em algas vermelhas, o esteroide tipicamente predominante é o colesterol e seus derivados (Doyle & Patterson 1972), da mesma forma que em animais. Já em plantas terrestres, são comuns os esteróis campesterol (C_{28}) e sitosterol (C_{29}), enquanto o colesterol está presente em pequenas quantidades (Behrman & Gopalan 2005).

A via de biossíntese do colesterol em organismos fotossintetizantes difere daquela presente em animais, já que esteroides apresentam diferentes precursores. Enquanto o lanosterol é o precursor em animais e fungos, nos organismos fotossintetizantes o cicloartenol é o precursor.

Figura 11. Estruturas moleculares dos esteróis identificados em *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*.

3.3.11. Heterosídeos

Heterosídeos ou glicosídeos são substâncias que possuem resíduos de carboidratos ligados a componentes não glicídicos denominados agliconas. Em algas vermelhas, a maioria dos grupos acumula heterosídeos como o principal produto da fotossíntese, conhecidos comumente por carboidratos de baixa massa molecular (Karsten et al. 1993).

Os principais heterosídeos em algas são floridosídeo e seus isômeros de posição D-/L-isofloridosídeo (Fig. 12). Estas substâncias são constituídas por um resíduo de glicerol (aglicona) ligado glicosidicamente a uma galactose. Nos extratos metanólicos e hidrometanólicos 80% de ambas algas, *G. caudata* e *G. domingensis*, esses heterosídeos foram possíveis de serem identificados de acordo com Meng (1989), sendo majoritários nos extratos (Tabela 3). Entretanto, não foi possível diferenciá-los, pois os padrões de fragmentação em espectrometria de massas são os mesmos.

Figura 12. Estruturas moleculares dos principais heterosídeos identificados em *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*.

O floridosídeo e os isofloridosídeos têm sido bastante estudados sob o ponto de vista fisiológico. O acúmulo dessas substâncias apresenta alta correlação com estresse salino (Martinez-Garcia & Maarel 2016) e dessecação (Qian et al. 2014), indicando sua função como osmólitos.

Em *Gracilaria*, há poucos trabalhos referentes a estas substâncias. Ascencio (2006) detectou aumento de floridosídeos nos estágios reprodutivos de *G. birdiae*. O mesmo foi observado para a linhagem vermelha de *G. domingensis*, distintamente da linhagem verde (Guimarães et al. 2007). Em *G. tenuistipitata* foi verificada uma resposta inversamente proporcional destas substâncias em relação a disponibilidade de nitrogênio, ou seja, quando houve um aumento de nitrogênio houve uma redução de floridosídeo e vice-versa (Collén et al. 2004). Além disso, aparentemente, os floridosídeos estão relacionados com a síntese dos polissacarídeos de paredes (Li et al 2002) e, portanto, podem ter influência direta na qualidade do ágar.

Recentemente, estudos referentes às possíveis atividades biológicas destas substâncias têm sido realizados. O floridosídeo mostrou atuar desativando processos pro-inflamatórios, sendo importantes contra doenças neuro-inflamatórias (Kim et al. 2013). Além disso, também parece atuar sobre a formação do osso promovendo a diferenciação osteogênica *in vitro* regulando marcadores do processo (Ryu et al. 2015). Em outro estudo, Lin et al. (2010) demonstraram a capacidade antioxidante do floridosídeo e do D-isofloridosídeo. Hellio et al. (2004) observaram que o floridosídeo impediu a fixação de larvas do cirripédio *Balanus*

amphitrite ao substrato com a vantagem de ter baixa toxicidade. Essa observação sugere uma aplicação contra bioincrustação.

3.3.12. Monossacarídeos

Monossacarídeos são carboidratos e unidades básicas dos oligossacarídeos e polissacarídeos. Livres, essas moléculas apresentam importantes funções no metabolismo, como regulação ou precursores na síntese de outras substâncias. Foram identificados alguns monossacarídeos nos extratos mais polares de *G. caudata* e *G. domingensis*: ácido treonico, ácido glicérico, L-treonolactona e xilulose (Fig. 13) (Tabela 3).

O ácido treonico foi o mais abundante e, assim como o ácido glicérico, foi detectado nas duas algas. A L-treonolactona e a xilulose foram detectadas apenas em *G. caudata*. Os ácidos treonico, glicérico e a L-treonolactona são, muito provavelmente, originados a partir do metabolismo do ácido ascórbico (Tadao et al. 1996; Loewus 1999). Xu et al. (2015), estudando *G. dura*, identificaram alguns monossacarídeos e dissacarídeos como galactose, maltose e melbiose, todos diferentes daqueles encontrados no presente trabalho.

Figura 13. Estruturas moleculares dos monossacarídeos identificados em *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*.

3.3.13. Polissacarídeos sulfatados

Os extratos aquosos das duas algas apresentaram os maiores rendimentos, em torno de 35% (Tabela 2). Através de técnicas de FTIR e RMN ^{13}C e ^1H realizadas na Universidade Federal do Paraná (UFPR) com a orientação do Prof. Dr. Miguel Nosedá e da Dr.^a Luciana Garcia

Ferreira, as análises desses extratos permitiram verificar que os dois extratos são ricos em polissacarídeos sulfatados.

A técnica de espectroscopia FTIR revelou várias informações sobre os polissacarídeos encontrados em *G. domingensis* e *G. caudata* (Fig. 14) conforme as descrições apresentadas em Melo et al. (2002). Estes polissacarídeos são galactanas, ou seja, constituídos de galactopirranose ou de galactopirranose modificada. Esta informação é confirmada pela presença da banda em 1070/cm. As galactanas em algas vermelhas são constituídas por díades, formadas pelas unidades A e B, repetidas ao longo do polissacarídeo. A unidade A é formada por resíduos de β -D-galactopirranose ligados glicosidicamente em C1 e C3; já a unidade B é formada por resíduos de α -galactopirranose ligados glicosidicamente em C1 e C4 (Usov 1998). A banda em 890/cm permite classificar estas galactanas como agaranas, ou seja, os resíduos de α -galactopirranose (unidade B) são do tipo L. No caso das carregenanas, comuns em algas vermelhas, esses resíduos são do tipo D (Usov 1998). A banda em 930/cm é característica de 3,6-anidro- α -L-galactose (Unidade B). As bandas em 1250/cm e em 1370/cm indicam a presença de éster sulfato, não especificando em qual unidade. A presença da banda próximo a 820/cm em *G. domingensis* indica a presença de α -L-galactose 6-sulfato.

Figura 14. Espectros de infravermelho para os extratos aquosos de *Gracilaria caudata* (A) e *Gracilaria domingensis* (B). As principais bandas foram identificadas com tracejados.

Os dados de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN – ^{13}C) para os extratos das duas algas estão especificados na Tabela 7. Foram verificados os sinais típicos para os resíduos de β -D-galactopiranosose (G) (C1 = 101,9 ppm, C2 = 69,6 ppm, C3 = 81,7 ppm, C4 = 68,3 ou 67,9 ppm, C5 = 75,1 ppm e C6 = 60,9 ppm ou 61,0 ppm) e para o resíduo de 3,6-anidro- α -L-galactose (LA) (C1 = 97,8 ppm, C2 = 69,4 ppm, C3 = 79,6 ppm, C4 = 76,8 ppm, C5 = 75,1 ppm e C6 = 68,8 ppm). Ambos resíduos formam a estrutura básica da agarobiose ($\text{G} \rightarrow \text{LA}$). A presença de sinais adicionais revelam as substituições nesta estrutura básica.

Em *G. caudata*, foram observados sinais que sugerem a presença do resíduo β -D-galactose-4,6-*O*-(1'-carboxietilideno) (GP), ou seja, resíduos de β -D-galactopiranosose substituídos em C4 e C6 por acetal de ácido pirúvico. O sinal típico deste substituinte é o sinal 25,17 ppm atribuído ao carbono metílico do acetal de ácido pirúvico (Garegg & Lindberg 1979). Outros sinais como 79,10 ppm (C3), 71,11 ppm (C4), 66,11 ppm (C5) e 64,80 ppm (C6) já foram determinados anteriormente para os carbonos do resíduo de β -galactopiranosose piruvatado (Murano et al. 1992; Cardoso 2007; Ferreira 2011).

Em *G. domingensis*, o sinal em 58,58 ppm indica a presença de metoxila. A presença dos sinais 68,63 ppm (C4), 73,06 ppm (C5) e 71,31 ppm (C6) sugerem esta metoxila em C6, assim sugerindo o resíduo 6-*O*-metil- β -D-galactose (G6M) (Valiente et al. 1992). Já os sinais 72,48 ppm (C5) e 66,91 ppm (C6) sugerem a presença de substituintes sulfatos em C6, sugerindo o resíduo β -D-galactose 6-sulfato (G6S) (Valiente et al. 1992).

Tabela 7. Deslocamentos químicos (ppm) determinados partir dos espectros de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN – ^{13}C) (Apêndice II) para os extratos aquosos de *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*. Siglas: G = β -D-galactopiranosose; LA = 3,6-anidro- α -L-galactose; GP = β -D-galactose-4,6-*O*-(1'-carboxietilideno); G6M = 6-*O*-metil- β -D-galactose; G6S = β -D-galactose 6-sulfato; OMe = Metoxila; P = carbono metílico do acetal de ácido pirúvico.

Espécie	Resíduos	C1	C2	C3	C4	C5	C6	OMe	P
<i>Gracilaria caudata</i>	G	101,92	69,64	81,77	68,33	75,10	60,99	-	-
	LA	97,84	69,40	79,60	76,86	75,10	68,88	-	-
	GP	-	-	79,10	71,11	66,11	64,80	-	25,17
<i>Gracilaria domingensis</i>	G	101,92	69,68	81,72	67,98	75,13	61,04	-	-
	LA	97,89	69,38	79,64	76,88	75,13	68,88	-	-
	G6M	101,92	69,68	81,72	68,63	73,06	71,31	58,58	-
	G6S	101,92	69,68	81,72	67,98	72,48	66,91	-	-

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN – ^1H) não foram muitos informativos devido à complexidade, por isso são representados apenas os sinais principais na figura 15. A interpretação foi feita com base em Mazumder et al. (2002), Melo et al. (2002) e Barros et al. (2013). No polissacarídeo de *G. caudata*, o intenso sinal em 1,46 ppm foi atribuído aos prótons metil do grupo piruvato, junto com o sinal em 5,24 ppm atribuído a H1 da L-galactose ligada a uma unidade A piruvatada sugere a presença do resíduo α -L-galactose ligado ao resíduo β -D-galactose piruvatada, sendo estimado 15,5% deste tipo de substituição pela integração dos sinais anoméricos.

Nos polissacarídeos de ambas algas apareceu um sinal de baixa intensidade em 3,53 ppm correspondente a prótons do grupo metil 2-*O* sugerindo a presença de 2-*O*-metil-3,6-anidro- α -L-galactose cujos correspondentes RMN- ^{13}C não foram encontrados. Em ambos polissacarídeos, o sinal 5,15 ppm referente a prótons α anoméricos indicam a presença de 3,6-anidro- α -L-galactose (LA). O sinal 3,43 ppm referente a prótons do grupo metil 6-*O* sugere a presença de 6-*O*-metil- β -D-galactose em ambas algas, porém o correspondente em RMN- ^{13}C só foi encontrado apenas em *G. domingensis*.

Figura 15. Principais sinais dos espectros de ressonância magnética nuclear de próton (RMN – ^1H) (Apêndice II) para os extratos aquosos de *Gracilaria caudata* (A) e *Gracilaria domingensis* (B) usados para identificação dos polissacarídeos.

De acordo com os dados de FTIR e RMN é possível propor as principais díades que constituem as agaranas das algas estudadas (Fig. 16). Esses polissacarídeos são constituídos principalmente por unidades de agarobiose repetidas. A unidade B só apresentou traços de substituições, principalmente, o resíduo 2-*O*-metil 3,6-anidro- α -L-galactose. Já na unidade A estão presentes as principais substituições. Em *G. caudata* estão presentes os resíduos de β -galactopiranosose piruvatada (Fig. 16 A) e em *G. domingensis* substituições de sulfatos ou metoxila no C6, gerando os resíduos β -D-galactose 6-sulfato e 6-*O*-metil- β -D-galactose, respectivamente (Fig. 16 B).

Figura 16. Principais díades propostas para os polissacarídeos de *Gracilaria caudata* (A) e *Gracilaria domingensis* (B).

Os resultados de *G. domingensis* estão em conformidade com resultados anteriormente encontrados para esta alga (Valiente et al. 1992; Guimarães et al. 2007). Em *G. caudata*, os resultados foram similares com os encontrados por Barros et al. (2013), porém com alguns pontos duvidosos como a presença de metoxilas e sulfatação detectados por aqueles autores. Os resultados para *G. caudata* foram similares ao encontrado para *G. dura* (Murano et al. 1992).

Os polissacarídeos sulfatados são constituintes de parede celulares e a partir deles, dependendo do grupo da alga, se obtém o ágar. O ágar é uma mistura de diferentes polissacarídeos sendo cerca de 70% de agarose e 30% de agarpectina (Pandey et al. 2015). A agarose é formada pela estrutura básica da agarobiose ($G \rightarrow LA$) e a agarpectina são os polissacarídeos formados pela agarobiose substituída geralmente por sulfato e piruvato (Pandey et al. 2015). Os teores de sulfato e de contaminantes proteicos são importantes parâmetros para a definição da qualidade do ágar. Quanto menor o teor destes componentes, um ágar de melhor qualidade será obtido. Os extratos aquosos de *G. caudata* e *G. domingensis* também foram avaliados quanto a estes parâmetros (Tabela 8).

O extrato aquoso de *G. caudata* apresentou menor teor de contaminantes proteicos (5,4%), quando comparado a *G. domingensis* (8%). Já o teor de enxofre foi maior em *G. caudata* (5,93%) do que em *G. domingensis* (3,04%). Os resultados em FTIR (Fig. 14) e RMN (Tabela 7), como vistos acima, indicam exatamente o contrário, ou seja, os polissacarídeos de *G. domingensis* parecem mais sulfatado que os de *G. caudata*. A explicação para essa aparente discrepância pode ser dada com a análise do teor de enxofre total e aquele realmente ligado ao polissacarídeo.

O enxofre é um elemento importante no metabolismo de plantas e algas, estando disponível para o uso acumulado em forma de sulfato, ou seja, na forma livre (Leustek & Saito 1999). A maioria dos trabalhos com algas assume o valor do teor de enxofre total como sendo o teor de enxofre esterificado aos polissacarídeos. Portanto, não é considerado que o valor do teor de enxofre total possa também incluir o enxofre do sulfato livre. Neste trabalho, foi avaliado o teor de enxofre total e aquele livre em ambos extratos aquosos, calculando-se o valor do teor de enxofre esterificado como a diferença entre eles. Dessa forma, o valor de enxofre esterificado foi de 0,7% para *G. caudata* e 2,0% para *G. domingensis*, mostrando estarem corretas as interpretações das análises em FTIR e RMN. Barros et al. (2013) já haviam apontado teores de enxofre esterificado aos polissacarídeos de *G. caudata* em torno de 1%, enquanto Valiente et al. (1992) mostraram valores de 2,33% para *G. domingensis*. Como o exposto, fica evidente a importância de avaliar o enxofre livre dos extratos aquosos principalmente, quando

o extrato aquoso não passa por maiores purificações, para se ter uma estimativa mais precisa sobre a porcentagem de sulfatação do polissacarídeo e, conseqüentemente, a sua qualidade.

Tabela 8. Teor proteico (%) e teor de enxofre (%) presentes nos extratos aquosos de *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*.

	<i>Gracilaria caudata</i>	<i>Gracilaria domingensis</i>
Proteínas	5,4%	8%
Enxofre esterificado	0,7%	2,0%
Enxofre total	5,93%	3,04%

Diferentes atividades biológicas têm sido descritas para os polissacarídeos de *Gracilaria*, como, por exemplo, antioxidantes (Souza et al. 2012), antiviral (Mazumder et al. 2002), anti-inflamatória (Coura et al. 2012), antitumoral (Jiang et al. 2014), entre outras. Os substituintes nos polissacarídeos parecem ser importantes para as diferentes bioatividades dessas substâncias, como por exemplo maior teor de enxofre pode implicar em maior atividade antiviral (Jiao et al. 2011).

3.3.14. Sais

Os extratos metanólicos e hidrometanólicos 80% das duas algas, após serem concentrados e dissolvidos em metanol, formaram precipitados que foram separados e analisados (Tabela 9). Estes precipitados apresentaram alto teor de íons halogenados e sais. Em contraposição, apresentaram baixo teor de carbono indicando baixo teor de metabólitos primários e secundários. Como estes precipitados foram similares quimicamente, foram reunidos os precipitados dos extratos metanólicos com o do extrato hidrometanólicos 80% de cada alga. No geral, foi verificado 8,30% e 14,88% de sal equivalente ao NaCl para a massa seca total de *G. caudata* e *G. domingensis*, respectivamente.

Tabela 9. Teor de íons halogenados (% em relação ao cloreto), teor de sal (% em relação ao NaCl) e porcentagem de carbono nos precipitados formados nos extratos obtidos em metanol e em metanol 80% de *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*. Valores expressos em médias $\pm$ DP (n = 3).

	<i>G. caudata</i>		<i>G. domingensis</i>	
	Metanol	Metanol 80%	Metanol	Metanol 80%
Íons halogenados (%)	36,56 $\pm$ 6,57	52,60 $\pm$ 3,70	52,80 $\pm$ 5,71	38,51 $\pm$ 5,84
Sal (%)	60,27 $\pm$ 10,82	86,70 $\pm$ 6,10	87,06 $\pm$ 9,41	63,48 $\pm$ 9,62
Carbono (%)	1,27 $\pm$ 0,22	2 $\pm$ 0,01	1,04 $\pm$ 0,01	2,85 $\pm$ 0,12

Algas marinhas são ricas nos íons halogenados cloreto, brometo e iodeto. A concentração de cada íon varia dependendo da alga, porém, o íon cloro é majoritário e os íons bromo e iodo são traços (Hou & Yan 1998). Geralmente, cloreto de sódio e cloreto de potássio são os principais sais encontrados nestas algas. *Gracilaria canaliculata* Sonder apresenta maior teor de sódio, enquanto *Gracilaria corticata* (J. Agardh) J. Agardh maior teor de potássio (Sivakumar & Arunkumar 2009). Apesar da água do mar ser rica em sódio, algumas algas marinhas acabam acumulando mais potássio que sódio, variando a relação Na^+/K^+ . Ultimamente, devido a esse alto teor de sal, algumas algas marinhas têm sido propostas como substituinte do sal comercial na alimentação (Magnusson et al. 2016).

3.3.15. Terpenoides

Os terpenoides são substâncias formadas por unidades de 5 carbonos muitas vezes chamadas de isoprenos. Há duas vias de biossíntese para os terpenos, a via do mevalonato e a via do metileritritol fosfato (MEP, do inglês *methylerythritol phosphate*).

Terpenoides foram identificados nas duas algas estudadas em quantidades inferiores a 1% (Tabela 3). Diidroactinidiolideo e fitona foram detectados apenas em *G. caudata* e fitol apenas em *G. domingensis* (Fig. 17).

Fitol é um diterpeno constituinte da cadeia lateral das moléculas de clorofila *a*, *b* e *d* e também é precursor da vitamina E. Fitol já foi encontrado em diferentes algas como, por exemplo, *G. vermiculophylla* (Santos et al. 2015). A fitona é originada a partir do fitol (Rontani & Volkman 2003) e já foi anteriormente encontrada em *G. caudata* e *G. cervicornis* (Tomaz et al. 2012). Já o diidroactinidiolideo é um derivado de β -caroteno (Esteban et al. 2015) já identificado em diferentes algas vermelhas por Kamenarska et al. (2006), além de *Gracilaria fisheri* (B. M. Xia & I. A. Abbott) I. A. Abbott, J. Zhang & B. M. Xia por Laohakunjit et al. (2014).

Figura 17. Estruturas moleculares dos terpenoides identificados em *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*.

3.3.16. Vitaminas

Foram identificados ácido pantoténico e niacina em *G. caudata* e niacinamida em *G. domingensis* (Tabela 3). Tratam-se de vitaminas do complexo B, essenciais para todos organismos (Gerdes et al. 2012). O ácido pantoténico, também conhecido como vitamina B₅, faz parte da coenzima A. A biossíntese desta vitamina necessita de β -alanina, aminoácido também identificado em *G. caudata* (Ver item 3.3.7.). A niacina e a niacinamida são denominadas vitamina B₃ e são essenciais para o metabolismo como um todo, pois, são precursores do NAD (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina), NADP (fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida) e derivados.

3.4. Considerações gerais sobre a química de *Gracilaria*

Para uma análise geral sobre a química de *Gracilaria*, foi feita uma revisão bibliográfica utilizando a plataforma “Google Scholar” para o período entre 1970 – 2016 usando como estratégia de busca as palavras *Gracilaria* HPLC or NMR or GCMS e considerando somente artigos publicados em inglês.

Com base no levantamento bibliográfico foi verificado que cerca de 170 substâncias já foram identificadas em *Gracilaria*. A figura 18 mostra o número de substâncias descritas para as principais classes químicas que ocorrem nas espécies desse gênero.

Muitos dos metabólitos identificados são comuns e pertencentes ao metabolismo primário, como, por exemplo, os ácidos graxos livres, que foram predominantes, os aminoácidos proteicos livres e os monossacarídeos livres. Dados sobre aminoácidos proteicos e ácidos graxos são mais comuns em estudos com perfis nutricionais (não incluídos na revisão), porém também aparecem em alguns estudos de caracterização química (Nylund et al. 2011). Ácidos dicarboxílicos e tricarboxílicos também já foram identificados neste gênero (Nylund et al. 2011; Xu et al. 2015), sendo os primeiros com uma maior diversidade química.

Em algas vermelhas, os metabólitos secundários mais comumente descritos são acetogeninas e terpenoides, principalmente, sesquiterpenos, sendo comum halogenação destes metabólitos (Maschek & Baker 2008). Entretanto, os únicos metabólitos halogenados já relatados em *Gracilaria* foram os bromofenóis identificados por Whitfield et al. (1999) (2-bromofenol, 4-bromofenol, 2,4-dibromofenol, 2,6-dibromofenol e 2,4,6-tribromofenol) em *G. edulis* e *Gracilaria secundata* Harvey. Com relação aos terpenoides, já foram identificados nas espécies deste gênero os diterpenos fitol e derivados (Santos et al. 2015), além do derivado de β -caroteno, diidroactinidiolideo (Laohakunjit et al. 2014). Entre os esteróis identificados em *Gracilaria* estão demosterol, fucoesterol, isofucoesterol, poriferastenol e principalmente colesterol e derivados (Das et al. 1989; Das et al. 1992a; Das et al. 1992 b; Santos et al. 2015).

Ácidos benzoicos, juntamente com bromofenóis, mencionados acima, parecem ser as substâncias fenólicas mais comuns em *Gracilaria*, porém identificadas em pequenas quantidades (Souza et al. 2011; Farvin & Jacobsen 2013; Xu et al. 2015).

Os alcaloides são raros em *Gracilaria*, sendo identificados feniletilaminas, como *N*-(2-feniletil)-acetamida, e a própria feniletilamina (Percot et al. 2009). As substâncias nitrogenadas mais comuns neste gênero são os MAAs, tendo sido identificados asterina 330, chinorina, palitinol, palitina e porphyra 334 (Torres et al. 2016) e, mais recentemente, paliteno e isômero usujireno por Marques (2015). Alguns aminoácidos não proteicos como ornitina, ácido piroglutâmico, β -alanina (*presente trabalho*) e a girgatinina (Wilcox et al. 2001; Wilcox et al. 2007) também foram identificados.

Derivados de ácidos graxos são bem comuns, sendo identificados alcanos, principalmente *n*-heptadecano, álcoois (Santos et al. 2015), aldeídos (Kajiwara et al. 1993), monoacilgliceróis (Santos et al. 2015), lipídios polares (Sun et al. 2006) e ésteres de ácido graxo (*presente trabalho*). O derivado de ácido graxo mais estudado são as oxilipinas, por exemplo Nylund et al. (2011) estudando *G. vermiculophylla*. Estas substâncias são oxigenadas e derivadas de ácidos graxos poli-insaturados C18 (octadecanoides) e C20 (eicosanoides) em algas marinhas (Bouarab et al. 2004). Os eicosanoides são os que mais despertaram atenção da

comunidade científica, pois são comumente encontrados também em animais atuando sobre o sistema imune, pressão sanguínea e até mesmo no crescimento celular. Casos de intoxicações relacionados ao consumo de *Gracilaria* são, muitas vezes, decorrentes das enzimas envolvidas na biossíntese dos eicosanoides (Noguchi et al. 1994). Estudos recentes sugerem que a função destas substâncias para algas está relacionada ao sistema de defesa da planta (Nylund et al. 2011; Weinberger et al. 2011).

Com menor diversidade química estão os heterosídeos e o ácido sulfônico. Pelo levantamento bibliográfico o único ácido sulfônico identificado é o ácido isetiônico, já o heterosídeo mais comum neste gênero é o floridosídeo.

Dessa forma, considerando os resultados levantados na literatura e aqueles obtidos no presente trabalho, na figura 19 é proposto um esquema geral das vias de biossíntese dos principais metabólitos secundários e alguns primários que ocorrem em *Gracilaria*.

No geral, a via do acetato-malonato parece ser preponderante no metabolismo desses organismos, sendo responsável por cerca 44,5% dos metabólitos já identificados para espécies de *Gracilaria*. Em seguida, aparecem a via dos terpenoides com 18,7% e a via do chiquimato com 12,9%. Entretanto, considerando apenas os metabólitos secundários, a via do acetato-malonato (19,9%) continua sendo importante por causa das oxilipinas, porém, em seguida vem a via do chiquimato (12,9%) e a menos expressiva é a via dos terpenoides (2,34%).

Figura 18. Número de substâncias descritas para cada classe química presente em *Gracilaria* no período de 1970 - 2016. Referências utilizadas para construção da tabela estão na tabela 1.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarif WM, Ayyad S-EN, Al-Lihaibi SS (2010) Acyclic diterpenoid from the red alga *Gracilaria foliifera*. *Revista Latinoamericana de Química* 38:52–57.
- Annarao S, Sidhu OP, Roy R, et al (2008) Lipid profiling of developing *Jatropha curcas* L. seeds using ¹H NMR spectroscopy. *Bioresource Technology* 99:9032–9035.
- Araki S, Sakurai T, Oohusa T, et al. (1989) Characterization of sulfoquinovosyl diacylglycerol from marine red algae. *Plant Cell physiology* 30:775–781.
- Armisen R (1997) Agar. In: Imeson AP (ed) *Thickening and Gelling Agents for Food*, 2nd ed. Springer Science+Business Media Dordrecht, pp 1–21.
- Ascencio SD (2006) *Heterosídeos sintetizados por linhagens de cor e estádios reprodutivos de macroalgas vermelhas dos gêneros Hypnea e Gracilaria*. Universidade Federal do Paraná: Tese (Doutorado em Bioquímica). 135p.
- Aydoğmuş Z, Topcu G, Güven KC (2008) Studies on chemical constituents of *Gracilaria verrucosa*. *Natural Product Research* 22:1589–1596.
- Barbosa M, Collado-González J, Andrade PB, et al. (2015) Nonenzymatic alfa-linolenic acid derivatives from the sea: macroalgae as novel sources of phytoprostanes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63:6466–6474.
- Barclay KD, McKersie BD (1994) Peroxidation reactions in plant membranes: Effects of free fatty acids. *Lipids* 29:877–882.
- Barre S La, Roullier C, Boustie J (2014) Mycosporine-like amino acids (MAAs) in biological photosystems. In: Barre S La, Kornprobst J-M (eds) *Outstanding marine molecules*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp 333–360.
- Barros FCN, Da Silva DC, Sombra VG, et al (2013) Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (J. Agardh). *Carbohydrate Polymers* 92:598–603.
- Barrow KD, Karsten U, King RJ (1993) Isethionic acid from the marine red alga *Ceramium flaccidum*. *Phytochemistry* 34:1429–1430.
- Barufi JB, Korbee N, Oliveira MC, Figueroa FL (2011) Effects of N supply on the accumulation of photosynthetic pigments and photoprotectors in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) cultured under UV radiation. *Journal of Applied Phycology* 23:457–466.
- Bartz R, Li W-H, Venables B, et al. (2007) Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *Journal of Lipid Research* 48:837–47.
- Behrman EJ, Gopalan V (2005) Cholesterol and Plants. *Journal of Chemical Education* 82:1791–1793.

- Beisson F, Li-Beisson Y, Pollard M (2012) Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 15:329–337.
- Bouarab K, Adas F, Gaquerel E, et al (2004) The innate immunity of a marine red alga involves oxylipins from both the eicosanoid and octadecanoid pathways. *Plant Physiology* 135:1838–1848.
- Broberg A, Kenne L, Pedersén M (1998) In-situ identification of major metabolites in the red alga *Gracilaria lemaneiformis* using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Planta* 206:300–307.
- Cardoso MA (2007) *Determinação da estrutura química de xilomananas e galactanas sulfatadas isoladas de macroalgas marinhas (Ceramiales, Rhodophyta)*. Universidade Federal do Paraná: Tese (Doutorado em Bioquímica). 149p.
- Cardozo KHM, Marques LG, Carvalho VM, et al (2011) Analyses of photoprotective compounds in red algae from the Brazilian coast. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 21:202–208.
- Cardozo KHM, Vessecchi R, Carvalho VM, et al (2008) A theoretical and mass spectrometry study of the fragmentation of mycosporine-like amino acids. *International Journal of Mass Spectrometry* 273:11–19.
- Carreto JJ, Carignan MO (2011) Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects. *Marine drugs* 9:387–446.
- Collén PN, Camitz A, Hancock RD, et al (2004) Effect of nutrient deprivation and resupply on metabolites and enzymes related to carbon allocation in *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 40:305–314.
- Cook SD, Nichols DS, Smith J, et al (2016) Auxin biosynthesis: are the indole-3-acetic acid and phenylacetic acid biosynthesis pathways mirror images? *Plant Physiology* 171:1230–1241.
- Cornils B, Lappe P (2000) Dicarboxylic Acids, Aliphatic. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, pp.1–18.
- Coruzzi G, Last R, Dudareva N, Amrhein N (2015) Amino acids. In: Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (eds) *Biochemistry & molecular biology of plants*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 289–336.
- Coura CO, de Araújo IWF, Vanderlei ESO, et al (2012) Antinociceptive and anti-inflammatory activities of sulphated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 110:335–41.
- Dang TH, Hong JK, Yoo ES, et al. (2003) Bioactive constituents from the red alga *Gracilaria verrucosa*. *Symposium on the Chemistry of Natural Products Symposium Products* 1511:2003.

- Dang HT, Lee HJ, Yoo ES, et al. (2008) Anti-inflammatory constituents of the red alga *Gracilaria verrucosa* and their synthetic analogues. *Journal of Natural Products* 71:232–40.
- Dang TH, Lee HJ, Yoo ES, et al. (2010) The occurrence of 15-keto-prostaglandins in the red alga *Gracilaria verrucosa*. *Archives of Pharmacal Research* 33:1325–9.
- Das B, Srinivas K (1992a) Dihydroxysterols from the marine red alga, *Gracilaria edulis*. *Phytochemistry* 31:4371–4373.
- Das B, Srinivas K (1992b) Minor C29-steroids from the marine red alga, *Gracilaria edulis*. *Phytochemistry* 31:2427–2429.
- Das B, Venkateswarlu Y, Srinivas K, Rao A (1989) 5 α -Poriferast-9 (11)-en-3 β -ol from the marine red alga, *Gracilaria edulis*. *Phytochemistry* 31:1054–1055.
- De Felicio R, de Albuquerque S, Young MCM, et al (2010) Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 52:763–9.
- De Oliveira ALL, Da Silva DB, Lopes NP, et al. (2012) Chemical constituents from red algae *Bostrychia radicans* (Rhodomelaceae): New amides and phenolic compounds. *Química Nova* 35:2186–2188.
- Doyle PJ, Patterson GW (1972) Sterols of some Chesapeake Bay algae. *Comparative Biochemistry and Physiology* 41:355–358.
- Esteban R, Moran JF, Becerril JM, García-Plazaola JI (2015) Versatility of carotenoids: An integrated view on diversity, evolution, functional roles and environmental interactions. *Environmental and Experimental Botany* 119:63–75.
- Farvin KHS, Jacobsen C (2013) Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chemistry* 138:1670–1681.
- FAO (2003) *Food energy – methods of analysis and conversion factors*. Fao Food and Nutrition Paper 77. Disponível em:
<<http://www.fao.org/docrep/006/y5022e/y5022e00.htm#Contents%5Cnftp://ftp.fao.org/docrep/fao/006/y5022e/y5022e00.pdf>>
- Ferreira LG (2011) *Estrutura química e atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados obtidos de algas do complexo Laurencia (Ceramiales, Rhodophyta)*. Universidade Federal do Paraná: Tese (Doutorado em Bioquímica). 217p.
- Figueroa FL, Israel A, Neori A, et al. (2010) Effect of nutrient supply on photosynthesis and pigmentation to short-term stress (UV radiation) in *Gracilaria conferta* (Rhodophyta). *Marine Pollution Bulletin* 60:1768–1778.
- Figueroa FL, Korbee N, Abdala R, et al. (2012) Biofiltration of fishpond effluents and accumulation of N-compounds (phycobiliproteins and mycosporine-like amino acids)

- versus C-compounds (polysaccharides) in *Hydropuntia cornea* (Rhodophyta). *Marine Pollution Bulletin* 64:310–8.
- Fries L (1977) Growth-regulating effects of phenylacetic acid and p-hydroxyphenylacetic acid on *Fucus spiralis* L. (Phaeophyceae, Fucales) in axenic culture. *Phycologia* 16:451–455.
- Fries L, Åberg S (1978) Morphogenetic effects of phenylacetic and p-OH-phenylacetic acid on the green alga *Enteromorpha compressa* (L.) GREV. in axenic culture. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 88:383–388.
- Fries L, Iwasaki H (1976) p-Hydroxyphenylacetic acid and other phenolic compounds as growth stimulators of the red alga *Porphyra tenera*. *Plant Science Letters* 6:299–307.
- Fusetani N, Hashimoto K (1984) Prostaglandin E2: a candidate for causative agent of “Ogonori” poisoning. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 50:465–469.
- Garegg PJ, Lindberg B (1979) Preparation and N.M.R. studies of pyruvic acid and related acetals of pyranosides: configuration at the acetal carbon atoms. *Carbohydrate Polymers* 77:71–78.
- Gerdes S, Lerma-Ortiz C, Frelin O, et al (2012) Plant B vitamin pathways and their compartmentation: a guide for the perplexed. *Journal of Experimental Botany* 63:5379–5395.
- Gholson RK, Sanders DC, Henderson LM (1959) Glutaric acid: A product of tryptophan metabolism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1:98–100.
- Gómez I, Figueroa FL, Huovinen P, et al. (2005) Photosynthesis of the red alga *Gracilaria chilensis* under natural solar radiation in an estuary in southern Chile. *Aquaculture* 244:369–382.
- González M, González V (2012) Organic acids. In: Nollet LML, Toldra F (eds) *Food analysis by HPLC*, 3rd edn. CRC Press, pp 443–465.
- Gregson RP, Marwood JF, Quinn RJ (1979) The occurrence of prostaglandins PGE2 and PGF2alpha in a plant - the red alga *Gracilaria lichenoides*. *Tetrahedron Letters* 46:4505–4506.
- Gressler V, Yokoya NNS, Fujii MTM, et al (2010) Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. *Food Chemistry* 120:585–590.
- Guaratini T, Lopes NP, Marinho-Soriano E, et al. (2012) Antioxidant activity and chemical composition of the non polar fraction of *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie and *Gracilaria birdiae* (Plastino & Oliveira). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22:724–729.
- Guimarães M, Viana AG, Rabello Duarte ME, et al (2007) Low-molecular-mass carbohydrates and soluble polysaccharides of green and red morphs of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Botanica Marina* 50:314–317.

- Guder JC, Buchhaupt M, Huth I, et al. (2014) Biotechnological approach towards a highly efficient production of natural prostaglandins. *Biotechnology letters* 36:2193–2198.
- Guiry MD (2016) AlgaeBase. In: M. D. Guiry & G. M. Guiry (eds) *World-wide electronic publication, National University of Ireland*. Disponível em: <http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=14>.
- Güven KC, Percot A, Sezik E (2010) Alkaloids in marine algae. *Marine Drugs* 8:269–284.
- Hammann M, Rempt M, Pohnert G, et al. (2016) Increased potential for wound activated production of Prostaglandin E2 and related toxic compounds in non-native populations of *Gracilaria vermiculophylla*. *Harmful Algae* 51:81–88.
- Hartmann A, Becker K, Karsten U, et al (2015) Analysis of mycosporine-like amino acids in selected algae and cyanobacteria by hydrophilic interaction liquid chromatography and a novel MAA from the red alga *Catenella repens*. *Marine Drugs* 13:6291–6305.
- Hayasaka S, Kodama T, Ohira A (2011) Retinal risks of high-dose ornithine supplements: a review. *The British journal of nutrition* 106:801–11.
- Hayee-Memon A, Shameel M, Ahmad M, et al. (1991) Phycochemical studies on *Gracilaria foliifera* (Gigartinales, Rhodophyta). *Botanica Marina* 34:107–112.
- Hellio C, Simon-Colin C, Clare AS, Deslandes E (2004) Isethionic acid and floridoside isolated from the red alga, *Grateloupia turuturu*, inhibit settlement of *Balanus amphitrite* cyprid larvae. *Biofouling* 20:139–145.
- Herrera-Valencia VA, Us-Vázquez RA, Larqué-Saavedra FA, Barahona-Pérez LF (2012) Naturally occurring fatty acid methyl esters and ethyl esters in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Annals of Microbiology* 62:865–870.
- Hirata Y, Uemura D, Ueda K, Takano S (1979) Several compounds from *Palythoa Tuberculosa* (Coelenterata). *Pure and Applied Chemistry* 51:1875–1883.
- Holst PB, Nielsen SE, Anthoni U, et al (1994) Isethionate in certain red algae. *Journal of Applied Phycology* 6:443–446.
- Honda M, Ishimaru T, Itabashi Y (2016) Lipid classes , fatty acid composition , and glycerolipid molecular species of the red alga *Gracilaria vermiculophylla*, a prostaglandin- producing seaweed. *Journal of Oleo Science* 732:723–732.
- Hou X, Yan X (1998) Study on the concentration and seasonal variation of inorganic elements in 35 species of marine algae. *Science of the Total Environment* 222:141–156.
- Hsu BY, Tsao CY, Chiou TK, et al. (2007) HPLC determination for prostaglandins from seaweed *Gracilaria gigas*. *Food Control* 18:639–645.
- Hsu BY, Tsao CY, Chiou TK, Hwang DF (2008) Factors affecting PGE2 production in seaweed *Gracilaria tenuistipitata*. *Journal of Food and Drug Analysis* 16:59–65.

- Ilijas MI, Terasaki M, Nakamura R, et al. (2008) Purification and characterization of glycerolipid acyl-hydrolase from the red alga *Gracilaria vermiculophylla*. *Fisheries Science* 74:670–676.
- Imbs AB, Vologodskaya AV, Nevshupova NV, et al. (2001) Response of prostaglandin content in the red alga *Gracilaria verrucosa* to season and solar irradiance. *Phytochemistry* 58:1067–1072.
- Jiang W, Fu Y, Yang F, et al (2014) *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharide as integrin-targeting surface decorator of selenium nanoparticles to achieve enhanced anticancer efficacy. *ACS Applied Materials and Interfaces* 6:13738–13748.
- Jiang Y, Song J (2010) Fruits and Fruit Flavor: Classification and Biological Characterization. In: Hui YH (ed) *Handbook of fruit and vegetable flavors*. John Wiley & Sons, Inc., pp 3–24.
- Jiao G, Yu G, Zhang J, Ewart HS (2011) Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine drugs* 9:196–223.
- Johari NA, Sidek HM, Othman R, Anuar N (2013) *Gracilaria changii* derived cholesterol cause necrotic cell death in an ovarian adenocarcinoma cell line, CAO-V-3 through p38 MAPK and FASl activation in combination with ethanol. *Global Journal of Pharmacology* 7:1–13.
- Kailas AP, Nair MS (2015) Saponins and the in vitro bioactivities of different solvent extracts of some tropical green and red seaweeds. *Journal of Coastal Life Medicine* 3:931–943.
- Kajiwara T, Matsui K, Hatanaka A, et al (1993) Distribution of an enzyme system producing seaweed flavor: conversion of fatty acids to long-chain aldehydes in seaweeds. *Journal of Applied Phycology* 5:225–230.
- Kamenarska Z, Ivanova A, Stancheva R, et al (2006) Volatile compounds from some Black Sea red algae and their chemotaxonomic application. *Botanica Marina* 49:47–56.
- Karsten U, Barrow KD, King RJ (1993) Floridoside, L-isofloridoside, and D-isofloridoside in the red alga *Porphyra columbina*: seasonal and osmotic effects. *Plant Physiology* 485–491.
- Karsten U, Sawall T, Wiencke C (1998) A survey of the distribution of UV-absorbing substances in tropical macroalgae. *Phycological Research* 46:271–279.
- Khotimchenko SV, Klochkova NG, Vaskovsky VE (1990) Polar lipids of marine macrophytic algae as chemotaxonomic markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 18:93–101.
- Khotimchenko SV (2002) Distribution of glyceroglycolipids in marine algae and grasses. *Chemistry of Natural Compounds* 38:223–229.
- Khotimchenko SV, Vas'kovsky VE (2004) An inositol-containing sphingolipid from the red alga *Gracilaria verrucosa*. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 30:168–171.

- Kim MJ, Li YX, Dewapriya P, et al (2013) Floridoside suppresses pro-inflammatory responses by blocking MAPK signaling in activated microglia. *BMB Reports* 46:398–403.
- Kinoshita K, Takahashi K, Zama K (1986) Triarachidonin and diarachidonoylphosphatidylcholine in “Ogonori” *Gracilaria verrucosa*. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish* 52:757.
- Kumar A, Bachhawat AK (2012) Pyroglutamic acid: Throwing light on a lightly studied metabolite. *Current Science* 102:288–297.
- Kumari P, Reddy R, Jha B (2014) Quantification of selected endogenous hydroxy-oxylipins from tropical marine macroalgae. *Marine Biotechnology* 16:74–87.
- Kumari P, Reddy CRK, Jha B (2015) Methyl jasmonate-induced lipidomic and biochemical alterations in the intertidal macroalga *Gracilaria dura* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Plant and Cell Physiology* 56:1877–1889.
- Laohakunjit N, Selamassakul O, Kerdchoechuen O (2014) Seafood-like flavour obtained from the enzymatic hydrolysis of the protein by-products of seaweed (*Gracilaria* sp.). *Food Chemistry* 158:162–170.
- Leal MC, Munro MHG, Blunt JW, et al (2013) Biogeography and biodiscovery hotspots of macroalgal marine natural products. *Natural Product Reports* 30:1380–90.
- Lee H-JJ, Dang H-TT, Kang G-JJ, et al. (2009) Two enone fatty acids isolated from *Gracilaria verrucosa* suppress the production of inflammatory mediators by down-regulating NF-kappaB and STAT1 activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Archives of Pharmacol Research* 32:453–62.
- Leustek T, Saito K (1999) Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiology* 120:637–644.
- Li SY, Shabtai Y, Arad S (2002) Floridoside as a carbon precursor for the synthesis of cell-wall polysaccharide in the red microalga *Porphyridium* sp. (Rhodophyta). *Journal of Phycology* 38:931–938.
- Lin Y-X, Li Y, Lee S-H, et al (2010) Inhibitors of oxidation and matrix metalloproteinases, floridoside, and D-isofloridoside from marine red alga *Laurencia undulata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:578–586.
- Lion U, Wiesemeier T, Weinberger F, et al. (2006) Phospholipases and galactolipases trigger oxylipin-mediated wound-activated defence in the red alga *Gracilaria chilensis* against epiphytes. *ChemBioChem* 7:457–462.
- Liu M, Hansen P, Lin X (2011) Bromophenols in marine algae and their bioactivities. *Marine drugs* 9:1273–1292.
- Loewus F (1999) Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. *Phytochemistry* 52:193–210.

- Lu H, Xie H, Gong Y, et al (2011) Secondary metabolites from the seaweed *Gracilaria lemaneiformis* and their allelopathic effects on *Skeletonema costatum*. *Biochemical Systematics and Ecology* 39:397–400.
- Magnusson M, Carl C, Mata L, et al (2016) Seaweed salt from *Ulva*: A novel first step in a cascading biorefinery model. *Algal Research* 16:308–316.
- Marques LG (2015) *Aminoácidos tipo micosporina: novas metodologias e distribuição em macroalgas da costa brasileira*. Universidade de São Paulo: Tese (Doutorado em Bioquímica). 164p.
- Martinez-Garcia M, van der Maarel MJEC (2016) Floridoside production by the red microalga *Galdieria sulphuraria* under different conditions of growth and osmotic stress. *AMB Express* 6:2–8.
- Maschek JA, Baker BJ (2008) The chemistry of algal secondary metabolism. In: Amsler CD (ed) *Algal Chemical Ecology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 1–24.
- Maskey RP, Helmke E, Laatsch H (2003) Himalomycin A and B: isolation and structure elucidation of new fridamycin type antibiotics from a marine *Streptomyces* isolate. *The Journal of Antibiotics* 56:942–949.
- Mazumder S, Ghosal PPK, Pujol CA, et al. (2002) Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *International Journal of Biological Macromolecules* 31:87–95.
- Melo MRS, Feitosa JPA, Freitas ALP, De Paula RCM (2002) Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Carbohydrate Polymers* 49:491–498.
- Meng J (1989) Floridosides in *Pophyra perforata*. Simon Fraser University: Thesis (Doctor of Philosophy). 125p.
- Murano E, Toffanin R, Zanetti F (1992) Chemical and macromolecular characterisation of agar polymers from *Gracilaria dura* (C. Agardh) J. Agardh (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Carbohydrate Polymers* 18:171–178.
- Nasir M, Saeidnia S, Mashinchian-Moradi A, Gohari AR (2011) Sterols from the red algae, *Gracilaria salicornia* and *Hypnea flagelliformis*, from Persian Gulf. *Pharmacognosy Magazine* 7:97–100.
- Nepal KK, Yoo JC, Sohng JK (2010) Biosynthetic approach for the production of new aminoglycoside derivative. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 110:109–112.
- Noguchi T, Matsui T, Miyazawa K, et al (1994) Poisoning by the red alga “ogonori” (*Gracilaria verrucosa*) on the Nojima Coast, Yokohama, Kanagawa Prefecture, Japan. *Toxicon* 32:1533–1538.

- Nylund GM, Weinberger F, Rempt M, Pohnert G (2011) Metabolomic assessment of induced and activated chemical defence in the invasive red alga *Gracilaria vermiculophylla*. *PLOS ONE* 6:1–12.
- Oyamada C, Kaneniwa M, Ebitani K, et al (2008) Mycosporine-like amino acids extracted from scallop (*Patinopecten yessoensis*) ovaries: UV protection and growth stimulation activities on human cells. *Marine biotechnology (New York, NY)* 10:141–150.
- Pandey A, Höfer R, Larroche C, et al. (2015) *Industrial Biorefineries and White Biotechnology*. Elsevier
- Percot A, Yalçın A, Aysel V, et al (2009) β -Phenylethylamine content in marine algae around Turkish coasts. *Botanica Marina* 52:87–90.
- Pollesello P, Toffanin R, Murano E, et al. (1992) ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopic studies of lipid extracts of the red alga *Gracilaria longa*. *Journal of Applied Phycology* 4:149–155.
- Premuzic ET, Gaffney JS, Cobb D, et al. (1982) Sterol Distribution in red algae from the Waters of Eastern Long Island. *Botanica Marina* 25:351–356.
- Qian F, Luo Q, Yang R, et al (2014) The littoral red alga *Pyropia haitanensis* uses rapid accumulation of floridoside as the desiccation acclimation strategy. *Journal of Applied Phycology* 27:621–632.
- Rahelivao MP, Gruner M, Andriamanantoanina H, et al. (2015) Red Algae (Rhodophyta) from the Coast of Madagascar: preliminary bioactivity studies and isolation of natural products. *Marine Drugs* 13:4197–4216.
- Rempt M, Weinberger F, Grosser K, Pohnert G (2012) Conserved and species-specific oxylipin pathways in the wound-activated chemical defense of the noninvasive red alga *Gracilaria chilensis* and the invasive *Gracilaria vermiculophylla*. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 8:283–289.
- Robyt JF, White BJ (1987) *Biochemical techniques: theory and practice*. Waveland Pr Inc (January 1990). 407p.
- Roehr M (1998) A century of citric acid fermentation and research. *Food Technology and Biotechnology* 36:163–171.
- Rontani JF, Volkman JK (2003) Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environments. *Organic Geochemistry* 34:1–35.
- Rybin VG, Svetashev VI, Imbs AB, et al. (2013) Detection of prostaglandin E3 in the red alga *Gracilaria vermiculophylla*. *Chemistry of Natural Compounds* 49:535–536.
- Ryu B, Li Y-X, Kang K-H, et al (2015) Floridoside from *Laurencia undulata* promotes osteogenic differentiation in murine bone marrow mesenchymal cells. *Journal of Functional Foods* 19:505–511.

- Saerens SMG, Verstrepen KJ, Van Laere SDM, et al (2006) The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *Journal of Biological Chemistry* 281:4446–4456.
- Sajiki J, Kakimi H (1998) Identification of eicosanoids in the red algae, *Gracilaria asiatica*, using High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of chromatography A* 795:227–237.
- Sajiki J, Yonekubo J (2002) Determination of free polyunsaturated fatty acids and their oxidative metabolites by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Mass Spectrometry (MS). *Analytica Chimica Acta* 465:417–426.
- Sakthivel R, Muniasamy S, Archunan G, Devi KP (2016) *Gracilaria edulis* exhibit antiproliferative activity against human lung adenocarcinoma cell line A549 without causing adverse toxic effect in vitro and in vivo. *Food Function* 7:1155–1165.
- Santelices B (2014) Cultured aquatic species information programme: *Gracilaria* spp. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department*. Disponível em: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Gracilaria_spp/en
- Santos SAO, Vilela C, Freire CSR, et al (2015) Chlorophyta and Rhodophyta macroalgae: A source of health promoting phytochemicals. *Food Chemistry* 183:122–128.
- Schirmer A, Rude MA, Li X, et al (2010) Microbial biosynthesis of alkanes. *Science* 329:559–562.
- Sheeja L, Lakshmi D, Bharadwaj S, Parveen KS (2016) Anticancer activity of phytol purified from *Gracilaria edulis* against human breast cancer cell line (MCF-7). *International Journal of Current Science* 19:36–46.
- Shoeb M, Jaspars M (2003) Chlorinated C12 fatty acid metabolites from the red alga *Gracilaria verrucosa*. *Journal of Natural Products* 66:1509–1511.
- Simon-Colin C, Kervarec N, Pichon R, Deslandes E (2004) NMR ¹³C-isotopic enrichment experiments to study carbon-partitioning into organic solutes in the red alga *Grateloupia doryphora*. *Plant Physiology and Biochemistry* 42:21–26.
- Sinha RP, Klisch M, Groniger A, et al. (2000) Mycosporine-like amino acids in the marine red alga *Gracilaria cornea* - effects of UV and heat. *Environmental and Experimental Botany* 43:33–43.
- Sivakumar SR, Arunkumar K (2009) Sodium, potassium and sulphate composition in some seaweeds occurring along the coast of Gulf of Mannar, India. *Asian Journal of Plant Sciences* 8:500–504.
- Skriptsova AV, Choi H-G (2009) Taxonomic revision of *Gracilaria* “*verrucosa*” from the Russian Far East based on morphological and molecular data. *Botanica Marina* 52:331–340.

- Son BW (1988) Glycolipid from the Korean marine red alga *Gracilaria verrucosa*. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 9:264–266.
- Son BW (1990) Glycolipids from *Gracilaria verrucosa*. *Phytochemistry* 29:307–309.
- Souza BWS, Cerqueira MA, Martins JT, et al. (2011) Antioxidant potential of two red seaweeds from the Brazilian coasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:5589–5594
- Souza BWSS, Cerqueira MA, Bourbon AI, et al (2012) Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Food Hydrocolloids* 27:287–292.
- Spoel SH, Dong X (2012) How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology* 12:89–100.
- Steentoft M, Irvine LM, Farnham WF (1995) Two terete species of *Gracilaria* and *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta) in Britain. *Phycologia* 34:113–127.
- Sun Y, Xu Y, Liu K, et al (2006) Gracilarioside and gracilamides from the red alga *Gracilaria asiatica*. *Journal of Natural Products* 69:1488–91.
- Tadao K, Noriko M, Yuzuru O (1996) Formation of L-threonolactone and oxalic acid in the autoxidation reaction of L-ascorbic acid. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 60:1212–1214.
- Takano S, Nakanshi A, Uemura D, Hirata Y (1979) Isolation and structure of A 334 Nm uv-absorbing substance, porphyra-334 from the red alga *Porphyra Tenera* Kjellman. *Chemistry Letters* 87:1176–1182.
- Takano S, Uemura D, Hirata Y (1978) Isolation and structure of two new amino acids, palythanol and palythene, from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. *Tetrahedron Letters* 19:4909–4912.
- Tomaz ACDA, Miranda GEC De, Souza MDFV De, et al (2012) Analysis and characterization of methyl esters of fatty acids of some *Gracilaria* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 44:303–306.
- Tornabene TG (1981) Formation of hydrocarbons by bacteria and algae. *Basic Life Sciences* 18:421–38.
- Torres PB, Chow F, Ferreira MJP, dos Santos DYAC (2016) Mycosporine-like amino acids from *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta) and its variation under high light. *Journal of Applied Phycology* 28:2035–2040.
- Tsujino I, Yabe K (1978) Isolation and structure of a mycosporine from red alga *Chondrus yendoii*. *Tetrahedron Letters* 16:1401–1402.

- Upta V, Thakur RS, Reddy CRK, Jha B (2013) Central metabolic processes of marine macrophytic algae revealed from NMR based metabolome analysis. *RSC Advances* 3:7037–7047.
- Usov AI (1998) Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. *Food Hydrocolloids* 12:301–308.
- Valiente O, Fernandez LE, Perez RM, et al (1992) Agar polysaccharides from the red seaweeds *Gracilaria domingensis* Sonder ex Kützinger and *Gracilaria mammillaris* (Montagne) Howe. *Botanica Marina* 35:77–82.
- Wang S, Wang G, Weinberger F, et al. (2016) Anti-epiphyte defenses in the red seaweed *Gracilaria vermiculophylla*: non-native algae are better defended than their native conspecifics. *Journal of Ecology*.
- Weinberger F, Lion U, Delage L, et al (2011) Up-regulation of lipoxygenase, phospholipase, and oxylipin-production in the induced chemical defense of the red alga *Gracilaria chilensis* against epiphytes. *Journal of chemical ecology* 37:677–686.
- Whitfield FB, Helidoniotis F, Shaw KJ, Svoronos D (1999) Distribution of bromophenols in species of marine algae from eastern Australia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:2367–2373.
- Widhalm JR, Dudareva N (2015) A familiar ring to it: Biosynthesis of plant benzoic acids. *Molecular Plant* 8:83–97.
- Wilcox SJ, Barr N, Broom J, et al (2007) Using gigartinine to track the distribution of an alien species of *Gracilaria* in New Zealand. *Journal of Applied Phycology* 19:313–323.
- Wilcox SJ, Bloor SJ, Hemmingson JA, et al (2001) The presence of gigartinine in a New Zealand *Gracilaria* species. *Journal of Applied Phycology* 13:409–413.
- Xu T, Sutour S, Casabianca H, et al (2015) Rapid Screening of chemical compositions of *Gracilaria dura* and *Hypnea mucisformis* (Rhodophyta) from Corsican Lagoon. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients* 2:8–8.
- Yoshimura CY (2006) *Avaliação do potencial de cultivo e produção de ágar de Gracilaria domingensis e de Gracilaria caudata (Rhodophyta, Gracilariales) na Enseada de Armação do Itapocoroy*. Universidade de São Paulo: Tese (Doutorado em Ciências). 163p.
- Youngblood WW, Blumer M, Guillard RL, Fiore F (1971) Saturated and unsaturated hydrocarbons in marine benthic algae. *Marine Biology* 8:190–201.
- Zoeller M, Stingl N, Krischke M, et al (2012) Lipid profiling of the *Arabidopsis* hypersensitive response reveals specific lipid peroxidation and fragmentation processes: biogenesis of pimelic and azelaic acid. *Plant Physiology* 160:365–378.

CAPÍTULO III

Potencial bioativo e isolamento biomonitorado de substâncias presentes em extratos de *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta)

RESUMO

Devido ao amplo uso e alta biodiversidade, muitas espécies de *Gracilaria* têm sido investigadas quanto ao potencial biológico. No entanto, apesar do conhecimento sobre potenciais biológicos com extratos obtidos de espécies do gênero, poucos estudos têm tentado isolar os constituintes químicos responsáveis por tais atividades. No presente trabalho foram investigadas as macroalgas vermelhas *Gracilaria caudata* J. Agardh e *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie quanto ao potencial antioxidante, de inibição enzimática (transcriptase reversa do HIV-1 e acetilcolinesterase) e de toxicidade frente aos crustáceos artêmias. Para isso, extratos de diferentes polaridades foram obtidos e submetidos ao isolamento biomonitorado utilizando como guias para fracionamentos e isolamentos os melhores resultados das atividades frente aos ensaios citados acima. Atividades promissoras foram encontradas para os extratos aquosos (ricos em polissacarídeos sulfatados) de *G. domingensis* frente à enzima transcriptase reversa do HIV-1 e para os extratos hexânico e diclorometânico de *G. caudata* frente à toxicidade nos crustáceos artêmias.

Palavras chaves: Rhodophyta, *Gracilaria*, isolamento biomonitorado, antioxidante, atividade inibidora da enzima transcriptase reversa, artêmias.

CHAPTER III

Biological activities as screening strategy for isolation of natural products from *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta)

ABSTRACT

Many species of *Gracilaria* have been investigated regarding their biological potential because of their large use and high biodiversity. However, despite the knowledge about biological potential with extracts obtained from the species of the genus, only few studies have tried to isolate the chemical constituents responsible for such activities. In this study, the red macroalgae *Gracilaria caudata* J. Agardh and *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie were investigated about their antioxidant potential, enzymatic inhibition of HIV-1 reverse transcriptase, anticholinesterase activity and the brine shrimp lethality assay. To achieve this goal, extracts of different polarities were obtained and submitted to the biomonitoring isolation, utilizing the extracts/fractions, which showed the best results for the activities mentioned above. Promising activities were obtained for the aqueous extract (which has a large amount of sulfated polysaccharides) of *G. domingensis* in the inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and the hexanic and dichloromethane extract of *G. caudata* in the brine shrimp lethality assay.

Keywords: Rhodophyta, *Gracilaria*, biomonitored isolation, antioxidant, reverse-transcriptase inhibitors, brine shrimp.

1. INTRODUÇÃO

Algas gracilarioides (Gracilariaceae) são algas vermelhas que incluem espécies de importância econômica devido à exploração do ficocoloide ágar, muito utilizado pelas indústrias alimentícia, química e de biotecnologia (Armisen 1997). O gênero com maior biodiversidade desta família é *Gracilaria* Greville, sendo também responsável pela maior parte do ágar comercializado no mundo (Santelices 2014). Espécies deste gênero também são consumidas *in natura* e usadas pela medicina popular (Armisen 1997). Devido ao amplo uso e alta biodiversidade, muitas destas espécies têm sido investigadas quanto ao potencial biológico.

Entre as atividades biológicas que têm sido relatadas incluem-se propriedades antitumoral de *Gracilaria corticata* (J. Agardh) J. Agardh (Zandi et al. 2010), anti-hipercolesterolêmica de *Gracilaria tenuistipitata* C. F. Chang & B. M. Xia (Lin et al. 2010), anti-obesidade de *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss (Kim et al. 2012) e antioxidante de *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) M. Steentoft, L. M. Irvine & W. F. Farnham (Francavilla et al. 2013). Até mesmo os polissacarídeos sulfatados, que são constituintes do ágar, apresentam atividade biológica descrita como, atividade contra os vírus do herpes simples 1 e 2 em *G. corticata* (Chattopadhyay et al. 2008), anti-inflamatória em *Gracilaria birdiae* E. M. Plastino & E. C. Oliveira (Vanderlei et al. 2011) e antidiarreica em *Gracilaria caudata* J. Agardh (Costa et al. 2016).

No entanto, apesar do conhecimento sobre potenciais biológicos com extratos obtidos de espécies do gênero, poucos estudos têm tentado isolar os constituintes químicos responsáveis por tais atividades. Um exemplo é o estudo de Sakthivel et al. (2016) no qual os autores isolaram o diterpeno fitol de *Gracilaria edulis* (S. G. Gmelin) P. C. Silva por isolamento biomonitorado frente a células de adenocarcinoma pulmonar (A549).

Estudos de caracterização química de espécies de Gracilariaceae têm descrito presença de ácidos graxos, assim como esteróis (Xu et al. 2015), carotenoides (Guaratini et al. 2012), diterpenos (Santos et al. 2015) e eicosanoides (Gerwick et al. 1990), além de compostos halogenados, principalmente voláteis (Whitfield et al. 1999). As espécies desta família também possuem aminoácidos tipo micosporina (MAAs, do inglês *Mycosporine-like Amino Acids*) que devido às suas propriedades antioxidantes e de fotoproteção frente à radiação ultravioleta, vêm sendo amplamente estudados (De la Coba et al. 2009; Wada et al. 2015).

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades biológicas dos extratos de duas espécies de macroalgas nativas, *G. caudata* e *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie, as quais são pouco estudadas. Desta forma, foram avaliados o potencial de seus extratos e/ou substâncias isoladas, visando uma triagem preliminar dessas

algas, em atividades inibidoras enzimática (transcriptase reversa do HIV do tipo 1 e acetilcolinesterase), antioxidantes e de toxicidade frente ao crustáceo artêmia.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta e obtenção do material algáceo

As macroalgas vermelhas estudadas foram coletadas na zona entremarés em duas praias no nordeste brasileiro em 2013. *Gracilaria caudata* foi coletada na Praia de Mãe Luiza (Natal – Rio Grande Norte) pela Prof.^a Eliane Marinho-Soriano (Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN) que também realizou a identificação. *Gracilaria domingensis* foi coletada na Praia Morro de Pernambuco (Ilhéus – Bahia) e a identificação foi confirmada pela Dr.^a Beatriz Nogueira Torrano da Silva por meio de *DNA BarCode*. Os materiais coletados foram lavados em água corrente para retirada de restos de areia, epífitos, epibiontes e fauna acompanhante e excesso de sal. Em seguida, secos ao sol para posterior transporte ao laboratório, onde foram secos em estufa a 40 °C por sete dias.

2.2. Obtenção dos extratos brutos

Os materiais algáceos secos (350 g de *G. caudata* e 1000 g de *G. domingensis*) foram pulverizados e submetidos a maceração seriada à quente (50 ± 5 °C) por 8 h com diferentes solventes de ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, metanol e metanol 80% (1:10, w/v). Em seguida, os solventes foram evaporados em rotaevaporador (temperatura < 50 °C). Um extrato aquoso à quente foi obtido a partir de 10% do resíduo final, por maceração em água a 50 ± 5 °C (1:20, w/v), por 8 h, e depois liofilizado. Os extratos obtidos em metanol e metanol 80% foram ressuspensos em metanol, o suficiente para solubilizar e visualizar a formação do precipitado. Este precipitado, correspondente a sais (ver Capítulo II), foi descartado. Dessa forma, foram obtidos cinco extratos brutos para cada alga: hexânico, diclorometânico, metanólico (dessalinizado), hidrometanólico 80% (dessalinizado) e aquoso.

2.3. Isolamento biomonitorado

O isolamento biomonitorado seguiu várias etapas conforme representado na Figura 1. Após realizar os bioensaios (inibição das enzimas transcriptase reversa do HIV-1 e acetilcolinesterase, antioxidantes e toxicidade frente as artêmias) com os cinco extratos brutos, aqueles ativos foram particionados gerando fases de partição. Estas fases de partição foram novamente testadas nos bioensaios citados anteriormente. As fases de partição ativas foram fracionadas gerando

frações. As frações ativas foram novamente fracionadas, quando possível, gerando subfrações ou fornecendo substâncias isoladas. Cada uma destas etapas será melhor descrita nos itens posteriores.

Figura 1. Guia do isolamento biomonitorado para *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*. Extratos brutos: H = hexânico, D = diclorometânico, M = metanólico, M80 = hidrometanólico 80% e A = aquoso. Fases de partição: “a” é referente à fase proveniente da partição com diclorometano (apolar) e “p” é referente à fase proveniente da partição com metanol 50% (polar). F é referente às frações e S referente às subfrações.

2.3.1 Particionamento dos extratos brutos ativos

Os extratos brutos ativos foram particionados entre os solventes metanol 50% e diclorometano, gerando duas fases de partição, uma polar obtida a partir do metanol 50% (“p” na Fig. 1) e a outra apolar obtida a partir do diclorometano (“a” na Fig. 1). Estas fases de partição ativas foram avaliadas em Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) (item 2.4). As fases de partição similares quimicamente foram reunidas: fases de partição polares (p) do extrato hexânico (H) e diclorometânico (D) em *G. caudata* formando a fase de partição HDp (Fig.1). Mais uma vez, as fases de partição obtidas foram submetidas aos bioensaios e, aquelas que se mostraram ativas foram fracionadas conforme suas polaridades e rendimento.

2.3.2. Fracionamento das fases de partição ativas

As fases de partição ativas de *G. caudata* (M80a) e *G. domingensis* (Ha e M80a) foram fracionadas em cromatografia em coluna de topo aberto utilizando silicagel 60 sinalizada (sílica de fase reversa) (MerckMillipore®) como adsorvente. A fase móvel utilizada consistiu em um gradiente de solvente em ordem decrescente de polaridade: água, metanol 10%, metanol 20%, metanol 40%, metanol 60%, metanol 80%, metanol e diclorometano. Cada uma das frações provenientes de uma fase de partição foi concentrada em rotaevaporador e comparadas em CG-EM, CLAE-DAD e em Cromatografia de Camada Delgada (CCD) (item 2.5). As frações quimicamente semelhantes foram reunidas.

A fase de partição HDp de *G. caudata* foi fracionada em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência semipreparativa (CLAE semipreparativa) no equipamento Agilent 1260 series. Foi usada uma coluna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB C18 (9,4 mm x 250 mm x 5 µm), com fase móvel de ácido acético 0,1% e acetonitrila com a seguinte programação: 90% A (0 min); 90% A (6 min); 85% A (7 min); 85% A (22 min); 50% A (32 min); 0% A (42 min); 0% A (50 min). Fluxo: 2,92 mL/min. Temperatura da coluna = 30 °C. Detecção em 225, 270 e 330 nm.

2.3.3. Subfracionamento das frações ativas e isolamento de substâncias

O subfracionamento através de Cromatografia em Camada Delgada preparativa (CCD preparativa) foi empregado para a fração HaF5 de *G. domingensis* (Fig.1). Foram utilizadas cromatoplasas de silicagel 60G (MerckMillipore®), previamente impregnadas com fluoresceína sódica (0,02%). A fase móvel foi hexano: éter dietílico: ácido acético (80:20:1). Após o desenvolvimento da cromatografia e evaporação completa do solvente, as placas foram visualizadas sob luz UV para visualização e coleta das faixas.

As frações ativas com menores complexidades químicas foram submetidas a CLAE semipreparativa para o isolamento dos constituintes (Fig. 1). A partir da fração M80aF2 e M80aF3 de *G. domingensis* foi isolada uma substância ainda não identificada (substância 3) e na fração HDpF9 de *G. caudata* foram isoladas duas substâncias não identificadas (substâncias 10 e 11). Para isso, foi empregada uma coluna de fase reversa Zorbax Eclipse XDB C18 (9,4 mm x 250 mm x 5 µm). O gradiente foi formado por ácido acético 0,1% (A) e acetonitrila (B) com a seguinte programação: 90% A (0 min); 90% A (6 min); 50% A (7 min); 0% A (17 min); 0% A (27 min); 90% A (30 min). Fluxo: 2,92 mL/min. Temperatura: 40 °C. Detecção em 225, 270 e 330 nm.

2.4. Isolamento dos aminoácidos tipo micosporina (MAAs)

Como dito anteriormente, MAAs são comuns em espécies de Gracilariaceae e vêm despertando grande interesse nos estudos dos seus potenciais biológicos. Com isso, independente da detecção de atividade, foi realizado os procedimentos de isolamentos na fase de partição polar do extrato metanólico de *G. domingensis* obtida por partição do extrato metanólico (dessalinizado) como descrito no item 2.3.1.

Foi empregada uma coluna de fase normal Zorbax RX-SIL (9,4 mm x 250 mm x 5 µm), com fluxo de 4 mL/min e temperatura de 30 °C. Primeiramente, foram coletadas frações enriquecidas com os MAAs utilizando uma fase móvel isocrática de 20% de ácido acético 0,2% e 80% de acetonitrila por 15 min. As frações ricas nos MAAs porphyra 334 e chinorina foram isoladas com um método isocrático com 20% de uma mistura de acetonitrila: metanol: água (80:10:10) (pH 2,2 ajustado com ácido trifluoroacético - TFA) e 80% de acetonitrila por 10 min. Já para as frações ricas no MAA palitina, o gradiente foi formado por ácido acético 0,2% (A) e acetonitrila (B), sendo de 0 a 15 min a variação de A, indo de 20% para 55%, depois até os 16 min voltando para 20% de A.

2.5. Avaliação química das amostras

Para reunir as fases de partição, frações e subfrações resultantes do isolamento biomonitorado (item 2.3), além de tentar identificar algumas das substâncias presentes nessas amostras, cada uma delas foi avaliada em CG-EM, CLAE-DAD e CCD, de acordo com suas características.

2.5.1. Análises em Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

Excetuando-se os extratos aquosos, todas as outras amostras foram analisadas em CG-EM. Para tanto, as amostras foram dissolvidas em 50 µL de piridina e derivatizadas por reação com 50 µL de BSTFA (N, O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida) por 30 min a 80 °C. Em seguida, foram analisados em CG-EM (Agilent 6890N/5975) na seguinte programação: $T_0 = 100$ °C por 6 min, 15 °C/min até 225 °C e 5 °C/min até 300 °C permanecendo constante nesta temperatura por 9 min. A coluna empregada foi a HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). O gás de arraste utilizado foi o hélio, com fluxo de 1 mL/min. A temperatura de injeção foi de 300 °C. O espectrômetro de massas foi ajustado com os seguintes parâmetros: temperatura da fonte de 230 °C, temperatura do quadrupolo de 150 °C, voltagem da eletromultiplicadora (EM) de 70 eV, amplitude de detecção de massa de 40 - 1000 unidades de massa atômica com 2,64 scan/s. A identificação dos componentes majoritários foi feita através do banco de dados NIST/NBS (aceitos índice de similaridade > 900) e através de comparação com dados da literatura.

2.5.2. Análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

Todas as amostras geradas no isolamento biomonitorado exceto os extratos aquosos foram analisadas em um cromatógrafo líquido Agilent 1260. Duas programações foram utilizadas de acordo com a composição das amostras. Para os metabólitos gerais foi empregada a coluna de fase reversa Zorbax Eclipse Plus C18 (150 mm x 4,6 mm x 3,5 μ m). Fase móvel de ácido acético 0,1% (A) e acetonitrila (B), com a seguinte programação: 90% A (0 min); 90% A (6 min); 85% A (7 min); 85% A (22 min); 50% A (32 min); 0% A (42 min); 0% A (50 min). Fluxo: 1 mL/min. Temperatura da coluna = 30 °C. Detecção em 225, 270, 320, 330 e 360 nm. Amplitude de varredura do DAD = 200 – 600 nm.

Para os MAAs foi empregada a coluna de fase normal Zorbax RX-SIL (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m). A fase móvel modificada de Hartmann et al. 2015 foi um gradiente de acetonitrila: acetato de amônio (5 mM) (9:1; v/v) (A) e acetonitrila: acetato de amônio (5 mM) (1:1; v/v) (B), com a seguinte programação: 20% A (0 min), aumentando para 55% A até 15 min e descendo para 20% A até 16 min e ficando constante até 21 min. Fluxo: 1 mL/min. Temperatura da coluna = 30 °C. Detecção em 225, 270, 320, 330 e 360 nm. Amplitude de varredura do DAD = 200 – 600 nm. A identificação dos MAAs foi feita por comparação com padrões.

2.5.3. Análises em Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Alíquotas de concentrações conhecidas das frações e subfrações geradas a partir da fase de partição Ha de *G. domingensis* (Fig. 1) foram aplicadas em placas cromatográficas de silicagel (60F - Merck). A fase móvel foi constituída de uma mistura de hexano: éter dietílico: ácido acético (80:20:1, v/v) (Bartz et al. 2007). A placa foi revelada com vapor de iodo em câmara fechada. Foram usados como padrões: ácido linoleico (Sigma-Aldrich®), triacilglicerol e colesterol, estes dois últimos obtidos a partir de gema de ovo de galinha (Robyt & White 1987).

2.6. Análises químicas dos extratos aquosos

Os extratos aquosos foram analisados por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*) na Universidade Federal do Paraná (UFPR) com a colaboração do Prof. Dr. Miguel Nosedá e da Dr.^a Luciana Garcia Ferreira. As análises de FTIR foram realizadas utilizando espectrofotômetro de marca Bruker Alpha FTIR. Os espectros foram obtidos na faixa de 400 a 4000/cm.

Os valores de porcentagens de carbono e de nitrogênio dos extratos aquosos foram obtidos por análises elementares no analisador Perkin-Elmer (CHN 2400) realizadas pela

Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) (Ver Capítulo II – item 2.5.1). Já o valor de enxofre foi obtido por turbidimetria com cloreto de bário, com metodologia modificada a partir de Yoshimura (2006) para espectrofotômetro de microplacas (Elisa) (Synergy™ H1) (Ver Capítulo II – item 2.5.2).

2.7. Ensaio da inibição da atividade da enzima transcriptase reversa do HIV-1

O ensaio da inibição da atividade da enzima Transcriptase Reversa do HIV do tipo 1 (TR-HIV-1) foi realizado utilizando-se o kit “*Reverse Transcriptase Assay, colorimetric*” (Roche®), em colaboração com a Prof.^a Dr.^a Lucimar Barbosa da Motta (Universidade Paulista - UNIP).

As amostras a serem testadas (extratos, fases de partição, frações e substâncias isoladas) foram preparadas a 1000 µg/mL em DMSO 10%, preparado em água tratada com dicarbonato de dietila (DEPC, do inglês *diethylpyrocarbonate*). O DMSO 10% também foi usado como controle negativo. Em microtubo, uma alíquota de 20 µL das amostras foi adicionada à 0,5 µL da enzima transcriptase reversa, 19 µL do tampão de lise e 20 µL da solução de oligos + polyA. Esta mistura resultante foi incubada a 37 °C por 1 h. Em seguida, esta mistura foi transferida para o poço da microplaca, coberta com uma fita adesiva (ambas fornecidas pelo fabricante do kit) e incubada a 37 °C por 1 h. Após este período, os poços da microplaca foram lavados por cinco vezes com 250 µL de tampão de lavagem. Após a lavagem foi adicionada a cada poço uma mistura contendo 198 µL do tampão de diluição conjugado e 2 µL da solução de anticorpo (Anti-DIG-POD). Em seguida, repetiu-se a lavagem dos poços da microplaca por cinco vezes com 250 µL de tampão de lavagem. A seguir, foi adicionado 200 µL de uma solução de ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] preparada com tampão de substrato.

Em espectrofotômetro para microplacas (Elisa) (Synergy™ H1), leituras da microplaca a 405 e 490 nm foram realizadas a cada 5 min por 20 min sob agitação constante. O controle positivo foi Foscarnet sódico hexahidrato (Sigma-Aldrich®) do qual foi feito um curva de dose-resposta (0-1 µg/mL) para o cálculo do IC50 (concentração inibitória em 50% da atividade da enzima). Para os cálculos de porcentagem de inibição da enzima, as absorbâncias obtidas em 490 nm foram descontadas das respectivas obtidas em 405 nm, esta diferença é usada para os cálculos. A seguinte fórmula foi aplicada: $(Ac - Aa) \times 100 / Ac$, onde Ac é absorbância do controle negativo e Aa absorbância da amostra.

2.8. Ensaio da inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase

O ensaio da inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase foi realizado conforme Mathew & Subramanian (2014) com modificações. Tampão Tris-HCl (50 mM, pH 8) foi usado para

preparar todas as soluções usadas neste ensaio. Foi preparada uma solução contendo DTNB (Ácido 2,2'-dinitro-5-5'-ditio-dibenzóico) (10 mM), cloreto de sódio (0,1 M) e cloreto de magnésio (0,02 M). A enzima acetilcolinesterase (Sigma-Aldrich®) foi dissolvida a 1026 U/mL e armazenada em freezer -80 °C (solução estoque). As diluições posteriores na concentração de 0,26 U/mL foram feitas em albumina do soro bovino (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*) 0,1% em tampão Tris-HCl.

Para o ensaio, foram adicionados em cada poço, 20 µL de amostra (1000 µg/mL em DMSO 10%) ou controle positivo (fisostigmina, 0 a 8 µg/mL em DMSO 10%) ou controle negativo (DMSO 10%), 50 µL da solução contendo DTNB, 10 µL da enzima acetilcolinesterase diluída (0,26 U/mL) e 110 µL de tampão Tris-HCl. A placa foi incubada por 15 min a temperatura ambiente sob agitação constante e, em seguida, realizada a leitura a 405 nm. Esta primeira leitura corresponde ao branco das amostras. Foram adicionados automaticamente 10 µL de iodeto de acetiltiocolina (15 mM) e novas leituras foram realizadas após 20 min em temperatura ambiente sob agitação constante. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da enzima, calculados com a seguinte fórmula: $(Ac - Aa) \times 100 / Ac$, onde Ac é absorbância do controle negativo e Aa absorbância da amostra, sendo estas obtidas através da diferença entre os valores de absorbância da leitura após a adição do iodeto de acetiltiocolina menos os valores das mesmas amostras antes da adição (branco das amostras).

2.9. Determinação das capacidades antioxidantes

Os ensaios antioxidantes foram realizados em espectrofotômetro para microplacas (Elisa) (Synergy™ H1). Os reagentes químicos foram comprados da marca Sigma-Aldrich® e grande parte deles gentilmente cedidos pela Prof.^a Dr.^a Cláudia Maria Furlan (Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - IB-USP). Metanol ou DMSO foram utilizados para diluir as amostras avaliadas (5 mg/mL), fazer o controle negativo para cada ensaio e diluir os padrões (ácido gálico e Trolox). Todos os ensaios foram realizados em penumbra, a temperatura ambiente e em triplicata, caso contrário será mencionado.

2.9.1. Atividade sequestradora do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

O ensaio do radical DPPH foi realizado segundo o método proposto por Brand-williams et al. (1995) conforme o protocolo adaptado por Furlan et al. (2015) com modificações. O radical DPPH foi dissolvido em metanol, com auxílio de sonicação por 15 min, para obtenção de uma solução de 0,142 mM (absorbância em torno de 1). Em microplaca de 96 poços, foram adicionadas, em cada poço, 20 µL das amostras a serem testadas (extratos, fases de partição,

frações, controle negativo ou curva padrão) e 280 µL da solução metanólica do radical DPPH. A microplaca ficou incubada sob agitação constante por 20 min, após este período foram realizadas leituras a 515 nm. Foi feita uma curva padrão com Trolox diluído em metanol nas concentrações entre 0 a 200 µg/mL.

2.9.2. Determinação da capacidade quelante do íon ferroso (Fe^{+2})

O ensaio para determinação da capacidade quelante do íon ferroso foi realizado segundo o método proposto por Dinis et al. (1994) conforme o protocolo adaptado por Harb et al. (2016). Em microplaca de 96 poços, foram adicionadas, em cada poço, 20 µL das amostras a serem testadas (extratos, fases de partição, frações, controle negativo ou curva padrão), 10 µL de uma solução aquosa de sulfato de amônio ferroso (1 mM) e 260 µL de uma solução aquosa de acetato de amônio 10%. Após 5 min foram adicionados 10 µL do reagente ferrozina (6,1 mM). A placa foi incubada por 10 min sob agitação constante. Logo após este período, leituras foram realizadas a 562 nm. Foi feita uma curva padrão com ácido gálico diluído em metanol nas concentrações entre 0 a 200 µg/mL. Os valores foram expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de amostra.

2.9.3. Atividade sequestradora do radical ABTS^{•+}

O ensaio do radical ABTS^{•+} foi realizado segundo método proposto por Re et al. (1999) e adaptado para microplacas de 96 poços. A solução do radical ABTS^{•+} foi preparada misturando 1 mL de uma solução aquosa de ABTS (7 mM) em 17,6 µL de uma solução aquosa de persulfato de potássio (140 mM). Esta solução reagiu por 16 h no escuro antes do uso. Em seguida, esta solução foi diluída em metanol (1:40) até obter absorbância em torno de 1. Em cada poço, foram adicionadas alíquotas de 20 µL das amostras a serem testadas (extratos, fases de partição, frações, controle negativo ou curva padrão) e 280 µL da solução do radical ABTS^{•+}. Após 20 min, a placa foi lida a 734 nm. Foi feita uma curva padrão com Trolox diluído em metanol nas concentrações entre 0 a 100 µg/mL e os resultados finais foram expressos em µmol de equivalentes Trolox (ET) por g de amostra.

2.9.4. Método de redução de ferro (FRAP - *Ferric Reducing Activity Power*)

O ensaio do método FRAP foi realizado segundo método proposto por Benzie & Strain (1996) conforme o protocolo adaptado por Urrea-Victoria et al. (2016). A solução reativa FRAP foi obtida através da mistura de 25 mL de tampão acetato (0,3 M; pH 3,6), 2,5 mL de uma solução de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) (10 mM) em ácido clorídrico (40 mM) e 2,5 mL de uma

solução aquosa de cloreto férrico (20 mM). Em microplacas de 96 poços, foram adicionadas, em cada poço, alíquotas de 20 μL das amostras (extratos, fases de partição, frações, controle negativo ou curva padrão), 15 μL de água ultrapura e 265 μL da solução reativa FRAP. A placa foi incubada por 20 min a 37 °C sob agitação constante. Logo em seguida, a placa foi lida a 595 nm. Foi feita uma curva padrão com Trolox diluído em metanol nas concentrações entre 0 a 100 $\mu\text{g/mL}$ e os valores finais foram calculados em μmol de equivalentes Trolox (ET) por g amostra.

2.9.5. Ensaio do reagente Folin-Ciocalteu

O ensaio do reagente Folin-Ciocalteu foi adaptado para microplaca de 96 poços com base no método descrito em Waterman & Mole (1994). Em cada poço, foram adicionadas alíquotas de 20 μL das amostras (extratos, fases de partição, frações, controle negativo ou curva padrão), 200 μL de água ultrapura e 20 μL do reagente Folin-Ciocalteu. No intervalo entre 5-8 min, foi adicionado 60 μL de uma solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3) (250 mg/mL). Após 30 min, as absorbâncias foram lidas a 760 nm. Foi feita uma curva padrão com ácido gálico diluído em metanol nas concentrações entre 0 a 150 $\mu\text{g/mL}$. Os valores foram expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de amostra.

2.9.6. Sistema β -caroteno/ácido linoleico

O protocolo foi adaptado para microplacas de 96 poços a partir do método descrito em Marco (1968). Foram misturados 16 μL de ácido linoleico, 160 μL de tween 40 e 200 μL de uma solução de β -caroteno (2 mg/mL em diclorometano). Após a homogeneização, a solução resultante foi evaporada até completa retirada do diclorometano. Em seguida, foram adicionados 50 mL da água ultrapura previamente oxigenada por pelo menos 30 min em compressor de ar e a solução reativa resultante foi homogeneizada. Desta solução reativa, 280 μL foram lidos a 450 nm para obter um valor inicial de absorbância entre 0,8 - 1. Em cada poço, foram adicionadas alíquotas de 20 μL das amostras (extratos, fases de partição, frações, controle negativo ou curva padrão) e 280 μL da solução reativa. A placa foi incubada a 45 °C sob agitação constante e leituras foram realizadas a cada 20 min por 2 h. Foi feita uma curva padrão com Trolox diluído em metanol nas concentrações entre 0 a 1,5 $\mu\text{g/mL}$ e os valores finais foram expressos em μmol de equivalentes Trolox (ET) por g amostra.

2.9.7. Índice de Capacidade Antioxidante Total (ICAT)

Para um panorama geral das atividades antioxidantes dos extratos foi calculado o Índice de Capacidade Antioxidante Total (ICAT), baseado em Seeram et al. (2008). Este índice atribui pesos iguais para os ensaios antioxidantes, permitindo fazer comparações entre eles. Dentro de um mesmo ensaio antioxidante em cada etapa do biomonitoramento os resultados foram transformados em porcentagens em relação a amostra mais ativa. A média dos valores obtidos para cada amostra nos diferentes ensaios foi chamado, no presente trabalho, de ICAT.

2.10. Ensaio de toxicidade frente às artêmias

O ensaio de toxicidade frente às artêmias foi realizado conforme Solis et al. (1993). Cistos de artêmias (Maramar®) foram eclodidos em 450 mL de água do mar (32 ups) sob forte aeração por compressor para aquários (BOYU® U9900), luz constante e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, mantidos em câmaras incubadoras do tipo BOD (FANEM 347 - CDG).

Após 48 h, os náuplios foram atraídos com uma fonte de luz e transferidos para um novo recipiente. Uma alíquota de 100 μL desta suspensão contendo cerca de 20 ± 5 náuplios foi adicionada ao poço da microplaca de 96 poços. Em seguida, foi adicionado 100 μL das amostras (extratos, fases de partição, frações ou substâncias isoladas). DMSO 2% preparado em água do mar foi utilizado como controle negativo e para diluição das amostras e do controle positivo (dicromato de potássio diluídos em concentrações entre 0 a 200 $\mu\text{g/mL}$). A placa foi colocada novamente na BOD por 24 h no escuro. Após este período foram contados os náuplios mortos em cada poço com auxílio de estereomicroscópio. Posterior a contagem, foram adicionados 100 μL de metanol 80% e após 30 min o número total de náuplios foi aferido. A porcentagem de mortalidade (%) foi calculada na seguinte maneira: $(M \times 100) / TN$, onde TN é o total de náuplios e M o de náuplios mortos. Foram testadas cinco concentrações das amostras ativas diluídas nas concentrações entre 0 a 2000 $\mu\text{g/mL}$ para o cálculo do IC50 ($\mu\text{g/mL}$), dependendo da atividade.

2.11. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP) ($n = 3$). O software para processamento dos dados, obtenção dos gráficos e cálculos dos IC50 ($\mu\text{g/mL}$) foi o GraphPad 7®.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Inibição da atividade da enzima Transcriptase Reversa do HIV do tipo 1 (TR-HIV-1)

Neste ensaio a concentração final das amostras testadas foi de 100 µg/mL. A atividade das amostras foram definidas em níveis: atividade insignificante, quando os valores foram abaixo de 25% de inibição da enzima; atividade baixa, quando os valores foram entre 25% e 50%; atividade moderada entre 50% e 75% e atividade potente com valores acima de 75%. Estes níveis de atividade foram baseados em César et al. (2011) e Chukwujekwu et al. (2014).

Os extratos hexânico, diclorometânico e metanólico de *G. caudata* e os extratos hexânico, metanólico e hidrometanólicos 80% de *G. domingensis* apresentaram atividades consideradas insignificantes com valores de inibição inferiores a 25% (Tabela 1). Os extratos hidrometanólicos 80% e aquosos de *G. caudata* e o extrato diclorometânico de *G. domingensis* apresentaram valores de inibição em torno de 30% indicando uma baixa atividade (Tabela 1). Somente o extrato aquoso de *G. domingensis* com 50% de inibição da enzima apresentou uma atividade considerada moderada (IC₅₀ = 76,5 µg/mL).

Tabela 1. Porcentagem de inibição da atividade da enzima transcriptase reversa do HIV do tipo 1 para os extratos brutos de *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis* e para o controle positivo Foscarnet sódico hexahidrato, todos na concentração de 100 µg/mL. Valores expressos em Médias ± DP (n = 3). O símbolo “-” representa que não se aplica.

Extratos	<i>Gracilaria caudata</i>	<i>Gracilaria domingensis</i>	100 µg/mL
Hexânico	20,1±14,0	19,3±1,7	-
Diclorometânico	18,4±6,0	31,5±4,7	-
Metanólico	21,4±1,0	8,1±4,6	-
Hidrometanólicos 80%	29,2±0,8	9,9±1,9	-
Aquoso	29,8±3,6	50,8±6,7	-
<i>Controle Positivo</i>	-	-	97

Extratos aquosos de algas marinhas têm sido relatados como ativos frente a várias fases de replicação do HIV. Segundo Cardellina et al. (1993) dos 307 extratos ativos de algas marinhas analisados pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI, do inglês *National Cancer Institute*), 86% eram extratos aquosos. Segundo os autores, estes extratos ativos são constituídos por polissacarídeos sulfatados.

Os extratos aquosos de *G. caudata* e *G. domingensis* também são majoritariamente constituídos por polissacarídeos sulfatados. No entanto, como visto (Tabela 1) as atividades

foram distintas. Enquanto o extrato aquoso de *G. caudata* apresentou uma atividade baixa, o de *G. domingensis* apresentou uma atividade moderada.

Analisando quimicamente, os dois polissacarídeos são do tipo galactanas, caracterizados por informações obtidas através de espectroscopia FTIR (Fig. 2) com base em Melo et al. (2002). As galactanas em algas vermelhas são constituídas por díades, formadas pelas unidades A (resíduos de β -D-galactopirranose) e B (resíduos de α -galactopirranose), repetidas ao longo do polissacarídeo. A banda 890/cm permite classificar estas galactanas como agaranas, ou seja, os resíduos de α -galactopirranose (unidade B) são do tipo L. A banda 930/cm é característica de 3,6-anidro- α -L-galactose (unidade B). As bandas 820/cm, 1250/cm e 1370/cm indicam a presença de éster sulfato.

Os polissacarídeos de *G. caudata* apresentaram menor grau de substituição por sulfato do que o polissacarídeos de *G. domingensis*, 0,17 e 0,34, respectivamente. Muitos trabalhos têm verificado uma alta correlação entre o aumento de sulfatação nos polissacarídeos e a maior inibição frente a diferentes vírus (Duchene & Wouessidjewe 1996; Li et al. 2015), explicando assim a maior atividade dos extratos aquosos de *G. domingensis* (50,8% - Tabela 1) em relação a *G. caudata* (29,8% - Tabela 1).

Figura 2. Espectros de infravermelho para os extratos aquosos de *Gracilaria caudata* (A) e *Gracilaria domingensis* (B). As principais bandas são representadas com tracejados.

Vários polissacarídeos naturais ou comerciais, como, heparina, sulfato de dextrana, ciclodextrinas sulfatadas (Duchene & Wouessidjewe 1996), fucanas (Queiroz et al. 2008) são

ativos frente a várias etapas da replicação do HIV. Nakashima et al. (1987), por exemplo, verificaram que o polissacarídeo sulfatado do tipo carragenana da rodófito *Schizymenia pacifica* (Kylin) Kylin inibiu a atividade da TR-HIV. Estes autores concluíram que o sulfato das cadeias laterais deste polissacarídeo parece atuar ativamente sobre a inibição desta enzima. Até onde sabemos, os polissacarídeos de *Gracilaria* ainda não tinham sido avaliados frente a atividade anti-HIV.

As atividades antivirais de polissacarídeos sulfatados são bem diversas, tendo sido relatada atividade não somente ao vírus do HIV, mas também ao vírus da dengue, influenza, herpes, citomegalovírus entre outros (Jiao et al. 2011). Estas atividades já são conhecidas há muito tempo, porém, como são estruturas poliméricas e o modo de ação muitas vezes não é específico, isso tem gerado pouco interesse por estas substâncias (Witvrouw & De Clercq 1997; Damonte et al. 2004). Por outro lado, como estes polímeros geralmente são de baixo custo, estão presentes em grandes quantidades e são de baixa toxicidade, o uso voltado a aplicação tópica em cremes e géis microbicidas tem um alto potencial (Damonte et al. 2004). Muitos polímeros como polissacarídeos vêm sendo testados para este fim, como pode ser visto na revisão sobre o tema por Alexandre et al. (2016), incluindo carragenanas. No entanto, estes últimos foram pouco eficientes em seres humanos.

Já ressaltamos anteriormente a importância que vem sendo dada aos estudos dos MAAs e explicamos a razão para o isolamento desses metabólitos (item 2.4), mesmo que os extratos não tivessem apresentado atividades promissoras. Dessa forma, decidimos avaliar o potencial inibitório de alguns MAAs presentes nos extratos das algas estudadas. Os MAAs chinorina, palitina e porphyra 334 foram testados frente à enzima TR-HIV-1 na concentração de 100 µg/mL (Tabela 2).

No geral, os MAAs foram ativos frente à enzima TR-HIV-1, porém pouco eficientes quando comparados ao controle positivo (Tabela 2). Palitina foi o único que apresentou atividade moderada, com um percentual de inibição superior a 50%. Algumas substâncias nitrogenadas, como é o caso dos MAAs, são ativas frente a enzima TR-HIV-1. Entre elas, as mais conhecidas são os análogos de nucleosídeos como o próprio AZT (azidotimidina), um dos fármacos mais antigos usados nas infecções com esse vírus (Béthune 2010). Até onde sabemos, não há na literatura outros dados referentes a atividade inibitória de MAAs em relação a transcriptase reversa do HIV tipo 1.

Tabela 2. Porcentagem de inibição da enzima transcriptase reversa do HIV-1 para aminoácidos tipo micosporina e para o controle positivo Foscarnet sódico hexahidrato. Os valores de IC50 (concentrações referentes a inibição de 50% da enzima) foram expressos em µg/mL. Valores expressos em Médias ± DP (n = 3). O símbolo “-” representa que não foi possível o cálculo do IC50.

	100 µg/mL	IC50 µg/mL
Chinorina	33,8± 4,5%	-
Palitina	57,3 ± 0,2%	-
Porphyra 334	27,2± 12,9%	-
Controle positivo	87,1%	0,061

3.2. Inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase

Amostras com valores de IC50 < 100 µg/mL já indicam que o extrato é ativo frente à enzima acetilcolinesterase (Mathew & Subramanian 2014). Os extratos brutos de ambas as algas, *G. caudata* e *G. domingensis*, não foram ativos (Fig. 3). Todos os valores foram inferiores a 20% de inibição, indicando que o IC50 é maior do que 100 µg/mL (maior concentração efetiva testada das amostras). Esse valor é muito superior ao IC50 de fisostigmina (controle positivo), que foi de 0,17 µg/mL.

Com base na literatura, há alguns trabalhos estudando extratos de espécies de *Gracilaria* frente à enzima acetilcolinesterase. Natarajan et al. (2009), por exemplo, estudando extratos metanólicos de *G. gracilis* e *G. edulis* verificaram um bom potencial destas algas com IC50 inferiores ao controle positivo donepezila. Entretanto, resultados semelhantes aos nossos foram encontrados com os extratos metanólicos para *G. corticata* e *Gracilaria salicornia* (C. Agardh) E. Y. Dawson por Ghannadi et al. (2013). Esses autores encontraram valores inferiores a 20% de inibição na concentração de 100 µg/mL para os extratos das duas algas, com IC50 de 9500 µg/mL e 8700 µg/mL, respectivamente, excepcionalmente maiores que o IC50 = 0,7 µg/mL do controle positivo galantamina.

Alguns estudos têm demonstrado que alcaloides tendem a serem inibidores da enzima acetilcolinesterase (Barbosa et al. 2006). Os MAAs podem ser caracterizados como alcaloides devido à presença de um nitrogênio em um anel heterocíclico. Nas algas estudadas, os MAAs foram detectados, principalmente, nos extratos metanólicos e hidrometanólicos 80% das duas algas. Mesmo esses extratos não tendo apresentado atividade, alguns MAAs foram testados isoladamente, a saber: chinorina, palitina e porphyra 334. Da mesma forma que os extratos, essas substâncias não foram ativas até a concentração de 100 µg/mL.

Figura 3. Porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase pelos extratos brutos de *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis* (100 µg/mL). O controle positivo (CP) foi fisostigmina (1 µg/mL). Valores expressos em Médias ± DP (n = 3). Extratos brutos: H = hexânico, D = diclorometânico, M = metanólico, M80 = hidrometanólico 80% e A = aquoso.

3.3. Avaliação da capacidade antioxidante

É recomendado que a capacidade antioxidante *in vitro* seja avaliada por diferentes métodos, pois, os resultados dos diferentes ensaios são complementares (Prior et al. 2005). Neste trabalho foram usados seis métodos para avaliar a capacidade antioxidante: sequestro do radical DPPH, redução do reagente de Folin-Ciocalteu, sequestro do radical ABTS⁺, redução do reagente FRAP, quelante do íon ferroso (Fe⁺²) e um ensaio frente a peroxidação lipídica usando o sistema β-caroteno/ácido linoleico.

Para facilitar o uso dos resultados da atividade antioxidante no direcionamento do isolamento biomonitorado, foi adotado o Índice de Capacidade Antioxidante Total (ICAT) baseado em Seeram et al. (2008) em cada etapa do biomonitoramento, ou seja, ICAT dos extratos brutos só são comparáveis entre si e assim por diante.

Todas as amostras foram inativas para o ensaio com o radical DPPH nas maiores concentrações testadas (5 mg/mL) e, por isso, os resultados não são apresentados neste capítulo.

3.3.1. Investigação da capacidade antioxidante dos extratos de *Gracilaria caudata*

Na Figura 4 é apresentado um esquema para acompanhar o isolamento biomonitorado através da capacidade antioxidante das amostras de *G. caudata*. As amostras (extratos brutos, fases de partição e frações) destacadas nos retângulos em preto foram ativas pelo biomonitoramento.

Figura 4. Isolamento biomonitorado guiado pela capacidade antioxidante das amostras de *Gracilaria caudata* (extratos brutos, fases de partição e frações). As amostras ativas foram destacadas em preto. Extratos brutos: H = hexânico, D = diclorometânico, M = metanólico, M80 = hidrometanólico 80% e A = aquoso. Fases de partição: “a” é referente à fase proveniente da partição com diclorometano (apolar) e “p” é referente à fase proveniente da partição com metanol 50% (polar). F é referente às frações.

Dos extratos brutos, o extrato hidrometanólico 80% (M80) apresentou o maior valor de ICAT (91%) (Tabela 3). A fase de partição apolar (M80a) derivada deste extrato foi a mais ativa (ICAT = 100%) (Tabela 3) e, por isso, foi escolhida para ser fracionada em cromatografia em coluna fornecendo quatro frações (M80aF1 a M80aF4) (Fig. 4). Os valores de ICAT para as frações a partir da fase de partição M80a foram muito próximos entre si e acima de 50% (Tabela 3), sendo, entre elas, a fração M80aF2 a mais ativa (ICAT = 59%). Devido ao baixo rendimento dessas frações (massas inferiores a 200 mg) não foi possível continuar o isolamento biomonitorado para tentar isolar a(s) substância(s) mais ativa.

Tabela 3. Índices de Capacidade Antioxidante Total (ICAT) em porcentagens e capacidades antioxidantes por massa seca para as amostras avaliadas (extratos, fases de partição e frações) de *Gracilaria caudata*. Valores expressos em Médias $\pm$ DP ($n = 3$). FC = ensaio do reagente Folin-Ciocalteu, ABTS^{•+} = ensaio do radical ABTS^{•+}, FRAP = ensaio do reagente FRAP, Quelante = ensaio quelante do íon ferroso (Fe⁺²) e BCAR = ensaio do sistema β -caroteno/ácido linoleico. O símbolo “-” representa que a amostra não foi ativa.

Amostras*	FC (mg EAG/g)	ABTS ^{•+} (μ mol ET/g)	FRAP (μ mol ET/g)	Quelante (mg EAG/g)	BCAR (μ mol ET/g)	ICAT (%)
<i>Extratos brutos</i>						
H	-	16,97 $\pm$ 1,17	6,56 $\pm$ 1,35	39,36 $\pm$ 1,15	0,49 $\pm$ 0,22	38
D	-	36,56 $\pm$ 3,69	11,80 $\pm$ 1,46	19,96 $\pm$ 1,98	0,55 $\pm$ 0,03	33
M	1,83 $\pm$ 0,67	80,47 $\pm$ 1,16	16,03 $\pm$ 1,07	3,19 $\pm$ 0,77	0,73 $\pm$ 0,01	40
M80	6,33 $\pm$ 0,32	109,55 $\pm$ 2,0	46,81 $\pm$ 1,76	22,43 $\pm$ 8,34	0,71 $\pm$ 0,01	91
A	-	23,96 $\pm$ 7,76	-	-	0,78 $\pm$ 0,01	26
<i>Fases de partição</i>						
M80p	1,73 $\pm$ 0,16	59,62 $\pm$ 0,99	5,73 $\pm$ 0,58	0,74 $\pm$ 1,28	0,65 $\pm$ 0,10	41
M80a	3,49 $\pm$ 0,02	79,93 $\pm$ 108	59,41 $\pm$ 14,71	19,08 $\pm$ 6,0	1,04 $\pm$ 0,09	100
<i>Frações a partir de M80a</i>						
F1	3,20 $\pm$ 0,23	252,90 $\pm$ 26,4	47,93 $\pm$ 0,48	-	2,16 $\pm$ 0,00	55
F2	7,25 $\pm$ 0,15	178,60 $\pm$ 33,6	81,93 $\pm$ 4,89	-	1,53 $\pm$ 0,09	59
F3	7,91 $\pm$ 0,24	100,31 $\pm$ 25,7	134,00 $\pm$ 2,03	-	0,42 $\pm$ 0,05	52
F4	2,99 $\pm$ 0,29	38,97 $\pm$ 15,11	120,65 $\pm$ 7,58	25,25 $\pm$ 0,7	0,69 $\pm$ 0,10	55

* Extratos brutos: H = hexânico, D = diclorometânico, M = metanólico, M80 = hidrometanólico 80% e A = aquoso. Fases de partição: “a” é referente à fase proveniente da partição com diclorometano (apolar) e “p” é referente à fase proveniente da partição com metanol 50% (polar). F é referente às frações.

Foi possível identificar algumas substâncias e classes químicas majoritárias apenas por CG-EM. Na fração M80aF1 foram encontrados ácidos graxos livres (ácido hexadecanoico e mirístico), colesterol, ácido isetiônico, heterosídeos (floridosídeo e os isômeros D/L isofloridosídeos), aminoácidos e monopalmitina. Nas frações M80aF2 e M80aF3 foram encontrados ácidos graxos livres (ácido hexadecanoico e mirístico), colesterol, ácido isetiônico e heterosídeos (floridosídeos e isômeros D/L isofloridosídeos) e em M80aF4 foram encontrados apenas ácidos graxos livres (ácido hexadecanoico e mirístico) e colesterol.

A composição química dessas frações é semelhante em CG-EM. Em todas foi verificada a presença de dos ácidos graxos hexadecanoico e mirístico e do colesterol, sugerindo que talvez essas substâncias, ou pelo menos alguma delas, possa ter um papel importante no resultado observado para a fase de partição M80a. Wang et al. (2014) verificaram que esteróis como colesterol podem apresentar atividade antioxidante moderada, auxiliando na proteção de membranas fosfolipídicas.

3.3.2. Investigação da capacidade antioxidante dos extratos de *Gracilaria domingensis*

Na Figura 5 é apresentado um esquema para acompanhar o isolamento biomonitorado através da capacidade antioxidante das amostras de *G. domingensis*. Os retângulos destacados em preto são referentes as amostras ativas (extratos brutos, fases de partição, frações e subfrações).

Figura 5. Isolamento biomonitorado guiado pela capacidade antioxidante das amostras de *Gracilaria domingensis* (extratos brutos, fases de partição, frações e subfrações). As amostras ativas foram destacadas em preto. Extratos brutos: H = hexânico, D = diclorometânico, M = metanólico, M80 = hidrometanólico 80% e A = aquoso. Fases de partição: “a” é referente à fase proveniente da partição com diclorometano (apolar) e “p” é referente à fase proveniente da partição com metanol 50% (polar). F é referente as frações e S as subfrações.

Os extratos hexânico (H) e hidrometanólico 80% (M80) foram os mais ativos dentre os extratos brutos, com valores de ICAT de 83% e 70%, respectivamente (Tabela 4). Primeiramente serão mostrados os resultados do biomonitoramento para o extrato hexânico e logo em seguida para o extrato hidrometanólico 80%.

Tabela 4. Índices de Capacidade Antioxidante Total (ICAT) em porcentagens e capacidades antioxidantes em massa seca para as amostras avaliadas (extratos, fases de partição e frações) de *Gracilaria domingensis*. Valores expressos em Médias $\pm$ DP ($n = 3$). FC = ensaio do reagente Folin-Ciocalteu, ABTS⁺⁺ = ensaio do radical ABTS⁺⁺, FRAP = ensaio do reagente FRAP, Quelante = quelante do íon ferroso (Fe⁺²) e BCAR = Sistema β -caroteno/ácido linoleico. O símbolo “-” representa que a amostra não foi ativa.

Amostras*	FC (mg EAG/g)	ABTS ⁺⁺ (μ mol ET/g)	FRAP (μ mol ET/g)	Quelante (mg EAG/g)	BCAR (μ mol ET/g)	ICAT (%)
<i>Extratos brutos</i>						
H	-	51,47 $\pm$ 4,01	44,48 $\pm$ 0,92	34,13 $\pm$ 4,81	0,82 $\pm$ 0,01	83
D	1,75 $\pm$ 0,30	42,73 $\pm$ 8,73	14,80 $\pm$ 1,07	14,34 $\pm$ 2,77	0,66 $\pm$ 0,01	59
M	5,05 $\pm$ 0,04	31,66 $\pm$ 1,43	-	-	0,67 $\pm$ 0,00	42
M80	5,33 $\pm$ 0,14	40,00 $\pm$ 1,11	6,60 $\pm$ 0,45	19,70 $\pm$ 7,88	0,80 $\pm$ 0,00	70
A	-	18,35 $\pm$ 1,84	-	-	0,69 $\pm$ 0,00	32
<i>Fases de partição de H</i>						
Hp	1,22 $\pm$ 0,16	30,99 $\pm$ 0,94	15,30 $\pm$ 0,50	25,56 $\pm$ 2,19	1,02 $\pm$ 0,02	38
Ha	-	67,04 $\pm$ 0,53	16,45 $\pm$ 3,08	34,41 $\pm$ 1,69	2,85 $\pm$ 0,10	62
<i>Fases de partição de M80</i>						
M80p	3,68 $\pm$ 0,24	37,29 $\pm$ 1,17	1,34 $\pm$ 0,26	-	1,27 $\pm$ 0,01	28
M80a	8,44 $\pm$ 0,64	75,24 $\pm$ 1,49	61,79 $\pm$ 0,87	28,22 $\pm$ 2,50	1,74 $\pm$ 0,52	89
<i>Frações a partir de Ha</i>						
F1	-	-	57,03 $\pm$ 5,38	35,47 $\pm$ 5,35	1,47 $\pm$ 0,24	29
F2	-	-	78,84 $\pm$ 8,11	-	0,82 $\pm$ 0,11	19
F3	5,82 $\pm$ 0,79	40,21 $\pm$ 5,41	79,48 $\pm$ 4,53	-	0,97 $\pm$ 0,13	49
F4	7,09 $\pm$ 1,68	77,12 $\pm$ 5,66	61,26 $\pm$ 1,85	-	1,77 $\pm$ 0,32	63
F5	-	-	123,41 $\pm$ 6,02	82,50 $\pm$ 8,27	2,63 $\pm$ 0,09	75
<i>Frações a partir de M80a</i>						
F1	0,24 $\pm$ 0,31	84,85 $\pm$ 10,47	103,89 $\pm$ 3,73	-	2,05 $\pm$ 0,29	24
F2	19,27 $\pm$ 1,98	294,55 $\pm$ 6,36	219,74 $\pm$ 7,19	-	5,07 $\pm$ 0,44	80
F3	18,46 $\pm$ 0,34	261,39 $\pm$ 3,26	267,73 $\pm$ 9,78	8,03 $\pm$ 3,43	4,73 $\pm$ 0,74	88
F4	11,74 $\pm$ 0,23	166,88 $\pm$ 11,9	191,26 $\pm$ 9,16	14,46 $\pm$ 3,09	3,84 $\pm$ 0,42	73
F5	12,19 $\pm$ 0,91	164,14 $\pm$ 5,29	232,59 $\pm$ 6,28	-	4,34 $\pm$ 0,15	58
<i>Subfrações a partir de HaF5</i>						
S1	-	-	61,21 $\pm$ 1,57	13,80 $\pm$ 0,88	0,77 $\pm$ 0,07	55
S2	-	-	112,77 $\pm$ 17,0	83,80 $\pm$ 3,86	0,79 $\pm$ 0,04	97
S3	-	-	89,68 $\pm$ 12,20	22,09 $\pm$ 7,86	0,35 $\pm$ 0,02	48
S4	-	-	122,39 $\pm$ 1,97	34,34 $\pm$ 5,11	0,68 $\pm$ 0,09	74
S5	-	-	52,26 $\pm$ 4,65	66,26 $\pm$ 4,75	0,53 $\pm$ 0,02	63
<i>Isolado de M80F2-F3</i>						
Substância 3	13,42 $\pm$ 4,08	32,88 $\pm$ 4,66	4,77 $\pm$ 1,98	-	-	-

* Extratos brutos: H = hexânico, D = diclorometânico, M = metanólico, M80 = hidrometanólico 80% e A = aquoso. Fases de partição: “a” é referente à fase proveniente da partição com diclorometano (apolar) e “p” é referente à fase proveniente da partição com metanol 50% (polar). F é referente às frações. S é referente às subfrações.

O extrato hexânico de *G. domingensis* foi particionado gerando as fases de partição: polar (Hp) e apolar (Ha). A fase de partição Ha (ICAT = 62%) foi mais ativa do que a Hp (ICAT = 38%) exceto para o ensaio do reagente Folin-Ciocalteu (Tabela 4) e, por isso, foi fracionada. Dentre as frações resultantes de Ha, as frações HaF4 e HaF5 apresentaram os maiores valores de ICAT (63% e 75%, respectivamente).

A capacidade antioxidante da fração HaF4 frente aos ensaios do reagente Folin-Ciocalteu, do radical ABTS⁺ e do reagente FRAP foi superior ao observado para a fase de partição de origem (Ha) e para o extrato bruto hexânico (H) do qual foi originada (Tabela 4). No caso da fração HaF5, o mesmo foi observado para os ensaios do reagente FRAP e quelante do íon ferroso. Entre as duas frações, entretanto, a HaF5 foi a mais complexa quimicamente (Fig. 6A), apresentando lipídios polares, monoacilglicerol, colesterol, ácidos graxos livres e triacilglicerol. Dessa forma, o isolamento biomonitorado prosseguiu com o fracionamento desta fração em CCD preparativa, originando cinco subfrações nomeadas de HaF5-S1 a HaF5-S5 (Fig. 5). A Figura 6B mostra a indicação das faixas que foram separadas em CCD. Essas subfrações foram testadas quanto às suas capacidades antioxidantes (Tabela 4).

As subfrações HaF5-S2, HaF5-S4 e HaF5-S5 apresentaram os maiores valores de ICAT. A subfração HaF5-S2 apresentou a maior capacidade antioxidante com ICAT de 97%, com destaque para o ensaio com o reagente FRAP e quelante de íon ferroso. Já HaF5-S4 apresentou alta capacidade antioxidante frente ao ensaio com o reagente FRAP e HaF5-S5 foi ativa para o ensaio quelante de íon ferroso. No ensaio do sistema β -caroteno/ácido linoleico ocorreu uma redução na atividade das subfrações em relação à fração de origem HaF5, sugerindo um efeito sinérgico ou aditivo das substâncias que compõem esta fração (Tabela 4).

Análises em CG-EM foram realizadas nas subfrações obtidas em CCD preparativa. Foi confirmada a presença em HaF5-S2 de monoacilglicerol, indetificado como monopalmitina, porém com 36% de abundância relativa. Os demais componentes dessa subfração não foram possíveis de serem identificados. Na subfração HaF5-S5 foram identificados ácidos graxos livres, majoritariamente composta pelo ácido palmítico (45,9% de abundância relativa), colesterol e derivados (51,2% de abundância relativa) e o alceno *n*-heptadecano (2,8% de abundância relativa). Apesar dessas duas subfrações, HaF5-S2 e HaF5-S5, se destacarem pela atividade frente ao ensaio quelante de íon ferroso (Tabela 4), a diferença observada nas suas composições químicas indica que a atividade antioxidante observada no extrato hexânico de *G. domingensis* pode ser, provavelmente, explicada pela presença de diferentes agentes quelantes. A subfração HaF5-S4 corresponde ao colesterol (96,9% de abundância relativa). Pelos resultados, sugere-se que esta substância provavelmente participa na capacidade antioxidante

frente o reagente FRAP e, em menor intensidade, nos ensaios de quelante do íon ferroso e sistema β -caroteno/ácido linoleico (Tabela 4). No entanto, como a subfração HaF5-S2, na qual não foi detectada a presença de colesterol, também apresenta uma capacidade antioxidante destacável no ensaio com o reagente FRAP, isso pode indicar que diferentes substâncias devem atuar nesse ensaio sobre o reagente FRAP. A presença do colesterol como importante antioxidante também foi observada para *Gracilaria caudata*, como mencionado acima.

Figura 6. Cromatografia em camada delgada de sílicagel para identificação das principais classes lipídicas nas frações HaF4 e HaF5 obtidas a partir do fracionamento das fases de partição apolares reunidas dos extratos brutos hexânico e diclorometânico de *Gracilaria domingensis* (A). Indicação das faixas numeradas de S1 a S5 (HaF5-S1 a HaF5-S5) obtidas da fração HaF5 (B). Padrão: gema de ovo de galinha. Fase móvel: hexano: éter dietílico: ácido acético (80:20:1, v/v). Revelação da placa: vapor de iodo.

O extrato bruto hidrometanólico 80% de *G. domingensis* também apresentou uma alta capacidade antioxidante com valor de ICAT de 70% (Tabela 4). Dessa forma, este extrato foi particionado gerando duas fases de partição, uma apolar (M80a) e outra polar (M80p) (Fig. 5). A fase de partição M80a foi a mais ativa frente a todos ensaios realizados (Tabela 4) sendo, por isso, fracionada em cromatografia de coluna gerando 5 frações (M80aF1 a M80aF5) (Fig. 5). As frações M80aF2 e M80aF3 foram as mais ativas, com valores de ICAT de 80% e 88%, respectivamente, seguidas da fração M80aF4 com ICAT de 73%. Comparativamente, houve um aumento da capacidade antioxidante das fases de partição e frações em relação ao extrato bruto (M80) (Tabela 4).

A análise em CG-EM das frações M80aF1 a M80aF5 não foi esclarecedora em termos de composição química. Todas as frações apresentaram como majoritário ácido palmítico. Em CLAE-DAD foi possível uma melhor distinção entre as frações (Fig. 7). A fração M80aF3 foi a mais complexa quimicamente (Fig. 7C) e como visto pelos valores de ICAT, esta também apresentou maior capacidade antioxidante. Nos primeiros cinco minutos do cromatograma, os picos 1 e 2 correspondem aos MAAs coeluidos (asterina 330, chinorina, palitina, palitinol e porphyra 334). Em torno dos 30 min, dois picos 3 e 4, aparecem nesta fração e também na fração M80aF2 majoritariamente (Fig. 7B). Entre os tempos 36-40 min, no final da corrida, foram detectados vários picos (5 a 8) em baixa abundância, que também foram observados na fração M80aF4 (Fig. 7D). Nenhum pico foi detectado na fração M80aF5 (Fig. 7E).

A partir da junção das frações M80aF2 e M80aF3 foi possível isolar as substâncias correspondentes aos picos 3 e 4, porém estas ainda não foram identificadas. Foram obtidos cerca de 10 mg da substância 3 e menos de 1 mg da substância 4. Por isso, a avaliação da atividade antioxidante só foi possível para a substância 3. Esta substância isolada mostrou resultado positivo nos ensaios antioxidantes com o reagente de Folin-Ciocalteu, com o radical ABTS^{••} e, de maneira reduzida, com o reagente de FRAP (Tabela 4). No entanto, de forma comparativa aos extratos, às fases de partição e às frações, a substância isolada apresentou baixa capacidade antioxidante (Tabela 4). Esta substância, apesar de ser majoritária nos cromatogramas, representou somente 1% da amostra após o isolamento. A menor atividade da substância 3 isolada sugere um efeito sinérgico das substâncias da fração M80aF3.

Os MAAs (asterina 330, chinorina, palitina, palitinol e porphyra 334) também foram isolados (ver item 2.4). No entanto, mais detalhes sobre a atividade antioxidante de MAAs estão apresentados no Capítulo V.

Figura 7. Perfil cromatográfico obtido em CLAE-DAD das frações M80aF1 (A), M80aF2 (B), M80aF3 (C), M80aF4 (D) e M80aF5 (E) em mesma escala geradas a partir da fase de partição apolar (M80a) do extrato hidrometanólico 80% (M80) de *Gracilaria domingensis*. Cromatogramas processados em $\lambda=280$ nm.

3.3.3. Considerações gerais sobre as capacidades antioxidantes de *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*

De maneira geral, as duas algas apresentaram capacidades antioxidantes similares. Frações derivadas a partir das fases de partição apolares provenientes dos extratos hidrometanólicos 80% das duas algas foram as mais ativas frente a maioria dos ensaios, exceto frente a capacidade quelante do íon ferroso (Tabela 3 e 4). Porém, como já mencionado acima, os baixos rendimentos dessas frações não permitiram o isolamento da(s) substância(s) responsável pelas atividades. Apenas para *G. domingensis* foi possível obter a substância 3, a qual, isoladamente, apresentou baixa capacidade antioxidante.

Analisando a capacidade quelante do íon ferroso, as amostras (fases de partição, frações e subfrações) originadas a partir do extrato hexânico de *G. domingensis* ricas em substâncias mais apolares foram as que apresentaram maiores atividades, indicando que estas substâncias são as responsáveis pela capacidade quelante nesta alga. Na literatura não foram encontrados relatos das substâncias detectadas aqui como majoritárias apresentando atividade quelante. No entanto, monoacilgliceróis, como por exemplo, a monopalmitina encontrada na subfração com maior atividade quelante HaF5-S2 são relatados por serem ativos antioxidantes (Gomes et al. 2010).

Foi possível verificar que o colesterol, presente nas duas algas, influenciou a capacidade antioxidante, principalmente, frente ao ensaio com o reagente FRAP. Vários esteróis apresentam moderada atividade antioxidante e ajudam a proteger as membranas fosfolipídicas (Wang et al. 2014). Galea & Brown (2009) sugerem que o colesterol é uma das barreiras antioxidantes mais antigas na história evolutiva dos organismos, ajudando a proteger contra espécies reativas de oxigênio.

Comparações diretas entre o presente estudo com outros trabalhos realizados com espécies de *Gracilaria* é bastante difícil, visto que: existe uma ampla variedade de procedimentos nos ensaios antioxidantes, na qual não há uma padronização entre os diferentes estudos, em alguns trabalhos há ausência de padrões de referências e há formas distintas de expressar as capacidades antioxidantes. No geral, a maioria dos trabalhos publicados que avaliaram a capacidade antioxidante de extratos de espécies deste gênero utilizou os ensaios com o reagente Folin-Ciocalteu e o radical DPPH.

Na Tabela 5 é apresentada uma compilação de vários trabalhos com extratos de espécies de *Gracilaria* que podem ser comparados com os resultados do presente trabalho. Para o ensaio utilizando o reagente Folin-Ciocalteu as capacidades antioxidantes variam de 0,1 mg EAG/g de extrato para *G. gracilis* (Zhang et al. 2007) a 107 mg EAG/g de extrato para *Gracilaria*

cearensis (A. B. Joly & Pinheiro) A. B. Joly & Pinheiro (Martins et al. 2013). Os resultados observados neste trabalho foram condizentes com esta variação, sendo o intervalo para *G. caudata* de 1,83 a 7,91 mg EAG/g de extrato, enquanto que para *G. domingensis* esse intervalo foi de 1,75 a 19,27 mg EAG/g de extrato.

Todas as amostras obtidas para *G. caudata* e *G. domingensis* no presente trabalho foram inativas para o ensaio com o radical DPPH. De forma coerente, os valores de IC50 disponíveis na literatura para os extratos de espécies de *Gracilaria* frente ao ensaio de DPPH geralmente são muito altos quando comparados a substâncias padrões, confirmando, assim, a baixa capacidade antioxidante frente a este ensaio (Tabela 5).

Os resultados para o método do reagente FRAP e do radical ABTS^{•+} foram possíveis de serem comparados apenas com os dados disponíveis para *G. gracilis* (Francavilla et al. 2013). Para o método do reagente FRAP as faixas de variação foram semelhantes entre *G. caudata* (1,83 - 252,90 µmol ET/g de extrato) e *G. domingensis* (1,73 - 267 µmol ET/g de extrato) e mais baixas que o obtido para *G. gracilis* (50 - 800 µmol ET/g de extrato). O mesmo foi observado com relação ao ensaio com o radical ABTS^{•+}. *Gracilaria caudata* (16,97 - 252,90 µmol ET/g de extrato) e *G. domingensis* (18,35 - 294,55 µmol ET/g de extrato) apresentaram valores semelhantes, sendo menos efetivos que aqueles obtidos para *G. gracilis* (70 - 430 µmol ET/g de extrato) que foram maiores.

Para os ensaios quelante do íon ferroso e sistema β-caroteno/ácido linoleico não foi possível comparar com a literatura, pois não foram encontrados trabalhos avaliando esses parâmetros com espécies de *Gracilaria*.

Tabela 5. Capacidades antioxidantes para os extratos de diferentes espécies de *Gracilaria* frente ao ensaio do reagente Folin-Ciocalteu (mg EAG/g de extrato) e do radical DPPH* (mg/mL).

Espécies	Folin-Ciocalteu	Radical DPPH*		R*
		IC50 dos extratos	IC50 do Padrão	
<i>Gracilaria birdiae</i>	1,06-1,13	0,76	-	1
<i>Gracilaria bursa-pastoris</i>	0,38	42,27	<0,16	2
<i>Gracilaria caudata</i>	0,34	33,73	<0,16	2
	1,83-7,91	>1	-	17
<i>Gracilaria cearensis</i>	107	-	-	3
<i>Gracilaria cervicornis</i>	20,18	-	-	3
<i>Gracilaria changii</i>	-	0,51-7,80	0,069	4
<i>Gracilaria cornea</i>	0,88-0,89	0,77-0,86	-	1
	0,5	72,51	<0,16	2
<i>Gracilaria corticata</i>	4,1-8,7	-	-	5
	5,13	>1	-	6
<i>Gracilaria cylindrica</i>	0,41	62,82	<0,16	2
<i>Gracilaria domingensis</i>	49,9	-	-	3
	1,75-19,27	>1	<0,1	17
<i>Gracilaria edulis</i>	1,49-16,26	-	-	7
	1,8-6,6	-	-	5
	3,49-34,30	-	-	8
<i>Gracilaria gracilis</i>	0,7	-	-	9
	2,11	9,30	<0,15	10
	0,1	-	-	11
	3,49-5,36	-	-	12
	0,16-21	0,82-35,03	0,67	13
	3,9	24,22	-	14
<i>Gracilaria tenuistipitata</i>	0,67	-	-	11
<i>Gracilaria textorii</i>	7,05-17,03	-	-	15
	0,36	28,94	<0,16	2
<i>Gracilaria tikvahiae</i>	0,7-2,94	2,07	<0,1	16
	0,62	-	-	11

*Referências : 1. Souza et al. (2011), 2. Zubia et al. (2007), 3. Martins et al. (2013), 4. Chan et al. (2015), 5. Sachindra et al. (2010), 6. Lakmal et al. (2014), 7. Ganesan et al. (2008), 8. Heffernan et al. (2014b), 9. Yildiz et al. (2014), 10. Zubia et al. (2009), 11. Zhang et al. (2007), 12. Heffernan et al. (2014a), 13. Francavilla et al. (2013), 14. Yangthong et al. (2009), 15. Heo et al. (2006), 16. Osuna-Ruiz et al. (2016), 17. Presente estudo.

3.4. Avaliação da toxicidade frente aos crustáceos artêmias

Para análises da atividade tóxica utilizando artêmias, valores de $IC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ já indicam que o extrato é ativo (Meyer et al. 1982). Assim, para a triagem dos extratos e fases de partição apenas a concentração efetiva de $1000 \mu\text{g/mL}$ foi testada.

Os extratos de *G. domingensis* não foram ativos, já que apresentaram $IC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$. Portanto, para estas amostras não se prosseguiu o isolamento biomonitorado. A Figura 8 resume o isolamento biomonitorado para *G. caudata*, as amostras ativas foram destacadas nos retângulos pretos. Os extratos brutos mais apolares foram ativos. O extrato hexânico foi mais efetivo matando 100% das artêmias ($IC_{50} = 560 \mu\text{g/mL}$); já o extrato diclorometânico matou 49% ($IC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 6).

Figura 8. Isolamento biomonitorado guiado pela toxicidade frente artêmias das amostras de *Gracilaria caudata* (extratos brutos, fases de partição e frações). As amostras ativas foram destacadas em preto. Extratos brutos: H = hexânico, D = diclorometânico, M = metanólico, M80 = hidrometanólico 80% e A = aquoso. Fases de partição: “a” é referente à fase proveniente da partição com diclorometano (apolar) e “p” é referente à fase proveniente da partição com metanol 50% (polar). F é referente às frações.

O rendimento dos extratos apolares foram baixos. Em *G. caudata*, o rendimento de extrato hexânico foi de 0,2% em relação à massa seca de alga, enquanto o extrato obtido com diclorometano rendeu 0,3%. Avaliando as fases de partição desses extratos ativos, verificou-se

que as atividades foram encontradas nas fases polares, com 100% de mortalidades das artêmias (Tabela 6). Estas fases de partição renderam, em relação à massa total, menos de 0,1%.

Tabela 6. Taxa de mortalidade de artêmias (%), quando expostas a diferentes extratos e fases de partição (1000 µmg/mL). O símbolo “-” representa que a fração não foi testada.

	<i>Gracilaria caudata</i>			<i>Gracilaria domingensis</i>
	Bruto	Fase apolar	Fase polar	Bruto
Hexano	100%	30%	100%	0%
Diclorometano	49%	0%	100%	0%
Metanol	0%	-	-	0%
Metanol 80%	0%	-	-	0%
Aquoso	0%	-	-	0%

As fases de partição polares dos extratos obtidos com hexano e diclorometano, como mencionado anteriormente (ver item 2.3.1), foram reunidas, pois foram similares em composição. Essa fase de partição (HDp = 507,7 mg) foi fracionada em CLAE semipreparativa resultando em 13 frações nomeadas HDpF1 a HDpF13 (Fig. 9). Apenas a fração 9 (HDpF9) foi efetiva frente as artêmias (Tabela 7). Essa fração rendeu 5,79% de toda HDp e apresentou IC₅₀ = 56,31 µg/mL, menor do que o IC₅₀ do controle positivo de dicromato de potássio (61 µg/mL) (Tabela 7).

Figura 9. Perfil cromatográfico em CLAE-DAD da fase polar dos extratos hexânico e diclorometânico. Os números indicam as frações de 1 a 13 (HDpF1 a HDpF13) que foram coletadas em CLAE semipreparativa.

Tabela 7. Rendimento (% em relação ao total da fase de partição HDp) das frações obtidas em CLAE semipreparativa (HDpF1 a HDpF13) a partir do fracionamento da fase de partição polar HDp de *Gracilaria caudata* e respectivas taxas de mortalidade de artêmias (%). Concentração das frações = 100 µg/mL. Controle positivo = dicromato de potássio. O símbolo “-” significa que não foi obtido o IC50 (concentração referente a 50% de mortalidade das artêmias).

Frações a partir de HDp	Rendimento (%)	Mortalidade (%) (100 µg/mL)	IC50
F1	2,08	0%	-
F2	1,33	0%	-
F3	1,67	0%	-
F4	2,87	0%	-
F5	3,15	0%	-
F6	3,89	0%	-
F7	3,30	0%	-
F8	3,88	0%	-
F9	5,79	77 ± 6,28 %	56,31 µg/mL
F10	3,09	0%	-
F11	8,15	0%	-
F12	3,76	0%	-
F13	56,98	0%	-
Controle positivo	-	100 ± 6,28 %	61 µg/mL

A fração HDpF9 apresentou cinco picos principais em CG-EM correspondendo às substâncias de 9 a 13 (Tabela 8). As duas substâncias majoritárias (picos 10 e 11) foram isoladas e apresentaram atividade de 50% de mortalidade a 100 µg/mL. Assim, houve uma diminuição na atividade dos isolados em relação à fração HDpF9. Provavelmente, há um sinergismo das substâncias que compõem a fração levando a sua maior toxicidade. Infelizmente, até o momento, os cinco constituintes não foram possíveis de serem identificados pela NIST e em buscas na literatura.

Na literatura, os relatos para atividade de extratos de espécies de Gracilariaceae frente artêmias são bem diversos, independente da polaridade do extrato. Lhullier et al. (2006), avaliando extrato etanólico de *G. domingensis*, encontraram IC50 menores do que 50 µg/mL, já Valdés-Iglesias et al. (2003) encontraram valores de IC50 maiores do que 1000 µg/mL para o extrato aquoso para mesma espécie de alga. Sasidharan et al. (2008) também encontraram valores de IC50 maiores do que 1000 µg/mL para os extratos metanólicos de *Gracilaria changii* (B. M. Xia & I. A. Abbott) I. A. Abbott, J. Zhang & B. M. Xia. Saeidnia et al. (2012) estudando *Gracilariopsis persica* A. M. Bellorin, J. Sohrabipour & E. C. Oliveira detectaram atividade

tóxica do extrato de acetato de etila, com IC₅₀ de 4 µg/mL, sendo estigmasterol e β-sitosterol indicados pelos autores como responsáveis por esta toxicidade.

Tabela 8. Abundância relativa e os dez fragmentos majoritários (*m/z*) (CG-EM) de cada constituinte da fração ativa HDpF9 obtida a partir da fase de partição polar HDp de *Gracilaria caudata*.

Substância	Padrão de fragmentação (<i>m/z</i>)	Abundância relativa (%)
9	43 (18,9); 57 (21,9); 73 (100); 81 (22,1); 83 (18,6); 95 (21,1); 109 (19,5); 117 (22,8); 143 (37,7).	11,4
10	55 (13,6); 67 (14,7); 73 (100); 75 (57,7); 81 (13,6); 129 (37,1); 241 (15,1); 277 (48,1); 329 (54,1); 330 (15,0).	50,1
11	55 (13,0); 67 (15,3); 73 (89,8); 75 (53,9); 81 (11,7); 129 (41,9); 130 (12,2); 199 (100); 200 (18,2); 357 (33,8) .	26,8
12	43 (34,1); 55 (94,0); 69 (43,1); 73 (100); 75 (96,9); 81 (36,2); 83 (34,0); 95 (37,5); 137 (42,2); 153 (36,2).	6,6
13	41 (24,3); 55 (100); 73 (78,8); 75 (81,5); 81 (30,8); 97 (23,1); 125 (47,0); 129 (30,9); 140 (22,8); 141 (25,8).	5

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Gracilaria caudata e *G. domingensis*, apresentaram algum tipo de potencial biológico. Um resumo geral das atividades avaliadas pode ser visto na Figura 10. Em ambas algas os extratos hexânico e hidrometanólico 80% foram ativos, já os extratos metanólicos não foram ativos em nenhum ensaio avaliado.

A triagem preliminar indica um bom potencial dos extratos apolares de *G. caudata* frente ao modelo animal de crustáceos artêmias. Já o extrato aquoso (rico em polissacarídeos sulfatados) de *G. domingensis* foi bastante ativo frente a inibição da atividade da enzima transcriptase reversa do HIV-1. As algas avaliadas não foram ativas no ensaio de avaliação da inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase.

A capacidade antioxidante foi fraca, porém foi possível verificar alguns padrões de respostas para as duas algas: (i) extratos apolares apresentaram maiores atividades quelantes, (ii) o maior potencial antioxidante foi verificado nas fases apolares dos extratos hidrometanólicos 80%, entretanto, apesar desta similaridade de respostas entre as algas, estas fases são distintas quimicamente.

Figura 10. Distribuição geral das atividades biológicas avaliadas para extratos, fases de partição, frações, subfrações e substâncias isoladas de *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*. Extratos brutos: H = hexânico, D = diclorometânico, M = metanólico, M80 = hidrometanólico 80% e A=aquoso. Letras minúsculas são referentes a fase de partição: a letra “p” é referente a fase proveniente do metanol 50% (polar) e a letra “a” é referente a fase proveniente do diclorometano (apolar). F é referente as frações e S referente a subfrações.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexandre KB, Mufhandu HT, London GM, et al. (2016) Progress and perspectives on HIV-1 microbicide development. *Virology* 497:69–80.
- Armisen R (1997) Agar. In: Imeson AP (ed) *Thickening and Gelling Agents for Food*, 2nd ed. Springer Science+Business Media Dordrecht, pp 1–21.
- Barbosa JM, Medeiros KCP, Diniz MDFFM, et al. (2006) Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16:258–285.
- Bartz R, Li W-H, Venables B, et al. (2007) Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *Journal of Lipid Research* 48:837–47.
- Benzie IF, Strain JJ (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239:70–6.
- Béthune M-P de (2010) Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: a review of the last 20 years (1989–2009). *Antiviral Research* 85:75–90.
- Brand-williams W, Cuvelier ME, Berset C, et al. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Science and Technology* 28:25–30.
- Cardellina J, Munro M, Fuller R, et al. (1993) A chemical screening strategy for the dereplication and prioritization of HIV-inhibitory aqueous natural products extracts. *Journal of Natural Products* 56:1123–1129.
- César GZJ, Alfonso MGG, Marius MM, et al. (2011) Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase, toxicological and chemical profile of *Calophyllum brasiliense* extracts from Chiapas, Mexico. *Fitoterapia* 82:1027–1034.
- Chan PT, Matanjun P, Yasir SM, Tan TS (2015) Antioxidant activities and polyphenolics of various solvent extracts of red seaweed, *Gracilaria changii*. *Journal of Applied Phycology* 27:2377–2386.
- Chattopadhyay K, Ghosh T, Pujol CA, et al. (2008) Polysaccharides from *Gracilaria corticata*: sulfation, chemical characterization and anti-HSV activities. *International Journal of Biological Macromolecules* 43:346–51.
- Chukwujekwu JC, Ndhlala AR, de Kock CA, et al. (2014) Antiplasmodial, HIV-1 reverse transcriptase inhibitory and cytotoxicity properties of *Centrathium punctatum* Cass. and its fractions. *South African Journal of Botany* 90:17–19.
- Costa DS, Araújo TSL, Sousa NA, et al. (2016) Sulphated polysaccharide isolated from the seaweed *Gracilaria caudata* exerts an antidiarrhoeal effect in rodents. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 118:440–448.
- Damonte EB, Matulewicz MC, Cerezo AS (2004) Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. *Current Medicinal Chemistry* 11:2399–419.

- De la Coba F, Aguilera J, de Gálvez MV, et al. (2009) Prevention of the ultraviolet effects on clinical and histopathological changes, as well as the heat shock protein-70 expression in mouse skin by topical application of algal UV-absorbing compounds. *Journal of Dermatological Science* 55:161–9.
- Dinis TCP, Madeira V, Almeida M (1994) Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 315:161–169.
- Duchene D, Wouessidjewe D (1996) Pharmaceutical and medical applications of cyclodextrins. In: Dumitriu S (ed) *Polysaccharides in Medicinal Applications*. pp 575–602
- Francavilla M, Franchi M, Monteleone M, Caroppo C (2013) The red seaweed *Gracilaria gracilis* as a multi products source. *Marine Drugs* 11:3754–76.
- Furlan CM, Santos KP, Sedano-Partida MD, et al. (2015) Flavonoids and antioxidant potential of nine Argentinian species of *Croton* (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Botanica* 38:693–702.
- Galea AM, Brown AJ (2009) Special relationship between sterols and oxygen: Were sterols an adaptation to aerobic life? *Free Radical Biology and Medicine* 47:880–889.
- Ganesan P, Kumar CS, Bhaskar N (2008) Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresource Technology* 99:2717–2723.
- Gerwick WH, Bernart MW, Moghaddam MF, et al. (1990) Eicosanoids from the Rhodophyta: new metabolism in the algae. *Hydrobiologia* 204–205:621–628.
- Ghannadi A, Plubrukarn A, Zandi K, et al. (2013) Screening for antimalarial and acetylcholinesterase inhibitory activities of some Iranian seaweeds. *Research in Pharmaceutical Sciences* 8:113–118.
- Gomes T, Caponio F, Bruno G, et al. (2010) Effects of monoacylglycerols on the oxidative stability of olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90:2228–2232.
- Guaratini T, Lopes NP, Marinho-Soriano E, et al. (2012) Antioxidant activity and chemical composition of the non polar fraction of *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie and *Gracilaria birdiae* (Plastino & Oliveira). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22:724–729.
- Harb TB, Torres PB, Pires JS, et al. (2016) Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do sistema quelante de metais para extratos de algas. *Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo*, pp. 1–5. Disponível em: http://www2.ib.usp.br/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=67&Itemid=98
- Hartmann A, Becker K, Karsten U, et al. (2015) Analysis of mycosporine-like amino acids in selected algae and cyanobacteria by hydrophilic interaction liquid chromatography and a novel MAA from the red alga *Catenella repens*. *Marine Drugs* 13:6291–6305.

- Heffernan N, Smyth TJ, Fitzgerald RJ, et al. (2014a) Antioxidant activity and phenolic content of pressurised liquid and solid-liquid extracts from four Irish origin macroalgae. *International Journal of Food Science and Technology* 49:1765–1772.
- Heffernan N, Smyth TJ, Soler-Villa A, et al. (2014b) Phenolic content and antioxidant activity of fractions obtained from selected Irish macroalgae species (*Laminaria digitata*, *Fucus serratus*, *Gracilaria gracilis* and *Codium fragile*). *Journal of Applied Phycology* 519–530.
- Heo S, Cha S, Lee K, Jeon Y (2006) Antioxidant activities of red algae from Jeju Island. *Algae* 21:149–156.
- Jiao G, Yu G, Zhang J, Ewart HS (2011) Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine drugs* 9:196–223.
- Kim H-M, Kang S-I, Shin H-S, et al. (2012) Anti-obesity effect of *komulkosiraegi* [*Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss] extract in 3T3-L1 cells. *Food Science and Biotechnology* 21:83–89.
- Lakmal HC, Samarakoon KW, Lee W, et al. (2014) Anticancer and antioxidant effects of selected Sri Lankan marine algae. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* 42:315–323.
- Lhullier C, Horta P, Falkenberg M (2006) Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16:158–163.
- Li S, Xiong Q, Lai X, et al. (2015) Molecular modification of polysaccharides and resulting bioactivities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15:237–250.
- Lin Y-H, Tsai J-S, Hung L, Pan BS (2010) Hypocholesterolemic effect of compounded freshwater clam protein hydrolysate and *Gracilaria*. *Food Chemistry* 123:395–399.
- Marco G (1968) A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 45:594–598.
- Martins CDL, Ramlov F, Nocchi Carneiro NP, et al. (2013) Antioxidant properties and total phenolic contents of some tropical seaweeds of the Brazilian coast. *Journal of Applied Phycology* 25:1179–1187.
- Mathew M, Subramanian S (2014) In vitro screening for anti-cholinesterase and antioxidant activity of methanolic extracts of Ayurvedic medicinal plants used for cognitive disorders. *PLOS ONE* 9:1–7.
- Melo MRS, Feitosa JPA, Freitas ALP, De Paula RCM (2002) Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Carbohydrate Polymers* 49:491–498.
- Meyer BN, Ferrigni NAR, Putnam JE, et al. (1982) Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45:31–34.

- Nakashima H, Kido Y, Kobayashi N, et al. (1987) Purification and characterization of an avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor, sulfated polysaccharides extracted from sea algae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 31:1524–1528.
- Natarajan S, Shanmugiahthevar KP, Kasi PD (2009) Cholinesterase inhibitors from *Sargassum* and *Gracilaria gracilis*: seaweeds inhabiting South Indian Coastal Areas (Hare Island, Gulf of Mannar). *Natural Product Research* 23:355–369.
- Osuna-Ruiz I, López-Saiz C-M, Burgos-Hernández A, et al. (2016) Antioxidant, antimutagenic and antiproliferative activities in selected seaweed species from Sinaloa, Mexico. *Pharmaceutical Biology* 209:1–15.
- Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:4290–4302.
- Queiroz KCS, Medeiros VP, Queiroz LS, et al. (2008) Inhibition of reverse transcriptase activity of HIV by polysaccharides of brown algae. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 62:303–307.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26:1231–1237.
- Robyt JF, White BJ (1987) *Biochemical techniques: theory and practice*. Waveland Pr Inc (January 1990). 407p.
- Sachindra NM, Airanthi MKWA, Hosokawa M, Miyashita K (2010) Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of extracts from Indian seaweeds. *Journal of Food Science and Technology* 47:94–99.
- Saeidnia S, Perme P, Gohari AR, Mashinchian-Moradi A (2012) *Gracilariopsis persica* from Persian Gulf contains bioactive sterols. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 11:845–9.
- Sakthivel R, Muniasamy S, Archunan G, Devi KP (2016) *Gracilaria edulis* exhibit antiproliferative activity against human lung adenocarcinoma cell line A549 without causing adverse toxic effect in vitro and in vivo. *Food Function* 7:1155–1165.
- Santelices B (2014) Cultured aquatic species information programme: *Gracilaria* spp. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department*. Disponível em: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Gracilaria_spp/en
- Santos SAO, Vilela C, Freire CSR, et al. (2015) Chlorophyta and Rhodophyta macroalgae: A source of health promoting phytochemicals. *Food Chemistry* 183:122–128.
- Sasidharan S, Darah I, Jain K (2008) In vivo. and in vitro. toxicity study of *Gracilaria changii*. *Pharmaceutical Biology* 46:413–417.

- Seeram NP, Aviram M, Zhang Y, et al. (2008) Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:1415–1422.
- Solis P, Wright C, Anderson M (1993) A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta medica* 59:250–252.
- Souza BWS, Cerqueira MA, Martins JT, et al. (2011) Antioxidant potential of two red seaweeds from the Brazilian coasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:5589–5594.
- Urrea-Victoria V, Pires J, Torres PB, et al. (2016) Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. *Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo*, pp. 1–6. Disponível em: <http://www2.ib.usp.br/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=66&Itemid=98>
- Valdés-iglesias O, Díaz N, Cabranes Y, et al. (2003) The seaweed of Cuban's shelf as source of bioactive extracts. *Avicennia* 36–45.
- Vanderlei E de SO, De Araújo IWF, Quinderé ALG, et al. (2011) The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Inflammation Research* 60:1121–1130.
- Wada N, Sakamoto T, Matsugo S (2015) Mycosporine-like amino acids and their derivatives as natural antioxidants. *Antioxidants* 4:603–646.
- Wang T, Jonsdottir R, Olafsdottir G, Kristinsson HG (2014) Antioxidant properties of marine macroalgae. In: Kristinsson HG (ed) *Antioxidants and functional components in aquatic foods*, 1st ed. John Wiley & Sons, pp 283–317.
- Waterman PG, Mole S (1994) Extraction and chemical quantification. In: *Analysis of phenolic plant metabolites*, 1st ed. Wiley-Blackwell, pp 333–360.
- Whitfield FB, Helidoniotis F, Shaw KJ, Svoronos D (1999) Distribution of bromophenols in species of marine algae from eastern Australia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:2367–2373.
- Witvrouw M, De Clercq E (1997) Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *General Pharmacology* 29:497–511
- Xu T, Sutour S, Casabianca H, et al. (2015) Rapid screening of chemical compositions of *Gracilaria dura* and *Hypnea mucisformis* (Rhodophyta) from Corsican Lagoon. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients* 2:8–8.
- Yangthong M, Hutadilok-Towatana N, Phromkunthong W (2009) Antioxidant activities of four edible seaweeds from the Southern coast of Thailand. *Plant Foods for Human Nutrition* 64:218–223.
- Yildiz G, Dere E, Dere Ş (2014) Comparison of the antioxidative components of some marine macroalgae from Turkey. *Pakistan Journal of Botany* 46:753–757.

- Yoshimura CY (2006) *Avaliação do potencial de cultivo e produção de ágar de Gracilaria domingensis e de Gracilaria caudata (Rhodophyta, Gracilariales) na Enseada de Armação do Itapocoroy*. Universidade de São Paulo: Tese (Doutorado em Ciências). 163p.
- Zandi K, Tajbakhsh S, Nabipour I, et al. (2010) *In vitro* antitumor activity of *Gracilaria corticata* (a red alga) against Jurkat and molt-4 human cancer cell lines. *African Journal of Biotechnology* 9:6787–6790.
- Zhang WW, Duan XJ, Huang HL, et al. (2007) Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from *Symphycladia latiuscula* (Rhodomelaceae). *Journal of Applied Phycology* 19:97–108.
- Zubia M, Fabre MS, Kerjean V, Deslandes E (2009) Antioxidant and cytotoxic activities of some red algae (Rhodophyta) from Brittany coasts (France). *Botanica Marina* 52:268–277.
- Zubia M, Robledo D, Freile-Pelegrin Y (2007) Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Applied Phycology* 19:449–458.

CAPÍTULO IV

Extratos de *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) estimulam o crescimento de *Lactuca sativa in vitro*

RESUMO

Algas marinhas, principalmente algas pardas, vêm sendo usadas há muito tempo como bioestimulantes na agricultura, com resultados bastante promissores. Neste trabalho, extratos de duas agarófitas (*Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*) foram testados quanto ao potencial bioestimulante *in vitro* da germinação e no desenvolvimento inicial de alface. Não foram observadas diferenças na taxa de germinação com qualquer um dos extratos testados. No entanto, mudanças significativas foram verificadas nos parâmetros de crescimento inicial. O isolamento biomonitorado indicou que os extratos mais ativos foram os mais apolares, obtidos com hexano ou diclorometano, e os aquosos. Nos extratos apolares, o ácido palmítico, componente majoritário, parece ter um papel bastante importante nos efeitos estimulantes, aumentando em até 83% o comprimento da raiz em relação ao controle. Já nos extratos aquosos, o efeito estimulante se deve, muito provavelmente, aos polissacarídeos sulfatados do tipo agarana que são os constituintes quase exclusivos. O polissacarídeo sulfatado de *G. domingensis* promoveu aumento de cerca de 60% no comprimento a raiz, já com o extrato de *G. caudata* este aumento foi de 40%. Este resultado indica que modificações na estrutura da agarana podem provocar respostas de intensidades diferentes dependendo do grau e tipo de substituições nos polissacarídeos. Apesar dos efeitos positivos dos extratos apolares serem maiores que aqueles dos extratos aquosos, a enorme diferença entre os rendimentos (menos de 1% da biomassa inicial para os apolares e em torno de 35% para os aquosos) torna estes últimos muito mais interessantes sob o ponto de vista de aplicação e uso direto da alga para este fim.

Palavras chaves: Rhodophyta, *Gracilaria caudata*, *Gracilaria domingensis*, bioestimulantes, polissacarídeos sulfatados, ácido palmítico, *Lactuca sativa*.

CHAPTER IV

Biostimulant effect of extracts from *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) on initial growth of *Lactuca sativa in vitro*

ABSTRACT

Marine algae, mainly brown algae, have been used as biostimulants in agriculture for a long time, showing very promising results. In this study, extracts of two agarophytes (*Gracilaria caudata* and *Gracilaria domingensis*) were evaluated for *in vitro* biostimulating potential on germination and during the initial development of lettuce. No differences were observed in the germination rate with any of the extracts tested. However, significant changes were detected in the initial growth parameters. The biomonitoring isolation indicated that the nonpolar extracts were the most active, obtained with hexane or dichloromethane, together with the aqueous extracts. In nonpolar extracts, palmitic acid, the major component, seems to play a very important role in stimulant effects, increasing root length up to 83% compared to control. In aqueous extracts, the stimulating effect was probably due to the sulfated polysaccharides of the agarana type, which are the exclusive constituents. The sulfated polysaccharide of *G. domingensis* promoted an increase of about 60% in the root length, whereas for the extract of *G. caudata* this increase was 40%. This result indicates that modifications in the structure of the agarana can elicit distinct responses depending on the degree and type of substitutions in the polysaccharides. Although the positive effects of nonpolar extracts were greater than those of the aqueous extracts, the huge difference between yields (less than 1% of the initial biomass for the nonpolar and about 35% for the aqueous ones) makes the aqueous extracts more promising for application and direct use of algae for this purpose.

Keywords: Rhodophyta, *Gracilaria caudata*, *Gracilaria domingensis*, biostimulants, sulphated polysaccharides, palmitic acid, *Lactuca sativa*.

1. INTRODUÇÃO

Algas marinhas são utilizadas pela humanidade desde épocas pré-históricas há mais de 14000 anos a.C. (Dillehay et al. 2008). Seus usos são principalmente alimentares, porém o uso como fertilizante ou adubo é comum para agricultores ou horticultores próximos ao litoral de alguns países do mundo.

Atualmente, algas marinhas, ou produtos derivados, são disponibilizados comercialmente para cultivos vegetais. As algas pardas são as mais usadas para este fim, como, por exemplo, *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis e *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenfuss. Entretanto, algumas espécies de macroalgas verdes e vermelhas também têm sido utilizadas em menor escala, como, por exemplo, espécies de macroalgas vermelhas calcárias do gênero *Lithothamnion* Heydrich comercializadas para correções do pH do solo e como adubo (McHugh 2003; Khan et al. 2009). As macroalgas podem ser vendidas diretamente como material seco e triturado, porém seus extratos são os mais comercializados, sendo vendidos líquidos e concentrados, facilitando o transporte e o uso (Craigie 2011). Esses extratos são obtidos por fermentação, cozimento com uso de altas pressões e, principalmente, por hidrólise alcalina (Arioli et al. 2015).

No geral, o uso de algas marinhas nos cultivos vegetais é bastante atrativo devido aos efeitos positivos no aumento da resistência da cultura aos estresses abiótico e biótico e uma melhor retenção da umidade e sais minerais no solo (Khan et al. 2009). No entanto, o aumento no crescimento da planta cultivada é o que mais estimula o uso e a comercialização de macroalgas nesse contexto. Esse crescimento tem sido atribuído aos macronutrientes, como nitrogênio e potássio (McHugh 2003), e micronutrientes, como zinco, magnésio e enxofre presentes nas algas e/ou em seus extratos (Crouch & Staden 1993). Cabe ressaltar, entretanto, que a mesma resposta de crescimento não é observada com o uso das cinzas obtidas de algas. Assim, é sugerido que a matéria orgânica presente nas preparações algáceas têm papel importante nesse estímulo (Finnie & Staden 1985; Zhang & Ervin 2004).

A elucidação da propriedade estimulante das algas e de seus extratos tem sido amplamente discutida na literatura, porém, não há consenso sobre o que promove esta ação (Battacharyya et al. 2015). Reguladores do crescimento, como citocininas, auxinas, etilenos, giberilinas, ácido abscísico, brassinosteroides, entre outros; osmólitos, como prolina e betainas; polissacarídeos diversos, como carregenananas e alginatos; e outros metabólitos secundários, como florotaninos, são algumas das substâncias sugeridas como responsáveis por essa ação. Assim, a complexidade destes extratos e o possível sinergismo entre essas diversas substâncias, provavelmente são responsáveis pelo efeito estimulante.

Atualmente, as previsões para a agricultura mundial sugerem uma redução na produtividade e uma maior demanda por alimento, basicamente devido a consequências das mudanças climáticas globais e ao aumento populacional (Hanjra & Qureshi 2010). Dessa forma, há grande procura por estratégias direcionadas a melhorar o uso do solo, aumentar a produtividade agrícola e aumentar a resistência dos cultivares a estresses bióticos e abióticos. Nessa perspectiva, as algas marinhas apresentam grande potencial para o desenvolvimento da agricultura mundial, sendo imprescindível a compreensão das propriedades e dos efeitos estimulantes a partir de material algáceo.

Neste contexto, as macroalgas vermelhas *Gracilaria* Greville apresentam algumas características que as colocam como de interesse de estudo para uso na agricultura, como por exemplo, o fato de algumas espécies já serem cultivadas em grande escala. Além disso, estudos com espécies desse gênero têm relatado efeitos positivos sobre plantas alvos, principalmente, no que se refere a melhoria na produtividade e no desenvolvimento. Singh et al. (2016) relataram, por exemplo que o fluido algáceo (“seaweed sap”) de *Gracilaria edulis* (S. G. Gmelin) P. C. Silva promoveu uma melhora na produtividade de grãos no milho (*Zea mays* L.). No entanto, poucos estudos são voltados para a investigação química dos componentes que promovem estes efeitos bioestimulantes.

Dessa forma, neste estudo, foram avaliados os extratos de duas macroalgas nativas, *Gracilaria caudata* J. Agardh e *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie sobre *Lactuca sativa* L. (alface), um modelo vegetal comumente estudado em ensaios *in vitro*, com o objetivo de verificar seus possíveis efeitos na taxa de germinação e/ou no desenvolvimento inicial da plântula. Além disso, buscou-se verificar qual(is) componente(s) seria responsável pelo efeito observado.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta do material

Foram selecionadas para este estudo duas macroalgas vermelhas (Gracilariales, Rhodophyta) coletadas no nordeste brasileiro em 2013. *Gracilaria caudata* foi coletada em Praia de Mãe Luiza na cidade de Natal em Rio Grande do Norte pela Prof.^a Dr.^a Eliane Marinho-Soriano (Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN) quem também realizou a identificação do material e *G. domingensis* foi coletada na Praia Morro de Pernambuco na cidade de Ilhéus na Bahia, sendo sua identificação confirmada pela Dr.^a Beatriz Nogueira Torrano da Silva por meio de *DNA BarCode*. Os materiais coletados foram lavados em água corrente para retirada

de fauna acompanhante, epífitos, epibioentes, restos de areia e excesso de sal. Após esse processo foram secos ao sol para transporte. No laboratório foram secos em estufa à 40 °C por 7 dias.

2.2. Metodologia de extração

As massas secas pulverizadas de *G. caudata* e *G. domingensis* foram submetidas a extração seriada por maceração (50 ± 5 °C) por 8 h em solventes de ordens crescentes de polaridade (10%, w/v): hexano, diclorometano, metanol e metanol 80%. Os solventes foram evaporados em rotaevaporador (temperatura < 50 °C). O extrato aquoso foi obtido a partir de uma parte do resíduo final (10%) por maceração em água (50 ± 5 °C) (5%, w/v) por 8 h e depois liofilizado. Após seco, os extratos brutos obtidos em metanol e metanol 80% foram ressuspensos em metanol utilizando o menor volume possível do solvente, suficiente para a precipitação de sais que foram separados e descartados. Assim, foram obtidos cinco extratos brutos para cada uma das algas: hexânico, diclorometânico, metanólico (dessalinizado), hidrometanólico 80% (dessalinizado) e aquoso.

2.3. Isolamento biomonitorado

O isolamento biomonitorado foi adotado no presente estudo. Cada um destes extratos brutos foi testado frente ao ensaio de germinação e crescimento inicial de alface (item 2.6.) e apenas os extratos ativos, quando possível, seguiram para o particionamento.

Os extratos brutos metanólico e hidrometanólico 80% de *G. caudata* foram particionados entre diclorometano e metanol 50%, obtendo-se uma fase de partição diclorometânica e uma fase de partição hidrometanólica para cada extrato. A fase de partição diclorometânica do extrato metanólico foi reunida com a fase de partição diclorometânica do extrato hidrometanólico 80% devido à similaridade química, sendo identificada como fase de partição apolar. Além da fase de partição apolar, obteve-se duas fases de partição hidrometanólicas nomeadas de fase de partição polar do extrato metanólico e fase de partição polar do extrato hidrometanólico 80%.

2.4. Análises químicas dos extratos

Alíquotas das amostras ativas (extratos brutos e fases de partição), exceto dos extratos aquosos, foram derivatizadas por reação com 50 µL de BSTFA (N, O-Bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida) em 50 µL de piridina por 30 min a 80 °C. Em seguida, foram analisadas em Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) (Agilent 6890N/5975) na

seguinte programação de análise: $T_0 = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 6 min, $15\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ até $225\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ até $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ e permanecendo nesta temperatura por 9 min. A coluna empregada foi a HP-5MS ($30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$). O gás de arraste utilizado foi o hélio com fluxo constante de 1 mL/min . A temperatura de injeção foi de $300\text{ }^{\circ}\text{C}$. O espectrômetro de massas foi ajustado com os seguintes parâmetros: temperatura da fonte = $230\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura do quadrupolo = $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, voltagem da eletromultiplicadora (EM) = 70 eV , amplitude de detecção de massa de 40 - 1000 unidades de massa atômica com 2,64 scan/s. O teor relativo de cada componente principal foi calculado a partir da área total. Foram excluídos os componentes com áreas menores do que 1%. A identificação dos componentes foi feita através do banco de dados NIST/NBS (aceitos índices de similaridade >900) e através de comparação com dados da literatura.

2.5. Análises químicas dos extratos aquosos

2.5.1. Teor proteico, de carbono e enxofre

Os valores de porcentagens de carbono e de nitrogênio dos extratos aquosos foram obtidos por análises elementares no analisador Perkin-Elmer (CHN 2400) realizadas pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) (Ver Capítulo II – item 2.5.1). Já o valor de enxofre foi obtido por turbidimetria com cloreto de bário, com metodologia modificada a partir de Yoshimura (2006) para espectrofotômetro de microplacas (Elisa) (Synergy™ H1) (Ver Capítulo II – item 2.5.2).

2.5.2. Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN- ^{13}C)

Análises em ressonância magnética nuclear de carbono (RMN – ^{13}C) foram realizadas na Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob a orientação do Prof. Dr. Miguel Nosedá e da Dr.^a Luciana Garcia Ferreira. Os extratos aquosos foram submetidos a Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN – ^{13}C) realizadas no equipamento BRUKER (modelo DRX 400) com frequência base para ^{13}C de $100,63\text{ MHz}$ e temperatura de $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. As amostras foram dissolvidas em água deuterada (40 mg/mL) e acetona foi usada como padrão interno ($\delta\text{ }30,2$).

2.6. Ensaio de germinação e crescimento inicial

O ensaio de germinação e crescimento inicial foi realizado em microplacas de 6 poços conforme Novaes et al. (2016) com modificações. Em cada poço utilizado, foram adicionados papéis filtros previamente autoclavados e 1 mL dos extratos dissolvidos em DMSO 0,5% (1 mg/mL). DMSO 0,5% também foi usado para fazer o controle negativo. Em seguida, foram adicionados

a cada poço 10 aquênios de alface (*Lactuca sativa* L. - baba de verão manteiga, ISLA. A placa foi selada com parafilme e posta para germinar em câmara de germinação do tipo BOD (temperatura 24 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro).

Após sete dias, as placas foram transferidas para freezer -20 °C por 24 h. Foram contados os aquênios que germinaram considerando como germinadas plântulas com raízes maiores do que 2 mm. As medidas de crescimento (comprimento da raiz, do hipocótilo e área foliar) foram obtidas através do escaneamento da plântula e posterior análise em software ImageJ®.

Como consequência do fracionamento biomonitorado, o ácido palmítico (Merck®) foi usado neste estudo, sendo esta substância dissolvida em solução 1:1 de DMSO 0,25% e tween 20 0,25%. Foram testadas três concentrações: 0,49 mM, 0,98 mM e 1,95 mM. A mesma solução usada para dissolver o ácido graxo foi usada para fazer o controle negativo. Os extratos aquosos das duas espécies de *Gracilaria* foram testados em diferentes concentrações, neste caso dissolvidos apenas em água ultrapura. As concentrações testadas foram 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL e 5 mg/mL. Água ultrapura foi usada como controle negativo.

2.7. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos a teste de homocedasticidade de Bartlett. Em seguida, foram submetidos a teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e análise de comparações múltiplas de Dunn ($p < 0,05$), comparando as diferenças estatísticas dos tratamentos em relação ao controle negativo. Os valores de comprimento de hipocótilo, raiz e área foliar foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP) ($n = 40$). Para germinação foram consideradas as porcentagens de aquênios germinados em cada poço ($n = 4$). O software para processamento dos dados, obtenção dos gráficos e análises estatísticas foi o GraphPad 6®. As estruturas moleculares foram representadas no software Accelrys Draw 4.1®.

3. RESULTADOS

Na Figura 1 é apresentado um esquema para acompanhar o isolamento biomonitorado a partir das atividades bioestimulantes sobre *L. sativa* das amostras de *G. caudata* (extratos brutos e fases de partição) (Fig. 1A) e as amostras de *G. domingensis* (extratos brutos) (Fig. 1B). As amostras destacadas em círculos pretos foram ativas pelo biomonitoramento.

A

B

Figura 1. Etapas do isolamento biomonitorado guiado pelo ensaio de germinação e crescimento inicial para as amostras de *Gracilaria caudata* (A) e *Gracilaria domingensis* (B). Letras maiúsculas são referentes aos extratos brutos: H = hexânico, D = diclorometânico, M = metanólico, M80 = hidrometanólico 80% e A = aquoso. Letras minúsculas são referentes a fase de partição: a letra “p” é referente a fase proveniente do metanol 50% (polar) e a letra “a” é referente a fase proveniente do diclorometano (apolar).

Os extratos e as fases de partição de *G. caudata* e *G. domingensis* não alteraram significativamente a porcentagem de germinação de *L. sativa* em relação ao controle negativo (Tabela 1). Entretanto, mudanças significativas foram verificadas nos parâmetros de crescimento inicial.

Tabela 1. Porcentagem de germinação de *Lactuca sativa* (n = 4) após os tratamentos com extratos brutos e fases de partição de *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*. Não foram encontradas diferenças significativas em relação aos controles negativos (Kruskal-Wallis; $p < 0,05$).

	<i>Gracilaria caudata</i>	<i>Gracilaria domingensis</i>
<i>Extratos brutos</i>		
Controle negativo	97±5	89±10
Hexânico	90±11	75±25
Diclorometânico	93±12	84±15
Metanólico	97±6	62,5±22
Hidrometanólico 80%	97±6	84±18
Aquoso	98±5	89±10
<i>Fases de partição</i>		
Controle negativo	100±0	-
Polar do metanólico	100±0	-
Polar do hidrometanólico 80%	98±5	-
Apolar*	100±0	-
<i>Extrato aquoso</i>		
Controle negativo	100±0	100±0
1 mg/mL	100±0	84±6
2 mg/mL	100±0	91±6
3 mg/mL	100±0	100±0
4 mg/mL	83±14	100±0
5 mg/mL	84±11	90±11

*fases de partição apolar dos extratos metanólico e hidrometanólico 80% reunidas.

Os resultados de comprimento da raiz e do hipocótilo para os extratos brutos de *G. caudata* e *G. domingensis* são apresentados na Figura 2. Em *G. domingensis*, os extratos diclorometânico e aquoso foram os mais efetivos, com um aumento médio no comprimento da raiz de cerca de 39% e 45%, respectivamente (Fig. 2A). Para os extratos de *G. caudata*, somente o extrato obtido com diclorometano não apresentou efeito significativo, ou seja, todos os outros apresentaram efeito estimulante no crescimento da raiz (Fig. 2A). No caso do desenvolvimento do hipocótilo, os efeitos significativos foram de inibição em relação ao controle, sendo observados para os extratos hexânicos das duas algas, *G. caudata* e *G. domingensis*, uma redução de 24% e 31% respectivamente, e também para o extrato obtido com diclorometano de *G. caudata* (28%) (Fig. 2B).

Com esses resultados, o isolamento biomonitorado prosseguiu com os extratos alcoólicos obtidos de *G. caudata*, pois apresentaram efeito estimulante no desenvolvimento da raiz de alface. Cabe ressaltar que, apesar dos efeitos bioestimulantes de raiz dos extratos

apolares (hexânico de *G. caudata* e diclorometânico de *G. domingensis*), devido ao baixíssimo rendimento (menos de 1% da biomassa inicial), não foi possível continuar isolamento biomonitorado. Já o extrato aquoso não foi particionado por ser composto unicamente de polissacarídeos (detalhes adiante).

Figura 2. Comprimentos da raiz (A) e do hipocótilo (B) de *Lactuca sativa* após tratamento com diferentes extratos brutos (1 mg/mL) de *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*. Valores expressos em médias $\pm$ DP ($n = 40$). O asterisco (*) sobre a barra indica que o valor difere significativamente do controle negativo (Kruskal-Wallis, Dunn; $p < 0,05$). C = controle negativo (DMSO 0,5%). Extratos brutos: H = hexânico, D = diclorometânico, M = metanólico, M80 = hidrometanólico 80%, A = aquoso.

Os extratos metanólico e hidrometanólico 80% de *G. caudata* foram particionados e as fases de partição novamente testadas (Fig. 1). As fases de partição polares, diferente dos extratos brutos, não foram bioestimulantes de raiz, porém apresentaram um pequeno

bioestímulo, em torno de 15%, sobre os hipocótilos (Tabela 2). Entretanto, foi verificada uma alta atividade bioestimulante da fase de partição apolar, acarretando um aumento em cerca de 90% no comprimento da raiz em relação ao controle (Tabela 2).

Dessa forma, podemos sugerir que a ação bioestimulante no crescimento da raiz dos extratos brutos obtidos em metanol e metanol 80% de *G. caudata* está relacionada a substâncias mais apolares presentes nesses extratos.

Tabela 2. Efeitos das diferentes fases de partição de *Gracilaria caudata* sobre crescimento do hipocótilo e da raiz de *Lactuca sativa*. Valores foram expressos em média $\pm$ DP (n = 40). Médias seguidas pelo asterisco (*) diferem significativamente do controle negativo (Kruskal-Wallis, Dunn; $p < 0.05$).

Fase de partição	Raiz (cm)	Hipocótilo (cm)
Polar do extrato metanólico	2,97 $\pm$ 0,44	0,71 $\pm$ 0,11*
Polar do extrato hidrometanólico 80%	3,13 $\pm$ 0,37	0,74 $\pm$ 0,07*
Apolar*	5,26 $\pm$ 0,66*	0,58 $\pm$ 0,09
Controle negativo	2,77 $\pm$ 0,42	0,62 $\pm$ 0,10

*fases de partição apolar dos extratos metanólico e hidrometanólico 80% reunidas.

Infelizmente, assim como mencionado acima para os extratos apolares, a fase de partição apolar apresentou rendimento muito baixo, impossibilitando novos fracionamentos. No entanto, estas amostras (extratos brutos e fase de partição) ativas tiveram seus componentes majoritários identificados.

A análise da composição química do extrato hexânico de *G. caudata*, do extrato diclorometânico de *G. domingensis* e da fase de partição apolar dos extratos metanólico e hidrometanólico 80% de *G. caudata* mostrou-se semelhante. As amostras são ricas em ácidos graxos saturados (ácido palmítico e ácido mirístico), colesterol e *n*-heptadecano (Tabela 3). A fase de partição apolar, que foi a mais estimulante de raiz, apresentou uma maior complexidade química que os extratos brutos analisados, apresentando como diferencial heterosídeos e os ácidos graxos linoleico e araquidônico, porém em pequena porcentagem.

O ácido palmítico foi o componente majoritário contribuindo com, no mínimo, 60% na composição química das amostras ativas. Este resultado, aliado a disponibilidade comercial do ácido palmítico, possibilitou a avaliação desse ácido graxo frente a *L. sativa* na busca da substância bioativa nessas amostras.

Tabela 3. Composição química (% relativa a área total) do extrato hexânico de *Gracilaria caudata*, do extrato diclorometânico de *Gracilaria domingensis* e da fase de partição apolar que foram estimulantes para o crescimento da raiz de *Lactuca sativa*.

Substâncias	<i>Gracilaria caudata</i>		<i>Gracilaria domingensis</i>
	Hexano	Fase apolar*	Diclorometano
<i>Ácidos graxos</i>			
Ácido araquidônico	-	2,33	-
Ácido esteárico	1,2	1,33	1,4
Ácido linoleico	-	1,33	-
Ácido mirístico	4,2	2,62	10,1
Ácido oleico	-	1,13	-
Ácido palmítico	79,6	63,49	66,3
<i>Esteróis</i>			
Colesterol	4,2	4,77	2,9
<i>Alcanos</i>			
<i>n</i> -heptadecano	1,4	-	1,0
<i>Ésteres de ácidos graxos</i>			
Monopalmitina	-	-	2,5
<i>Outros</i>			
Glicerol	-	-	1,56
Heterosídeos	-	3,73	-
<i>Total identificados</i>	56	80,73	58

*fases de partição apolar dos extratos metanólico e hidrometanólico 80% reunidas.

O ácido palmítico foi testado em diferentes concentrações (0,49 mM, 0,98 mM e 1,95 mM) frente a *L. sativa* (Fig. 3). A porcentagem de germinação em todas elas e no controle foi de 100%, ou seja, o ácido palmítico não tem qualquer influência sobre a germinação dos aquênios de alface. Quanto aos parâmetros de crescimento inicial, também não houve diferença significativa no crescimento do hipocótilo em relação ao controle (Fig. 3A), porém o crescimento da raiz foi estimulado de maneira dose-dependente ($R^2 = 0,9812$; $EC_{50}=1,1$ mM) (Fig. 3B).

A maior concentração testada de 1,95 mM promoveu o crescimento da raiz em 83% em relação ao controle (Fig. 3B e 3C), quase a mesma porcentagem de estímulo obtida no ensaio com a fase apolar (90% - Tabela 2). Dessa forma, podemos sugerir que o ácido palmítico seja, provavelmente, uma das substâncias determinantes no bioestímulo dos extratos apolares das duas algas analisadas sobre a raiz de *L. sativa*.

Figura 3. Respostas do hipocótilo (cm) (A) e da raiz (cm) (B) de *Lactuca sativa* ao ácido palmítico. Aspecto geral da plântula de *Lactuca sativa* exposta ao controle (DMSO 0,25% + Tween 20 0,25%) e o ácido palmítico (concentração: 1,95 mM) (C). Valores expressos em médias $\pm$ DP (n = 40). Asteriscos (*) se referem a média significativamente diferente em relação ao controle (0 mg/mL) (Kruskal-Wallis, Dunn; $p < 0.05$).

Além dos extratos apolares e da fase de partição apolar discutidos acima, os extratos aquosos de ambas algas foram estimulantes frente a *L. sativa* (Fig. 1). Estes extratos foram os que apresentaram os maiores rendimentos, 36% para *G. caudata* e 34,4% para *G. domingensis*.

Várias concentrações dos extratos aquosos obtidos das duas espécies foram testadas (Fig. 4). A porcentagem de germinação, como já mencionado, foi semelhante ao controle (Tabela 1). No entanto, efeito estimulante, ou seja, de aumento no desenvolvimento, foi observado para as raízes e folhas das plântulas de alface expostas aos extratos aquosos das duas algas estudadas. Já para o hipocótilo, quando houve alguma alteração comparada ao controle, foi de inibição do desenvolvimento.

O crescimento da raiz frente aos extratos aquosos de *G. caudata* e *G. domingensis* não apresentou resposta dose-dependente, ou seja, independente da concentração utilizada foi observado um aumento em torno de 40% com o extrato de *G. caudata* (Fig. 4A) e um crescimento médio em torno de 60% com o extrato de *G. domingensis*, exceto para a concentração de 1 mg/mL que apresentou um crescimento menor (Fig. 4D). A inibição do crescimento do hipocótilo foi observada somente nas concentrações de 4 mg/mL e 5 mg/mL com o extrato de *G. caudata* (Fig. 4B) e nas concentrações de 1 mg/mL e 5 mg/mL com o extrato de *G. domingensis* (Fig. 4E).

Os extratos aquosos promoveram aumento da área foliar nas plântulas de alface em relação ao controle (Fig. 4C e F). No caso do extrato de *G. caudata* esse aumento foi linear e dose-dependente ($R^2 = 0,99$), atingindo 27% na maior concentração (Fig. 4C). Para o extrato de *G. domingensis* o aumento foi detectado a partir de 2 mg/mL não havendo diferença com maiores concentrações (Fig. 4F).

Dessa forma, vemos que os extratos aquosos das duas algas analisadas influenciam o desenvolvimento inicial das plântulas de alface aumentando a área foliar e o comprimento da raiz (Fig. 5). No geral, a menor concentração testada que promoveu crescimento de raiz foi 1 mg/mL com o extrato aquoso de *G. caudata* (aumento de 40%) e 2 mg/mL com o de *G. domingensis* (aumento de 60%). Já para área foliar, 2 mg/mL de extrato aquoso foi a menor concentração que promoveu aumento significativo com os extratos das duas algas.

Figura 4. Respostas do desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* aos extratos aquosos de *Gracilaria caudata* (raiz – A, hipocótilo – B e área foliar – C) e *Gracilaria domingensis* (raiz – D, hipocótilo – E e área foliar – F). Valores expressos em médias $\pm$ DP ($n = 40$). Asteriscos (*) se referem a médias significativamente diferentes ao controle (0 mg/mL) (Kruskal-wallis, Dunn; $p < 0.05$).

Figura 5. Aspecto geral das plântulas de *Lactuca sativa* após sete dias de exposição aos polissacarídeos sulfatados de *Gracilaria caudata* (1 mg/mL - menor concentração efetiva) e de *Gracilaria domingensis* (2 mg/mL - menor concentração efetiva). Controle = água ultrapura.

Como já mencionado, os extratos aquosos não foram fracionados por serem compostos unicamente de polissacarídeos. As análises de RMN C^{13} permitiram verificar que estes extratos são constituídos majoritariamente de polissacarídeos sulfatados, isto é, galactanas do tipo agaranas (Tabela 4).

Foram verificados os sinais típicos para o resíduo de β -D-galactopiranosose (G; Unidade A) ($C1 = 101,9$ ppm, $C2 = 69,6$ ppm, $C3 = 81,7$ ppm, $C4 = 68,3$ ou $67,9$ ppm, $C5 = 75,1$ ppm e $C6 = 60,9$ ppm ou $61,0$ ppm) e para o resíduo de 3,6-anidro- α -L-galactose (LA; Unidade B) ($C1 = 97,8$ ppm, $C2 = 69,4$ ppm, $C3 = 79,6$ ppm, $C4 = 76,8$ ppm, $C5 = 75,1$ ppm e $C6 = 68,8$ ppm). Ambos resíduos formam a estrutura básica da agarobiose ($G \rightarrow LA$). A presença de sinais adicionais revelou as substituições nesta estrutura básica.

Em *G. caudata*, foram observados sinais que sugerem a presença do resíduo β -D-galactose-4,6-*O*-(1'-carboxietilideno) (GP), ou seja, resíduos de β -D-galactopiranosose substituídos em $C4$ e $C6$ por acetal de ácido pirúvico. O sinal típico deste substituinte é o sinal 25,17 ppm atribuído ao carbono metílico do acetal de ácido pirúvico (Garegg & Lindberg 1979). Outros sinais como 79,10 ppm ($C3$), 71,11 ppm ($C4$), 66,11 ppm ($C5$) e 64,80 ppm ($C6$) já foram determinados anteriormente para os carbonos do resíduo de β -galactopiranosose piruvatado (Murano et al. 1992; Cardoso 2007; Ferreira 2011).

Em *G. domingensis*, o sinal em 58,58 ppm indica a presença de metoxila. A presença dos sinais 68,63 ppm ($C4$), 73,06 ppm ($C5$) e 71,31 ppm ($C6$) sugerem esta metoxila em $C6$,

assim sugerindo o resíduo 6-*O*-metil- β -D-galactose (G6M) (Valiente et al. 1992). Já os sinais 72,48 ppm (C5) e 66,91 ppm (C6) sugerem a presença de substituintes sulfatos em C6, sugerindo o resíduo β -D-galactose 6-sulfato (G6S) (Valiente et al. 1992).

Tabela 4: Deslocamentos químicos (ppm) determinados a partir dos espectros de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN – ^{13}C) para os extratos aquosos de *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis*. Siglas: G = β -D-galactopiranosose; LA = 3,6-anidro- α -L-galactose; GP = β -D-galactose-4,6-*O*-(1'-carboxietilideno); G6M = 6-*O*-metil- β -D-galactose; G6S = β -D-galactose 6-sulfato; OMe = Metoxila; P = carbono metílico do acetal de ácido pirúvico.

Espécies	Resíduos	C1	C2	C3	C4	C5	C6	OMe	P
<i>Gracilaria caudata</i>	G	101,92	69,64	81,77	68,33	75,10	60,99	-	-
	LA	97,84	69,40	79,60	76,86	75,10	68,88	-	-
	GP	-	-	79,10	71,11	66,11	64,80	-	25,17
<i>Gracilaria domingensis</i>	G	101,92	69,68	81,72	67,98	75,13	61,04	-	-
	LA	97,89	69,38	79,64	76,88	75,13	68,88	-	-
	G6M	101,92	69,68	81,72	68,63	73,06	71,31	58,58	-
	G6S	101,92	69,68	81,72	67,98	72,48	66,91	-	-

Os extratos aquosos de *G. caudata* e *G. domingensis* também foram avaliados quanto ao teor de enxofre e contaminantes proteicos (Tabela 5). O extrato aquoso de *G. caudata* apresentou menor teor de contaminantes proteicos (5,4%), quando comparado a *G. domingensis* (8%). Por outro lado, o polissacarídeo de *G. domingensis* apresentou o dobro de teor de enxofre (2,0%) em relação ao de *G. caudata* (0,7%). A substituição por sulfato foi de 0,17 para *G. caudata* e 0,34 para *G. domingensis* sendo, portanto, o polissacarídeo de *G. domingensis* mais sulfatado.

Tabela 5. Teor proteico (%) dos extratos aquosos e teor de enxofre (%) e grau de substituição dos polissacarídeos para ambas as algas (*G. caudata* e *G. domingensis*).

	<i>Gracilaria caudata</i>	<i>Gracilaria domingensis</i>
Proteínas (%)	5,4	8
Enxofre (%)	0,7	2,0
Grau de substituição por sulfato	0,17	0,34

Em resumo, os polissacarídeos das duas algas apresentam a estrutura básica da agarobiose com substituições na unidade A, diferindo no que se refere às substituições. As principais díades propostas para ambos polissacarídeos estão nas Figuras 6. O polissacarídeo

de *G. caudata* (Fig. 6A) é piruvatados, já o de *G. domingensis* (Fig. 6B) apresenta metoxilas e sulfatos. Os dados quantitativos sugerem que os polissacarídeos de *G. domingensis* são mais sulfatados do que *G. caudata* (Tabela 5). O pequeno teor de enxofre dos polissacarídeos de *G. caudata* pode explicar o motivo de não haver sinais nos espectros de RMN – ^{13}C referentes à sulfatação.

Figura 6. Estruturas moleculares das principais substâncias que estimulam o crescimento em *Lactuca sativa*. A - Principais díades encontradas no polissacarídeos de *G. caudata* e B - Principais díades encontradas no polissacarídeos de *G. domingensis*.

4. DISCUSSÃO

Espécies de *Gracilaria* têm sido estudadas como bioestimulantes ou fertilizantes em cultivos de plantas terrestres através da obtenção direta de um extrato aquoso, da obtenção do fluido algáceo (*seaweed sap*) ou, mais raramente, através do uso de solventes orgânicos para obtenção de extratos, como feito no presente estudo. De maneira geral, estes estudos com *Gracilaria* relataram aumento da produtividade, da qualidade e do crescimento de plantas alvo. Chitra & Sreeja (2013), aplicando o extrato aquoso de *Gracilaria corticata* (J. Agardh) J. Agardh na cultura do feijão-mungo (*Vigna radiata* L.), verificaram um aumento no comprimento da raiz, do caule e no número de folhas. Já os extratos aquosos de *G. corticata* (Vinoth et al. 2014), *G. edulis* (Vinoth et al. 2012; Satish et al. 2016) e *Gracilaria salicornia* (C. Agardh) E. Y. Dawson (Satish et al. 2015) têm sido relatados como bons substitutos de reguladores de crescimento vegetal em culturas *in vitro*, promovendo o desenvolvimento de calos.

No presente trabalho, os extratos mais apolares e os aquosos foram os mais ativos. A estratégia de isolamento biomonitorado possibilitou verificar que o ácido palmítico (ou ácido hexadecanoico), isoladamente, promoveu o crescimento da raiz e, possivelmente, é uma substância importante na atividade estimulante dos extratos mais apolares. Este ácido graxo saturado é o principal ácido graxo em espécies de *Gracilaria* (Gressler et al. 2010; Tomaz et al. 2012), além de ser um dos mais comuns em plantas terrestres.

Óleo vegetal já é usado na agricultura para proteção de sementes contra fungos e insetos. Shabelsky & Yaniv (1998), em um estudo sobre o efeito de diferentes óleos vegetais ricos em ácidos graxos insaturados sobre diversas sementes, verificaram que algumas plântulas como, *Helianthus annuus* L., *Mathiola incana* (L.) R.Br. e *Linum usitatissimum* L. desenvolveram raízes maiores, enquanto outras foram inibidas. Apesar dessas evidências, estudos com ácidos graxos isoladamente são escassos. Um dos poucos estudos é o de Marambe et al. (1993) no qual os autores verificaram que o ácido palmítico e o ácido mirístico inibiram a germinação de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), pelo menos nas 48 h avaliadas, contrariamente ao observado no presente estudo para *L. sativa* após sete dias.

Ácidos graxos ainda não tinham sido citados como estimulantes no desenvolvimento de vegetais em se tratando de ensaios feitos com algas marinhas, como pode ser visto em revisões específicas da área (Craigie 2011; Battacharyya et al. 2015). Entretanto, pensando no uso da alga como estimulante, apesar dos resultados *in vitro* serem promissores, cabe lembrar que os extratos apolares e a fase de partição apolar nas quais esses componentes são majoritários apresentaram um baixo rendimento (<1%), inviabilizando essa aplicação.

De maneira oposta, os extratos aquosos, que também apresentaram efeito bioestimulante, renderam em torno de 35%. As análises químicas revelaram que extratos aquosos de *G. caudata* e *G. domingensis* são constituídos majoritariamente por polissacarídeos sulfatados do tipo agaranas. Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas como carregenanas, ulvanas, fucanas e laminarana já foram descritos por atuarem de forma positiva como estimulantes sobre plantas terrestres (Khan et al. 2009; Stadnik & De Freitas 2014). Dessa forma, o efeito estimulante dos extratos aquosos observado no presente estudo pode ser, provavelmente, atribuído aos polissacarídeos sulfatados.

Os polissacarídeos sulfatados das duas espécies de *Gracilaria* são distintos entre si quanto às substituições e grau de sulfatação. O polissacarídeo de *G. caudata* apresentou semelhanças com o descrito por Barros et al. (2013) estudando a mesma alga, principalmente no que se refere a piruvatação e ao teor de sulfatação (Barros et al. (2013) - 1%; presente trabalho - 0,7%). No entanto, diferindo do presente trabalho, aqueles autores encontraram sinais nos espectros de RMN – ^{13}C referentes a presença de metoxilas e sulfatação. Já o polissacarídeo de *G. domingensis* foi similar ao encontrado por Valiente et al. (1992) e Guimarães et al. (2007) estudando a mesma espécie de alga inclusive no que se refere ao teor de sulfatação, Valiente et al. (1992) encontraram 2,33%, um valor próximo ao do presente trabalho (2%).

O grau e o tipo de substituições podem afetar as bioatividades dos polissacarídeos (Li et al. 2015). No presente trabalho, o polissacarídeo de *G. domingensis* foi mais estimulante sobre *L. sativa* do que o polissacarídeo de *G. caudata*, corroborando a ideia que modificações na estrutura da agarana podem provocar respostas de intensidades diferentes. *Gracilaria domingensis* apresentou um polissacarídeo duas vezes mais sulfatado. Na literatura, muitas atividades biológicas associadas aos polissacarídeos são altamente correlacionadas com sulfatação como, por exemplo, atividades anticoagulantes e antivirais (Li et al. 2015). Além disso, muitos dos polissacarídeos descritos como estimulantes de alguns cultivos são sulfatados como, por exemplo, fucanas e carragenanas presentes em algas pardas e vermelhas, respectivamente. (Khan et al. 2009). Dessa forma, o grau de sulfatação pode ter sido um dos diferenciais no polissacarídeo de *G. domingensis*.

5. CONCLUSÃO

Alguns dos os extratos de *G. caudata* e *G. domingensis* se mostraram muito interessantes como bioestimulantes nos estágios iniciais de desenvolvimento de *L. sativa in vitro*, pois promoveram o aumento da área foliar e, principalmente, o aumento do comprimento da raiz. Estes resultados corroboram o que muitos trabalhos têm verificado que o desenvolvimento e crescimento da raiz

são estimulados por algas marinhas, podendo resultar num aumento do vigor e crescimento geral da planta (Khan et al. 2009). Os extratos apolares e também a fase de partição apolar dos extratos alcoólicos foram mais efetivos do que os extratos aquosos. A fase de partição apolar dos extratos metanólicos e hidrometanólicos 80% de *G. caudata*, por exemplo, promoveu o crescimento das raízes em 90%. Analisando a composição dessas amostras, podemos sugerir que o ácido palmítico tem papel importante nesse resultado. No entanto, os altos rendimentos dos também estimulantes extratos aquosos, compostos por polissacarídeos do tipo agaranas, os tornaram muito interessante sob o ponto de vista de aplicação e uso direto da alga para este fim.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arioli T, Mattner SW, Winberg PC (2015) Applications of seaweed extracts in Australian agriculture: past, present and future. *Journal of Applied Phycology* 27:2007–2015.
- Barros FCN, Da Silva DC, Sombra VG, et al. (2013) Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (J. Agardh). *Carbohydrate Polymers* 92:598–603.
- Battacharyya D, Babgohari MZ, Rathor P, Prithiviraj B (2015) Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae* 196:39–48.
- Cardoso MA (2007) *Determinação da estrutura química de xilomananas e galactanas sulfatadas isoladas de macroalgas marinhas (Ceramiales, Rhodophyta)*. Universidade Federal do Paraná: Tese (Doutorado em Bioquímica). 149p.
- Chitra G, Sreeja PS (2013) A comparative study on the effect of seaweed liquid fertilizers on the growth and yield of *Vigna radiata* (L.). *Nature Environment and Pollution Technology an International Quarterly Scientific Journal* 12:359–362.
- Craigie JS (2011) Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of Applied Phycology* 23:371–393.
- Crouch IJ, Staden J Van (1993) Evidence for the presence of plant growth regulators in commercial seaweed products. *Plant Growth Regulations* 13:21–29.
- Dillehay TD, Ramirez C, Pino M, et al. (2008) Monte Verde: seaweed, food, medicine, and the peopling of South America. *Science* 320:784–786.
- Ferreira LG (2011) *Estrutura química e atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados obtidos de algas do complexo Laurencia (Ceramiales, Rhodophyta)*. Universidade Federal do Paraná: Tese (Doutorado em Bioquímica). 217p.
- Finnie A, Staden J Van (1985) Effect of seaweed concentrate and applied hormones on *In vitro* cultured tomato roots. *Journal of Plant Physiology* 120:215–222.

- Garegg PJ, Lindberg B (1979) Preparation and N.M.R. studies of pyruvic acid and related acetals of pyranosides: configuration at the acetal carbon atoms. *Carbohydrate Polymers* 77:71–78.
- Gressler V, Yokoya N, Fujii M (2010) Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. *Food chemistry* 120:585–590.
- Guimarães M, Viana AG, Rabello Duarte ME, et al. (2007) Low-molecular-mass carbohydrates and soluble polysaccharides of green and red morphs of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Botanica Marina* 50:314–317.
- Hanjra MA, Qureshi ME (2010) Global water crisis and future food security in an era of climate change. *Food Policy* 35:365–377.
- Khan W, Subramanian UPRS, Jithesh MN, et al. (2009) Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation* 67:386–399.
- Li S, Xiong Q, Lai X, et al. (2015) Molecular modification of polysaccharides and resulting bioactivities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15:237–250.
- Marambe B, Nagaoka T, Ando T (1993) Identification and biological activity of germination-inhibiting long-chain fatty acids in animal-waste composts. *Plant & cell physiology* 34:605–612.
- McHugh DJ (2003) *A Guide to the seaweed industry*. FAO Fisheries Technical Paper 441. 118p.
- Melo MRS, Feitosa JPA, Freitas ALP, De Paula RCM (2002) Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Carbohydrate Polymers* 49:491–498.
- Murano E, Toffanin R, Zanetti F (1992) Chemical and macromolecular characterisation of agar polymers from *Gracilaria dura* (C. Agardh) J. Agardh (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Carbohydrate Polymers* 18:171–178.
- Novaes P, Torres PB, dos Santos DYAC (2016) Biological activities of Annonaceae species extracts from Cerrado. *Brazilian Journal of Botany* 39:131–137.
- Satish L, Rameshkumar R, Rathinapriya P, et al. (2015) Effect of seaweed liquid extracts and plant growth regulators on in vitro mass propagation of brinjal (*Solanum melongena* L.) through hypocotyl and leaf disc explants. *Journal of Applied Phycology* 27:993–1002.
- Satish L, Rathinapriya P, Rency AS, et al. (2016) Somatic embryogenesis and regeneration using *Gracilaria edulis* and *Padina boergeresii* seaweed liquid extracts and genetic fidelity in finger millet (*Eleusine coracana*). *Journal of Applied Phycology* 28:2083–2098.
- Shabelsky E, Yaniv Z (1998) The effect of treatment with vegetable oils on seed germination and shoot elongation. *Seed Science and Technology* 26:571–578.

- Singh S, Singh MK, Pal SK, et al. (2016) Sustainable enhancement in yield and quality of rain-fed maize through *Gracilaria edulis* and *Kappaphycus alvarezii* seaweed sap. *Journal of Applied Phycology* 28:2099–2112.
- Stadnik MJMJ, Freitas MB De, De Freitas MB (2014) Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers. *Tropical Plant Pathology* 39:111–118.
- Tomaz ACDA, Miranda GEC De, Souza MDFV De, et al. (2012) Analysis and characterization of methyl esters of fatty acids of some *Gracilaria* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 44:303–306.
- Valiente O, Fernandez LE, Perez RM, et al. (1992) Agar polysaccharides from the red seaweeds *Gracilaria domingensis* Sonder ex Kützinger and *Gracilaria mammillaris* (Montagne) Howe. *Botanica Marina* 35:77–82.
- Vinoth S, Gurusaravanan P, Jayabalan N (2014) Optimization of somatic embryogenesis protocol in *Lycopersicon esculentum* L. using plant growth regulators and seaweed extracts. *Journal of Applied Phycology* 26:1527–1537.
- Vinoth S, Gurusaravanan P, Jayabalan N (2012) Effect of seaweed extracts and plant growth regulators on high-frequency in vitro mass propagation of *Lycopersicon esculentum* L (tomato) through double cotyledonary nodal explant. *Journal of Applied Phycology* 24:1329–1337.
- Yoshimura CY (2006) *Avaliação do potencial de cultivo e produção de ágar de Gracilaria domingensis e de Gracilaria caudata (Rhodophyta, Gracilariales) na Enseada de Armação do Itapocoroy*. Universidade de São Paulo: Tese (Doutorado em Ciências). 163p.
- Zhang X, Ervin EH (2004) Cytokinin-containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokinins and drought resistance. *Crop Science* 44:1737–1745.

RESUMO

Aminoácidos tipo micosporina (MAAs, do inglês *Mycosporine-like Amino Acids*) são conhecidos metabólitos secundários presentes em organismos marinhos. Além da função fotoprotetora, uma função antioxidante é atribuída a estes metabólitos. Entre os MAAs mais comuns encontrados em algas vermelhas estão asterina 330, chinorina, palitina, palitinol e porphyra 334. No presente estudo, estas substâncias isoladas de *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie (Gracilariaceae, Rhodophyta) foram avaliadas quanto a capacidade antioxidante *in vitro* e comparadas a antioxidantes sintéticos (BHT e Trolox) e naturais (ácido ascórbico, ácido gálico, ácido *p*-cumárico, quercetina e rutina). Os MAAs isolados não foram ativos frente à atividade quelante de íon ferroso (Fe^{2+}) e ao radical DPPH. Em ensaios que envolvem reações mediadas por transferências de elétrons, houve uma tendência de aumento na atividade, conforme o aumento do pH. No ensaio do radical do ABTS^{•+} a dependência do pH bem evidente para porphyra 334 e chinorina. Estas substâncias foram inativas em meio ácido, apresentaram atividades intermediárias em meio neutro e foram ativas em meio básico. Frente ao ensaio ORAC, os MAAs apresentaram uma pequena atividade quando comparados aos padrões e no ensaio frente a peroxidação lipídica (sistema β -caroteno/ácido linoleico) foram pró-oxidantes. Com isso, fica evidente que os MAAs avaliados não apresentam capacidade antioxidante *in vitro* relevante, exceto em condições específicas de pH e, conseqüentemente, somente em ensaios que estão envolvidos a transferência de elétrons.

Palavras-chaves: Aminoácidos tipo micosporina, capacidades antioxidantes, chinorina, porphyra 334 e Rhodophyta.

ABSTRACT

Mycosporine-like Amino Acids (MAAs) are secondary metabolites found in marine organisms. These metabolites are known for their photoprotective activity. Besides, some antioxidant activity has been attributed to these metabolites. For red algae, the most common MAAs is asterine 330, shinorine, palythine, palythanol and porphyra 334. In the present study, these compounds, obtained from *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie (Gracilariaceae, Rhodophyta) were evaluated regarding their *in vitro* antioxidant capacity in comparison to synthetic (BHT and Trolox) and natural antioxidants (ascorbic acid, galic acid, *p*-cumaric acid, quercetin and rutin). The isolated MAAs were not active against the ferrous ion chelating activity (Fe^{2+}) and the DPPH radical. In tests involving reactions mediated by electron transfer, there was a tendency for increased activity, as the pH increased. The pH interference in the antioxidant capacity was evident for porphyra-334 and shinorine, using ABTS^{•+} assay. The two compounds presented no activity in acid pH, intermediate activity in neutral medium and were active at high pH (alkaline medium). Comparing to standards, all MAAs showed low activity using ORAC assay, and were even pro-oxidant in β -carotene/linoleic acid system. Therefore, it is evident that these MAAs do not have relevant *in vitro* antioxidant capacity, except in specific pH conditions and in assays based on electron transfer.

Keywords: Mycosporine-like Amino Acids, antioxidant, shinorine, porphyra 334 e Rhodophyta.

1. INTRODUÇÃO

Aminoácidos tipo micosporina (MAAs, do inglês *Mycosporine-like Amino Acids*) são metabólitos secundários de baixo peso molecular (< 400 Da), nitrogenados e altamente solúveis em água (Barre et al. 2014). A máxima absorção destas substâncias é na região do ultravioleta (UV), entre 310 a 360 nm, apresentando alta absortividade molar (ao redor de $40000/\text{M.cm}$) (Shick & Dunlap 2002). MAAs são comuns em organismos marinhos, incluindo representantes unicelulares como dinoflagelados e cianobactérias, animais como corais, peixes e crustáceos, além de macroalgas marinhas, principalmente rodófitas (Sinha et al. 2007). São exceções em organismos terrestres, estando presentes em alguns fungos e líquens (Sinha et al. 2007).

Essas substâncias apresentam um núcleo básico de ciclo-hexenona ou de ciclo-hexenimina. O núcleo de ciclo-hexenona é conjugado com uma única amina, ou seja, é mono-substituído, formando os oxo-MAAs. Já o núcleo de ciclo-hexenimina é conjugado com duas aminas, ou seja, é di-substituído, formando os imino-MAAs. Pouco se sabe sobre a biossíntese destas substâncias. Há evidências tanto de uma origem a partir da via do chiquimato, assim como evidências para uma origem diretamente da via das pentoses (Portwich & Garcia-Pichel 2003; Balskus & Walsh 2010). De qualquer modo, independente da via de síntese, a substância 4-deoxigadusol é a precursora (Fig. 1). A partir dela, mediante a adição de uma glicina (Gly) é formada a micosporina-glicina, um oxo-MAA. A adição de outros aminoácidos à micosporina-glicina leva à formação de imino-MAAs primários (ex. chinorina e porphyra 334 com adição de serina e treonina, respectivamente); já modificações nos aminoácidos laterais levam à formação dos imino-MAAs secundários (ex. asterina 330 e palitinol) (Carreto & Carignan 2011).

Fortes evidências sugerem uma função fotoprotetora dos MAAs frente a radiação UV. Estudos ecológicos têm mostrado que há uma alta correlação positiva na concentração de MAAs e os níveis da radiação UV no ambiente (Carreto & Carignan 2011). Estudos fisiológicos têm verificado a indução na síntese destas substâncias com o aumento deste tipo de radiação (Shick & Dunlap 2002). Além disso, estudos fotoquímicos e fotofísicos têm mostrado que estas substâncias absorvem radiação UV e a eliminam quase completamente em forma de calor, sem formar radicais livres (Bhatia et al. 2011). Outras funções como osmólitos, reguladores da reprodução em animais, reguladores da esporulação em fungos, sinalizadores químicos ou pigmentos acessórios na fotossíntese (Carreto & Carignan 2011) têm sido atribuídas a estas substâncias, apesar de haver poucas evidências. No entanto, entre estas funções menos estudadas, a ação como antioxidante tem sido a mais aceita pela comunidade científica.

Figura 1. Vias de biossíntese dos principais aminoácidos tipo micosporina (MAAs). Baseado em Carreto & Carignan (2011). Siglas: Gly = glicina, Thr = treonina e Ser = serina.

Antioxidantes são substâncias que podem prevenir ou atenuar o estresse oxidativo sobre os organismos ou mesmo sobre materiais suscetíveis a oxidação, como alimentos e cosméticos. Este tipo de estresse pode ser consequência de diferentes tipos de estresses como alta radiação UV e radiação solar, dessecação, toxicidade por metais pesados, entre outros.

Algumas pesquisas têm demonstrado um aumento de MAAs em situações envolvendo estresse oxidativo sem o envolvimento da radiação UV, apoiando a ideia de uma função antioxidante destas substâncias. Por exemplo, a indução da síntese de micosporina-glicina no coral *Platygyra ryukyuensis* Yabe & Sugiyama submetido a estresse térmico (Yakovleva et al. 2004), um aumento de micosporina-glicina e paliteno no dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* H. W. Graham em condição de estresse por baixa salinidade (Vale 2016) e um aumento de palitinol na rodófito *Gracilariopsis tenuifrons* (C. J. Bird & E. C. Oliveira) Fredericq & Hommersand cultivada com altas intensidades de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) (Torres et al. 2016). Em um estudo recente, o estresse oxidativo induzido em meio de cultura de células humanas foi atenuado pela aplicação exógena de micosporina-2-glicina (Cheewinhamrongrod et al. 2016).

Estudos *in vitro* também têm demonstrado a capacidade antioxidante de alguns MAAs (Dunlap & Yamamoto 1995; De La Coba et al. 2009). No entanto, há uma lacuna nesses estudos relacionada à comparação entre o potencial antioxidante dos MAAs com outras substâncias de reconhecida capacidade antioxidante, como, por exemplo, algumas substâncias fenólicas e antioxidantes sintéticos. Segundo uma revisão abrangente sobre a capacidade antioxidante de MAAs de Wada et al. (2015), muitos ensaios antioxidantes *in vitro*, rotineiramente usados em vários estudos, ainda não foram realizados com MAAs, por exemplo o ensaio do reagente Folin-Ciocalteu. Diferentes ensaios antioxidantes *in vitro* apresentam mecanismos de reações distintos, que em conjunto podem ajudar na compreensão de como uma determinada substância atua como antioxidante. Além disso, são em geral ensaios simples e comuns que fornecem informações complementares a outras áreas, por exemplo, estudos fisiológicos e ecológicos.

Sob esta perspectiva, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* dos imino-MAAs asterina 330, chinorina, palitina, palitinol e porphyra 334, muito comuns em algas vermelhas, através de diversos ensaios e comparar essas atividades a de substâncias padrão de reconhecida capacidade antioxidante.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material algáceo e quantificação dos MAAs

A macroalga *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie (Gracilariaceae, Rhodophyta) foi coletada na Praia de Morro de Pernambuco (Ilhéus – Bahia), lavada em água corrente para retirada de restos de areia, epífitos, epibiontes e fauna acompanhante e excesso de sal, seca ao sol e, posteriormente, transportada até o laboratório, onde foi seca em estufa a 40 °C por sete dias. O material pulverizado (1 kg) em moinho de facas foi submetido a maceração seriada à quente (50 ± 5 °C) por 8 h com diferentes solventes de ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, metanol e metanol 80% (10% m/v), originando quatro extratos. Os solventes foram evaporados em rotaevaporador (temperatura < 50 °C).

Os MAAs de cada um dos extratos foram analisados e quantificados em relação a massa seca da alga em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de Diodos (CLAE-DAD). A coluna utilizada foi de fase normal Zorbax RX-SIL (4,6 mm x 250 mm x 5 µm) no cromatógrafo Agilent 1260 series, com fase móvel baseada em Hartmann et al. (2015) que consistiu em um gradiente de acetonitrila: acetato de amônio 5 mM (9:1; v/v) (A) e acetonitrila: acetato de amônio 5 mM (1:1; v/v) (B), com a seguinte programação: 20% A (0 min), aumentando para 55% A até 15 min e descendo para 20% A até 16 min e ficando constante até 21 min. Fluxo: 1 mL/min. Temperatura da coluna = 30 °C. Detecção em 320, 330 e 360 nm. Os MAAs foram quantificados por uma curva padrão feita com porphyra 334 (0 - 25 µg/mL; $R^2 > 0,99$).

2.2. Procedimentos para isolamento dos MAAs

Somente o extrato metanólico foi usado para o isolamento dos MAAs, pois foi o mais rico nestas substâncias. O extrato metanólico seco foi ressuscitado em metanol utilizando o menor volume possível de solvente para separar os sais da parte solúvel (ver detalhes no Capítulo II). A porção solúvel foi transferida para um novo tubo, seca em rotaevaporador, ressuscitada em metanol 50% e submetida a uma partição com diclorometano. A fase de partição hidrometanólica 50% foi evaporada em rotaevaporador (< 50 °C), ressuscitada em metanol (0,4 g/mL), centrifugada (10000 RPM, temperatura ambiente, 15 min) e o precipitado formado foi descartado. O sobrenadante foi fracionado em CLAE semipreparativa (Agilent 1200 series) em coluna de fase normal Zorbax RX-SIL (9,4 mm x 250 mm x 5 µm) a 30 °C e fase móvel isocrática composta de 32% de ácido acético 0,2% e 68% de acetonitrila por 20 min. O fluxo foi de 4 mL/min e as substâncias foram monitoradas nos comprimentos de onda de 225, 270 e 330 nm.

Foram coletadas três frações: fração 1 enriquecida com porphyra 334 e chinorina, fração 2 enriquecida com palitina e palitinol e fração 3 enriquecida com asterina 330 e palitinol.

As frações coletadas foram novamente submetidas a CLAE semipreparativo nas mesmas condições descritas anteriormente, utilizando fases móveis específicas para o isolamento de cada MAAs:

- Fração 1: método isocrático com 20% de uma mistura de acetonitrila: metanol: água (80:10:10) (pH 2,2 ajustado com ácido trifluoroacético - TFA) e 80% de acetonitrila por 10 min. Obteve-se chinorina e porphyra 334.

- Frações 2 e 3: gradiente formado por ácido acético 0,2% (A) e acetonitrila (B), sendo de 0 a 15 min a variação de A de 20% para 55%, depois até os 16 min voltando para 20% de A. Obteve-se asterina 330, palitina e palitinol.

Os MAAs foram identificados por meio de CLAE-DAD acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-DAD-EM). No caso das substâncias chinorina, porphyra 334 e palitina também foram identificadas por Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 (RMN- ^{13}C) e de Próton (RMN - ^1H) com auxílio do Prof. Dr. Marcelo José Pena Ferreira (Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - IB-USP). As análises de CLAE-EM e RMN foram realizadas na central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) (ver detalhes no item 2.4 do Capítulo II).

2.3. Determinação da capacidade antioxidante

Os ensaios antioxidantes foram realizados em espectrofotômetro para microplacas (Elisa) (Synergy™ H1). Os reagentes químicos foram comprados da Sigma-Aldrich® e grande parte deles gentilmente cedidos pela Prof.^a Dr.^a Cláudia Maria Furlan (IB-USP). As preparações das soluções foram feitas em água ultrapura (Milli-Q®) ou em metanol (JT Baker®; pureza $\geq 99,9\%$) conforme os protocolos.

Os padrões (amostras de referência) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® e dissolvidos em metanol, tendo sido usados ácido L-ascórbico (pureza $\geq 99\%$), ácido gálico (pureza $\geq 97,5\%$), ácido *p*-cumárico (pureza $\geq 98\%$), hidroxitolueno butilado (BHT, do inglês *butylated hydroxytoluene*) (pureza $\geq 99\%$), quercetina (pureza $\geq 95\%$), rutina (pureza $\geq 94\%$) e Trolox (pureza de 97%) (Fig. 2). O ácido ascórbico (vitamina C), os flavonoides (quercetina e seu glicosídeo rutina) e os ácidos fenólicos (ácido *p*-cumárico e ácido gálico) são substâncias que ocorrem naturalmente em diferentes organismos, o Trolox e BHT são antioxidantes sintéticos.

O Trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E, foi escolhido para ser padrão de referência neste estudo, pois é usado em diferentes ensaios antioxidantes *in vitro*. As concentrações dos padrões foram variáveis em cada ensaio.

Figura 2. Estruturas moleculares das substâncias sintéticas (BHT e Trolox) e naturais (ácido ascórbico, ácido gálico, ácido *p*-cumárico, quercetina e rutina) utilizadas como referência para comparação da capacidade antioxidante dos MAAs isolados.

Os MAAs isolados foram dissolvidos em água ultrapura em concentração de 1 mg/mL resultando nas seguintes concentrações efetivas em mM: asterina 330 (0,46 mM), chinorina (0,20 mM), palitina (0,27 mM), palitinol + palitina (+P) (0,22 mM) e porphyra 334 (0,19 mM). A concentração máxima de 1 mg/mL foi escolhida, pois testes anteriores indicaram este valor de referência como o valor necessário ou bem superior para atingir o efeito máximo de atividades antioxidantes nas curvas de dose-resposta para cada padrão nos diferentes ensaios.

Todos os ensaios foram realizados em penumbra, a temperatura ambiente e em triplicata, caso contrário será mencionado. Foram utilizados água ultrapura e metanol como controles negativos.

2.3.1. Atividade sequestradora do radical DPPH

O ensaio do radical DPPH foi realizado segundo o método proposto por Brand-Williams et al. (1995) conforme o protocolo adaptado por Furlan et al. (2015) com modificações. O radical DPPH foi dissolvido em metanol, com auxílio de sonicação por 15 min para obtenção de uma solução de 0,142 mM (absorbância em torno de 1). Em microplacas de 96 poços, foram adicionados, em cada poço, 20 µL dos padrões ou dos MAAs ou dos controles negativos e 280 µL da solução metanólica de DPPH. As placas ficaram incubadas sob agitação constante e leituras a 515 nm foram realizadas após 20 min e 60 min. A capacidade antioxidante das substâncias ativas foi expressa por IC₅₀, ou seja, a concentração das substâncias testadas em mM que reduz 50% do radical DPPH.

2.3.2. Determinação da capacidade quelante do íon ferroso (Fe⁺²)

O ensaio para determinação da capacidade quelante do íon ferroso foi realizado segundo o método proposto por Dinis et al. (1994) conforme o protocolo adaptado por Harb et al. (2016). Em microplacas de 96 poços, foram adicionados, em cada poço, 20 µL dos padrões ou dos MAAs ou dos controles negativos, 10 µL de uma solução aquosa de sulfato de amônio e ferro (II) (1 mM) e 260 µL de uma solução aquosa de acetato de amônio 10%. Após 5 min, foram adicionados 10 µL de uma solução aquosa do reagente ferrozina (6,1 mM). A microplaca foi incubada por 10 min sob agitação constante e logo após leituras foram realizadas em 562 nm. A capacidade antioxidante das substâncias ativas foi expressa por IC₅₀, ou seja, a concentração em mM responsável por 50% da capacidade quelante do íon ferroso.

2.3.3. Atividade sequestradora do radical ABTS^{•+}

O ensaio do radical ABTS^{•+} foi realizado segundo método proposto por Re et al. (1999) e adaptado para microplacas de 96 poços. A solução do radical ABTS^{•+} foi preparada misturando 1 mL de uma solução aquosa de ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] (7 mM) em 17,6 µL de uma solução aquosa de persulfato de potássio (140 mM). Esta solução reagiu por 16 h no escuro antes do uso. Em seguida, foi diluída em metanol (1:40; v/v) (absorbância ± 1; pH 6,7). Em microplacas de 96 poços, foram adicionados, em cada poço, 20 µL dos padrões ou dos MAAs ou dos controles negativos e 280 µL da solução do radical ABTS^{•+}. Leituras a 734 nm foram realizadas por 60 min a cada 20 min sob agitação constante. Os valores para MAAs e padrões foram expressos em mmol de equivalentes Trolox/mol de substância.

Para verificar o efeito do pH sobre a capacidade antioxidante dos MAAs, diferentes soluções de tampão de fosfato de sódio foram preparados e tiveram seus pHs ajustados para o meio ácido (pH 4,6), meio neutro (pH 7,4) e meio alcalino (pH 9,6). Estes tampões foram usados para diluir a solução do radical ABTS^{•+} ao invés do metanol. O restante do procedimento seguiu o protocolo acima, porém com o tempo de leitura das absorbâncias prolongando para 2 h a cada 20 min.

2.3.4. Método de redução de ferro (FRAP - *Ferric Reducing Antioxidant Power*)

O ensaio do método FRAP foi realizado segundo método proposto por Benzie & Strain (1996) conforme o protocolo adaptado por Urrea-Victoria et al. (2016). A solução reativa FRAP foi obtida pela mistura de 25 mL de tampão acetato (0,3 M; pH = 3,6), 2,5 mL de uma solução de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) (10 mM) em ácido clorídrico (40 mM) e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico (20 mM). Em microplacas de 96 poços, foram adicionados, em cada poço, 20 µL dos padrões ou dos MAAs ou dos controles negativos, 15 µL de água ultrapura e 265 µL da solução reativa FRAP. A microplaca foi incubada a 37 °C sob agitação constante e leituras a 595 nm foram realizadas após 30 min e após 12 h. Os valores para MAAs e padrões foram expressos em mmol de equivalentes Trolox/mol de substância.

2.3.5. Ensaio do reagente Folin-Ciocalteu

O ensaio do reagente Folin-Ciocalteu foi modificado para microplaca de 96 poços com base no método de Waterman & Mole (1994). Na microplaca de 96 poços, foram adicionados alíquotas de 20 µL dos padrões ou dos MAAs ou dos controles negativos, 200 µL de água ultrapura e 20 µL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 5 - 8 min, foram adicionados 60 µL de uma solução saturada de carbonato de sódio (Na₂CO₃) preparada a 250 mg/mL e utilizada após a formação de um precipitado. Em seguida, a microplaca foi incubada sob agitação constante por 30 min, após este período as absorbâncias foram lidas a 760 nm. Os valores para MAAs e padrões foram expressos em mmol de equivalentes Trolox/mol de substância.

2.3.6. Sistema β-caroteno/ácido linoleico

O protocolo foi adaptado para microplacas de 96 poços a partir do método descrito em Marco (1968). Primeiramente, foi feita uma solução reativa com a mistura de 16 µL de ácido linoleico, 160 µL de Tween 40 e 200 µL de solução de β-caroteno (2 mg/mL em diclorometano). Após a homogeneização, a solução resultante foi evaporada até retirada por completo do diclorometano. Em seguida, foram adicionados 50 mL de água ultrapura previamente

oxigenada por 30 min em compressor de ar e a solução reativa resultante foi homogeneizada. Desta solução reativa, 280 μL foram lidos a 450 nm para verificar o valor inicial de absorbância que deve ser de 0,8 - 1. Na microplaca de 96 poços, foram adicionados em cada poço 20 μL dos padrões ou dos MAAs ou dos controles negativos e 280 μL da solução reativa. A placa foi incubada a 45 °C sob agitação e leituras foram realizadas a cada 20 min por 2 h. A atividade de proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico para MAAs e padrões foi calculada em mmol de equivalentes Trolox/mol de substância.

2.3.7. Capacidade de absorção dos radicais oxigenados (ORAC - *Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

O ensaio ORAC foi realizado conforme Gillespie et al. (2007). As soluções de fluoresceína sódica (0,08 μM) e o gerador de radical peroxila AAPH (2,2'-azobis-2-amidinopropano) (150 mM) foram preparados em tampão fosfato de potássio (75 mM, pH 7). Na microplaca de 96 poços branca, descartando os poços das bordas, foram adicionados, em cada poço, 20 μL dos padrões ou dos extratos ou dos controles negativos e 150 μL da solução de fluoresceína sódica. A microplaca ficou sob agitação constante por 30 min a 37 °C. Após este período foi injetado, automaticamente, 25 μL da solução de AAPH. A fluorescência foi medida a cada 1 min por 2 h (comprimento de emissão: 530 nm e comprimento de excitação: 485 nm) mantendo-se a agitação constante a 37 °C. A área sob a curva (AUC, do inglês *Area Under the Curve*) foi calculada pela regra do trapézio, descontando-se os valores das áreas dos brancos. Os valores para MAAs e padrões foram expressos em mmol de equivalentes Trolox/mol de substância.

2.3.8. Comparação entre os ensaios antioxidantes e ranqueamento dos MAAs e dos padrões de referência

Para comparação entre os diferentes ensaios antioxidantes foi utilizado o módulo do coeficiente angular (α) obtido pela equação da reta ($y = \alpha x + b$) para cada substância a partir das curvas lineares de dose-resposta. A comparação entre dois ensaios antioxidantes para uma mesma substância foi feita a partir da razão dos coeficientes angulares obtidos em cada ensaio. Assim, se o resultado for igual a 1, a reatividade foi a mesma entre os ensaios, ou seja, concentrações similares são necessárias para a construção da curva dose-resposta nesses ensaios.

Para o ranqueamento, dentro de um mesmo ensaio antioxidante, os resultados para cada MAA e padrão de referência foram transformados em porcentagens relativas à substância mais ativa. Os valores obtidos para cada substância nos diferentes ensaios foram reduzidos a uma média aritmética. Em seguida, foi feito o ranqueamento, sendo o número 1 o mais ativo.

2.4. Análises estatísticas

Todos os dados foram obtidos em réplicas ($n = 3$), submetidos a teste de normalidade de Anderson-Darling e de homocedasticidade de Brown-Forsythe. Comparações foram feitas por ANOVA unifatorial e, quando houve diferença, foi utilizado o teste *a posteriori* de Tukey ($p < 0,05$). Comparações entre duas variáveis foram realizadas pelo teste *t* de Student pareado ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP (desvio padrão).

O software para processamentos dos dados, obtenção dos gráficos e análises estatísticas foi o GraphPad 7®. As estruturas moleculares foram representadas no software Accelrys Draw 4.1®. Análise de agrupamento hierárquico usando distância Euclidiana e método de ligação da mediana foi realizado no software STATISTICA 13®. Para tanto, foi construída uma matriz com as médias obtidas nos diferentes ensaios antioxidantes para cada MAA e padrão de referência, em seguida normalizada e realizado o teste estatístico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Gracilaria domingensis apresentou cerca de 0,78% da massa seca de MAAs totais, sendo porphyra 334 a majoritária (0,553%), seguida de chinorina (0,172%), palitina (0,043%), palitinol (0,005%) e asterina 330 (0,005%). Estes MAAs são os mais comuns em Gracilariaceae (Marques 2015; Torres et al. 2016) e são classificados como imino-MAAs. No isolamento desses MAAs, a fração correspondente ao palitinol apresentou o menor grau de pureza, 76%, tendo a palitina (+P) como impureza. Os outros MAAs apresentaram grau de pureza maior do que 99%. As capacidades antioxidantes dos MAAs foram comparadas àquelas de substâncias naturais e/ou sintéticas, conhecidas quanto aos seus potenciais antioxidantes com base na revisão de Gülçin (2012). Foram escolhidos ensaios *in vitro* comumente usados para abranger uma ampla variação de interpretações de capacidades antioxidantes (Huang et al. 2005; Prior et al. 2005).

3.1. Atividade sequestradora do radical DPPH

Os MAAs asterina 330 (0,46 mM), chinorina (0,20 mM), palitina (0,27 mM), palitinol (+P) (0,22 mM) e porphyra 334 (0,19 mM) não foram ativos nas maiores concentrações testadas mesmo prolongando o tempo de reação por até 2 horas, conforme sugerido por Tan & Lim (2015). O ensaio do radical DPPH é um dos ensaios mais comuns para avaliação da capacidade antioxidante (Tan & Lim 2015). Porphyra 334 (Yoshiki et al. 2009; Suh et al. 2014), chinorina (Suh et al. 2014) e palitina (Cheewinthamrongrod et al. 2016) já haviam sido testadas frente a este ensaio, apresentando-se inativas da mesma forma que o observado. No entanto, MAAs em

altas concentrações podem ser ativos frente a este ensaio. Cheewinathamrongrod et al. (2016) verificaram que aumentando a concentração de uma mistura de porphyrina 334 e chinorina a valores até 5 mM, mais de 20 vezes maior que aquelas usadas no presente estudo, foi possível detectar 60% de inibição da redução do radical DPPH. Rastogi & Incharoensakdi (2014), testando diferentes concentrações de palitina semipurificada, verificaram respostas dose-dependente. Com a menor concentração testada por aqueles autores, ou seja, 115 µg/mL, foi observado 14,5% de inibição. No presente estudo, a maior concentração testada teve cerca de metade dessa concentração 66,70 µg/mL ou 0,27 mM.

Das substâncias referência testadas, o ácido gálico (IC₅₀ = 0,011 mM), a quercetina (IC₅₀ = 0,017 mM), a rutina (IC₅₀ = 0,017 mM), o ácido ascórbico (IC₅₀ = 0,029 mM) e o Trolox (IC₅₀ = 0,03 mM) apresentaram as maiores atividades, já o BHT foi o menos ativo (IC₅₀ = 0,19 mM) e o ácido *p*-cumárico não foi ativo nas concentrações testadas (IC₅₀ > 0,40 mM). No geral, as concentrações testadas de MAAs no presente estudo foram bem superiores aos IC₅₀ dos padrões ativos.

3.2. Capacidade quelante do íon ferroso (Fe⁺²)

Até onde sabemos, esta é a primeira vez que a atividade quelante do íon ferroso (Fe⁺²) é testada para MAAs. Todas as substâncias não foram ativas nas maiores concentrações avaliadas. Para verificar se havia pelo menos uma atividade fraca, como já relatado para o ensaio de DPPH, porphyrina 334, o MAA com maior massa disponível, foi testado em altas concentrações (5 mg/mL ou 0,95 mM) e mesmo assim foi inativo. Os padrões ativos foram apenas o ácido gálico (IC₅₀ = 0,049 mM), a quercetina e a rutina (IC₅₀ = 0,035 mM), enquanto Trolox, BHT, ácido *p*-cumárico e ácido ascórbico foram inativos nas maiores concentrações testadas (IC₅₀ > 0,40 mM).

3.3. Atividade sequestradora do radical ABTS⁺, método de redução de ferro (FRAP) e ensaio do Folin-Ciocalteu

Estes três ensaios são altamente correlacionados, pois envolvem reações químicas de transferências de elétrons para a estabilização do radical, sugerindo uma estimativa da capacidade redutora da substância que está sendo avaliada (Huang et al. 2005; Gülçin 2012). No entanto, o radical ABTS⁺ também já foi relatado como estando envolvido em reações de transferência de hidrogênio (Prior et al. 2005).

No ensaio do radical ABTS⁺, os MAAs apresentaram capacidade antioxidante significativamente maior quando o tempo de reação foi prolongado de 20 min para 40 min e 60

min, indicando que estas substâncias reagem lentamente com este radical. Este resultado de aumento da atividade antioxidante com o maior tempo de reação foi semelhante com os padrões analisados, exceto para Trolox, BHT e ácido ascórbico, cujas reações ocorreram nos primeiros 20 minutos (Tabela 1). Walker & Everette (2009) obtiveram resultados semelhantes estudando diferentes substâncias fenólicas.

Os MAAs apresentaram atividade frente ao ensaio do radical ABTS^{•+} na seguinte ordem: palitinol (+P), mais ativo, seguida palitina, chinorina, porphyra 334 e asterina 330 (Tabela 1). Entretanto, estas substâncias foram pouco ativas quando comparadas aos padrões. Tomando o BHT como referência, que foi o padrão menos eficiente neste ensaio, a atividade deste padrão foi cerca de três vezes superior ao palitinol, o MAA mais ativo. Dessa forma, ainda que apresentando atividade antioxidante, os MAAs foram pouco eficientes frente ao ensaio do radical ABTS^{•+}, destacando-se apenas o palitinol (+P) com uma maior atividade.

Tabela 1. Atividades antioxidantes para o ensaio do radical ABTS^{•+} expressos em mmol de equivalentes Trolox/mol de substância (média $\pm$ desvio padrão, n = 3), comparando os tempos de reação de 20 min, 40 min e 60 min. Para uma mesma substância, letras distintas representam diferenças significativas (ANOVA unifatorial e teste *a posteriori* de Tukey; p < 0,05).

Substância testada	Tempo de reação		
	20 min	40 min	60 min
<i>MAAs</i>			
Asterina 330	6,8 $\pm$ 0,3 ^C	8,7 $\pm$ 0,2 ^B	10,0 $\pm$ 0,1 ^A
Chinorina	11,1 $\pm$ 1,7 ^C	20,6 $\pm$ 1,1 ^B	29,8 $\pm$ 1,5 ^A
Palitina	25,2 $\pm$ 2,1 ^C	38,5 $\pm$ 1,8 ^B	46,5 $\pm$ 1,9 ^A
Palitinol (+P)	88,6 $\pm$ 1,9 ^C	119,1 $\pm$ 1,2 ^B	133,0 $\pm$ 1,0 ^A
Porphyra 334	9,8 $\pm$ 1,0 ^C	19,7 $\pm$ 1,1 ^B	28,8 $\pm$ 0,8 ^A
<i>Ácidos fenólicos</i>			
Ácido gálico	2524,7 $\pm$ 204,5 ^B	2785,8 $\pm$ 186,2 ^A	2953,3 $\pm$ 200,5 ^A
Ácido <i>p</i> -cumárico	1104,7 $\pm$ 58,2 ^B	1179,1 $\pm$ 45,1 ^{A,B}	1299,3 $\pm$ 38,7 ^A
<i>Flavonoides</i>			
Quercetina	1473,5 $\pm$ 114,5 ^B	1571,9 $\pm$ 89,7 ^{A,B}	1654,7 $\pm$ 79,6 ^A
Rutina	272,35 $\pm$ 78,5 ^C	442,46 $\pm$ 65,9 ^B	578,52 $\pm$ 74,7 ^A
<i>Hidroxiácido</i>			
Ácido ascórbico	641,8 $\pm$ 108,4 ^A	646,3 $\pm$ 103,7 ^A	650,0 $\pm$ 100,0 ^A
<i>Sintéticos</i>			
BHT	408,18 $\pm$ 27,0 ^{A,B}	396,58 $\pm$ 27,4 ^A	446,0 $\pm$ 26,7 ^A
Trolox	993,2 $\pm$ 29,7 ^A	991,0 $\pm$ 33,6 ^A	986,7 $\pm$ 41,3 ^A

No ensaio do reagente FRAP, foi observado o mesmo efeito que o ensaio do radical ABTS^{•+} de uma cinética mais prolongada (Tabela 2). A capacidade antioxidante para os MAAs no tempo comumente avaliado (30 min) foi muito baixa quando comparado com a atividade dos padrões (Tabela 2), sendo nula para porphyra 334 e chinorina. Com o tempo de reação do reagente FRAP de 12 horas, bem superior ao tempo convencional, a maioria das substâncias mais que dobraram a capacidade antioxidante (Tabela 2). Pulido et al. (2000) também verificaram a necessidade de diversas horas para efetivar a reação no ensaio do reagente FRAP para diferentes substâncias fenólicas.

Após 12h, palitinol (+P) também foi o MAA mais ativo, seguido de asterina 330, chinorina, palitina e porphyra 334 (Tabela 2). No entanto, da mesma forma que observado para o ensaio ABTS^{•+}, estas atividades foram bastante reduzidas quando comparadas aos padrões. O ácido *p*-cumárico, que foi o padrão menos ativo, foi 40 vezes mais efetivo do que o palitinol.

Tabela 2. Atividades antioxidantes para o método de redução de ferro (FRAP) expressos em mmol de equivalentes Trolox/mol de substância (média $\pm$ desvio padrão, $n = 3$), comparando os tempos de reação de 30 min e 12 h. Para uma mesma substância, letras distintas representam diferença significativa pelo teste *t* de Student pareado ($p < 0,05$).

Substância testada	Tempo de reação	
	30 min	12 h
<i>MAAs</i>		
Asterina 330	1,7 $\pm$ 0,1 ^B	8,7 $\pm$ 0,34 ^A
Chinorina	0,00 $\pm$ 0,00 ^B	8,5 $\pm$ 0,39 ^A
Palitina	0,65 $\pm$ 0,19 ^B	7,07 $\pm$ 0,2 ^A
Palitinol (+P)	2,5 $\pm$ 0,1 ^B	14,4 $\pm$ 0,5 ^A
Porphyra 334	0,00 $\pm$ 0,00 ^B	5,7 $\pm$ 0,10 ^A
<i>Ácidos fenólicos</i>		
Ácido gálico	3362,8 $\pm$ 245,5 ^B	4474,6 $\pm$ 252,7 ^A
Ácido <i>p</i> -cumárico	268,9 $\pm$ 40,0 ^B	560,7 $\pm$ 74,3 ^A
<i>Flavonoides</i>		
Quercetina	6473,7 $\pm$ 406,7 ^B	10730,48 $\pm$ 689,3 ^A
Rutina	2923,7 $\pm$ 63,6 ^B	5010,0 $\pm$ 172,25 ^A
<i>Hidroxiácido</i>		
Ácido ascórbico	1400,0 $\pm$ 124,1 ^B	2139,4 $\pm$ 198,0 ^A
<i>Sintéticos</i>		
BHT	819,5 $\pm$ 63,2 ^B	1545,5 $\pm$ 231,7 ^A
Trolox	1007,6 $\pm$ 47,4 ^A	1033,5 $\pm$ 55,78 ^A

No ensaio do reagente Folin-Ciocalteu, a atividade antioxidante foi detectada em níveis significativos após os 30 min de reação ficando constante até 2 h, motivo pelo qual não foi testado maior tempo de reação. A capacidade antioxidante para os MAAs em ordem decrescente, pelo ensaio do Folin-Ciocalteu, foi porphyrina 334, mais ativo, seguida de chinorina, palitina, palitinol (+P) e o menos ativo foi o MAA asterina 330 (Tabela 3). A capacidade antioxidante de porphyrina 334, chinorina e palitina foram semelhantes ou superiores aos padrões sintéticos, porém sempre inferiores aos outros produtos naturais testados de reconhecida capacidade antioxidante.

Tabela 3. Atividades antioxidantes para o ensaio do reagente Folin-Ciocalteu expressos em mmol de equivalentes Trolox (ET)/mol de substância (média $\pm$ desvio padrão, n = 3). Letras distintas representam diferenças significativas entre as substâncias testadas (ANOVA unifatorial e teste *a posteriori* de Tukey; p < 0,05).

Substância testada	mmol ET/mol de substância
<i>MAAs</i>	
Asterina 330	139,0 $\pm$ 8,0 ^H
Chinorina	1032,4 $\pm$ 83,4 ^E
Palitina	905,4 $\pm$ 70,9 ^{EF}
Palitinol (+P)	670,9 $\pm$ 26,6 ^G
Porphyrina 334	1286,9 $\pm$ 126,7 ^D
<i>Ácidos fenólicos</i>	
Ácido gálico	3591,9 $\pm$ 236,8 ^B
Ácido <i>p</i> -cumárico	2268,8 $\pm$ 95,2 ^C
<i>Flavonoides</i>	
Quercetina	6258,5 $\pm$ 480,9 ^A
Rutina	6443,2 $\pm$ 656,6 ^A
<i>Hidroxiácido</i>	
Ácido ascórbico	2122,6 $\pm$ 123,3 ^C
<i>Sintéticos</i>	
BHT	797,1 $\pm$ 74,6 ^F
Trolox	993,2 $\pm$ 29,7 ^E

Os MAAs apresentaram diferentes capacidades antioxidantes entre os três ensaios descritos acima, quando comparados aos padrões. Tanto no ensaio do reagente FRAP como no ensaio do radical ABTS^{•+} as atividades apresentadas pelos MAAs foram baixas, sendo um pouco maiores no segundo. Já no ensaio do reagente Folin-Ciocalteu, estas substâncias foram

consideradas bem ativas, pois apresentaram resultados semelhantes a alguns padrões. Uma forma de comparar a reatividade das substâncias mensuradas por diferentes ensaios é através da razão dos coeficientes angulares obtidos para cada ensaio. Esse coeficiente angular é calculado a partir do ajuste linear das diferentes concentrações das substâncias testadas. Se a razão entre os coeficientes angulares de dois ensaios para uma mesma substância for 1, isso significa que a reatividade dessa substância é a mesma entre os ensaios. Se a razão for menor ou maior do que 1, isso significa que existem diferenças entre a reatividade nos ensaios comparados.

No geral, as razões $\alpha_{\text{Folin-Ciocalteu}}/\alpha_{\text{FRAP}}$, $\alpha_{\text{Folin-Ciocalteu}}/\alpha_{\text{ABTS}^{+\bullet}}$ e $\alpha_{\text{ABTS}^{+\bullet}}/\alpha_{\text{FRAP}}$ foram maiores do que 1 para os MAAs, exceto para $\alpha_{\text{Folin-Ciocalteu}}/\alpha_{\text{ABTS}^{+\bullet}}$ para o palitínol (+P) (Tabela 4). Isso indica, em resumo, que a ordem de reatividade para os MAAs nesses três ensaios é: ensaio do reagente FRAP < ensaio do radical ABTS⁺⁺ < ensaio do reagente Folin-Ciocalteu. Este padrão de resposta foi mais evidente para porphyrina 334, chinorina e palitina. No caso das substâncias de referência, os padrões foram menos reativos no ensaio do reagente de Folin-Ciocalteu, seguido do radical ABTS⁺⁺ e mais reativo no ensaio do reagente FRAP (Tabela 4).

Dessa forma, temos dois grandes grupos de reatividades nesses três ensaios. Os MAAs são mais reativos no ensaio com reagente de Folin-Ciocalteu e os padrões, no geral, mais ativos no ensaio do reagente FRAP. Dois motivos podem ser responsáveis pelas diferenças na reatividade das substâncias. Um deles é relativo aos próprios oxidantes dos ensaios que são bem distintos entre si. O outro pode estar relacionado a diferenças nos pHs das reações. O FRAP é realizado em pH ácido (pH = 3,6), o ensaio Folin-Ciocalteu é realizado em pH básico (pH ± 10), já o ensaio do radical ABTS⁺⁺ geralmente é realizado em pHs intermediários (no presente estudo o pH foi de 6,7) (Huang et al. 2005). É provável que as respostas obtidas para os MAAs nestes ensaios possam ser influenciadas pelos pHs.

Tabela 4. Para uma mesma substância, relação entre os módulos dos coeficientes angulares (α) obtidos através das curvas dose resposta nos ensaios de capacidades antioxidantes. Foram determinados: $\alpha_{\text{Folin-Ciocalteu}}/\alpha_{\text{FRAP}}$, $\alpha_{\text{Folin-Ciocalteu}}/\alpha_{\text{ABTS}^{+\bullet}}$ e $\alpha_{\text{ABTS}^{+\bullet}}/\alpha_{\text{FRAP}}$.

Substância	$\alpha_{\text{Folin-Ciocalteu}}/\alpha_{\text{FRAP}}$	$\alpha_{\text{Folin-Ciocalteu}}/\alpha_{\text{ABTS}^{+\bullet}}$	$\alpha_{\text{ABTS}^{+\bullet}}/\alpha_{\text{FRAP}}$
<i>MAAs</i>			
Asterina 330	2,44	2,38	1,03
Chinorina	18,62	5,93	3,14
Palitina	19,60	3,33	5,88
Palitinol (+P)	7,15	0,86	8,26
Porphyra 334	34,83	7,65	4,55
<i>Ácidos fenólicos</i>			
Ácido gálico	0,12	0,19	0,62
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,74	0,32	2,35
<i>Flavonoides</i>			
Quercetina	0,09	0,56	0,17
Rutina	0,20	1,60	0,13
<i>Hidroxiácido</i>			
Ácido ascórbico	0,13	0,38	0,35
<i>Sintéticos</i>			
BHT	0,11	0,45	0,24
Trolox	0,15	0,17	0,87

Na literatura, até onde sabemos, não há estudos referentes a avaliação da capacidade antioxidante de MAAs frente ao ensaio do reagente Folin-Ciocalteu e do reagente FRAP. No caso do ensaio com o radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$, há um único estudo com estas substâncias (De La Coba et al. 2009). Como os protocolos utilizados no presente estudo e no estudo de De La Coba et al. (2009) foram diferentes quanto ao solvente utilizado para dissolver o radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ e os pHs utilizados, há certa dificuldade de comparação direta. Ainda assim, os resultados de baixa reatividade obtidos para chinorina e porphyra 334 foram similares nos dois estudos. Em contraposição, asterina 330 foi mais ativa que estes dois MAAs no estudo de De La Coba et al. (2009), diferente do que foi encontrado nos nossos resultados em que essa substância foi a menos ativa entre todas.

Além da realização de ensaios inéditos para avaliação *in vitro* do potencial antioxidante de alguns MAAs, o presente estudo apresenta como inovação ao acompanhamento das reações ao longo do tempo. De maneira geral, ensaios que envolvem transferências de elétrons são avaliados em um tempo fixo (Prior et al. 2005), não havendo o acompanhamento da cinética de

reação. Neste trabalho, foi observado que as reações para os ensaios do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ e do reagente FRAP são dependentes do tempo de reação e, tanto os MAAs como os padrões, apresentaram maior atividade antioxidante quando o tempo de reação foi maior. Assim, visto os MAAs serem moléculas que reagem lentamente frente a estes ensaios, é importante prolongar o tempo de reação até a estabilização para que suas capacidades antioxidantes não sejam subestimadas (Re et al. 1999; Pulido et al. 2000).

3.4. Efeito do pH sobre a reatividade dos MAAs na atividade sequestradora do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$

O ensaio do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ foi escolhido para avaliar a influência do pH sobre a capacidade antioxidante dos MAAs, pois este radical é estável em diferentes pHs, apesar do meio básico tender a diminuir esta estabilidade (Prior et al. 2005; Ozgen et al. 2006). Chinorina e porphyrina 334, os MAAs mais abundantes, foram usadas nessa comparação e avaliadas pelo ensaio do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ em meio ácido (pH 4,6), meio neutro (pH 7,4) e meio alcalino (pH 9,6).

As cinéticas de atividade antioxidante destes dois MAAs sob os diferentes pHs foram semelhantes (Fig. 3). Em meio ácido, a capacidade antioxidante foi bem próxima a 0%, aumentando muito pouco, em torno de 3%, continuamente ao longo do tempo. Em meio neutro, a cinética de atividade antioxidante seguiu uma curva hiperbólica, verificando-se aumento rápido da atividade até próximo dos 60 min. Após este período, a capacidade antioxidante foi aumentando em menor magnitude, chegando próximo à estabilização em 120 min. Este mesmo padrão de cinética hiperbólica, caracterizada por uma reação mais rápida e seguida de um período de reação mais lento, foi também observado por Zheng et al. (2016) estudando aminoácidos. Para esses autores, esse padrão poderia ser explicado pela reação rápida das substâncias antioxidantes, no nosso caso os MAAs, com o radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ formando produtos de oxidação que, por sua vez, reagiriam mais lentamente com o radical. Já em meio alcalino a reação foi mais rápida, atingindo o máximo nos primeiros oito minutos, permanecendo estável até os 25 min e depois tendendo a uma queda ao longo do tempo.

O conjunto dos resultados indica um comportamento distinto para estes dois MAAs nos diferentes pHs, sendo no pH alcalino o que apresentou a maior porcentagem de atividade.

Figura 3. Cinética do ensaio antioxidante do sequestro do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ao longo de 120 min de reação com os MAAs chinorina (A) e porphyrin 334 (B) em diferentes pHs. Concentrações: porphyrin 334 (0,19 mM para pH 4,6 e pH 7,4 e 0,038 mM para pH 9,6) e chinorina (0,20 mM para pH 4,6 e pH 7,4 e 0,040 mM para pH 9,6).

De posse destes resultados, a análise da capacidade antioxidante para esses dois MAAs (chinorina e porphyrin 334) foi avaliada em cada pH, realizando-se leituras nos seus máximos de atividade, ou seja, após oito minutos de reação para meio básico e após 120 minutos para meios ácido e neutro, conforme a cinética da reação (Fig. 3).

Utilizando os tempos de reação ótimo para cada pH, as curvas de calibração feitas para o padrão Trolox foram estatisticamente semelhantes, ou seja, em meio ácido ($y = -21,0x + 1,15$; $R^2 > 0,98$), meio neutro ($y = -20,8x + 1,1$; $R^2 > 0,99$) e meio alcalino ($y = -20,5x + 0,92$; $R^2 > 0,99$). Esses resultados evidenciam que a capacidade antioxidante para o padrão Trolox não muda com a variação do pH. Assim, é possível calcular o equivalente Trolox para chinorina e porphyrin 334 nos ensaios com diferentes pHs e compara-los, pois, não há diferença de sensibilidade do padrão.

Chinorina em meio ácido apresentou atividade de $4,76 \pm 0,01$ mmol ET/mol, em meio neutro $218,35 \pm 0,02$ mmol ET/mol e em meio alcalino $1023,80 \pm 0,04$ mmol ET/mol (Fig. 4A). Já porphyrin 334 em meio ácido apresentou $1,83 \pm 0,01$ mmol ET/mol, em meio neutro $207,26 \pm 0,02$ mmol ET/mol e meio alcalino $1058,63 \pm 0,01$ mmol ET/mol (Fig. 4B). Assim, os dois MAAs apresentaram praticamente a mesma capacidade antioxidante para um mesmo pH, sendo em meio alcalino a capacidade antioxidante similar ao padrão Trolox, já que os valores obtidos foram próximos a 1000 mmol ET/mol, ou seja, 1 mol de equivalente Trolox por mol de MAAs.

Figura 4. Capacidade antioxidante dos MAAs chinorina (A) e porphyrina 334 (B) em diferentes pHs (4,6; 7,4 e 9,6). Unidades expressas em mmol de equivalentes Trolox (ET)/mol de substância. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$).

Outras substâncias já foram relatadas com o mesmo padrão de comportamento de capacidade antioxidante dependente do pH, como, por exemplo, aminoácidos (Zheng et al. 2016), algumas substâncias fenólicas (Labrinea & Georgiou 2004) e betalaínas (Gliszczynska-Świgło et al. 2006), entre outras. No caso de MAAs, De La Coba et al. (2009) também verificaram a dependência da atividade antioxidante em relação ao pH do meio, principalmente para asterina 330 (+palitina), que apresentou uma diminuição expressiva de IC_{50} de 1 mM em pH 6, para 0,01 mM em pH 8,5. Segundo Apak et al. (2016a), é comum os ensaios que envolvem reações antioxidantes do tipo transferência de elétrons, como no caso do ensaio com o radical $ABTS^{+}$, serem influenciados pelo pH, pois o meio básico pode promover a desprotonação das moléculas suscetíveis que estão sendo avaliadas e, concomitantemente, aumentar a sua capacidade de doar elétrons.

Os MAAs têm resíduos de aminoácidos em suas estruturas e, conseqüentemente, apresentam aminas e carboxilas que são suscetíveis à ionização. Dependendo do pH do meio, essas substâncias podem estar carregadas positivamente, negativamente ou estarem neutras, neste caso, são conhecidos como sais internos ou *zwitterion*. Para se estimar a carga global dessas substâncias em cada pH seria necessário saber suas constantes de dissociação (pK_a), as quais, infelizmente, ainda não foram descritas.

Neste trabalho, com o uso do software MarvinSketch® (Balogh et al. 2012) os valores de pK_a s teóricos de chinorina e porphyrina 334 foram estimados e, assim, foi possível calcular a carga global de cada uma delas. Para os cálculos das pK_a s foram consideradas as formas ressonantes principais para cada estrutura (Fig. 5A) (Carreto & Carignan 2011).

Figura 5. PKas teóricos (A) e cargas globais teóricas nos diferentes pHs (B) para chinorina e porphyrin 334 determinados com uso do software MarvinSketch®. Sigla: pI = ponto isoelétrico.

Chinorina e porphyrin 334 apresentaram ponto isoelétrico de 3,3, ou seja, possuem um caráter ácido, devido aos dois grupos carboxílicos presentes nas moléculas (Fig. 5B). Do pH 4,6 ao 7,4, usados no ensaio antioxidante, a carga global ficou progressivamente mais negativa, ou seja, é bem provável ter havido um aumento na capacidade de doar elétrons por essas substâncias, o que ajudaria a explicar o aumento da capacidade antioxidante neste intervalo de pH (Fig. 4). No entanto, entre o pH 7,4 e 10 a carga global permaneceu constante, mesmo tendo sido observado uma capacidade antioxidante muito mais elevada no pH alcalino (Fig. 4). Essa observação sugere que talvez não só o simples aumento da densidade eletrônica esteja envolvido no aumento da capacidade antioxidante, pelo menos neste intervalo de pH. Dessa forma, a determinação real da pKa seria importante para se entender a variação da capacidade antioxidante dependente do pH dessas substâncias.

3.5. Sistema β -caroteno/ácido linoleico

A peroxidação lipídica é um processo oxidativo que envolve a formação e propagação de radicais peroxilas, resultando em uma série de produtos como o hidroperóxido de lipídio. Estas substâncias resultantes podem causar sérios danos aos organismos, principalmente às membranas celulares. Muitos ensaios tentam avaliar a capacidade antioxidante de uma determinada substância ou extrato sobre este processo, como, por exemplo, o ensaio do sistema β -caroteno/ácido linoleico.

Os MAAs foram pró-oxidantes neste ensaio (Tabela 5), sendo o palitinol o mais pró-oxidante, seguido de palitina, asterina 330, chinorina e porphyra 334. Os padrões ácido gálico e o ácido ascórbico também apresentaram a mesma resposta pró-oxidativa. Em contraposição, os outros padrões apresentaram atividade antioxidante na concentração avaliada, merecendo destaque o Trolox e a quercetina.

Tabela 5. Porcentagens de proteção (%) de cada substância (0,01 mM) frente ao sistema β -caroteno/ácido linoleico. Valores positivos de porcentagens correspondem a atividades antioxidantes e valores negativos a pró-oxidantes.

Substância testada	Proteção (%)
<i>MAAs</i>	
Asterina 330	-33,6
Chinorina	-25,4
Palitina	-42,4
Palitinol (+P)	-70,9
Porphyra 334	-18,3
<i>Ácidos fenólicos</i>	
Ácido gálico	-31,5
Ácido <i>p</i> -cumárico	10,2
<i>Flavonoides</i>	
Quercetina	72,5
Rutina	16
<i>Hidroxiácido</i>	
Ácido ascórbico	-48,5
<i>Sintéticos</i>	
BHT	58,5
Trolox	98,8

Para melhor compreensão das respostas destas substâncias com este ensaio, as atividades foram avaliadas em diferentes concentrações de MAAs. As respostas pró-oxidantes

dos MAAs, assim como para o ácido ascórbico, foram mantidas mesmo nas maiores concentrações (Fig. 6). Já o ácido gálico em altas concentrações ($> 0,05$ mM), assim como todas as concentrações testadas dos outros padrões, apresentaram atividade antioxidante (Fig. 7).

Neste ensaio os resultados das respostas não foram bem definidas, exceto para o Trolox com uma curva dose-resposta linear (Fig. 6 e 7). A não linearidade das respostas, ou mesmo a ação pró-oxidante ou antioxidante dependendo da dose, como o observado para o ácido gálico, gera uma grande dificuldade na interpretação de dados obtidos por este ensaio. Segundo Prior et al (2005), esta resposta não bem definida pode estar relacionada com o envolvimento do β -caroteno em outras reações que não só a peroxidação lipídica, reagindo inclusive diretamente com o oxigênio.

O ácido ascórbico é um antioxidante bem conhecido na literatura, sendo amplamente empregado na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. Entretanto, esta capacidade pró-oxidante frente ao ensaio *in vitro* do sistema β -caroteno/ácido linoleico já havia sido verificada anteriormente por Duarte-Almeida et al. (2006). De La Coba et al. (2009), estudando asterina 330 (+palitina), chinorina e porphyra 334 (+chinorina), verificaram uma moderada capacidade antioxidante em relação ao α -tocoferol (uma forma da vitamina E), diferente do observado no presente trabalho que encontrou atividades pró-oxidantes.

O ensaio do sistema β -caroteno/ácido linoleico, apesar de avaliar a capacidade antioxidante frente às várias etapas do processo de peroxidação lipídica, vem recebendo várias críticas, principalmente devido à pouca reprodutibilidade e à complexidade da preparação da solução reativa (Apak et al. 2016b). Isso pode ajudar a explicar a discrepância encontrada entre nossos resultados e de De La Coba et al. (2009).

Figura 6. Curvas de dose-resposta para os MAAs (asterina 330, chinorina, palitina, palitinol e porphyrina 334) e o ácido ascórbico no sistema β -caroteno/ácido linoleico. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$).

Figura 7. Curvas de dose respostas para ácido gálico, ácido *p*-cumárico, BHT, Trolox, quercetina e rutina no sistema β -caroteno/ácido linoleico. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$).

3.6. Capacidade de absorção dos radicais oxigenados (ORAC)

O ensaio ORAC é um dos principais ensaios antioxidantes que avalia a atividade sobre o radical peroxila formado a partir da fonte radicalar AAPH. Este ensaio é fundamentado em reações de transferência de hidrogênio (Prior 2015). Chinorina foi o MAAs mais ativo frente a este ensaio,

seguido de palitinol, palitina, porphyra 334 e asterina 330 (Tabela 6). Estas capacidades antioxidantes foram menores do que as dos padrões analisados, principalmente, dos ácidos fenólicos, flavonoides e Trolox. Os padrões menos ativos, ácido ascórbico e BHT apresentaram, respectivamente, capacidade antioxidante cerca de 5 vezes e 2 vezes maior do que chinorina, o MAA mais ativo. Diferente do sistema β -caroteno/ácido linoleico, a atividade frente ao ORAC foi antioxidante e dose-dependente (Fig. 8).

Tabela 6. Resultados para o ensaio antioxidante ORAC (capacidade de absorção dos radicais oxigenados), expressos em mmol de equivalentes Trolox (ET)/mol de substância. Letras diferentes significam que as médias diferem significativamente entre si (Anova unifatorial e *posteriori* de Tukey; $p < 0,05$).

Substância testada	mmol ET/mol de substância
<i>MAAs</i>	
Asterina 330	$28,8 \pm 1,3^F$
Chinorina	$75,5 \pm 8,7^F$
Palitina	$57,4 \pm 1,9^F$
Palitinol (+P)	$63,4 \pm 4,5^F$
Porphyra 334	$33,8 \pm 2,9^F$
<i>Ácidos fenólicos</i>	
Ácido gálico	$1107,2 \pm 32,0^D$
Ácido <i>p</i> -cumárico	$5575,4 \pm 375,9^C$
<i>Flavonoides</i>	
Quercetina	$15492,2 \pm 1121,8^A$
Rutina	$3993,1 \pm 293,0^B$
<i>Hidroxiácido</i>	
Ácido ascórbico	$350,0 \pm 15,2^E$
<i>Sintéticos</i>	
BHT	$156,5 \pm 13,5^{EF}$
Trolox	$993,2 \pm 29,7^D$

Figura 8. Curvas de dose-resposta com respectivas equações das retas e R^2 para os MAAs asterina 330, chinorina, palitina, palitinol e porphyra 334 comparados ao padrão Trolox (o eixo X está em escala diferente dos MAAs) no ensaio antioxidante ORAC (capacidade de absorção dos radicais oxigenados). AUC = área sob a curva. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$).

Na literatura, até onde sabemos, não há estudos referentes a estes MAAs com bioensaio do ORAC. Dunlap & Yamamoto (1995) usando o AAPH para obtenção de radical peroxila (a mesma fonte usada no ensaio ORAC) verificaram que diferentes MAAs (asterina 330,

chinorina, palitinol e porphyra 334) não foram decompostos, ou seja, não foram antioxidantes ativos, após serem expostos a este radical. Como os ensaios neste estudo e os de Dunlap & Yamamoto (1995) foram muito diferentes, não há como fazer uma comparação direta dos trabalhos. Além disso, os autores usaram extratos de diferentes organismos e não MAAs purificados. De qualquer maneira, nossos resultados mostram que os MAAs não apresentam expressiva capacidade antioxidante nesse ensaio.

3.7. Considerações gerais sobre a capacidade antioxidante *in vitro* de MAAs

Os MAAs avaliados no presente trabalho apresentaram baixas capacidades antioxidantes quando comparadas a de padrões naturais e/ou comerciais. Em um ranqueamento geral, as substâncias fenólicas estudadas neste trabalho foram as mais efetivas, com os flavonoides sendo mais ativos, seguidos dos ácidos fenólicos (Tabela 7). As substâncias comerciais Trolox, ácido ascórbico e BHT ficaram em posições intermediárias, já os MAAs foram os menos ativos (Tabela 7).

Tabela 7. Ranqueamento geral das substâncias avaliadas considerando os ensaios antioxidantes *in vitro*.

Substância testada	Ranqueamento
<i>MAAs</i>	
Asterina 330	12
Chinorina	9
Palitina	11
Palitinol (+P)	10
Porphyra 334	8
<i>Ácidos fenólicos</i>	
Ácido gálico	3
Ácido <i>p</i> -cumárico	4
<i>Flavonoides</i>	
Quercetina	1
Rutina	2
<i>Hidroxiácido</i>	
Ácido ascórbico	6
<i>Sintéticos</i>	
BHT	7
Trolox	5

Na Figura 9 há o dendograma obtido a partir dos valores de atividades antioxidantes dos diferentes ensaios para MAAs e padrões de referências. As respostas dos MAAs foram similares entre si, agrupando-os em um único grupo (grupo A), e bem diferentes das respostas dos padrões testados agrupados no grupo B (Fig. 9). Dentro do grupo dos padrões é possível verificar dois subgrupos, um formado pelas substâncias sintéticas (grupo B1) e outro pelas substâncias fenólicas (grupo B2) (Fig. 9).

A junção dos MAAs em um único grupo pode indicar que os mecanismos de ação destas substâncias sejam semelhantes, variando conforme a especificidade da estrutura. Dentro do grupo dos MAAs, as substâncias chinorina e porphyra 334 aparecem mais proximamente agrupadas (Fig. 9). Em termos estruturais, a diferença entre estas duas substâncias é a presença de um grupo metila a mais em porphyra 334 (Fig. 1). Estes dois MAAs são bastante ácidos, pois apresentam duas carboxílicas em suas estruturas, enquanto os outros MAAs avaliados possuem apenas uma. Talvez por isso foram as mais afetadas pelo aumento da basicidade do meio, na comparação entre os ensaios com reagente Folin-Ciocalteu, radical ABTS⁺ e reagente FRAP, já que carboxilas são facilmente desprotonadas com o aumento do pH. Distintamente do exemplo anterior, ainda que o palitinol e a asterina 330 também se diferenciem somente pela presença de uma metila a mais no palitinol (Fig. 1), estes dois MAAs não aparecem formando um grupo próximo no dendograma (Fig. 9), talvez devido ao palitinol avaliado ser semipurificado contendo impurezas de palitina.

Figura 9. Dendrograma obtido para os MAAs e padrões de referências agrupados através das capacidades antioxidantes nos diferentes ensaios *in vitro* (Distância Euclidiana; método da mediana). As letras indicam os clusters considerados relevantes no agrupamento do resultados.

Concluindo, os MAAs avaliados (asterina 330, chinorina, palitina, palitinol e porphyra 334) no presente estudo não apresentaram atividades antioxidantes expressivas nos ensaios *in vitro*, exceto em condições específicas de pH alcalino e em ensaios que envolvem transferência de elétrons. No entanto, não se pode generalizar estes resultados para os outros MAAs, pois dependerá da substância. Micosporina-glicina, por exemplo, é descrito como uma substância antioxidante *in vitro*, com atividade de moderada a alta em ensaios de peroxidação lipídica (Dunlap & Yamamoto 1995), frente ao radical ABTS⁺ (De La Coba et al. 2009; Suh et al. 2014) e frente ao radical DPPH (Suh et al. 2014). Uma possível explicação para esta maior atividade está relacionada, provavelmente, à estrutura desta substância que corresponde a um oxo-MAA, ou seja, apresenta uma carbonila, que pode estar envolvida na maior capacidade antioxidante, diferente dos MAAs estudados no presente trabalho que são todos imino-MAAs. No entanto, o usujireno, um imino-MAA, já foi descrito com uma capacidade antioxidante similar ao α -tocoferol frente à peroxidação lipídica (Nakayama et al. 1999). Neste caso, acredita-se que a dupla ligação na cadeia lateral contribua com esta maior atividade.

Estudos fisiológicos, ecológicos e/ou *in vivo* são necessários para melhor entender, ou mesmo propor, uma função antioxidante para estas substâncias, pois ensaios *in vitro* apenas sinalizam algumas estruturas ou condições mais promissoras a maior capacidade antioxidante.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Apak R, Özyürek M, Güçlü K, Çapanoğlu E (2016a) Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and Electron Transfer (ET)-based assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64:997–1027.
- Apak R, Özyürek M, Güçlü K, Çapanoğlu E (2016b) Antioxidant activity/capacity measurement. 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-based, mixed-mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and lipid peroxidation assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64:1028–1045.
- Balogh GT, Tarcsay Á, Keserü GM (2012) Comparative evaluation of pKa prediction tools on a drug discovery dataset. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 67–68:63–70.
- Balskus EP, Walsh CT (2010) The genetic and molecular basis for sunscreen biosynthesis in cyanobacteria. *Science* 329:1653–1656.
- Barre S La, Roullier C, Boustie J (2014) Mycosporine-like amino acids (MAAs) in biological photosystems. In: Barre S La, Kornprobst J-M (eds) *Outstanding marine molecules*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp 333–360.
- Benzie IF, Strain JJ (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239:70–6.
- Bhatia S, Sharma K, Sharma A, et al. (2011) Mycosporine and mycosporine-like amino acids: A paramount tool against ultra violet irradiation. *Pharmacognosy Reviews* 5:138–146.
- Brand-williams W, Cuvelier ME, Berset C, et al. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Science and Technology* 28:25–30.
- Carreto JJ, Carignan MO (2011) Mycosporine-like amino acids: Relevant secondary metabolites, chemical and ecological aspects. *Marine Drugs* 9:387–446.
- Cheewinhamrongrod V, Kageyama H, Palaga T, et al. (2016) DNA damage protecting and free radical scavenging properties of mycosporine-2-glycine from the Dead Sea cyanobacterium in A375 human melanoma cell lines. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 164:289–295.
- De La Coba F, Aguilera J, Figueroa FL, et al. (2009) Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. *Journal of Applied Phycology* 21:161–169.

- Dinis TCP, Madeira V, Almeida M (1994) Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 315:161–169.
- Duarte-Almeida JM, Santos RJ Dos, Genovese MI, Lajolo FM (2006) Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26:446–452.
- Dunlap WWC, Yamamoto Y (1995) Small-molecule antioxidants in marine organisms: antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comparative Biochemistry and Physiology* 112B:105–114.
- Furlan CM, Santos KP, Sedano-Partida MD, et al. (2015) Flavonoids and antioxidant potential of nine Argentinian species of *Croton* (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Botanica* 38:693–702.
- Gillespie KM, Chae JM, Ainsworth E a (2007) Rapid measurement of total antioxidant capacity in plants. *Nature Protocols* 2:867–870.
- Gliszczyńska-Świgło A, Szymusiak H, Malinowska P (2006) Betanin, the main pigment of red beet - molecular origin of its exceptionally high free radical scavenging activity. *Food Additives and Contaminants* 11:1079–1087.
- Gülçin İİ (2012) Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology* 86:345–391.
- Harb TB, Torres PB, Pires JS, et al. (2016) Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do sistema quelante de metais para extratos de algas. *Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo*, pp. 1–5. Disponível em: http://www2.ib.usp.br/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=67&Itemid=98
- Hartmann A, Becker K, Karsten U, et al. (2015) Analysis of mycosporine-like amino acids in selected algae and cyanobacteria by hydrophilic interaction liquid chromatography and a novel MAA from the red alga *Catenella repens*. *Marine Drugs* 13:6291–6305.
- Huang D, Ou B, Prior R, Rior ROLP (2005a) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1841–1856.
- Labrinea EP, Georgiou CA (2004) Stopped-flow method for assessment of pH and timing effect on the ABTS total antioxidant capacity assay. *Analytica Chimica Acta* 526:63–68.
- Marco G (1968) A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 45:594–598.
- Marques LG (2015) *Aminoácidos tipo micosporina: novas metodologias e distribuição em macroalgas da costa brasileira*. Universidade de São Paulo: Tese (Doutorado em Bioquímica). 164p.

- Nakayama R, Tamura Y, Kikuzaki H, Nakatani N (1999) Antioxidant effect of the constituents of *Susabinori* (*Porphyra yezoensis*). *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76:649–653.
- Ozgen M, Reese RN, Tulio AZ, et al. (2006) Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:1151–1157.
- Portwich A, Garcia-Pichel F (2003) Biosynthetic pathway of mycosporines (mycosporine-like amino acids) in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* sp. strain PCC 6912. *Phycologia* 42:384–392.
- Prior RL (2015) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods* 18:797–810.
- Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:4290–4302.
- Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F (2000) Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:3396–3402.
- Rastogi RP, Incharoensakdi A (2014) Characterization of UV-screening compounds, mycosporine-like amino acids, and scytonemin in the cyanobacterium *Lyngbya* sp. CU2555. *FEMS Microbiology Ecology* 87:244–56.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26:1231–1237.
- Shick JM, Dunlap WC (2002) Mycosporine-like amino acids and related Gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. *Annual Review of Physiology* 64:223–262.
- Sinha RP, Singh SP, Häder DP (2007) Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 89:29–35.
- Suh S-S, Hwang J, Park M, et al. (2014) Anti-inflammation activities of Mycosporine-Like Amino Acids (MAAs) in response to UV radiation suggest potential anti-skin aging activity. *Marine drugs* 12:5174–87.
- Tan JBL, Lim YY (2015) Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. *Food Chemistry* 172:814–822.

- Torres PB, Chow F, Ferreira MJP, dos Santos DYAC (2016) Mycosporine-like amino acids from *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta) and its variation under high light. *Journal of Applied Phycology* 28:2035–2040.
- Urrea-Victoria V, Pires J, Torres PB, et al. (2016) Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. *Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo*, pp. 1–6. Disponível em: <http://www2.ib.usp.br/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=66&Itemid=98>
- Vale P (2016) Can Mycosporine-like amino acids act as multifunctional compounds in *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae)? *Photochemistry and Photobiology* 92:264–275.
- Wada N, Sakamoto T, Matsugo S (2015) Mycosporine-like amino acids and their derivatives as natural antioxidants. *Antioxidants* 4:603–646.
- Walker RBB, Everette JDD (2009) Comparative reaction rates of various antioxidants with ABTS radical cation comparative reaction rates of various antioxidants with ABTS Radical cation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:1155–1161.
- Waterman PG, Mole S (1994) Extraction and chemical quantification. In: *Analysis of phenolic plant metabolites*, 1st ed. Wiley-Blackwell, pp 333–360.
- Yakovleva I, Bhagooli R, Takemura A, Hidaka M (2004) Differential susceptibility to oxidative stress of two scleractinian corals: Antioxidant functioning of mycosporine-glycine. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 139:721–730.
- Yoshiki M, Tsuge K, Tsuruta Y, et al. (2009) Production of new antioxidant compound from mycosporine-like amino acid, porphyra-334 by heat treatment. *Food Chemistry* 113:1127–1132.
- Zheng L, Zhao M, Xiao C, et al. (2016) Practical problems when using ABTS assay to assess the radical-scavenging activity of peptides: Importance of controlling reaction pH and time. *Food Chemistry* 192:288–294.

RESUMO

No Brasil, a exploração de algas marinhas como um recurso econômico ou alimentício não é tradicional, restringindo-se a pequenas comunidades pobres no litoral nordestino. Entre as espécies de macroalgas exploradas estão as algas escolhidas para realização deste estudo: *Gracilaria birdiae* E. M. Plastino & E. C. Oliveira, *Gracilaria caudata* J. Agardh e *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie. Foram realizados dois conjuntos de análises. Em um deles, as amostras secas e despigmentadas das três espécies, além de uma amostra comercializada de *G. birdiae* diferencialmente processada foram avaliadas quanto a propriedades nutricionais e potencial antioxidante. O segundo conjunto de análises envolveu a identificação das principais classes de metabolitos e avaliação do potencial biológico das duas amostras de *G. birdiae* (alga seca e comercializada). Quanto ao aspecto nutricional, as espécies analisadas foram ricas em fibras dietéticas e sais minerais formando um grupo alimentar único com potencial para uso como suplemento alimentar. A amostra de *G. birdiae* comercializada apresentou algumas vantagens sobre as demais avaliadas, como maiores teores de fibras dietéticas, menores concentrações de sais minerais e maior rendimento de polissacarídeos, resultando em maior produtividade do ágar. Entretanto, essa mesma amostra mostrou perdas significativas no conteúdo de aminoácidos tipo micosporina. Os resultados com os ensaios biológicos sugerem que os extratos das amostras de *G. birdiae*, tanto da alga seca como da alga comercializada, são promissores na busca por substâncias com potencial antitumoral ou fitotóxico.

Palavras chaves: *Gracilaria*, composição centesimal, polissacarídeos sulfatados, aminoácidos tipo micosporina, atividade de toxicidade, atividade fitotóxica.

ABSTRACT

In Brazil, the exploitation of marine algae economically or as food source is not traditional, restricting itself to small poor communities in the northeastern coast. *Gracilaria birdiae* E. M. Plastino & E. C. Oliveira, *Gracilaria caudata* J. Agardh and *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie, on the other hand, have been explored commercially and they have been selected for this study, which was divided into two parts. The first one evaluated nutritional and antioxidant properties from dried samples of the three species above and an extra sample of *G. birdiae* obtained from the market was also used, and was differentially processed. The second analysis involved the identification of the main classes of metabolites and the evaluation of the biological potential of two differentially processed samples of *G. birdiae*. Concerning the nutritional aspects, a high amount of dietary fibers and mineral salts was detected, which enables their use as food supplement. The sample of *G. birdiae* obtained from the market showed advantages over the others, such as higher amounts of dietary fibers, lower concentration of mineral salts and higher yield of polysaccharides, resulting in improved agar productivity. However, this sample showed lower content of mycosporine-like amino acids. The results using the biological assays suggest that extracts of the *G. birdiae* samples from both dried algae and commercialized algae are promising to the search for metabolites with antitumor or phytotoxic potential.

Keywords: *Gracilaria*, centesimal composition, sulphated polysaccharides, mycosporine-like amino acids, toxicity activity, phytotoxic activity.

1. INTRODUÇÃO

Algas marinhas desempenham um importante papel biológico como um dos principais produtores primários dos oceanos e são de grande interesse econômico e social. O uso destes organismos pelos seres humanos data de milênios (Dillehay et al. 2008b) sendo usados, principalmente, como fertilizantes, fonte direta de alimento, e como fonte de ficocoloides (alginatos, caragenanas e agaranas). O mercado de macroalgas marinhas representa quase 27% da biomassa total comercializada na aquicultura, sendo um mercado estimado em US\$ 5,6 bilhões (FAO 2016).

Entre as macroalgas exploradas comercialmente estão espécies de *Gracilaria* Greville, importantes na exploração do ficocoloide ágar, visto contribuírem com cerca de 80% do ágar comercializado (Santelices 2014). O principal uso do ágar é na indústria alimentícia ou na culinária. Além disso, espécies deste gênero também são usadas diretamente na alimentação no preparo de saladas, pratos típicos em países como Havaí, Japão e China (Armisen 1997) e no preparo de bebidas, principalmente, nos países caribenhos como na Jamaica e St. Lucia. Atualmente, espécies de *Gracilaria* vêm ganhando importância também na alimentação de animais (em cultivos de crustáceos e ostras), no uso em cosméticos, na produção de fitoterápicos (contra problemas de constipação) e em remédios para emagrecimento.

No Brasil, entre as principais espécies deste gênero que vêm sendo exploradas nos bancos naturais estão *Gracilaria birdiae* E. M. Plastino & E. C. Oliveira, *Gracilaria caudata* J. Agardh e *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie (Marinho-Soriano 2016). No entanto, a exploração de algas marinhas como um recurso econômico, apesar do vasto litoral brasileiro, não é tradicional, restringindo-se a pequenas comunidades caiçaras no litoral nordestino.

A colheita de algas em bancos naturais ou arribadas é prática comum nestas comunidades, que têm na comercialização destas algas uma forma de aumentar a renda familiar (Marinho-Soriano 2016). Atualmente, o governo brasileiro tem incentivado alguns projetos de cultivo em pequena escala afim de evitar a superexploração dos costões e aumentar o valor da renda obtida. Além da exploração dos ficocoloides, outros usos têm sido incentivados, como na alimentação direta, na produção de artesanatos e de cosméticos (Rebouças 2013).

As algas são utilizadas secas e despigmentadas, no entanto pouco se conhece sobre estas algas após passar por este processamento. Dentre as espécies mais comumente exploradas, *G. birdiae* foi a escolhida para os cultivos artesanais (Marinho-Soriano 2016). Atualmente, esta alga é comercializada após ser submetida a um maior processamento de desidratação e

despigmentação que resulta na perda da coloração avermelhada e na maior redução no cheiro característico, tornando a alga mais atrativa ao uso pela população no geral.

Com o exposto, fica evidente que as espécies de *Gracilaria* apontadas acima desempenham um importante papel social e econômico para comunidades caiçaras do nordeste do Brasil. Dessa forma, estudos relacionados a estas espécies são de grande interesse para estas populações, pois podem fornecer informações que levem a melhoria do cultivo, melhoria na forma de exploração do recurso, ou mesmo agregar mais valor a este material.

Nesse contexto, o presente trabalho avaliou amostras das algas *G. birdiae*, *G. caudata* e *G. domingensis* em dois conjuntos de análises com alguns objetivos:

- No primeiro, amostras coletadas em campo das três espécies apenas secas e despigmentadas, além de uma amostra comercializada de *G. birdiae* foram avaliadas frente a vários parâmetros afim de obter conhecimento sobre o valor nutricional e o potencial uso como fontes de bioativos e de produtos de valor econômico, por exemplo, antioxidantes, polissacarídeos sulfatados e aminoácidos tipo micosporina.

- Além disso, a amostra comercializada de *G. birdiae*, por ser de importância econômica, foi avaliada quanto a composição dos principais metabólitos presentes em diferentes extratos e quanto aos possíveis potenciais biológicos. Estas análises também foram realizadas na amostra de *G. birdiae* seca não comercializada a fim de verificar se a forma de processamento da alga para comercialização altera a composição química e, conseqüentemente, suas possibilidades de uso.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta e obtenção do material

As macroalgas vermelhas *Gracilaria domingensis* (Fig. 1A), *Gracilaria caudata* (Fig. 1B) e *Gracilaria birdiae* (Fig. 1C) foram coletadas na Praia de Mãe Luiza (Natal – Rio Grande Norte) pela Prof.^a Dr.^a Eliane Marinho-Soriano (Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN) em 2013. O material coletado foi lavado em água corrente até retirada de restos de areia, pigmentos, fauna associada, excesso de sal e, em seguida, seco ao sol. Além disso, uma amostra de material de *G. birdiae* comercializado (Fig. 1D) foi comprada da Associação de Maricultura e Beneficiamento de Algas de Pitangui (AMBAP) (Rio Grande do Norte) e fornecida pelo Prof. Dr. Dárlcio Inácio Alves Teixeira (UFRN). Este material, para ser comercializado, é processado para uma maior redução da coloração avermelhada e do cheiro

característico. Assim, quatro diferentes amostras foram avaliadas: amostras de alga seca de *G. caudata*, *G. domingensis* e duas amostras de *G. birdiae* (alga seca e comercializada).

Figura 1. Aspectos gerais das amostras de algas analisadas no estudo: A - *Gracilaria domingensis*, B - *Gracilaria caudata*, C - *Gracilaria birdiae* e D - *Gracilaria birdiae* comercializada como alimento pela Associação de Maricultura e Beneficiamento de Algas de Pitangui (AMBAP) (Rio Grande do Norte). Fotos: Priscila Bezerra Torres.

A. Análises comparativas entre as diferentes amostras de *Gracilaria*

Neste bloco estão descritas as metodologias usadas no primeiro conjunto de análises. As duas amostras de *G. birdiae* (alga seca e comercializada), além das amostras de alga seca de *G. caudata* e *G. domingensis* foram submetidas a diversas metodologias que serão descritas nos itens subsequentes (2.2 a 2.5), afim de averiguar o valor nutricional e o potencial uso como fontes de bioativos e produtos de valor econômico como uma forma de agregar valor a essas espécies.

2.2. Análises centesimais

Foram avaliados o teor de proteínas totais, teor de cinzas e umidade, lipídios totais, fibras dietéticas totais, carboidratos totais, carboidratos disponíveis e valores energéticos. Os resultados foram expressos em g/100 g de massa algácea seca.

2.2.1. Proteínas totais e teor de carbono

Alíquotas das amostras das algas foram submetidas a análises elementares no analisador Perkin-Elmer (CHN 2400) na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP). Foram obtidos os valores de porcentagens de carbono e de nitrogênio. O conteúdo de proteína foi estimado usando o fator de correção 6,25 sobre a porcentagem de nitrogênio obtida (FAO 2003).

2.2.2. Teores de cinza e umidade

Os teores de umidade e de cinza foram determinados por gravimetria (Wychen & Laurens 2013). O teor de umidade foi determinado após aquecimento de massa conhecida das amostras em estufa a 105 °C até obter massa constante. O teor de cinzas foi determinado em mufla por incineração a 550 °C por cerca de 12 horas até calcinação. O teor de cinza foi usado para estimar o teor de sais minerais.

2.2.3. Teor de lipídios totais, análises e quantificação dos ácidos graxos

A extração de lipídios totais foi baseada em Folch et al. (1957). O material algáceo pulverizado (400 mg) foi macerado em 8 mL de clorofórmio: metanol (2:1; v/v) sob agitação constante por 3 h. O extrato foi filtrado, adicionado 2 mL de uma solução de cloreto de sódio (0,9%), homogeneizado em vortex (30 s) e centrifugado para formar duas fases (2000 RPM por 5 min). A camada inferior foi coletada, seca em N₂ (g) e a massa resultante mensurada para o cálculo dos lipídios totais.

Os ácidos graxos foram derivatizados a ésteres metílicos a partir do processo de transesterificação baseado em Christie & Han (2010). Os lipídios totais foram dissolvidos em 2 mL de tolueno, adicionados 4 mL de solução metanólica de ácido sulfúrico (1%), homogeneizados em vortex (30 s) e mantidos em banho-seco a 80 °C por 3 h. Após esse período, foram adicionados 5 mL de cloreto de sódio (5%). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram extraídos desta mistura resultante com hexano (2 x 4 mL). A fase hexânica foi transferida para outro tubo e lavada com 4 mL de cloreto de sódio (5%). Em seguida, a mesma fase hexânica

foi filtrada através de sulfato de sódio anidro e evaporada em N₂(g). O resíduo resultante foi solubilizado em 250 µL de hexano para análise em cromatografia a gás.

Para a identificação e quantificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos uma alíquota de 1 µL da solução em hexano foi injetada em cromatógrafo a gás com detector de ionização por chamas (CG-FID) (Coluna HP-INNOWax - 30 m x 0,32 mm x 0,5 µm). O gás de arraste foi o hélio (1 mL/min), a temperatura do injetor foi 220 °C e a temperatura do detector foi 270 °C. O gradiente de temperatura foi de 150 °C por 1 min, elevação de 15 °C/min até 225 °C, elevação de 5 °C/min até 260 °C, permanecendo isotérmico por 7 min. Para identificação os tempos de retenção dos ésteres metílicos foram comparados ao de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (óleo de canola-Sigma®) analisados nas mesmas condições descritas. Para a quantificação foi feita uma curva de calibração com éster metil palmitato (0-4 mg/mL).

2.2.4. Teor das fibras dietéticas totais

A quantificação das fibras dietéticas totais foi baseada no método não-enzimático gravimétrico (Método oficial da AOAC 993.21). O material algáceo pulverizado (100 mg) foi disperso em 7,5 mL de água com ajuda de um sonificador. Em seguida, foi mantido em banho-maria a 37 °C por 90 min. Foram adicionados 30 mL de etanol 95%, deixado em repouso por 1 h e o sobrenadante descartado. O resíduo resultante foi lavado com 6 mL de etanol 78% (2x), 3 mL de etanol 95% (2x) e 3 mL de acetona (1x), sendo o sobrenadante descartado em cada lavagem. Após esse processo, o resíduo resultante foi seco e liofilizado e a massa mensurada. Parte desse material foi submetido a quantificação de proteínas (%) (item 2.2.1) e a outra parte submetida a análise de teor de cinzas (%) (item 2.2.2).

O cálculo do teor de fibras dietéticas (%) (TFD) foi baseado na seguinte fórmula: $TFD (\%) = [100 - (TC + TP)] \times R / M$, onde TC = teor de cinza (%), TP = teor de proteínas (%), R = resíduo resultante (mg) e M = material algáceo inicial (mg).

2.2.5. Carboidratos totais e disponíveis

Os valores de carboidratos totais foram obtidos por subtração dos valores obtidos para proteínas totais (%) (item 2.2.1), cinzas (%) (item 2.2.2), umidade (%) (item 2.2.2) e lipídios totais (%) (item 2.2.3) de 100% (FAO 2003). Os carboidratos disponíveis foram inferidos pela subtração do valor de fibras dietéticas totais (%) (item 2.2.4) de carboidratos totais (FAO 2003).

2.2.6. Valores energéticos

Os valores energéticos foram estimados pelos fatores de conversão de Atwater, ou seja, 4 kcal/g para proteínas totais (P) (g/100 g) e carboidratos disponíveis (C) (g/100 g) e 9 kcal/g para lipídios totais (L) (g/100 g). Para os cálculos dos valores energéticos a seguinte fórmula foi usada: Valores energéticos (Kcal/100 g) = $4 \times (P + C) + 9 \times L$.

2.2.7. Comparação dos dados centesimais com a tabela brasileira de composição de alimentos (TACO)

Os dados centesimais foram comparados com a tabela brasileira de composição de alimentos (TACO) desenvolvida pelo Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA) da Universidade de Campinas (UNICAMP) (NEPA 2011).

Não foram considerados alimentos preparados com aditivos como sal, por exemplo, ou processados, ou seja, assados ou fritos. Na comparação consideramos apenas alimentos crus e farinhas, já que algumas algas são comercializadas na forma de pó. Foram escolhidos 218 alimentos distribuídos nos seguintes grupos alimentares: vegetais, cereais, leguminosas, frutas, peixes e frutos do mar, carnes (outras) e sementes. Também foram calculados os valores de carboidratos disponíveis pela subtração das fibras dietéticas totais dos carboidratos totais (FAO 2003).

2.3. Extração e análises dos polissacarídeos sulfatados

A extração dos polissacarídeos sulfatados foi baseada em Barros et al. (2013). 100 mg do material algáceo pulverizado foi disperso em 16 mL de água e, em seguida, macerado à 100 ± 1 °C por 3 h em banho seco. Após a filtração, os polissacarídeos sulfatados foram precipitados em etanol (1:3; v/v). O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi seco e a massa mensurada. Os valores foram expressos em % relativa a massa seca da alga.

Os teores de cinza (%) (item 2.2.2) e de proteínas (%) (item 2.2.1) dos polissacarídeos foram avaliados conforme descritos anteriormente. O teor de enxofre para os polissacarídeos sulfatados foi obtido por turbidimetria utilizando cloreto de bário através de metodologia modificada a partir de Yoshimura (2006) para espectrofotômetro de microplacas (Elisa) (Synergy™ H1) (Ver Capítulo II – item 2.5.2).

2.4. Extração dos aminoácidos tipo micosporina (MAAs) e dos componentes com capacidade antioxidante

O material algáceo seco e pulverizado (100 mg) foi macerado em 20 mL, sequencialmente, em metanol 25% (v/v), metanol 50% (v/v) e metanol PA sob agitação constante por 2 h com cada solvente. Em cada troca de solvente, o macerado foi centrifugado (10000 RPM por 15 min a temperatura ambiente). Os sobrenadantes recuperados foram reunidos, rotaevaporados, liofilizados e depois dissolvidos em metanol 50% (v/v; 20 mg/mL). Estes extratos brutos resultantes foram avaliados quanto à capacidade antioxidante (item 2.5) e a quantificação total de MAAs conforme o item 2.8.2.

2.5. Ensaio para avaliação das capacidades antioxidantes

Os ensaios para avaliação da capacidade antioxidante foram realizados utilizando espectrofotômetro para microplacas (Elisa) (Synergy™ H1). Os reagentes químicos foram comprados da Sigma-Aldrich® e grande parte deles gentilmente cedidos pela Prof.^a Dr.^a Cláudia Maria Furlan (Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - IB-USP). Metanol 50% (v/v), já usado para diluir os extratos, também foi utilizado para fazer o controle negativo em cada ensaio e diluir os padrões (ácido gálico e Trolox). Todos os ensaios foram realizados em penumbra, a temperatura ambiente e em triplicata.

2.5.1. Determinação da capacidade quelante do íon ferroso (Fe^{+2})

O ensaio para determinação da capacidade quelante do íon ferroso foi realizado segundo o método proposto por Dinis et al. (1994) conforme o protocolo adaptado por Harb et al. (2016) (Ver Capítulo V – item 2.3.2). Foi feita uma curva com ácido gálico diluído nas concentrações entre 0 a 200 $\mu\text{g/mL}$ e os valores foram expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de massa seca.

2.5.2. Atividade sequestradora do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$

O ensaio do radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] foi realizado segundo método proposto por Re et al. (1999) e adaptado para microplacas de 96 poços (Ver Capítulo V – item 2.3.3). A leitura da placa a 734 nm foi realizada após 60 min. Uma curva de calibração foi construída com Trolox diluído nas concentrações entre 0 a 100 $\mu\text{g/mL}$ e os valores foram expressos em equivalentes de Trolox (ET) por 100 g de massa seca.

2.5.3. Método de redução do íon de ferro (FRAP, do inglês *Ferric Reducing Ability of Plasma*)

O ensaio do método FRAP foi realizado segundo método proposto por Benzie & Strain (1996) conforme o protocolo adaptado por Urrea-Victoria et al. (2016) (Ver Capítulo V – item 2.3.4). Leituras da placa foram realizadas até atingir valores de absorbâncias constantes em $\lambda = 595$ nm. Uma curva de calibração foi construída com Trolox diluído nas concentrações entre 0 a 100 $\mu\text{g/mL}$ e os valores foram expressos em equivalentes de Trolox (ET) por 100 g de massa seca.

2.5.4. Ensaio do reagente Folin-Ciocalteu

O ensaio do reagente Folin-Ciocalteu foi adaptado para microplaca de 96 poços com base no método de Waterman & Mole (1994) (Ver Capítulo V – item 2.3.5). Após 30 min, as absorbâncias foram lidas a $\lambda = 760$ nm. Uma curva de calibração foi construída com ácido gálico diluído nas concentrações entre 0 a 150 $\mu\text{g/mL}$ e os valores foram expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de massa seca.

2.5.5. Capacidade de absorção dos radicais oxigenados (ORAC, do inglês *Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

O ensaio ORAC foi realizado conforme Gillespie et al. (2007) (Ver Capítulo V – item 2.3.7). Uma curva de calibração foi construída com Trolox diluído nas concentrações entre 0 a 25 $\mu\text{g/mL}$ e os valores foram expressos em μmol de equivalentes trolox/100 g de massa seca.

2.5.6. Índice de capacidade antioxidante total

Para um panorama geral das atividades antioxidantes dos extratos foi calculado o Índice de Capacidade Antioxidante Total (ICAT) baseado em Seeram et al. (2008). Este índice atribui pesos iguais para os ensaios antioxidantes, permitindo fazer comparações entre os ensaios. Dentro de um mesmo ensaio antioxidante, os resultados foram transformados em porcentagens em relação ao extrato mais ativo. Os valores obtidos para cada extrato nos diferentes ensaios foram somados e divididos pelo número total de ensaios avaliados. Esta porcentagem final foi chamada, no presente trabalho, de ICAT.

B. Análises comparativas entre as amostras de *Gracilaria birdae*

Amostras de *Gracilaria birdae* (alga seca e comercializada), inicialmente processadas de maneira distinta (ver item 2.1), foram avaliadas para comparação da composição dos principais metabólitos e potencial biológico dos diferentes extratos conforme itens 2.6 a 2.8.

2.6. Extração seriada

Foram avaliadas as amostras de *Gracilaria birdae* seca e da mesma alga comercializada. O material algáceo seco (40 g) foi pulverizado em moinho de facas. A extração foi feita por maceração seriada por 48 h com solventes de ordem crescentes de polaridade (600 mL), a saber, hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e metanol 80%. Os solventes foram evaporados em rotaevaporador (temperatura < 50 °C). Uma parte do resíduo final (10%) foi macerado em água (100 ± 5 °C) (1,5%, w/v) por 3 h e depois liofilizado. As extrações resultaram nos seguintes extratos: hexânico, diclorometânico, obtido com acetato de etila, metanólico, hidrometanólico 80% e aquoso. Cada um destes extratos foi avaliado quanto ao potencial biológico (item 2.7) e analisado quimicamente (exceto o extrato aquoso) (item 2.8).

2.7. Ensaios para a avaliação do potencial biológico

2.7.1. Ensaio de germinação e crescimento inicial

O ensaio de germinação e de crescimento inicial foi realizado em microplacas de seis poços como descrito em Novaes et al. (2016) com algumas modificações. Em cada poço a ser utilizado, foram adicionados papéis filtros previamente autoclavados, 1 mL das amostras (1 mg/mL dissolvidas em DMSO 0,5%) e 10 aquênios de alface (baba de verão manteiga, ISLA®). Para o controle negativo, o volume da amostra foi substituído por DMSO 0,5%.

A microplaca foi selada com parafilme e acomodada em câmara incubadora do tipo BOD (FANEM 347 - CDG) com temperatura 24 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro. Após sete dias, as placas foram transferidas para freezer -20 °C por 24 h. Foram contados os aquênios que germinaram, considerando como germinadas plântulas com raízes maiores do que 2 mm. As medidas de crescimento (comprimento da raiz e do hipocótilo) foram obtidas através do escaneamento das plântulas e posterior análise em software ImageJ®.

2.7.2. Ensaio de toxicidade frente a artêmias

O ensaio de toxicidade frente as artêmias foi realizado conforme Solis et al. (1993). Cerca de 50 - 100 mg dos cistos (Maramar®) foram eclodidos em 450 mL de água do mar (32 ups) em câmaras incubadoras do tipo BOD (FANEM 347 - CDG) sob luz constante, temperatura de 25 ± 1 °C e forte aeração gerada por compressor para aquários (BOYU® U9900).

Após 48 h, os náuplios foram atraídos com uma fonte de luz e transferidos para novo recipiente. Na microplaca de 96 poços foram adicionados, em cada poço, uma alíquota de 100 µL desta suspensão contendo cerca de 20 ± 5 náuplios e 100 µL dos extratos em diferentes concentrações (250, 500, 1000 e 2000 µg/mL em DMSO 2% preparado em água do mar).

A placa foi colocada novamente em BOD por 24 h no escuro. Em seguida, foram contados os náuplios mortos em cada poço. Alíquotas de 100 µL de metanol 80% foram adicionadas nos poços e após 30 min contou-se o número total de náuplios. A porcentagem de mortalidade (%) foi calculada da seguinte maneira: $(M \times 100) / TN$, onde TN é o total de náuplios e M o de náuplios mortos. Foram utilizados DMSO 2% preparado em água do mar como controle negativo e dicromato de potássio (50, 100, 150 e 200 µg/mL em DMSO 2% preparado em água do mar) como controle positivo. Valores de IC₅₀ (µg/mL), concentração necessária para matar 50% dos náuplios, foram calculados para os extratos ativos e para o controle positivo.

2.8. Análises químicas

Os extratos de *G. birdiae* (alga seca e comercializada), exceto o extrato aquoso, obtidos no item 2.6 foram analisados em Cromatografia a Gás Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) para avaliação dos metabólitos totais e em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) para as análises de MAAs.

2.8.1. Análises em Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

As amostras foram dissolvidas em 50 µL de piridina e derivatizada por reação com 50 µL de BSTFA (N, O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida) por 30 min a 80 °C. Em seguida, foram analisadas em CG-EM (Agilent 6890N/5975) na seguinte programação de análise: $T_0 = 100$ °C por 6 min, 15 °C/min até 225 °C, 5 °C/min até 300 °C permanecendo constante nesta temperatura por 9 min.

A coluna empregada foi a HP-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm). O gás de arraste utilizado foi o hélio com fluxo de 1 mL/min. A temperatura de injeção foi de 300 °C. O espectrômetro de massas foi ajustado com os seguintes parâmetros: temperatura da fonte foi de

230 °C, temperatura do quadrupolo de 150 °C, voltagem da eletromultiplicadora (EM) de 70 eV, amplitude de detecção de massa foi de 40 - 1000 unidades de massa atômica com 2,64 scan/s. A identificação dos componentes majoritários foi feita através do banco de dados NIST/NBS (aceitos índice de similaridade >900) e através de comparação com dados da literatura.

2.8.2. Análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector por Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

Para as análises em CLAE-DAD foi utilizado um cromatógrafo Agilent 1260 com coluna Zorbax RX-SIL (250 mm x 4,6 mm x 5 µm). A fase móvel foi baseada em Hartmann et al. (2015) e consistiu de um gradiente de acetonitrila: acetato de amônio a 5 mM (9:1; v/v) (A) e acetonitrila: acetato de amônio a 5 mM (1:1; v/v) (B), com a seguinte programação: 20% A (0 min), aumentando para 55% A até 15 min e descendo para 20% A até 16 min e ficando constante até 21 min. Fluxo: 1 mL/min. Temperatura da coluna = 30 °C. Detecção em 320, 330 e 360 nm. A identificação dos MAAs foi feita por comparação com padrões e foram quantificados por uma curva padrão feita com porphyrin 334 (0 - 25 µg/mL; $R^2 > 0,99$).

2.9. Análises estatísticas

Os ensaios foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP) e realizados com $n = 3$ exceto no ensaio de germinação e crescimento inicial no qual os valores de comprimento de hipocótilo e raiz com $n = 40$ e para germinação foram consideradas as porcentagens de aquênios germinados em cada poço com $n = 4$. Os dados foram submetidos a teste de normalidade de Anderson-Darling e homocedasticidade de Bartlett. Quando houve normalidade, os dados foram submetidos a ANOVA unifatorial e posteriori de Tukey ($p < 0,05$). Caso contrário, os dados foram submetidos a análise não paramétrica com teste de Kruskal-Wallis e posteriori de Dunn ($p < 0,05$).

Para obtenção dos valores médios da composição centesimal dos grupos alimentares selecionados da TACO (item 2.2.7) foram excluídos os *outliers* pelo o método de ROUT ($Q = 5\%$). O software para processamentos dos dados, obtenção dos gráficos e análises estatísticas foi o GraphPad 7®.

Análises de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) foram realizadas sobre uma matriz construída com os valores brutos da composição centesimal para cada alimento selecionado da TACO (item 2.2.7) e os valores médios obtidos para cada

alga estudada. A análise foi realizada no programa STATISTICA 13® utilizando uma matriz de correlação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A. Análises comparativas entre as diferentes amostras de *Gracilaria*

3.1. Composição centesimal

De modo geral, como pode ser visto na tabela 1, os resultados para composição centesimal indicam que há diferenças nutricionais entre as amostras das algas avaliadas.

A amostra comercializada de *G. birdiae* apresentou os maiores teores de fibras dietéticas totais (60,8 g/100 g) e de carboidratos totais (73,44 g/100 g). A amostra da alga seca de *G. birdiae* também foi rica em fibras dietéticas totais (52,04 g/100 g), significativamente maior do que em *G. caudata* (41,54 g/100 g) e *G. domingensis* (44,51 g/100 g). A alga *G. domingensis* foi rica em carboidratos disponíveis (26,17 g/100 g) e apresentou o maior valor energético (156 Kcal/100 g). Já *G. caudata* se destacou no maior teor de sais minerais (22,89 g/100 g), cerca de cinco vezes maior que o menor valor encontrado para a amostra comercializada de *G. birdiae* (4,45 g/100 g).

Valores de lipídios totais foram inferiores a 1% para todas as amostras analisadas. Esse resultado não surpreende, pois, as macroalgas não são fontes ricas de lipídios, possuindo, geralmente, até 2% em massa seca (MacArtain et al. 2007). Os valores proteicos não foram discrepantes entre as amostras avaliadas, mas significativamente maiores em *G. birdiae* (12,1 g/100 g) e *G. caudata* (13,13 g/100 g) em relação a amostra comercializada de *G. birdiae* (9,5 g/100 g). Os teores de umidade foram similares entre as algas em média 10,5 g/100 g, lembrando que todas as amostras eram previamente secas.

Tabela 1. Composição centesimal de *Gracilaria birdiae* (alga seca e comercializada), *Gracilaria domingensis* e *Gracilaria caudata*. Valores foram expressos em média $\pm$ DP (n = 3). Em uma mesma linha, letras diferentes significam que as médias diferem significativamente entre si (Anova unifatorial e *posteriori* de Tukey; $p < 0,05$). Unidades expressas por massa algácea seca.

	<i>Gracilaria birdiae</i>	<i>G. birdiae</i> (comercializada)	<i>Gracilaria domingensis</i>	<i>Gracilaria caudata</i>
Proteína (g/100 g)	12,21 $\pm$ 0,04 ^A	9,56 $\pm$ 0,53 ^B	11,15 $\pm$ 0,22 ^{AB}	13,13 $\pm$ 0,53 ^A
Fibras dietéticas totais (g/100 g)	52,04 $\pm$ 1,08 ^B	60,84 $\pm$ 0,87 ^A	41,54 $\pm$ 0,64 ^C	44,51 $\pm$ 0,29 ^D
Sais minerais (g/100 g)	9,25 $\pm$ 0,43 ^B	4,45 $\pm$ 0,13 ^C	11,28 $\pm$ 0,24 ^B	22,89 $\pm$ 1,27 ^A
Lipídios (g/100 g)	0,54 $\pm$ 0,03 ^B	0,76 $\pm$ 0,08 ^A	0,78 $\pm$ 0,08 ^A	0,33 $\pm$ 0,08 ^C
Umidade (g/100 g)	10,69 $\pm$ 0,55 ^A	11,77 $\pm$ 1,17 ^A	9,06 $\pm$ 0,89 ^A	10,55 $\pm$ 0,18 ^A
Carboidratos totais (g/100 g)	67,29	73,44	67,71	53,10
Carboidratos disponíveis (g/100 g)	15,25	12,6	26,17	8,59
Valor energético (Kcal/100 g)	114,75	95,55	156,36	89,86

Na tabela 2 são apresentados dados de composição centesimal disponíveis para espécies de *Gracilaria*. Os dados disponíveis na literatura para o gênero são bastante variáveis, com esta variabilidade podendo estar relacionada a influências sazonais, geográficas e/ou forma de processamento da amostra (Holdt & Kraan 2011; Wells et al. 2016). Diferenças metodológicas também podem influenciar os resultados, como, por exemplo, o teor de sais minerais inferidos pela quantidade de cinzas pode ser superestimado se não ocorrer a adequada calcinação do material avaliado. Além disso, somente os valores de proteínas totais, lipídios totais e sais minerais estão disponíveis para todas as espécies já avaliadas. Dados relacionados a teor de fibras totais, carboidratos totais, umidade e valor energético são menos disponíveis. Com essas limitações em mente, algumas observações merecem destaque.

Para as diferentes espécies de *Gracilaria* (Tabela 2), os valores proteicos variaram entre 5,18 a 26,71 g/100 g, com média de 12,05 g/100 g, valor próximo ao encontrado para as espécies do presente trabalho (Tabela 1). Fibras dietéticas totais variaram entre 5,21 a 63,17 g/100 g, com média de 29,36 g/100 g (Tabela 2). Nesse parâmetro, nossos resultados ficaram acima da média, principalmente, considerando a amostra comercializada de *G. birdiae* que apresentou o maior valor, 60,84 g/100 g. A quantidade encontrada nessa amostra ficou bem próxima aos de

Gracilaria edulis (S. G. Gmelin) P. C. Silva (63,17 g/100 g), *Gracilaria fisheri* (B. M. Xia & I. A. Abbott) I. A. Abbott, J. Zhang & B. M. Xia (60,7 g/100 g) e *Gracilaria tenuistipitata* C. F. Chang & B. M. Xia (58,4 g/100 g) (Tabela 2).

Os valores de sais minerais para as espécies de *Gracilaria* variaram entre 4,04 a 53,40 g/100 g, com média de 26,90 g/100 g (Tabela 2). Nesse aspecto, o valor mais alto obtido nas espécies analisadas (*G. caudata* - 22,89 g/100 g) ficou relativamente próximo ao valor médio. As demais espécies estudadas ficaram abaixo da média, sendo o menor valor encontrado na amostra comercializada de *G. birdiae* (4,45 g/100 g) semelhante ao de *Gracilaria cornea* J. Agardh (4,04 g/100 g).

Os teores de lipídios totais variaram entre 0,26 a 3,30 g/100 g, com média de 1,55 g/100 g (Tabela 2). Nossos resultados ficaram abaixo da média. A amostra comercializada de *Gracilaria birdiae* apresentou o menor valor (0,33 g/100 g), comparável ao encontrado em *G. cornea* (0,26 g/100 g). Como já mencionado acima, estes organismos não são ricos em lipídios.

No que se refere ao teor de umidade, o valor médio para as diversas espécies de *Gracilaria* foi de 10,02 g/100 g, com a amplitude de valores indo de 3,60 a 15,62 g/100 g (Tabela 2). Nas amostras analisadas, os valores ficaram entre 9,06 e 11,77 g/100 g, próximos à média para o gênero.

A estimativa calórica, ou seja, os valores energéticos, é o parâmetro menos estudado em amostras de espécies de *Gracilaria*. Das 16 espécies para as quais existem dados relacionados a composição centesimal, somente cinco apresentam essa estimativa. Esse parâmetro apresentou variação entre 101 a 217 Kcal/100 g, com valor médio de 149,20 Kcal/100 g. Nas amostras analisadas, somente *G. domingensis* apresentou valor próximo a essa média (156,36 Kcal/100 g). As demais apresentaram valores energéticos abaixo da média.

Valores de carboidratos totais ficaram entre 15,20 a 66,10 g/100 g, com média de 39,40 g/100 g. Os resultados encontrados com as amostras do presente trabalho foram maiores do que a média, devido, principalmente, aos maiores teores de fibras, já que os carboidratos totais incluem fibras dietéticas.

De modo geral, os resultados de composição centesimal para as espécies estudadas neste trabalho estão dentro da variação relatada na literatura para o gênero. Analisando os valores médios, as amostras analisadas neste trabalho apresentaram maiores teores de fibras dietéticas e carboidratos totais, valores semelhantes de teores proteicos e de umidade e baixos teores de sais minerais, lipídios e valores energéticos.

Tabela 2. Composição centesimal para diferentes espécies de *Gracilaria*. Unidades expressas em g/100 g de massa algácea seca exceto para os valores energéticos expressos em Kcal/100 g de massa algácea seca.

	Proteínas totais	Fibras dietéticas totais	Sais minerais	Lipídios totais	Umidade	Carboi- dratos totais	Valor energético	Ref*
<i>Gracilaria arcuata</i>	13,79	19,89	16,51	1,07	-	-	-	1
<i>Gracilaria birdiae</i>	7,10	-	22,50	1,30	-	-	-	2
<i>Gracilaria cervicornis</i>	22,96	5,65	7,72	0,43	14,33	63,12	-	3
<i>Gracilaria changii</i>	6,90	24,70	22,70	3,30	-	-	-	4
<i>Gracilaria chilensis</i>	13,70	-	18,90	1,30	-	66,10	-	5
<i>Gracilaria cornea</i>	5,47	5,21	39,06	0,26	-	36,29	-	6
	17,80	-	4,04	0,57	15,62	61,97	-	7
<i>Gracilaria coronopifolia</i>	10,50	-	53,40	2,10	-	15,20	126	8
<i>Gracilaria corticata</i>	19,30	-	23,10	1,80	9,20	43,00	-	9
<i>Gracilaria crassa</i>	6,18	45,58	19,24	1,89		43,85	217	10
	5,18	-	43,18	1,30	7,46	42,00	-	11
<i>Gracilaria domingensis</i>	6,40	-	52,30	1,90	-	18,70	-	12
	16,60	-	14,43	1,43	14,44	52,92	-	7
<i>Gracilaria edulis</i>	6,20	-	23,80	1,30	-	-	-	2
	14,26	63,17	7,63	0,93	-	-	-	13
<i>Gracilaria fisheri</i>	11,60	60,70	21,20	2,20	5,50	-	-	14
	26,71	11,78	9,71	0,62		47,47		15
<i>Gracilaria foliifera</i>	6,98	51,43	23,12	1,69	-	31,02	167	10
<i>Gracilaria salicornia</i>	5,60	-	52,90	2,40	-	20,00	101	8
	6,00	-	49,30	1,30	-	24,40	-	12
	9,58	10,40	38,91	2,00	-	-	-	16
	9,55	12,52	29,10	1,47	-	-	-	1
<i>Gracilaria parvispora</i>	7,60	-	48,10	2,80	-	22,90	135	8
<i>Gracilaria tenuistipitata</i>	26,13	12,21	14,65	0,75	-	41,45	-	15
	21,60	58,40	17,00	2,80	3,60	-	-	14
Médias	12,15	29,36	26,90	1,55	10,02	39,40	149,2	-

*Referências: 1. Mwalugha et al, (2015), 2. Gressler et al, (2010), 3. Marinho-Soriano et al, (2006), 4. Norziah & Ching (2000), 5. Ortiz et al, (2009), 6. Robledo & Pelegrín (1997), 7. Calado et al, (2013a), 8. McDermid & Stuercke (2003), 9. Rohani-Ghadikolaei et al, (2012), 10. Kailas & Nair (2015), 11. Baghel et al, (2014), 12. Renaud & Luong-Van (2006), 13. Debbarma et al. (2016), 14. Benjama & Masniyom (2012), 15. Setthamongkol et al (2015), 16. Tabarsa et al, (2012).

Para uma contextualização dos resultados obtidos das algas estudadas, na tabela 3 é apresentada uma comparação da composição centesimal média dos principais grupos de alimentos consumidos no Brasil (NEPA 2011) com as médias obtidas para espécies de algas estudadas no presente trabalho (*G. birdiae* – alga seca e comercializada, *G. domingensis* e *G. caudata*). A maior parte dos alimentos consumidos no Brasil são de origem animal ou de plantas terrestres. Os principais representantes do ambiente marinho estão na classe dos peixes e frutos do mar. Nenhuma espécie de alga é incluída na tabela brasileira de composição de alimentos (TACO) (NEPA 2011), reforçando a baixa tradição de consumo direto de algas na alimentação pela população brasileira.

Na tabela 3 vemos que dentre os alimentos de origem vegetal, as algas são boas fontes proteicas (11,50 g/100 g), com valores próximos ao encontrados em média para os cereais (9,30 g/100 g), mas aquém daqueles observados para as leguminosas, tradicionalmente apontadas como as principais fontes de proteína vegetal, tendo valores médios superiores até a fontes de origem animal.

Considerando as fibras dietéticas, as algas aparecem como ótimas fontes (49,70 g/100 g), principalmente devido à grande quantidade de polissacarídeos sulfatados presente nesses organismos. Os valores foram mais que o dobro de leguminosas (21,01 g/100 g), a principal fonte deste componente nutricional na dieta dos brasileiros. A linhaça, incluída no grupo das sementes, atualmente é bastante usada como alimento funcional, principalmente, pelo alto teor de fibras (em torno de 33,5 g/100 g). Até mesmo nessa comparação, as algas aparecem como boas fontes de fibras alimentares.

O teor de sais minerais também é bem superior em algas (12,00 g/100 g) quando comparado ao encontrado nos grupos alimentares tradicionais. Frutas e verduras apontadas como boas fontes de sais minerais na alimentação, apresentam valores 15-20 vezes menores. Os baixos teores de lipídeos encontrados (0,60 g/100 g), superiores somente as frutas (0,17 g/100 g) e das verduras (0,21 g/100 g), ajudam a entender os baixos valores energéticos (114,10 Kcal/100 g), comparáveis aos de peixes e frutos do mar (106,90 g/100 g).

As algas estudadas apresentaram valores de umidades de 10,50 g/100 g similares aos cereais (11,62 g/100 g), leguminosas (12,69 g/100 g) e sementes (12,70 g/100 g). Os valores de carboidratos disponíveis ficaram atrás somente dos cereais (70,41 g/100 g) e leguminosas (32,05 g/100 g).

Tabela 3. Comparação entre as médias dos valores da composição centesimal dos principais grupos de alimentos consumidos no Brasil com base na tabela brasileira de composição de alimentos (TACO) com a média das algas estudadas: *Gracilaria birdiae* (alga seca e comercializada), *Gracilaria domingensis* e *Gracilaria caudata*. Unidades expressas em g/100 g de massa total exceto para os valores energéticos expressos em Kcal/100 g de massa total.

Grupos alimentares	Proteínas totais	Fibras dietéticas totais	Sais minerais	Lipídios totais	Umidade	Carboidratos disponíveis	Valor energético
<i>Algas marinhas</i>							
<i>Gracilaria</i> (estudo atual)	11,50	49,70	12,00	0,60	10,50	15,70	114,10
<i>Alimentos de origem animal</i>							
Carnes	19,70	0,00	1,30	10,10	68,90	0,00	175,10
Peixes e frutos do mar	17,92	0,00	1,07	3,37	78,05	0,00	106,90
<i>Alimentos de origem vegetal</i>							
Cereais	9,30	4,31	1,01	1,32	11,62	70,41	355,90
Frutas	0,95	2,34	0,51	0,17	84,2	11,04	55,58
Leguminosas	21,05	21,01	3,34	1,29	12,69	32,05	335,20
Sementes	15,90	13,20	2,60	49,50	12,70	8,60	549,60
Verduras	1,63	2,44	0,79	0,21	92,51	2,20	22,96

A análise de componente principal (PCA) foi realizada com os resultados de composição centesimal, utilizando as diversas fontes inclusas em cada um dos grupos alimentares e as quatro amostras de algas deste estudo, afim de entender melhor o valor nutricional das algas analisadas quando comparadas aos principais grupos de alimentos consumidos no Brasil.

O componente principal 1 (PC1) explica 49,27% da variância dos dados e o componente principal 2 (PC2) explica 20,75%, assim o gráfico apresentado na figura 2 explica 70,02% da variância total dos dados. Umidade (27%) e energia (24%) têm maiores pesos sobre PC1 e lipídios (33%) e carboidratos disponíveis (24%) sobre PC2.

De modo geral, nos valores mais negativos de PC1 estão plotados, principalmente, as verduras e as frutas (Fig. 2A) devido aos maiores valores de umidade (Fig. 2B), enquanto no lado dos valores positivos desse eixo estão os cereais, as leguminosas, as algas e as sementes (Fig. 2A), por causa dos maiores valores energéticos (Fig. 2B). O PC2 separou dois grandes grupos de alimentos: valores negativos estão os peixes, as carnes e as sementes (Fig. 2A), ricos em proteínas e lipídios totais (Fig. 2B), enquanto nos valores mais positivos estão as algas, os cereais e as leguminosas (Fig. 2A) sobre influência principalmente de carboidratos disponíveis, sais minerais e fibras dietéticas totais (Fig. 2B). Apesar desta similaridade, as algas formaram um grupo bem distinto de leguminosas e cereais (Fig. 2A).

Figura 2. Gráfico dos escores de componente principal 1 (PC1) e do componente principal 2 (PC2) para os as algas avaliadas e os principais grupos de alimentos consumidos no Brasil com base na tabela brasileira de composição de alimentos (TACO) (A) e gráfico dos pesos das variáveis nutricionais nos eixos de PC1 e PC2 (B).

Em resumo, as algas estudadas foram mais similares a leguminosas e cereais, porém são alimentos distintos quanto aos altos valores de fibras dietéticas totais e sais minerais. Nenhum dos alimentos corriqueiramente consumidos no Brasil apresentaram tais características, tornando as algas avaliadas um grupo único. Outras algas marinhas comumente consumidas em países orientais, como *kombu* (*Laminaria* e *Saccharina*), *wakame* (*Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar) e *nori* (*Pyropia* e *Porphyra*) apresentam características similares: baixo teor lipídicos e altos teores de fibras dietéticas totais e sais minerais (Holdt & Kraan 2011; Abreu et al. 2015). É importante salientar que estes resultados só são válidos para algas secas, já que a maior parte da massa total da alga fresca, em média de 94%, é constituída de água (Abreu et al. 2015).

As fibras dietéticas em algas vermelhas são classificadas, principalmente, como solúveis, tendo como principal componente galactanas sulfatadas, sendo já as fibras insolúveis formadas, majoritariamente, por celulose (Hamed et al. 2015). Fibras, apesar de não serem aproveitadas como nutrientes, são componentes importantes das dietas. Estudos têm demonstrado uma alta correlação entre a ingestão de fibras e menores riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes e cânceres de colón e reto, além de estarem associadas ao menor índice de obesidade e ao um bom funcionamento do intestino (Anderson et al. 2009).

No Brasil, há um déficit no consumo de fibras. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o consumo diário de 12,5 g de fibras dietéticas totais para cada 1000 Kcal ingerida de alimentos, porém, o consumo brasileiro é de apenas 7,6 g/1000 Kcal em média (Sardinha et al. 2014). As espécies de *Gracilaria* estudadas apresentam em média 435,5 g de fibras dietéticas totais para cada 1000 Kcal da alga, ou seja, apresentam uma alta densidade de fibras por valor energético. Assim, estas espécies podem ser consideradas bons suplementos alimentares nas dietas dos brasileiros, sem aumentar significativamente o valor energético consumido.

Estudos têm sido realizados visando adicionar espécies de *Gracilaria* na preparação de alguns alimentos ou na substituição de ingredientes. Calado et al. (2013b) substituíram uma parte da farinha do trigo por “farinha” de *G. domingensis* na produção de bolo e Ponte et al. (2010) adicionaram *G. birdiae* no preparo de doce de coco. Estudos deste tipo são importantes para incentivo de uso de algas na alimentação brasileira.

Sais minerais em algas marinhas geralmente são constituídos por macro e micronutrientes, principalmente, sódio e potássio, contribuindo com o sabor salgado desses organismos. Outros minerais, muitas vezes escassos na dieta humana como iodo e ferro, também podem ser encontrados em altas concentrações dependendo da espécie de alga, de

condições ambientais ou variações sazonais (Wells et al. 2016). Essa propriedade torna as algas boas fontes suplementares de sais em caso de deficiência de alguns minerais, como, por exemplo, o uso de algas pardas ricas em iodo (Wells et al. 2016). Para *Gracilaria* não há relato de estudo ou não é comum o uso neste aspecto. O processamento feito na amostra de *G. birdiae* para ser comercializada reduziu significativamente (cerca de duas vezes menos) o teor de sais minerais em relação a amostra de *G. birdiae* não processada para comercialização (Tabela 1). Entretanto, dependendo do uso da alga esta redução pode ser interessante, pois pode diminuir o sabor salgado e a ingestão em excesso de sais, como sódio, na alimentação. Uma análise mais minuciosa desses sais seria interessante para pensar no aproveitamento dessas algas.

3.2. Composição de ácidos graxos

Os teores de lipídios totais para as algas estudadas foram menores do que 1% (Tabela 1). A composição dos ácidos graxos destes extratos lipídicos é apresentada na tabela 4. A maior parte dos ácidos graxos são saturados representando mais de 90% da composição de ácidos graxos totais. Insaturações foram incomuns, tendo sido encontrado somente um único ácido graxo monoinsaturado, o ácido oleico (C18:1 *n* - 9), presente, principalmente, em *G. domingensis*. O ácido palmítico (C16:0) é o principal componente contribuindo com mais de 75%. O segundo majoritário foi o ácido mirístico (C14:0), seguido de ácido esteárico (C18:0) exceto em *G. domingensis* em que o ácido oleico (C18:1 *n* - 9) foi mais abundante que o ácido esteárico.

A maior parte dos trabalhos relativos a composição de ácidos graxos para espécies de *Gracilaria* também verificou maior composição de ácidos graxos saturados e predomínio de ácido palmítico. No entanto, as quantidades de ácidos graxos insaturados são bem maiores do que as observadas no presente trabalho. Por exemplo, Gressler et al. (2010), avaliando também *G. birdiae* e *G. domingensis*, encontraram respectivamente 36,5% e 22,3% de ácidos graxos insaturados em relação a massa seca, com predomínio de poliinsaturados, majoritariamente, o ácido araquidônico.

Uma provável explicação para as menores concentrações de ácidos graxos insaturados no presente trabalho pode estar relacionada a forma de secagem do material algáceo. Alguns trabalhos têm verificado redução do teor lipídico e das quantidades de ácidos graxos insaturados associados a secagem do material ao ar livre ou em temperaturas maiores do que a temperatura ambiente, como Stewart et al. (2003) estudando soja que verificaram que há uma diminuição no teor de ácidos graxos insaturados com o aumento da temperatura.

Tabela 4. Composição de ácidos graxos (mg/g de massa algácea seca) de *Gracilaria birdiae* (alga seca e comercializada), *Gracilaria domingensis* e *Gracilaria caudata*. Valores foram expressos em média $\pm$ DP (n = 3).

	<i>Gracilaria birdiae</i>	<i>G. birdiae</i> (comercializada)	<i>Gracilaria domingensis</i>	<i>Gracilaria caudata</i>
<i>Saturado</i>				
Ácido mirístico (C14:0)	0,12 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,03	0,15 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,00
Ácido palmítico (C16:0)	1,29 $\pm$ 0,08	1,60 $\pm$ 0,43	1,02 $\pm$ 0,17	0,72 $\pm$ 0,06
Ácido esteárico (C18:0)	0,04 $\pm$ 0,00	0,07 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00
<i>Monoinsaturado</i>				
Ácido oleico (C18:1 <i>n</i> - 9)	0,02 $\pm$ 0,0	tr	0,08 $\pm$ 0,01	-
Ácidos graxos totais	1,47 $\pm$ 0,09	1,81 $\pm$ 0,54	1,33 $\pm$ 0,22	0,78 $\pm$ 0,06
Saturado (%)	98,61	98,24	91,35	100
Monoinsaturado (%)	1,39	1,76	8,65	tr
<i>Total identificado (%)</i>	94	92	93	93

3.3. Capacidades antioxidantes

Atualmente, há um grande interesse no estudo das capacidades antioxidantes dos alimentos, pois, estudos epidemiológicos têm associado alimentos ricos em antioxidantes a baixa incidência de doenças como câncer, diabetes e aquelas relacionadas ao sistema cardiovascular (Gülçin 2012). Nesse contexto, os extratos brutos das algas estudadas foram avaliados frente a diferentes ensaios *in vitro* com mecanismos de reações antioxidantes distintos. Os ensaios com reagente Folin-Ciocalteu e com reagente FRAP envolvem reações químicas de transferências de elétrons; o ensaio do ORAC é fundamentado em reações de transferência de hidrogênio; o ensaio do radical ABTS^{•+} envolve reações dos dois mecanismos anteriores e, o ensaio de quelante do íon ferroso, como o próprio nome sugere, avalia a capacidade quelante de metais (Huang et al. 2005; Prior et al. 2005). Os resultados de rendimento dos extratos brutos e das avaliações das capacidades antioxidantes das algas estudadas estão na tabela 5.

O rendimento do extrato bruto para *G. caudata* (32,14%) foi significativamente o maior, equivalente a cerca de três vezes o rendimento da amostra comercializada de *G. birdiae* (10,02%) e cerca de duas vezes ao rendimento da amostra de alga seca de *G. birdiae* (17,63%). A alga *G. caudata* foi a mais ativa frente aos ensaios do reagente Folin-Ciocalteu (59,99 mg EAG/100 g), no ensaio ORAC (682,75 μ mol ET/100 g) e no ensaio do radical ABTS^{•+} (813,42

$\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$), sendo cerca de três vezes mais ativa nesses ensaios do que a amostra comercializada de *G. birdiae*, a menos ativa.

A amostra de alga seca de *G. birdiae* foi mais ativa frente ao reagente FRAP (346,59 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$) e no ensaio do quelante do íon ferroso (137,59 mg EAG/100 g). No primeiro caso, o valor observado para *G. birdiae* foi cerca do dobro da capacidade antioxidante de *G. domingensis* (168,22 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$), a amostra menos ativa. Já no ensaio do quelante do íon ferroso, a atividade antioxidante foi oito vezes maior.

No geral, a amostra menos ativa foi a comercializada de *G. birdiae* (ICAT = 42%) indicando que o processamento para comercialização provocou uma redução na capacidade antioxidante. Em contrapartida, *G. caudata* e a amostra de alga seca de *G. birdiae* apresentaram as maiores capacidades antioxidantes, com valores de ICAT de 92% e 86%, respectivamente.

Tabela 5. Rendimentos (%), capacidades antioxidantes e Índices de Capacidade Antioxidante Total (ICAT) obtidos para *Gracilaria birdiae*, *G. birdiae* (comercializada), *Gracilaria domingensis* e *Gracilaria caudata*. Valores foram expressos em média $\pm$ DP (n = 3). Em uma mesma linha, letras diferentes significam que as médias diferem significativamente entre si (Anova unifatorial e *posteriori* de Tukey; $p < 0,05$). Valores expressos por massa algácea seca.

	<i>Gracilaria birdiae</i>	<i>G. birdiae</i> (comercializada)	<i>Gracilaria domingensis</i>	<i>Gracilaria caudata</i>
Rendimentos (%)	17,63 $\pm$ 0,68 ^C	10,02 $\pm$ 0,18 ^D	20,03 $\pm$ 0,66 ^B	32,14 $\pm$ 0,40 ^A
Folin-Ciocalteu (mg EAG/100 g)	42,68 $\pm$ 1,95 ^B	18,30 $\pm$ 3,85 ^C	44,90 $\pm$ 3,92 ^B	59,99 $\pm$ 0,98 ^A
FRAP ($\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$)	346,59 $\pm$ 37,60 ^A	196,27 $\pm$ 51,82 ^C	168,22 $\pm$ 52,01 ^C	325,78 $\pm$ 14,98 ^B
ABTS ⁺⁺ ($\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$)	574,09 $\pm$ 89,77 ^{AB}	297,94 $\pm$ 27,58 ^B	520,01 $\pm$ 45,45 ^B	813,42 $\pm$ 194,58 ^A
Quelante (mg EAG/100 g)	137,59 $\pm$ 20,59 ^A	72,16 $\pm$ 3,95 ^B	17,59 $\pm$ 4,32 ^C	91,63 $\pm$ 20,91 ^{AB}
ORAC ($\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$)	600,09 $\pm$ 31,04 ^B	241,36 $\pm$ 15,93 ^D	412,21 $\pm$ 8,55 ^C	682,75 $\pm$ 31,83 ^A
ICAT (%)	86	42	52	92

Na literatura para algas marinhas ainda há poucos trabalhos avaliando as capacidades antioxidantes com ênfase nos produtos usados na alimentação. A maioria dos trabalhos foca apenas nos extratos, mesmo quando analisa algas marinhas comestíveis. Esse quadro é bem distinto quando se analisa alimentos de origem de plantas terrestres ou animais. Nesses casos,

existem bancos de dados com informações disponíveis para os diferentes ensaios. Nesse contexto, comparamos os dados obtidos neste trabalho com aqueles disponíveis para alguns dos principais grupos de alimento usados corriqueiramente na nossa alimentação.

Utilizando o ensaio do reagente FRAP, Carlsen et al. (2010) analisaram mais de 3100 alimentos. Foi possível verificar que os resultados obtidos para *G. caudata* e para a amostra de alga seca de *G. birdiae* foram semelhantes às médias obtidas para leguminosas (480 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$), cereais (340 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$) e carnes (310 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$), porém muito abaixo da média para alimentos que são ricos em antioxidantes, como frutos do tipo bagas (9800 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$). Da mesma forma, comparando os resultados obtidos com aqueles de Pellegrini et al. (2006) utilizando o ensaio com o radical ABTS, *G. caudata* e *G. birdiae* não comercializadas apresentaram resultados similares a cereais e legumes (valores até 800 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$), muito abaixo de alimentos conhecidos por serem ricos em antioxidantes como as nozes, por exemplo, que apresentaram em torno de 12000 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$.

Wu et al. (2004) analisaram mais de 100 alimentos quanto as suas capacidades antioxidantes baseado no ensaio ORAC e no ensaio com reagente de Folin-Ciocalteu. Os resultados para *G. caudata* e para alga seca de *G. birdiae* foram, no geral, menores do que a maioria dos alimentos avaliados por estes autores. Para o ORAC, os resultados foram similares a algumas variedades de tomate, alface, milho, cenoura, abacaxi, manga, banana, kiwi, couve-flor, entre outras, cujos valores de capacidade antioxidante estão entre 400 a 800 $\mu\text{mol ET}/100\text{ g}$. Já para o reagente Folin-Ciocalteu os resultados foram próximos a algumas variedades de melão, pera, cenoura, pepino, alface, batata doce e tomate com resultados até 100 mg EAG/100 g.

Dessa forma, vemos que as amostras de algas avaliadas apresentaram pouca capacidade antioxidante quando comparadas a alimentos reconhecidamente ricos nessas substâncias, não sendo esta característica uma boa justificativa para inclusão desse item na alimentação.

3.4. Polissacarídeos sulfatados

Polissacarídeos sulfatados são componentes das paredes celulares em algas marinhas. Em *Gracilaria*, os polissacarídeos têm grande importância econômica, pois são os constituintes do ágar. Além disso, diferentes atividades biológicas têm sido demonstradas para essas substâncias, como antioxidantes (Souza et al. 2012), antiviral (Mazumder et al. 2002), anti-inflamatória (Coura et al. 2012), antitumoral (Jiang et al. 2014), entre outras. O presente trabalho fez uma triagem preliminar das algas estudadas para avaliar o potencial de exploração do ficocoloide e do seu potencial bioativo.

Os resultados para os polissacarídeos sulfatados estão representados na tabela 6. Os polissacarídeos extraídos das amostras de *G. birdiae* apresentaram resultados semelhantes, com baixo grau de sulfatação e de contaminantes proteicos. Entretanto, na amostra comercializada o rendimento foi maior (59,29%), sendo praticamente o dobro do encontrado em *G. caudata*. O polissacarídeo de *G. caudata* foi o que menos rendeu (32%), apresentou maior teor de contaminantes proteicos e baixo grau de sulfatação. Já o polissacarídeo de *G. domingensis* teve como principal característica o maior grau de sulfatação, cerca de dez vezes o encontrado para o polissacarídeo de *G. caudata*.

Tabela 6. Rendimento total (%), teor de cinza (%), contaminantes proteicos (%), enxofre (%) e grau de sulfatação para os polissacarídeos sulfatados de *Gracilaria birdiae* (alga seca e comercializada), *Gracilaria domingensis* e *Gracilaria caudata*. Valores foram expressos em média $\pm$ DP (n = 3) por massa seca dos polissacarídeos, exceto para o rendimento que foram expressos por massa seca da alga. Em uma mesma linha, letras diferentes significam que as médias diferem significativamente entre si (Anova unifatorial e *posteriori* de Tukey; p < 0,05).

	<i>Gracilaria birdiae</i>	<i>G. birdiae</i> (comercializada)	<i>Gracilaria domingensis</i>	<i>Gracilaria caudata</i>
Rendimentos (%)	47,59 $\pm$ 3,12 ^B	59,29 $\pm$ 4,30 ^A	42,36 $\pm$ 2,66 ^B	32,00 $\pm$ 0,65 ^C
Proteínas (%)	5,40 $\pm$ 0,33 ^B	5,78 $\pm$ 0,19 ^B	6,37 $\pm$ 0,48 ^{AB}	8,25 $\pm$ 0,30 ^A
Enxofre (%)	0,81 $\pm$ 0,28 ^B	0,64 $\pm$ 0,10 ^B	3,04 $\pm$ 0,42 ^A	0,32 $\pm$ 0,05 ^B
Grau de sulfatação	0,10 $\pm$ 0,03 ^B	0,07 $\pm$ 0,01 ^B	0,41 $\pm$ 0,05 ^A	0,04 $\pm$ 0,01 ^B

Os rendimentos para os polissacarídeos do presente trabalho foram similares aos da literatura para *G. domingensis* (Guimarães et al. 2007) e *G. caudata* (Barros et al. 2013). No entanto, para *G. birdiae* o rendimento de 47,59% foi significativamente maior quando comparado aos 27,2% obtidos por Souza et al. (2012) e os 6,5% de Maciel et al. (2008). Variações nas quantidades de polissacarídeos em uma mesma espécie já foram verificadas em outras algas. Para *Gracilaria debilis* (Forsskål) Børgesen já foram obtidos rendimentos de polissacarídeos de 14,8% (Mehta et al. 2010) e de 63% (Sudharsan et al. 2015). Fatores como variações sazonais, diferenças fisiológicas e, principalmente, diferenças na metodologia de extração podem explicar essas variações. O teor de enxofre também é bem variável.

De uma lado, os polissacarídeos com bom potencial para aplicação como ficocoloides apresentam, segundo Armisen & Galatas (1987), baixos teores de sulfatos e de contaminantes proteicos. Dessa forma, os polissacarídeos obtidos das duas amostras de *G. birdiae* foram os de

melhor qualidade. O processamento realizado para comercialização de *G. birdiae* parece ter promovido um maior rendimento de polissacarídeo, tornando esse material uma boa fonte desse produto. Por outro lado, maiores teores de enxofre parecem estar correlacionados a maiores atividades biológicas, principalmente, como antiviral (Li et al. 2015). Neste caso, o polissacarídeo de *G. domingensis*, teria maior potencial biológico e maior valor agregado em termos de aproveitamento do material.

3.5. Aminoácidos tipo micosporina (MAAs)

Os MAAs são substâncias nitrogenadas comumente encontradas em algas vermelhas. Estas substâncias apresentam, principalmente, função fotoprotetora frente a radiação ultravioleta (RUV). Muitos estudos têm comprovado um bom potencial destas substâncias como parte de protetores solares (Torres et al. 2004; de la Coba et al. 2009), além de aplicações como materiais para revestimento (Fernandes et al. 2015). Atualmente, alguns protetores solares já contêm formulações com estas substâncias (exemplo Helioguard 365®).

Os valores de MAAs para as algas estudadas é apresentado na tabela 7. *Gracilaria domingensis* e *G. caudata* foram mais diversas, com a presença dos principais MAAs de algas vermelhas, ou seja, asterina 330, chinorina, palitina, palitinol e porphyra 334. Esta composição de MAAs foi similar ao encontrado por Marques (2015) para as mesmas espécies. As amostras de *G. birdiae* apresentaram apenas chinorina, palitina e porphyra 334. Este resultado foi semelhante ao obtido por Cardozo et al. (2011). Em termos quantitativos, a amostra de alga seca de *G. birdiae* apresentou mais do que o dobro de MAAs totais quando comparada a *G. caudata*, que teve o segundo maior rendimento, e 60 vezes mais que a amostra comercializada de *G. birdiae*, demonstrando que o processamento feito para a comercialização de *G. birdiae* provocou a perda praticamente total dos MAAs deste material.

A amostras de alga seca de *Gracilaria birdiae* (245,77 mg/100 g de massa seca) apresentou, em termos quantitativos, resultados bastante expressivos, ainda maiores que os encontrados por Navarro (2015) estudando *Pyropia columbina* (Montagne) W. A. Nelson (220 mg/100 g de massa seca) e *Mazzaella laminarioides* (Bory de Saint-Vincent) Fredericq (227 mg/100 g de massa seca), quem as considerou promissoras para exploração destes metabólitos. Nesse contexto, a exploração dos MAAs em *G. birdiae* pode ser uma alternativa para melhoria de aproveitamento e uso dessa espécie.

Tabela 7. Teor de aminoácidos tipo micosporina (mg/100 g de massa seca) para *Gracilaria birdiae* (alga seca e comercializada), *Gracilaria domingensis* e *Gracilaria caudata*. Valores foram expressos em média $\pm$ DP (n = 3).

	<i>Gracilaria birdiae</i>	<i>G. birdiae</i> (comercializada)	<i>Gracilaria domingensis</i>	<i>Gracilaria caudata</i>
Porphyra 334	178,39 $\pm$ 18,13	2,17 $\pm$ 0,36	28,82 $\pm$ 6,02	48,15 $\pm$ 1,81
Chinorina	52,70 $\pm$ 4,54	0,82 $\pm$ 0,15	7,56 $\pm$ 1,62	32,20 $\pm$ 1,52
Palitina	14,67 $\pm$ 1,20	1,02 $\pm$ 0,17	10,41 $\pm$ 0,47	34,55 $\pm$ 1,29
Palitinol	-	-	1,54 $\pm$ 0,06	tr
Asterina 330	-	-	1,25 $\pm$ 0,31	tr
<i>Total</i>	245,77 $\pm$ 23,86	4,03 $\pm$ 0,68	49,59 $\pm$ 8,39	114,90 $\pm$ 4,63

B. Análises comparativas entre as amostras de *Gracilaria birdae*

3.6. Análises das principais classes químicas e atividades biológicas

Dentre as espécies analisadas, *Gracilaria birdiae* é a de maior importância econômica. Por isso, as duas amostras desta espécie (alga seca e amostra comercializada) foram escolhidas para uma comparação mais detalhada, avaliando a composição das principais classes químicas e comparando o potencial biológico destes materiais frente a um modelo vegetal (alface) e a um modelo animal (artêmias).

Como foi explicado no item 2.6 dos Materiais e Métodos, estas amostras foram submetidas a extração seriada e os extratos obtidos foram avaliados quimicamente e submetidos aos bioensaios.

3.6.1. Rendimento dos extratos e análises das principais classes químicas

Os rendimentos totais para as duas amostras foram semelhantes, com 48,38% para a alga seca e 51,46% para alga comercializada. Os extratos hexânico, metanólico e hidrometanólico 80% para a alga seca apresentaram rendimentos superiores aos correspondentes na alga comercializada. O contrário ocorreu para os extratos de acetato de etila e aquoso (Tabela 8).

Tabela 8. Rendimentos totais (%) por massa seca da alga para os extratos de *Gracilaria birdiae* (alga seca e comercializada).

Extratos	<i>Gracilaria birdiae</i>	<i>G. birdiae</i> (comercializada)
Hexânico (%)	0,32	0,14
Diclorometânico (%)	0,25	0,27
Acetato de etila (%)	0,06	0,28
Metanólico (%)	3,87	1,45
Hidrometanólico 80% (%)	6,15	4,34
Aquoso (%)	37,70	44,95
<i>Total (%)</i>	48,38	51,46

Na tabela 9 são apresentados os resultados das análises químicas. Ambas as amostras (alga seca e comercializada) apresentaram uma composição química bem simples com a presença de ácidos graxos livres, esteróis, glicerol, heterosídeos, MAAs e alguns monossacarídeos. Estes últimos não foram possíveis de serem distinguidos. A amostra comercializada de *G. birdiae* apresentou uma diversidade maior de classes químicas com a presença de monoacilglicerol e alceno.

Entre os ácidos graxos foram identificados principalmente os ácidos esteárico, mirístico e palmítico. Entre os esteróis, o colesterol é o mais abundante. Os principais heterosídeos são floridosídeo e os isômeros isofloridosídeo de posição D- e L-. Entretanto, não foi possível fazer a distinção completa entre os três heterosídeos já que apresentam o mesmo espectro de massas em CG-EM. Foi identificado apenas um único monoacilglicerol, a monopalmitina, e um único alceno, o *n*-heptadecano. Dentre os MAAs, foram identificados chinorina, palitina e porphyrina 334.

Para a amostra de alga seca, os extratos hexânico, diclorometânico e de acetato de etila, mais apolares, apresentaram o ácido palmítico como majoritário, com mais de 60% de contribuição na abundância relativa. Já os extratos metanólico e hidrometanólico 80% apresentaram os heterosídeos com valores de abundâncias relativas maiores que 80%. Nesses mesmos extratos, os MAAs representam cerca de 1% da massa seca do extrato.

Na amostra comercializada os resultados foram atípicos, pois, todos os extratos apresentaram o ácido palmítico como majoritário (valores de abundâncias relativas maiores do que 55%), inclusive os extratos mais polares. Foi observado uma redução na quantidade dos heterosídeos e dos MAAs em relação a amostra de alga seca de 80% para 5,34% e de 1% para 0,42%, respectivamente.

O processamento para obtenção da alga comercializada provavelmente provocou uma perda destas substâncias mais polares, resultando nas maiores abundâncias relativas de

substâncias apolares e/ou de outras substâncias que, por estarem em quantidades muito pequenas originalmente, não foram possíveis de serem analisadas em CLAE e CG-EM na amostra da alga seca. As principais classes químicas encontradas nas duas amostras de *G. birdiae* são similares ao encontrado por Xu et al. (2015) estudando *Gracilaria dura* (C. Agardh) J. Agardh, e por Santos et al. (2015) estudando *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss, e também para *G. caudata* e *G. domingensis* (Capítulo II). No entanto, a diversidade química para *G. birdiae* foi menor.

Tabela 9. Principais metabólitos identificados nos extratos, exceto o aquoso, das amostras de alga seca e comercializada de *Gracilaria birdiae*. Extratos brutos: H = hexânico; D = diclorometânico; Ac = obtido em acetato de etila; M = metanólico; M80 = hidrometanólico 80%.

Substância proposta*	<i>Gracilaria birdiae</i>					<i>G. birdiae</i> (comercializada)				
	H	D	Ac	M	M80	H	D	Ac	M	M80
<i>Ácidos graxos livres</i>										
Ácido esteárico	2,5	1,8	1,8			4,8	4,8	3,5	2,6	1,8
Ácido mirístico	10,8	9,0	8,1			6,6	6,9	7,2	5,7	6,8
Ácido oleico	4,0					2,3				
Ácido palmítico	74,0	69,9	62,6	2,6	5,7	66,3	78,0	69,0	55,4	69,4
Ácido pentadecanoico										2,2
<i>Alcanos</i>										
<i>n</i> -Heptadecano						2,1				
<i>Ésteres de ácidos graxos</i>										
Monopalmitina								1,9	2,0	
<i>Esteróis</i>										
Colesterol		6,1				9,5	4,5	4,3	5,3	4,4
7 β -hidroxicolesterol	1,6	3,1	2,1				2,3	2,4	1,8	
Colest-5-en-7-ona						3,1				
<i>Outros</i>										
Glicerol			6,3	2,9	1,3			1,9	3,3	13,5
Heterosídeos			1,6	85,9	83,2				5,4	
MAAs total				1,09	1,18				0,42	
Monossacarídeos				4,2	4,9			1,9	13,4	

* Todas as substâncias, exceto os MAAs, foram identificadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e os valores correspondem a abundância relativa em porcentagem. Os MAAs foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e seus valores correspondem a porcentagem da substância por massa de extrato seco.

3.6.2. Atividades biológicas

Na tabela 10 são apresentados os resultados de mortalidade de náuplios de artêmias em contato com os extratos brutos para as duas amostras de *G. birdiae* avaliadas. Os extratos foram considerados ativos com valores de IC50 < 1000 µg/mL (Meyer et al. 1982). Para a amostra de alga seca os extratos hexânico, diclorometânico e o obtido com acetato de etila foram ativos com IC50 menores do que 1000 µg/mL, já a amostra comercializada foi menos ativa, sendo apenas o extrato hexânico considerado ativo com IC50 inferior a 1000 µg/mL. No entanto, analisando a composição química de ambas amostras (alga seca e comercializada) (Tabela 9) não pode ser visto grandes variações e, por isso, não é possível afirmar qual substância poderia estar envolvida nesta toxicidade.

Na literatura para Gracilariaceae a maior atividade de extratos apolares, semelhante ao observado no presente trabalho, foi observada por Saeidnia et al. (2012) estudando *Gracilariopsis persica* A. M. Bellorin, J. Sohrabipour & E. C. Oliveira. Nesse estudo, o estigmasterol e o β -sitosterol foram indicados pelos autores como responsáveis por esta toxicidade.

Tabela 10. Taxa de mortalidade (%) de náuplios de artêmias submetidas a extratos obtidos com as amostras de alga seca e comercializada de *Gracilaria birdiae* em 1000 µg/mL e IC50 (µg/mL) desses extratos

Extratos	<i>Gracilaria birdiae</i>		<i>G. birdiae</i> (comercializada)	
	1000 µg /mL	IC50 (µg/mL)	1000 µg /mL	IC50 (µg/mL)
Hexânico	100%	634	100%	554
Diclorometânico	100%	816	0%	-
Acetato de etila	100%	822	0%	-
Metanólico	0%	-	0%	-
Metanólico 80%	0%	-	0%	-
Aquoso	0%	-	0%	-

Alguns trabalhos correlacionam positivamente os resultados de toxicidade em ensaios com artêmias com potenciais efeitos antitumorais (Meyer et al. 1982). Além disso, alguns autores sugerem que este ensaio também pode ser correlacionado positivamente com ensaios em camundongos para determinar toxicidade oral (Parra et al. 2001). Pensando nessas duas possibilidades, não há necessidade de preocupação com possível intoxicação pelo consumo destas amostras de alga, pois, os extratos ativos frente a artêmias apresentaram baixo rendimento (Tabela 6). Em contrapartida, esses mesmos extratos podem ser vistos com

potencial para obtenção de substâncias com atividade antitumoral. Recentemente, Sakthivel et al. (2016) e Sheeja et al. (2016) chegaram ao fitol, uma substância frequente em extratos apolares, como componente ativo isolado de *G. edulis* frente a células tumorais de pulmão (A549) e de mama (MCF-7).

Na figura 3 são apresentados os resultados dos efeitos dos extratos brutos das duas amostras (alga seca e comercializada) de *G. birdiae* sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas de alface (*Lactuca sativa*). Somente os extratos hexânicos das duas amostras foram fitotóxicos sobre a germinação (Fig. 3A). Entretanto, os extratos hexânico, diclorometânico e de acetato de etila (Fig. 3B), das duas amostras, além do extrato hidrometanólico 80% da amostra de alga seca, levaram a redução do desenvolvimento do hipocótilo. No que se refere ao desenvolvimento da raiz, somente os extratos hidrometanólico 80% e aquoso não acarretaram redução no desenvolvimento deste órgão (Fig. 3C).

Comumente os estudos com extratos de espécies de *Gracilaria* têm relatado efeitos bioestimulantes, como aqueles descritos no capítulo IV com os extratos de *G. caudata* e *G. domingensis*. Comparando-se a composição química das amostras de *G. birdiae* com aquelas de *G. caudata* e *G. domingensis* (Capítulo II), a principal diferença é a presença de 7 β -hidroxicolesterol na amostra da alga seca e comercializada e de colest-5-en-7-ona somente na amostra de alga comercializada (Tabela 7), no entanto não é possível afirmar se estas substâncias são as responsáveis pela fitotoxicidade.

Na literatura, até onde sabemos, foi encontrado um único trabalho com efeito de fitotoxicidade com *Gracilaria*, a saber, Chenieux et al. (1980) estudando o extrato etanólico de *Gracilaria compressa* (C. Agardh) Greville e o extrato aquoso de *Gracilaria foliifera* (Forsskål) Børgesen sobre a planta terrestre *Helianthus tuberosus* L.

Figura 3. Efeitos dos extratos hexânico (H), diclorometânico (D), obtido com acetato de etila (AC), metanólico (M), hidrometanólico 80% (M80) e aquoso (A) obtidos das amostras de *Gracilaria birdiae* (alga seca e comercializada) sobre a porcentagem de germinação (A) e o desenvolvimento do hipocótilo (cm) (B) e da raiz (cm) (C) de *Lactuca sativa*. Valores expressos em médias $\pm$ DP. Asteriscos (*) se referem a médias significativamente diferentes ao controle (DMSO 0,5%) (Kruskal-wallis, Dunn; $p < 0.05$).

4. CONCLUSÃO

De modo geral, as espécies analisadas apresentaram bom potencial para aplicação econômica e biológica. As quatro amostras das três espécies de algas avaliadas foram distintas quanto a composição nutricional, porém com resultados não discrepantes quando comparadas a outras espécies de *Gracilaria*. Quando comparadas a alimentos tradicionais na mesa dos brasileiros, as quatro amostras apareceram como parte de um grupo único caracterizado por ser rico em fibras dietéticas totais e sais minerais.

A comparação entre as duas amostras *G. birdiae* mostrou alguns outros pontos interessantes. Os maiores teores de fibras dietéticas e sais minerais, além do maior rendimento dos polissacarídeos colocam a amostra comercializada dessa alga não só como uma boa fonte de ágar, como também uma opção para suplemento alimentar. No entanto, o processamento feito na produção dessa amostra leva a perdas significativas de algumas substâncias. A redução nos teores de MAAs compromete seu aproveitamento para outros fins, como, produção de cosméticos ou como protetores solares. Um processo de manipulação que diminuísse a perda dessas substâncias possibilitaria agregar mais valor à exploração dessa espécie e aos produtos. Ainda nessa comparação, os resultados com os ensaios biológicos sugerem que os extratos das amostras de *G. birdiae*, tanto a alga seca como a alga comercializada, são promissores na busca por substâncias com potencial antitumoral ou fitotóxico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu MH, Pereira R, Sassi J (2015) Marine algae and the global food industry. In: Pereira L, Neto JM (eds) *Marine algae: biodiversity, taxonomy, environmental assessment, and biotechnology*. CRC Press, pp 300–319.
- Anderson JW, Baird P, Davis RH, et al. (2009) Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews* 67:188–205.
- Armisen R (1997) Agar. In: Imeson AP (ed) *Thickening and Gelling Agents for Food*, 2nd ed. Springer Science+Business Media Dordrecht, pp 1–21.
- Armisen R, Galatas F (1987) Production, properties and uses of agar. In: McHugh DJ (ed) *Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds*. FAO Fisheries Technical Paper 288, pp 1–57.
- Baghel RS, Kumari P, Reddy CRK, Jha B (2014) Growth, pigments, and biochemical composition of marine red alga *Gracilaria crassa*. *Journal of Applied Phycology* 26:2143–2150.
- Barros FCN, Da Silva DC, Sombra VG, et al. (2013) Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed *Gracilaria caudata* (J. Agardh). *Carbohydrate Polymers* 92:598–603.
- Benjama O, Masniyom P (2012) Biochemical composition and physicochemical properties of two red seaweeds (*Gracilaria fisheri* and *G. tenuistipitata*) from the Pattani Bay in Southern Thailand. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 34:223–230.
- Benzie IF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239:70–6.

- Calado CMB, Pires VCF, Albuquerque AP, et al. (2013a) Algas comestíveis: comparação nutricional entre espécies de *Gracilaria* (*G. cornea* e *G. domingensis*) de ocorrências no litoral nordestino. In: *Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia/UEPB*.
- Calado CMB, Souza JS de B, Medeiros FAF de, França Pires VC (2013b) Análise sensorial de bolos elaborados com a alga *Gracilaria Domingensis*. In: *5º Congresso Norte-Nordeste de Química*.
- Cardozo KHM, Marques LG, Carvalho VM, et al. (2011) Analyses of photoprotective compounds in red algae from the Brazilian coast. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21:202–208.
- Carlsen MH, Halvorsen BL, Holte K, et al. (2010) The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal* 9:1-11.
- Chenieux JC, Verbist JF, Biard JF, et al. (1980) Seaweeds of French atlantic coast with antimutagenic activity. *Planta Medica* 40:152–162.
- Christie WW, Han X (2010) *Lipid analysis - isolation, separation, identification and lipidomic analysis*, 4th ed. Oily Press Lipid Library Series.
- Coura CO, de Araújo IWF, Vanderlei ESO, et al. (2012) Antinociceptive and anti-inflammatory activities of sulphated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 110:335–41.
- Debbarma J, Rao BM, Murthy LN, et al. (2016) Nutritional profiling of the edible seaweeds *Gracilaria edulis*, *Ulva lactuca* and *Sargassum* sp. *Indian Journal of Fisheries* 63:81–87.
- De la Coba F, Aguilera J, de Gálvez M V, et al. (2009) Prevention of the ultraviolet effects on clinical and histopathological changes, as well as the heat shock protein-70 expression in mouse skin by topical application of algal UV-absorbing compounds. *Journal of Dermatological Science* 55:161–9.
- Dillehay TD, Ramírez C, Pino M, et al. (2008) Monte Verde: seaweed, food, medicine, and the peopling of South America. *Science* 320:784–786.
- Dinis TCP, Madeira V, Almeida M (1994) Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 315:161–169.
- FAO (2003) *Food energy – methods of analysis and conversion factors*. Fao Food and Nutrition Paper 77. Disponível em:
<<http://www.fao.org/docrep/006/y5022e/y5022e00.htm#Contents%5Cnftp://ftp.fao.org/docrep/fao/006/y5022e/y5022e00.pdf>>
- FAO (2016) *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016: Contributing to food security and nutrition for all*. Food and Agriculture organization of the United Nations, Rome. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i3720e.pdf>>

- Fernandes SCM, Alonso-Varona A, Palomares T, et al. (2015) Exploiting mycosporines as natural molecular sunscreens for the fabrication of UV-absorbing green materials. *ACS Applied Materials & Interfaces* 7:16558–64.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 226:497–507.
- Gillespie KM, Chae JM, Ainsworth E a (2007) Rapid measurement of total antioxidant capacity in plants. *Nature Protocols* 2:867–870.
- Gressler V, Yokoya NNS, Fujii MTM, et al. (2010) Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. *Food Chemistry* 120:585–590.
- Guimarães M, Viana AG, Rabello Duarte ME, et al. (2007) Low-molecular-mass carbohydrates and soluble polysaccharides of green and red morphs of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *Botanica Marina* 50:314–317.
- Gülçin İİ (2012) Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology* 86:345–391.
- Hamed I, Özogul F, Özogul Y, Regenstein JM (2015) Marine bioactive compounds and their health benefits: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14:446–465.
- Harb TB, Torres PB, Pires JS, et al. (2016) Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do sistema quelante de metais para extratos de algas. *Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo*, pp. 1–5. Disponível em:
<http://www2.ib.usp.br/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=67&Itemid=98>
- Hartmann A, Becker K, Karsten U, et al. (2015) Analysis of mycosporine-like amino acids in selected algae and cyanobacteria by hydrophilic interaction liquid chromatography and a novel MAA from the red alga *Catenella repens*. *Marine Drugs* 13:6291–6305.
- Holdt SL, Kraan S (2011) Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology* 23:543–597.
- Huang D, Ou B, Prior R, Rior ROLP (2005) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1841–1856.
- Jiang W, Fu Y, Yang F, et al. (2014) *Gracilaria lemaneiformis* polysaccharide as integrin-targeting surface decorator of selenium nanoparticles to achieve enhanced anticancer efficacy. *ACS Applied Materials and Interfaces* 6:13738–13748.
- Kailas AP, Nair SM (2015) Comparison of nutrient compositions and calorific values of eight tropical seaweeds. *Phykos* 45:62–74.
- Li S, Xiong Q, Lai X, et al. (2015) Molecular modification of polysaccharides and resulting bioactivities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15:237–250.
- MacArtain P, Gill CIR, Brooks M, et al. (2007) Nutritional value of edible seaweeds. *Nutrition Reviews* 65:535–543.

- Maciel J, Chaves L, Souza B, et al. (2008) Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Carbohydrate Polymers* 71:559–565.
- Marinho-Soriano E (2016) Historical context of commercial exploitation of seaweeds in Brazil. *Journal of Applied Phycology*.
- Marinho-Soriano E, Fonseca PC, Carneiro MAA, Moreira WSC (2006) Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresource Technology* 97:2402–2406.
- Marques LG (2015) *Aminoácidos tipo micosporina: novas metodologias e distribuição em macroalgas da costa brasileira*. Universidade de São Paulo: Tese (Doutorado em Bioquímica). 164p.
- Mazumder S, Ghosal PK, Pujol CA, et al. (2002) Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *International Journal of Biological Macromolecules* 31:87–95.
- McDermid KJ, Stuercke B (2003) Nutritional composition of edible Hawaiian seaweeds. *Journal of Applied Phycology* 15:513–524.
- Mehta GK, Meena R, Prasad K, et al. (2010) Preparation of galactans from *Gracilaria debilis* and *Gracilaria salicornia* (Gracilariales, Rhodophyta) of Indian waters. *Journal of Applied Phycology* 22:623–627.
- Melo MRS, Feitosa JPA, Freitas ALP, De Paula RCM (2002) Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Carbohydrate Polymers* 49:491–498.
- Meyer BN, Ferrigni NAR, Putnam JE, et al. (1982) Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45:31–34.
- Mwalugha HM, Wakibia JG, Kenji GM, Mwasaru MA (2015) Chemical composition of common seaweeds from the Kenya Coast. *Journal of Food Research* 4:28-38.
- Navarro NP (2015) Sunscreens of red algae from Patagonia: a biotechnological perspective. *Pure and Applied Chemistry* 87:953–960.
- NEPA - Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (2011) *Tabela brasileira de composição de alimentos*, 4ª edição. Campinas. Disponível em: <<http://www.unicamp.br/nepa/taco/>>.
- Norziah MH, Ching CY (2000) Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria Changgi*. *Food Chemistry* 68:69–76.
- Novaes P, Torres PB, dos Santos DYAC (2016) Biological activities of Annonaceae species extracts from Cerrado. *Brazilian Journal of Botany* 39:131–137.
- Ortiz J, Uquiche E, Robert P, et al. (2009) Functional and nutritional value of the Chilean seaweeds *Codium fragile*, *Gracilaria chilensis* and *Macrocystis pyrifera*. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111:320–327.

- Parra AL, Silva Yhebra R, Guerra Sardiñas I, Iglesias Buela L (2001) Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* 8:395–400.
- Pellegrini N, Serafini M, Salvatore S, et al. (2006) Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Molecular Nutrition and Food Research* 50:1030–1038.
- Ponte AP da, Portela L da P, Silva ED da, et al. (2010) Análise sensorial de doce de coco enriquecido com fibras de alga marinha cultivada (*Gracilaria birdiae*). In: *V Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica*.
- Prior RL, Wu X, Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:4290–4302.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26:1231–1237.
- Rebouças RF da C (2013) *Estudo do teor de lipídios e avaliação dos resíduos das algas marinhas: Gracilaria caudata, Gracilaria birdiae, Gracilaria domingensis para preparação de biodiesel e biofertilizante*. Universidade do Estado do Rio Grande do Norte: Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais). 79p.
- Renaud SM, Luong-Van JT (2006) Seasonal variation in the chemical composition of tropical Australian marine macroalgae. *Journal of Applied Phycology* 18:381–387.
- Robledo D, Freile-Pelegrín Y (1997) Chemical and mineral composition of six potentially edible seaweed species of Yucatán. *Botanica Marina* 40:301–306.
- Rohani-Ghadikolaei K, Abdulalian E, Ng WK (2012) Evaluation of the proximate, fatty acid and mineral composition of representative green, brown and red seaweeds from the Persian Gulf of Iran as potential food and feed resources. *Journal of Food Science and Technology* 49:774–780.
- Saeidnia S, Perme P, Gohari AR, Mashinchian-Moradi A (2012) *Gracilaria persica* from Persian Gulf contains bioactive sterols. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 11:845–9.
- Sakthivel R, Muniasamy S, Archunan G, Devi KP (2016) *Gracilaria edulis* exhibit antiproliferative activity against human lung adenocarcinoma cell line A549 without causing adverse toxic effect in vitro and in vivo. *Food Function* 7:1155–1165
- Santelices B (2014) Cultured aquatic species information programme: *Gracilaria* spp. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department*. Disponível em: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Gracilaria_spp/en
- Santos SAO, Vilela C, Freire CSR, et al. (2015) Chlorophyta and Rhodophyta macroalgae: A source of health promoting phytochemicals. *Food Chemistry* 183:122–128.

- Sardinha AN, Canella DS, Martins APB, et al. (2014) Dietary sources of fiber intake in Brazil. *Appetite* 79:134–138.
- Seeram NP, Aviram M, Zhang Y, et al. (2008) Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the united. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:1415–1422.
- Setthamongkol P, Tunkijjanukij S, Satapornvanit K, Salaenoi J (2015) Growth and nutrients analysis in marine macroalgae. *Kasetsart Journal - Natural Science* 49:211–218.
- Sheeja L, Lakshmi D, Bharadwaj S, Parveen KS (2016) Anticancer activity of phytol purified from *Gracilaria edulis* against human breast cancer cell line (MCF-7). *International Journal of Current Science* 19:36–46.
- Solis PN, Wright CW, Anderson MM, et al. (1993) A Microwell Cytotoxicity Assay using *Artemia salina* (Brine Shrimp). *Planta Medica* 59:250–252.
- Souza BWS, Cerqueira MA, Bourbon AI, et al. (2012) Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Food Hydrocolloids* 27:287–292.
- Stewart OJ, Raghavan GS V, Orsat V, Golden KD (2003) The effect of drying on unsaturated fatty acids and trypsin inhibitor activity in soybean. *Process Biochemistry* 39:483–489.
- Sudharsan S, Subhapradha N, Seedeve P, et al. (2015) Antioxidant and anticoagulant activity of sulfated polysaccharide from *Gracilaria debilis* (Forsskal). *International Journal of Biological Macromolecules* 81:1031–1038.
- Tabarsa M, Rezaei M, Ramezanpour Z, Waaland JR (2012) Chemical compositions of the marine algae *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta) as a potential food source. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92:2500–2506.
- Torres A, Hochberg M, Pergament I, et al. (2004) A new UV-B absorbing mycosporine with photo protective activity from the lichenized ascomycete *Collema cristatum*. *European Journal of Biochemistry* 271:780–784.
- Urrea-Victoria V, Pires J, Torres PB, et al. (2016) Ensaio antioxidante em microplaca do Poder de Redução do Ferro (FRAP) para extratos de algas. *Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo*, pp. 1–6. Disponível m: <http://www2.ib.usp.br/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=66&Itemid=98>
- Waterman PG, Mole S (1994) Extraction and chemical quantification. In: *Analysis of phenolic plant metabolites*, 1st ed. Wiley-Blackwell, pp 333–360.
- Wells ML, Potin P, Craigie JS, et al. (2016) Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of Applied Phycology*.
- Wu X, Beecher GR, Holden JM, et al. (2004) Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:4026–37.

- Wycken S Van, Laurens LML (2013) Determination of total solids and ash in algal biomass. *National Renewable Energy Laboratory (NREL)* 303:275–3000.
- Xu T, Sutour S, Casabianca H, et al. (2015) Rapid Screening of Chemical Compositions of *Gracilaria dura* and *Hypnea muciformis* (Rhodophyta) from Corsican Lagoon. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients* 2:8–8.
- Yoshimura CY (2006) *Avaliação do potencial de cultivo e produção de ágar de Gracilaria domingensis e de Gracilaria caudata (Rhodophyta, Gracilariales) na Enseada de Armação do Itapocoroy*. Universidade de São Paulo: Tese (Doutorado em Ciências). 163p.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

O objetivo geral deste estudo foi investigar os componentes químicos majoritários e avaliar o potencial biológico de macroalgas vermelhas nativas do gênero *Gracilaria*. Através do levantamento bibliográfico ficou evidente uma lacuna de conhecimento relacionada a estudos fitoquímicos com essas espécies. Neste projeto, optou-se por estudar algas de importância econômica já exploradas de forma extrativista ou cultivadas artesanalmente no litoral do nordeste brasileiro. Assim, foram avaliadas principalmente duas espécies, *Gracilaria caudata* J. Agardh e *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie, além de amostras distintamente processadas de *Gracilaria birdiae* E. M. Plastino & E. C. Oliveira. Os resultados obtidos foram expostos em 6 capítulos, porém os principais resultados serão aqui destacados e conectados.

No capítulo I foi exposto um dos principais problemas enfrentados com os extratos metanólicos e hidrometanólicos 80% que foi o excesso de sal. Estes sais podem prejudicar as análises dos constituintes de interesse e a realização de bioensaios. O ensaio preliminar para estabelecimento e padronização dos protocolos de extração foi essencial para as análises apresentadas nos capítulos seguintes. Foram desenvolvidas metodologias de precipitação e quantificação de sais que permitiram o uso dos extratos praticamente livres dessas substâncias, possibilitando as identificações dos constituintes majoritários (capítulo II) e a realização dos bioensaios (capítulo III, IV e V) sem interferentes.

A composição química das algas avaliadas, *G. caudata* e *G. domingensis* (capítulo II) e *G. birdiae* (capítulo VI) foram bem similares, sendo para esta última espécie um pouco menos diversa que as outras duas. De maneira geral, os extratos apolares (hexânico e diclorometânico) foram ricos em ácidos graxos, colesterol e *n*-heptadecano, enquanto os extratos mais polares (metanólicos e hidrometanólicos 80%) foram ricos em ácido isetiônico, aminoácidos, aminoácidos tipo micosporina, heterosídeos e monossacarídeos. O ácido isetiônico, um dos componentes majoritários nos extratos polares de *G. caudata* e *G. domingensis*, não foi detectado em *G. birdiae*. Cabe ressaltar, porém, que Ascencio (2006) detectaram esse ácido nessa espécie de *Gracilaria*.

Outros metabólitos identificados, como substâncias fenólicas, alcaloides e terpenoides apareceram em quantidades inferiores a 1%. Não foram encontradas substâncias halogenadas

comuns em espécies de Rhodophyta, como nas algas do complexo *Laurencia*. Assim, os resultados encontrados para as três algas estudadas, juntamente com trabalhos de caracterização química em *Gracilaria*, por exemplo Santos et al. (2015) com *Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss, reforçam a ideia que as algas desse gênero apresentam uma composição química bem distinta entre as rodófitas, reforçando a importância de seus estudos.

Os resultados do isolamento biomonitorado associados aos resultados de composição química (capítulo II e III) permitiram perceber que para as duas algas, *G. caudata* e *G. domingensis*, os extratos mais apolares foram bem ativos. Quando os extratos polares foram ativos, após suas partições percebeu-se que a atividade biológica estava na fase de partição apolar. Esses achados sugerem que substâncias de polaridade baixa e/ou intermediárias são as principais responsáveis pelas atividades dos extratos dessas espécies.

A adoção da estratégia de isolamento biomonitorado de substâncias potencialmente ativas permitiu chegar em alguns resultados promissores: (i) duas substâncias ativas, ainda não identificadas, foram obtidas dos extratos mais apolares de *G. caudata* com resultados muito bons no ensaio com as artêmias (capítulo III), (ii) o ácido palmítico, ácido graxo majoritário dos extratos apolares de *G. caudata* e *G. domingensis*, merece destaque como um dos responsáveis pelo estímulo do crescimento, *in vitro*, da raiz em plântulas de alface (capítulo IV) (iii) duas outras substâncias, colesterol e outra não identificada, presentes em *G. domingensis* (capítulo III) se destacaram com base nos resultados dos ensaios de atividades antioxidantes *in vitro*.

Ao mesmo tempo que os resultados mencionados acima são promissores, eles nos colocam de frente com um imenso desafio. Durante os capítulos foi demonstrado o quanto os rendimentos desses extratos apolares e/ou fases de partição apolares provenientes dos extratos metanólicos e hidrometanólicos 80% foram baixos em relação a massa seca das matérias primas utilizadas. Essa dificuldade foi evidenciada no texto diversas vezes em que os procedimentos de isolamento não puderam ter continuidade. Essa baixa disponibilidade de material também dificultou a identificação daquelas substâncias.

Por outro lado, o alto rendimento dos extratos aquosos permitiu que seus componentes, os polissacarídeos sulfatados, fossem bem investigados tanto quimicamente, como em relação às suas potenciais atividades biológicas. Os polissacarídeos sulfatados foram as substâncias majoritárias dos extratos aquosos e apresentaram atividades promissoras como bioestimulantes do desenvolvimento foliar e de raiz de alface (*G. caudata* e *G. domingensis* – capítulo IV), além de serem considerados ativos no ensaio de inibição da atividade da enzima transcriptase reversa do HIV do tipo I (*G. domingensis* – capítulo III). A maior atividade dos polissacarídeos de *G.*

domingensis em relação aos de *G. caudata* pode, provavelmente, ser atribuída ao maior grau de sulfatação dos primeiros. Boas atividades anticoagulantes e antivirais (Jiao et al. 2011) parecem ser altamente correlacionadas com o nível de sulfatação dos polissacarídeos.

Os extratos aquosos, quando comparados aos extratos originados por solventes orgânicos, foram relativamente mais simples de se trabalhar, pois apresentaram altos rendimentos, baixos teores de sais e composição química simples. Essas características, associadas às promissoras atividades biológicas, ajudam a entender o porquê que os polissacarídeos são os metabólitos mais estudados em *Gracilaria* (Introdução geral), sem contar sua principal importância que é o ágar.

Além disso, como visto no capítulo VI, estes mesmos polissacarídeos sulfatados são os responsáveis pela principal qualidade de *Gracilaria* do ponto de vista nutricional, fazendo dessas algas um bom suplemento alimentar fornecedor de fibras dietéticas.

O isolamento biomonitorado, como dito anteriormente, foi uma técnica bastante útil neste trabalho, permitindo compreender em maior detalhe as respostas dos bioensaios e isolar, quando possível, as possíveis substâncias ativas. No entanto, como os extratos polares não se destacaram nos ensaios utilizados, não teria sido possível chegar ao isolamento dos aminoácidos do tipo micosporinas (MAAs), que quando isolados foram considerados ativos em alguns ensaios, se o interesse por essas substâncias não tivesse sido despertado em trabalhos anteriores e pela literatura.

Em *G. caudata* e *G. domingensis* foram detectados cinco MAAs, comuns em Rhodophyta (Marques, 2015), já *G. birdiae* foi menos diversa (capítulo VI). Estes metabólitos, principalmente a palitina, foram ativos no ensaio de inibição da atividade da enzima transcriptase reversa do HIV do tipo I (capítulo III) e apresentaram resultados similares aos padrões sintéticos Trolox e BHT frente ao ensaio antioxidante do reagente Folin Ciocalteu (capítulo V). No entanto, de maneira geral, diferente do que vem sendo sugerido na literatura (Wada et al. 2015), esses MAAs não se destacaram como potentes antioxidantes.

Apesar dos resultados promissores obtidos neste trabalho e do crescente interesse pelos MAAs na literatura, o estudo dessas substâncias não foi simples devido à complexidade para seu isolamento. Além de estarem presentes em quantidades relativamente baixas (capítulos III e VI), estas substâncias apresentam grande similaridade química e altos coeficientes de extinção que podem conduzir a falsos compostos puros. Mesmo com os vários métodos descritos na literatura que utilizam colunas de fase reversa (Carreto et al. 2005), o isolamento dessas substâncias só foi possível empregando uma coluna de fase normal (Zorbax-RX-SIL).

Assim, os principais objetivos propostos neste projeto foram alcançados. Foi possível fazer a caracterização química das principais espécies de *Gracilaria* de importância econômica do nordeste brasileiro, para as quais ainda não haviam estudos abrangentes sobre a fitoquímica. Foi feita a avaliação quanto ao potencial biológico dos extratos dessas espécies empregando bioensaios distintos e relativamente fáceis de serem usados como guias para isolamento de substâncias bioativas. Além disso, foi possível avaliar o potencial nutricional, incluindo uma amostra já comercializada, sugerindo outras aplicações para essas espécies.

Em resumo, as principais conclusões deste projeto foram as seguintes:

- As espécies de *Gracilaria* avaliadas apresentaram como metabólitos característicos ácidos graxos livres (ácido mirístico e ácido hexadecanóico), colesterol, heterosídeos, MAAs e polissacarídeos sulfatados.
- O extrato aquoso, rico em polissacarídeos sulfatados, de *G. domingensis* e o MAA palitina inibiram a atividade da enzima transcriptase reversa do HIV-1.
- Boa atividade quelante de íon ferroso foi verificada para os extratos mais apolares, principalmente o extrato hexânico, de *G. domingensis*.
- Os melhores potenciais antioxidantes foram observados para as fases de partição apolares dos extratos hidrometanólicos 80% de *G. caudata* e *G. domingensis*.
- Colesterol e uma substância ainda não identificada foram isolados de *G. domingensis* de maneira guiada pelas atividades antioxidantes.
- Os MAAs apresentaram capacidades antioxidantes semelhantes aos padrões comerciais BHT e Trolox no ensaio do reagente Folin-Ciocalteu. No entanto, não foram ativos principalmente, frente ao ensaio do radical DPPH, ensaio do quelante do íon ferroso e do ensaio do reagente FRAP.
- As capacidades antioxidantes de porphyrina 334 e chinorina são maiores com o aumento do pH nos ensaios que envolvem reações de transferências de elétrons, como ensaios com reagente de Folin-Ciocalteu e do radical ABTS⁺.
- Os extratos diclorometânico e aquoso de *G. domingensis* e os extratos hexânico, metanólico, hidrometanólico 80% e aquoso de *G. caudata* estimularam o crescimento, *in vitro*, da raiz de plântulas de alface.
- O ácido palmítico e os polissacarídeos sulfatados provavelmente contribuem com a atividade bioestimulante dos extratos de *G. domingensis* e *G. caudata*.

- Os extratos hexânico e diclorometânico de *G. caudata* foram considerados tóxicos frente as artêmias. Foi possível isolar duas substâncias destes extratos ativos que ainda não foram identificadas.

- As algas secas *G. caudata*, *G. domingensis*, além das duas amostras de *G. birdiae* (alga seca e comercializadas) apresentaram um bom potencial uso como fonte de fibras dietéticas suplementar nas dietas dos brasileiros.

- O processamento feito na produção da amostra comercializada de *G. birdiae* levou a perdas significativas de algumas substâncias como MAAs que podem comprometer o aproveitamento da amostra para outros fins, como, produção de cosméticos ou como protetores solares.

- Os ensaios biológicos indicaram que os extratos das amostras de *G. birdiae*, tanto a alga seca como a alga comercializada, são promissores na busca por substâncias com potencial antitumoral ou fitotóxico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ascencio SD (2006) *Heterosídeos sintetizados por linhagens de cor e estádios reprodutivos de macroalgas vermelhas dos gêneros Hypnea e Gracilaria*. Universidade Federal do Paraná: Tese (Doutorado em Bioquímica). 135p.
- Carreto JJ, Carignan MO, Montoya NG (2005) A high-resolution reverse-phase liquid chromatography method for the analysis of mycosporine-like amino acids (MAAs) in marine organisms. *Marine Biology* 146:237–252.
- Jiao G, Yu G, Zhang J, Ewart HS (2011) Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine drugs* 9:196–223.
- Marques LG (2015) *Aminoácidos tipo micosporina: novas metodologias e distribuição em macroalgas da costa brasileira*. Universidade de São Paulo: Tese (Doutorado em Bioquímica). 164p.
- Santos SAO, Vilela C, Freire CSR, et al (2015) Chlorophyta and Rhodophyta macroalgae: A source of health promoting phytochemicals. *Food Chemistry* 183:122–128.
- Wada N, Sakamoto T, Matsugo S (2015) Mycosporine-like amino acids and their derivatives as natural antioxidants. *Antioxidants* 4:603–646.

RESUMO GERAL

Muitas espécies de *Gracilaria* são de importância econômica devido à exploração do ágar e, em menor escala, por serem consumidas diretamente na alimentação. Recentemente pesquisas têm mostrado um bom potencial biológico dessas espécies, porém com pouca investigação relacionada a identificação das substâncias bioativas. Sob esta perspectiva, o objetivo geral deste estudo foi investigar os componentes químicos majoritários e avaliar o potencial biológico e nutricional de três espécies nativas obtidas no litoral do nordeste brasileiro: *Gracilaria birdiae* E. M. Plastino & E. C. Oliveira *Gracilaria caudata* J. Agardh e *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie.

A análise da composição química levou a identificação de cerca de 50 substâncias distribuídas em alcanos, ácidos graxos livres, monossacarídeos, ácidos sulfônicos, aminoácidos livres, esteróis, heterosídeos, lipídios polares, monoacilgliceróis, polissacarídeos sulfatados, aminoácidos do tipo micosporinas e sais halogenados. Ésteres de ácidos graxos, ácidos carboxílicos aromáticos, fitol e o derivado fitona, diidroactinidiolideo também foram detectados em pequenas quantidades. *Gracilaria caudata* e *G. domingensis* foram muito semelhantes quimicamente. Já *G. birdiae* foi menos diversa, compartilhando, porém, muitas das substâncias majoritárias. Os resultados desse trabalho sugerem grande diversidade química para espécies de *Gracilaria*, ampliando o conhecimento disponível para Rhodophyta.

Atividades biológicas promissoras foram detectadas para diversos ensaios. O extrato hexânico de *G. caudata* foi ativo frente as artêmias, com o isolamento biomonitorado de duas possíveis substâncias bioativas. O isolamento biomonitorado guiado pela atividade bioestimulante *in vitro* de plântulas de *Lactuca sativa* L. (alface) resultou no ácido palmítico como sendo responsável pelo aumento em 83% do crescimento de raiz. Os polissacarídeos sulfatados presentes nos extratos aquosos de *G. caudata* e *G. domingensis* foram bioestimulantes de raiz e folha de alface. Além disso, esses polissacarídeos de *G. domingensis* inibiu a atividade da enzima transcriptase reversa do HIV-1. Para *G. birdiae* vários extratos se mostraram com potenciais citotóxico e fitotóxico.

Os aminoácidos tipo micosporinas (asterina 330, chinorina, palitina, palitinol e porphyra 334), por serem substâncias comuns em algas vermelhas, foram isolados e avaliados quanto ao potencial biológico. A palitina inibiu a atividade da enzima transcriptase reversa do HIV-1,

enquanto porphyra 334, chinorina e também palitina apresentaram boa atividade antioxidante com o ensaio do reagente Folin-Ciocalteu. Quanto ao aspecto nutricional, os resultados indicaram que as três algas avaliadas, principalmente *G. birdiae*, foram ricas em fibras dietéticas e sais minerais, formando um grupo alimentar único bem diferente dos alimentos tradicionais na mesa dos brasileiros. Em resumo, os resultados obtidos para as espécies de *Gracilaria* avaliadas reforçaram a ideia de ampla diversidade química para as rodófitas, mostraram resultados promissores em diferentes ensaios, além de apontarem um potencial uso como fonte suplementar nas dietas dos brasileiros.

GENERAL ABSTRACT

Many *Gracilaria* species are economically important due to the exploitation of agar and, to a lesser extent, because they are consumed directly in the food. Recent studies have shown a good biological potential of these species, but with few studies aimed at the identification of bioactive substances. From this perspective, the general objective of this study was to investigate the major chemical components and to evaluate the biological and nutritional potential of three native species obtained in the northeast Brazilian coast: *Gracilaria birdiae* E. M. Plastino & E. C. Oliveira *Gracilaria caudata* J. Agardh and *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie.

The chemical composition analysis resulted in the identification of about 50 metabolites distributed as alkanes, free fatty acids, monosaccharides, sulfonic acids, free amino acids, sterols, heterosides, polar lipids, monoacylglycerols, sulfated polysaccharides, mycosporine-like amino acids and halogenated salts. Esters of fatty acids, aromatic carboxylic acids, phytol and the phytone derivative, dihydroactinidiolide were also detected in small amounts. *G. caudata* and *G. domingensis* were chemically similar. On the other hand *G. birdiae* was less diverse, sharing, however, many of the major metabolites. The results of this work suggest a great chemical diversity for *Gracilaria* species, increasing the knowledge available for Rhodophyta.

Promising biological activities were detected for several assays. The hexane extract of *G. caudata* was active in brine shrimp lethality assay, with the biomonitoring isolation of two possible bioactive substances. The biomonitoring isolation guided by *in vitro* biostimulant activity of young *Lactuca sativa* L. (lettuce) seedlings resulted in palmitic acid as responsible for 83% increase in root growth. The sulfated polysaccharides present in the aqueous extracts of *G. caudata* and *G. domingensis* were biostimulant of root and lettuce leaf. In addition, these polysaccharides from *G. domingensis* inhibited the activity of the HIV-1 reverse transcriptase enzyme. For *G. birdiae* several extracts showed cytotoxic and phytotoxic potentials.

Mycosporine-like amino acids (asterina 330, shinorine, palythine, palythinol and porphyra 334), known as common red algae substances, were isolated and evaluated for biological potential. Palythine inhibited the activity of the HIV-1 reverse transcriptase enzyme, while porphyra 334, shinorine and palythine showed good antioxidant activity using the Folin-

Ciocalteu reagent assay. Regarding the nutritional aspect, the results indicated that from the three algae evaluated, highlighting *G. birdiae*, all were rich in dietary fibers and minerals, forming a unique food that is very different from the traditional Brazilian food. In summary, the results obtained for the *Gracilaria* species studied reinforced the idea of a wide chemical diversity for red algae, showing promising results in different bioassays, besides indicating a potential use as a supplementary food source in Brazilian diets.

APÊNDICE I

Referências bibliográficas referentes ao levantamento bibliográfico sobre o potencial biológico de *Gracilaria* Greville entre 1980 a 2016.

1. Abdalla EO, Shigidi MTA, Elsubki HK, Osman NAR (2016) Antimicrobial activity of methanolic extracts of selected marine macroalgae against some pathogenic microorganisms. *Journal of Coastal Life Medicine* 4:364–367.
2. Abdullah NNS, Muhamad S, Omar ICI, Abdullah H (2012) Radical scavenging activity and total phenolic content of *Gracilaria manilaensis* extracts. *Technology, Science, Social Sciences and Humanities International Conference* 1–7.
3. Abdullah N, Muhamad S, Omar I, Abdullah H (2013) Determination of antioxidant and cytotoxic activities of red seaweed, (*Gracilaria manilaensis*) against different cancer cell lines. *Journal of Food Science and Engineering* 3:616–624.
4. Abirami RG, Kowsalya S (2016) Quantification and correlation study on derived phenols and antioxidant activity of seaweeds from Gulf of Mannar. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 1–9.
5. Abirami RG, Kowsalya S (2011) Phytochemical screening, microbial load and antimicrobial activity of underexploited seaweeds. *International Research Journal of Microbiology* 3:328–332.
6. Adaikalaraj G, Patric RD, Johnson M, et al (2012) Antibacterial potential of selected red seaweeds from Manapad coastal areas, Thoothukudi, Tamil Nadu, India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2:S1077–S1080.
7. Afsharnasab M, Kakoolaki S, Mohammadidost M (2016) Immunity enhancement with administration of *Gracilaria corticata* and *Saccharomyces cerevisiae* compared to gamma irradiation in expose to WSSV in shrimp, in juvenile *Litopenaeus vannamei*: A comparative study. *Fish & Shellfish Immunology* 56:21–33.
8. Ahmad R, Yu K, Wong C, Jantan I (2016) Larvicidal and adulticidal activities of malaysian seaweeds against *Aedes aegypti* (L.) And *Aedes albopictus* skuse (Diptera: Culicidae). *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 47:719–730.
9. Ahn MJM, Yoon KKD, Kim CCY, et al (2002) Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 integrase and antiviral activity of Korean seaweed extracts. *Journal of Applied Phycology* 14:325–329.
10. Ainouz IL, Sampaio AH (1991) Screening of Brazilian marine algae for hemagglutinins. *Botanica Marina* 34:211–214.
11. Alam JM, Qasim R (1994) Toxic effects of dietary seaweeds *Sargassum bovinum*, *Caulerpa faridii* and *Gracilaria corticata* on blood parameters of albino rats. *Pakistan Journal of Marine Sciences* 3:101–105.
12. Alam MT, Usmanghani K (1994) Studies on marine algae for haemagglutinin activity. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 7:1–15.
13. AL-Haj N, Mashan N (2009) Antibacterial Effect of *Gracilaria changii* and *Euchema denticulatum* on molecular properties of *Staphylococcus aureus* genes mecA, mecR1 and mecI. *Research Journal of Biological Sciences* 4:580–584.
14. AL-Haj NA, Mashan NI, Shamsudin MN, et al (2010) Antibacterial activity of marine source extracts against multidrug resistance organisms. *American Journal of Pharmacology and Toxicology* 5:95–102.
15. Ali MYS, Ravikumar S, Beula JM (2013) Mosquito larvicidal activity of seaweeds extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 3:196–201.
16. Allmendinger A, Spavieri J, Kaiser M, et al (2010) Antiprotozoal, antimycobacterial and cytotoxic potential of twenty-three British and Irish red algae. *Phytotherapy Research* 24:1099–103.
17. Al-saif SSA, Abdel-raouf N, Aref IA (2014) Antibacterial substances from marine algae isolated from Jeddah coast of Red Sea, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences* 21:57–64.

18. Al-zahrani A, Al-haj N, Omer H, Al-judaibi A (2014) Impact of extracts of marine macroalgae on multidrug-resistant bacteria. *Journal of Microbiology Research* 4:18–24.
19. Amorim R das N dos S, Rodrigues JAG, Holanda ML, et al (2012) Antimicrobial effect of a crude sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria ornata*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 55:171–181.
20. Anandhan S, Sornakumari H (2011) Biorestraining potentials of marine macroalgae collected from Rameshwaram, Tamil nadu. *Journal of Research in Biology* 1:385–392.
21. Arisawa M, Hayashi K, Nikaido T, et al (1997) Screening of some marine organism extracts for cAMP phosphodiesterase inhibition, cytotoxicity, and antiviral activity against HSV-1. *International Journal of Pharmacognosy* 35:6–11.
22. Arun KK, Rengasamy R (2000) Antibacterial activities of seaweed extracts/fractions obtained through a TLC profile against the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Botanica Marina* 43:417–422.
23. Aruna P, Mansuya P, Sridhar S, Kumar JS (2010) Pharmacognostical and antifungal activity of selected seaweeds from Gulf of Mannar region. *Journal of Phytology Pharmacology* 2:55–60.
24. Balasubramanian G, Sudhakaran R, Syed Musthaq S, et al (2006) Studies on the inactivation of white spot syndrome virus of shrimp by physical and chemical treatments, and seaweed extracts tested in marine and freshwater animal models. *Journal of Fish Diseases* 29:569–572.
25. Ballantine DL, Gerwick WH, Velez SM, et al (1987) Antibiotic activity of lipid-soluble extracts from Caribbean marine algae. *Hydrobiologia* 151–152:463–469.
26. Bandara BMR, Gunatilaka AAL, Gunatilaka AAL, N, Kumar NS, Wimalasiri WR, Adikaram NKB, Balasubramaniam S (1988) Antimicrobial activity of some marine algae of Sri Lanka. *Journal of National Science Council of Sri Lanka* 16:209–221.
27. Bansemir A, Blume M, Schröder S, Lindequist U (2006) Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture* 252:79–84.
28. Bianco EM, Pires L, Santos GKN, et al (2013) Larvicidal activity of seaweeds from northeastern Brazil and of a halogenated sesquiterpene against the dengue mosquito (*Aedes aegypti*). *Industrial Crops and Products* 43:270–275.
29. Bianco EM, de Oliveira SQ, Rigotto C, et al (2013) Anti-infective potential of marine invertebrates and seaweeds from the Brazilian coast. *Molecules* 18:5761–78.
30. Bianco ÉM, Krug JL, Zimath PL, et al (2015) Antimicrobial (including antimollicutes), antioxidant and anticholinesterase activities of Brazilian and Spanish marine organisms - evaluation of extracts and pure compounds. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 25:668–676.
31. Bird KT, Chiles TC, Longley RE, et al (1993) Agglutinins from marine macroalgae of the southeastern United States. *Journal of Applied Phycology* 5:213–218.
32. Biswajit P, Koushik B, Arup G, et al (2013) Effect of seaweed saps on growth and yield improvement of green gram. *African Journal of Agricultural Research* 8:1180–1186.
33. Bitou N, Ninomiya M, Tsujita T, Okuda H (1999) Screening of lipase inhibitors from marine algae. *Lipids* 34:441–445.
34. Bobadilla F, Rodriguez-Tirado C, Imarai M, et al (2013) Soluble β -1,3/1,6-glucan in seaweed from the southern hemisphere and its immunomodulatory effect. *Carbohydrate Polymers* 92:241–248.
35. Boergs FF, Chitra G, *Gracilaria* K (2016) Bioactive Potentials of Red Seaweeds, *Gracilaria Corticata* J. Ag., and *Gracilaria Follifera* (Forssk.) Boergs. *International Journal of Scientific Research* 632–636.
36. Boonsri N, Rudtanatip T, Withyachumnarnkul B, Wongprasert K (2016) Protein extract from red seaweed *Gracilaria fisheri* prevents acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) infection in shrimp. *Journal of Applied Phycology*.
37. Boudier A, Tournebize J, Bartosz G, et al (2012) High-performance liquid chromatographic method to evaluate the hydrogen atom transfer during reaction between 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical and antioxidants. *Analytica Chimica Acta* 711:97–106.

38. Brito T V., Neto JPRP, Prudêncio RS, et al (2014) Sulfated-polysaccharide fraction extracted from red algae *Gracilaria birdiae* ameliorates trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 66:1161–1170.
39. Cabrita ARJ, Correia A, Rodrigues AR, et al (2016) Assessing in vivo digestibility and effects on immune system of sheep fed alfalfa hay supplemented with a fixed amount of *Ulva rigida* and *Gracilaria vermiculophylla*. *Journal of Applied Phycology*.
40. Çadirci BH, Ünal D, Sukatar A (2006) Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the Coast of Urla (Izmir, Turkey). *Turkish Journal of Biology* 30:171–175.
41. Campos-Takaki GM de, Diu MBS, Pereira EC, Koenig ML (1988) Screening of marine algae from Brazilian northeastern coast for antimicrobial activity. *Botanica Marina* 31:375–378.
42. Cavallo RA, Acquaviva MI, Stabili L, et al (2013) Antibacterial activity of marine macroalgae against fish pathogenic *Vibrio* species. *Central European Journal of Biology* 8:646–653.
43. Cells RAW, Jung JH, Kang HK, et al (2009) Two enone fatty acids isolated from *Gracilaria verrucosa* suppress the production of inflammatory mediators by down-regulating NF- κ B and STAT1 activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Archives of Pharmacal Research* 32:453–462.
44. Cha SH, Lee KW, Jeon YJ (2006) Screening of extracts from red algae in Jeju for potentials marine angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Algae* 21:343–348.
45. Cha SH, Ko SC, Kim D, Jeon YJ (2011) Screening of marine algae for potential tyrosinase inhibitor: those inhibitors reduced tyrosinase activity and melanin synthesis in zebrafish. *The Journal of Dermatology* 38:354–363.
46. Chakraborty S, Ghosh U, Balasubramanian T, Das P (2014) Screening, isolation and optimization of anti-white spot syndrome virus drug derived from marine plants. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* 4:S107–S117.
47. Chan PT, Matanjun P, Yasir SM, Tan TS (2016) Oxidative stress biomarkers in organs of hyperlipidaemic and normal rats fed tropical red seaweed, *Gracilaria changii*. *Journal of Applied Phycology* 28:1371–1378.
48. Chan PT, Matanjun P, Yasir SM, Tan TS (2014) Antioxidant and hypolipidaemic properties of red seaweed, *Gracilaria changii*. *Journal of Applied Phycology* 26:987–997.
49. Chan PT, Matanjun P, Yasir SM, Tan TS (2015) Antioxidant activities and polyphenolics of various solvent extracts of red seaweed, *Gracilaria changii*. *Journal of Applied Phycology* 27:2377–2386.
50. Chan PT, Matanjun P, Yasir SM, Tan TS (2015) Histopathological studies on liver, kidney and heart of normal and dietary induced hyperlipidaemic rats fed with tropical red seaweed *Gracilaria changii*. *Journal of Functional Foods* 17:202–213.
51. Chander MP, Vijayachari P (2016) *In vitro* antibacterial and anti-oxidant potentials of selected seaweeds of Andaman and Nicobar Islands, India. *Bangladesh Journal of Pharmacology* 11:874.
52. Chandrasekaran, M. VV and GAR (2014) Anti-MRSA activity of brown and red algae from Gulf of Mannar Coast, South India. *International Journal of Life Sciences and Technology* 7:22–31.
53. Chandrasekaran M, Venkatesalu V, Raj GA (2014) Antibacterial activity of selected marine macro algae against vancomycin resistant *Enterococcus faecalis*. *Journal of Coastal Life Medicine* 2:940–946.
54. Chanthini K, Kumar C, Kingsley S (2012) Antifungal activity of seaweed extracts against phytopathogen *Alternaria solani*. *Journal of Academia and Industrial Research* 1:86–90.
55. Chattopadhyay K, Ghosh T, Pujol CA, et al (2008) Polysaccharides from *Gracilaria corticata*: sulfation, chemical characterization and anti-HSV activities. *International Journal of Biological Macromolecules* 43:346–51.
56. Chaves LDS, Nicolau LAD, Silva RO, et al (2012) Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 35:1–8.
57. Chejara DR, Kondaveeti S, Meena R, Siddhanta AK (2014) Antioxidant activity and phytochemical analysis of a few Indian seaweed species. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 43:507–518.

58. Chen KJ, Tseng CK, Chang FR, et al (2013) Aqueous extract of the edible *Gracilaria tenuistipitata* inhibits hepatitis c viral replication via cyclooxygenase-2 suppression and reduces virus-induced inflammation. *PLOS ONE* 8:e57704.
59. Chen YY, Sim SS, Chiew SL, et al (2012) Dietary administration of a *Gracilaria tenuistipitata* extract produces protective immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to ammonia stress. *Aquaculture* 370–371:26–31.
60. Chen Y-Y, Chen J, Lin Y, et al (2015) White shrimp *Litopenaeus vannamei* that have received *Gracilaria tenuistipitata* extract show early recovery of immune parameters after ammonia stressing. *Marine Drugs* 13:3606–3624.
61. Chiles TC, Bird KT (1989) A comparative study of animal erythrocyte agglutinins from marine algae. *Comparative Biochemistry and Physiology* 94:107–111.
62. Chiles TC, Bird KT (1990) *Gracilaria tikvahiae* agglutinin. Partial purification and preliminary characterization of its carbohydrate specificity. *Carbohydrate Research* 207:319–326.
63. Chitra G, Sreeja PS (2013) A comparative study on the effect of seaweed liquid fertilizers on the growth and yield of *Vigna radiata* (L.). *Nature Environment and Pollution Technology an International Quarterly Scientific Journal* 12:359–362.
64. Choudhury S, Sree a, Mukherjee SC, et al (2005) *In Vitro* antibacterial activity of extracts of selected marine algae and mangroves against fish pathogens. *Asian Fisheries Science* 18:285–294.
65. Christabell J, Lipton A (2011) Antibacterial activity of aqueous extract from selected macroalgae of southwest coast of India. *Seaweed Research and Utilization* 33:67–75.
66. Costa DS, Araújo TSL, Sousa NA, et al (2016) Sulphated polysaccharide isolated from the seaweed *Gracilaria caudata* exerts an antidiarrhoeal effect in rodents. *Basic and Clinical Pharmacology & Toxicology* 118:440–448.
67. Costa LSS, Fidelis GPP, Cordeiro SLL, et al (2010) Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. *Biomedicine & pharmacotherapy* 64:21–8.
68. Coura CO, de Araújo IWF, Vanderlei ESO, et al (2012) Antinociceptive and anti-inflammatory activities of sulphated polysaccharides from the Red Seaweed *Gracilaria cornea*. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 110:335–341.
69. Coura CO, Souza RB, Rodrigues JAG, et al (2015) Mechanisms involved in the anti-inflammatory action of a polysulfated fraction from *Gracilaria cornea* in rats. *PLOS ONE* 10:1–18.
70. Crasta PJ, Raviraja NS, Sridhar KR (1997) Antimicrobial activity of some marine algae of southwest coast of India. *Indian Journal of Marine Sciences* 26:201–205.
71. Dang HT, Lee HJ, Yoo ES, et al (2008) Anti-inflammatory constituents of the red alga *Gracilaria verrucosa* and their synthetic analogues. *Journal of Natural Products* 71:232–240.
72. Das Chagas Vieira Júnior F, Sales AB, Barros FCN, et al (2012) Involvement of the NO/cGMP/PKG/KATP pathway and endogenous opioids in the antinociceptive effect of a sulphated-polysaccharide fraction extracted from the red algae, *Gracilaria caudata*. *Biomedicine and Preventive Nutrition* 2:303–309.
73. De Aragão AP, de Oliveira TM, Quelemes PV, et al (2016) Green synthesis of silver nanoparticles using the seaweed *Gracilaria birdiae* and their antibacterial activity. *Arabian Journal of Chemistry*.
74. De Lara-Isassi G, Álvarez-Hernández S, Collado-Vides L (2000) Ichthyotoxic activity of extracts from Mexican marine macroalgae. *Journal of Applied Phycology* 12:45–52.
75. Deepika RC, Bhaskar TCJ (2016) Antioxidant activities of a few common seaweeds from Gulf of Mannar and the effect of drying as the method of preservation. *International Research Journal of Engineering and Technology* 3:2615–2620.
76. Demir N, Dural B, Yildirim K (2006) Effect of seaweed suspensions on seed germination of tomato, pepper and aubergine. *Journal of Biological Sciences* 6:1130–1133.
77. Devi GK, Manivannan K, Thirumaran G, et al (2011) *In vitro* antioxidant activities of selected seaweeds from Southeast coast of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 4:205–11.

78. Devi KP, Suganthi N, Kesika P (2008) Bioprotective properties of seaweeds: *In vitro* evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity against food borne bacteria in relation to polyphenolic content. *BMC complementary and alternative medicine* 11:1–11.
79. Devi NL, Mani S (2015) Effect of seaweed sap on growth, yield and quality of soybean Co. (soy) 3. *Seaweed Research and Utilization* 37:26–32.
80. Devi NL, Mani S (2013) Effect of seaweed extracts on the yield, yield attributes and juice quality of sugarcane in coastal region of Tamil Nadu. *Asian Journal of Soil Science* 8:304–310.
81. Devi NL, Mani S (2014) Effect of seaweed saps concentrates on nutrient content in cane, leaves and nutrient uptake of sugarcane. *Asian Journal of Soil Science* 9:196–202.
82. Díaz-Rosales P, Felices C, Abdala R, et al (2007) *In vitro* effect of the red alga *Hydropuntia cornea* (J. Agardh) on the respiratory burst activity of sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) phagocytes. *Aquaculture Research* 38:1411–1418.
83. Dinh H Le, Hori K, Quang NH (2009) Screening and preliminary characterization of hemagglutinins in Vietnamese marine algae. *Journal of Applied Phycology* 21:89–97.
84. Divya K, Kalyani P (2016) Influence of seaweed extract of *Gracilaria Textorii* and *Turbenaria Arnata* on the germination, growth and yield of some vegetable crops. *International Journal of Pure & Applied Bioscience* 4:42–47.
85. Divya SR, Padmaja M, A. C, Dhanarajan MS (2013) Analysis and comparison of antioxidant activity of *Gracilaria Edulis* and *Gelidium Acerosa*. *International Journal of Agriculture Innovations and Research* 2:251–252.
86. Dwivedi SK, Meshram MR, Pal A, et al (2014) Impact of natural organic fertilizar (seaweed saps) on productivity and nutrient status of blackgram (*Phaseolus mungo* L.). *The Bioscan* 9:1535–1539.
87. Eahamban K, Antonisamy JM (2012) Preliminary phytochemical, UV-VIS, HPLC and anti-bacterial studies on *Gracilaria corticata* J. Ag. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2:S568–S574.
88. Elalla F, Shalaby E (2009) Antioxidant activity of extract and semi-purified fractions of marine red macroalga, *Gracilaria verrucosa*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3:3179–3185.
89. Etahiri S, Bultel-Poncé V, Elkouri AE, et al (2003) Antibacterial activities of marine alga from the Atlantic Coast of Morocco. *Mar. Life* 13:3–9.
90. Fabregas J, Muñoz A, Llovo J, Villa TG (1989) Differentiation of *Candida guilliermondii* varieties by lectin-like substances from marine algae. *Research in Microbiology* 140:373–378.
91. Fábregas J, Llovo J, Muñoz A (1988) Agglutination activity of algal extracts against spermatazoa of the fish *Diplodus sargus* L. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54:2121–2126.
92. Fidelis GP, Camara RBG, Queiroz MF, et al (2014) Proteolysis, NaOH and ultrasound-enhanced extraction of anticoagulant and antioxidant sulfated polysaccharides from the edible seaweed, *Gracilaria birdiae*. *Molecules* 19:18511–18526.
93. Fitria M, Warganegara FM (2015) Aqueous-methanol extract of *Gracilaria verrucosa* induces cytochrome c release from mitochondria. *Procedia Chemistry* 16:407–412.
94. Fouladvand M, Barazesh A, Farokhzad F, et al (2011) Evaluation of *in vitro* anti-leishmanial activity of some brown, green and red algae from the Persian Gulf. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 15:597–600.
95. Francavilla M, Franchi M, Monteleone M, Caroppo C (2013) The red seaweed *Gracilaria gracilis* as a multi products source. *Marine Drugs* 11:3754–76.
96. Freile-Pelegrin Y, Robledo D, Chan-Bacab MJ, Ortega-Morales BO (2008) Antileishmanial properties of tropical marine algae extracts. *Fitoterapia* 79:374–377.
97. Freitas ALP, Teixeira DIA, Costa FHF, et al (1997) A new survey of Brazilian marine algae for agglutinins. *Journal of Applied Phycology* 9:495–501.
98. Furuno A, Watari K, Mamiyo N, et al (2011) A natural anti-inflammatory enone fatty acid inhibits angiogenesis by attenuating nuclear factor -κB signaling in vascular endothelial cells. *International Journal of Oncology* 38:493–501.

99. Ganesan P, Kumar CS, Bhaskar N (2008) Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresource Technology* 99:2717–2723.
100. Ghannadi A, Plubrukarn A, Zandi K, et al (2013) Screening for antimalarial and acetylcholinesterase inhibitory activities of some Iranian seaweeds. *Research in Pharmaceutical Sciences* 8:113–118.
101. Ghannadi A, Shabani L, Yegdaneh A (2016) Cytotoxic, antioxidant and phytochemical analysis of *Gracilaria* species from Persian Gulf. *Advanced Biomedical Research* 5:139.
102. Gouda S, Moharana RR, Das G, Patra JK (2013) Free radical scavenging potential of extracts of *Gracilaria verrucosa* (L) (Harvey): An economically important seaweed from Chilika lake, India. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6:13–16.
103. Govindasamy C, Arulpriya M, Ruban P (2012) Nuclear magnetic resonance analysis for antimicrobial compounds from the red seaweed *Gracilaria corticata*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2:S329–S333.
104. Guaratini T, Lopes NP, Marinho-Soriano E, et al (2012) Antioxidant activity and chemical composition of the non polar fraction of *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie and *Gracilaria birdiae* (Plastino & Oliveira). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 22:724–729.
105. Guedes ÉAC, Silva TG da, Aguiar JS, et al (2013) Cytotoxic activity of marine algae against cancerous cells. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23:668–673.
106. Gupta A, Vijayaraghavan MR, Gupta R (1998) The presence of cholinesterase in marine algae. *Phytochemistry* 49:1875–1877.
107. Hardoko H, Febriani A, Sirantri T (2015) *In vitro* antidiabetic activities of agar, agarosa, and agaropectin from *Gracilaria gigas* seaweed. *Journal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 18:128–139.
108. Hart GM, Ticktin T, Kelman D, et al (2014) Contemporary gathering practice and antioxidant benefit of wild seaweeds in Hawai'i. *Economic Botany* 68:30–43. doi:
109. Hayashi K, Hamada J, Hayashi T (1996) A screening strategy for selection of Anti-HSV-1 and Anti-HIV extracts from algae. *Phytotherapy Research* 10:233–237.
110. Heffernan N, Smyth TJ, Soler-Villa A, et al (2015) Phenolic content and antioxidant activity of fractions obtained from selected Irish macroalgae species (*Laminaria digitata*, *Fucus serratus*, *Gracilaria gracilis* and *Codium fragile*). *Journal of Applied Phycology* 27:519–530.
111. Heffernan N, Smyth TJ, Fitzgerald RJ, et al (2014) Antioxidant activity and phenolic content of pressurised liquid and solid-liquid extracts from four Irish origin macroalgae. *International Journal of Food Science and Technology* 49:1765–1772.
112. Heo S, Cha S, Lee K, Jeon Y (2006) Antioxidant activities of red algae from Jeju Island. *Algae* 21:149–156.
113. Hiomi K, Yamanaka H, Kikuchi T, et al (1981) Purification and physicochemical properties of a hemagglutinin (GVA-1) in the red alga *Gracilaria verrucosa*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 47:1079–1084.
114. Hori K, Miyazawa K, Ito K (1986) Preliminary characterization of agglutinins from seven marine algal species. *Bulletin Japanese of the Society of Scientific Fisheries* 52:323–332.
115. Hori K, Miyazawa K, Ito K (1981) Hemagglutinins in Marine algae. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 47:793–798.
116. Hou WY, Chen JC (2005) The immunostimulatory effect of hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology* 19:127–138.
117. Hudson JB, Lee MK, Kim JH, et al (1999) Multiple antiviral activities in extracts of seaweeds from British Columbia. *Pharmaceutical Biology* 37:300–306.
118. Imjongjairak S, Ratanakhanokchai K, Laohakunjit N, et al (2015) Biochemical characteristics and antioxidant activity of crude and purified sulfated polysaccharides from *Gracilaria fisheri*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 8451:0–9.
119. Isassi GDL, Hernández SA, Pimentel AQ, et al (2004) Screening for anticoagulant substances in some marine macroalgae. *Hidrobiologica* 14:47–54.

120. Jadhao GR, Chaudhary DR, Khadse VA, Zodape ST (2014) Utilization of seaweeds in enhancing productivity and quality of black gram [*Vigna mungo* (L.) Hepper] for sustainable agriculture. *Indian Journal of Natural Products and Resources* 6:16–22.
121. Jebasingh S, Rosemary S (2011) Potential antibacterial activity of selected green and red seaweeds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 5:1–7.
122. Jeong SY, Qian Z, Jin Y, et al (2012) Investigation of α -glucosidase inhibitory activity of ethanolic extracts from 19 species of marine macroalgae in Korea. *Natural Product Sciences* 18:130–136.
123. Jeyanthi LR, Dhanalakshmi V, Sharmila S, Das MP (2013) *In vitro* antimicrobial activity of *Gracilaria* SP and *Enteromorpha* SP. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 4:693–697.
124. Jiménez E, Dorta F, Medina C, et al (2011) Anti-phytopathogenic activities of macro-algae extracts. *Marine Drugs* 9:739–56.
125. Johari NA, Sidek HM, Othman R, Anuar N (2013) *Gracilaria changii* derived cholesterol cause necrotic cell death in an ovarian adenocarcinoma cell line, CAO-V-3 through p38 MAPK and fasl activation in combination with ethanol. *Global Journal of Pharmacology* 7:1–13.
126. Julyasih Marhaeni, S., Suata, K., Wirawan, I.G.P., Astawa M.I.N. (2011) Seaweed extracts improve lipid profile of wistar rat. *Indonesia Journal of Biomedical Science* 2:1–8.
127. Kailas AP, Nair SM (2016) HPLC profiling of antimicrobial and antioxidant phyco sugars isolated from the South West Coast of India. *Carbohydrate Polymers* 151:584–592.
128. Kajiwarra T, Matsui K, Akakabe Y, et al (2006) Antimicrobial browning-inhibitory effect of flavor compounds in seaweeds. *Journal of Applied Phycology* 18:413–422.
129. Kakita H, Fukuoka S, Obika H, et al (1997) Purification and properties of a high molecular weight hemagglutinin from the red alga, *Gracilaria verrucosa*. *Botanica Marina* 40:241–248.
130. Kalimuthu K, Lin SM, Tseng LC, et al (2014) Bio-efficacy potential of seaweed *Gracilaria firma* with copepod, *Megacyclops formosanus* for the control larvae of dengue vector *Aedes aegypti*. *Hydrobiologia* 741:113–123.
131. Kang SY, Kim SR, Oh M (2008) *In vitro* Antiviral activities of Korean marine algae extracts against fish pathogenic infectious hematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus. *Food Science and Biotechnology* 17:1074–1078.
132. Kanjana K, Radtanatip T, Asuvapongpatana S, et al (2011) Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology* 30:389–396.
133. Kanoh H, Kitamura T, Kobayashi Y (1992) A sulfated proteoglycan from the red alga *Gracilaria verrucosa* is a hemagglutinin. *Comparative Biochemistry and Physiology* 102:445–449.
134. Kawano N, Egashira Y, Sanada H (2007) Effects of various kinds of edible seaweeds in diets on the development of D-galactosamine-induced hepatopathy in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 53:315–23.
135. Kazłowski B, Chiu Y-H, Kazłowska K, et al (2012) Prevention of Japanese encephalitis virus infections by low-degree-polymerisation sulfated saccharides from *Gracilaria* sp. and *Monostroma nitidum*. *Fish & Shellfish Immunology* 133:866–874.
136. Khan MNA, Choi JS, Lee MC, et al (2008) Anti-inflammatory activities of methanol extracts from various seaweed species. *Journal of Environmental Biology* 29:465–469.
137. Khan SA, Abid M, Hussain F (2015) Nematicidal activity of seaweeds against *Meloidogyne javanica*. *Pakistan Journal of Nematology* 33:195–203.
138. Kim H, Kang SSS-I, Shin H-S, et al (2012) Anti-obesity effect of komulkosiraegi [*Gracilaria vermiculophylla* (Ohmi) Papenfuss] extract in 3T3-L1 cells. *Food Science and Biotechnology* 21:83–89.
139. Kim K-N, Lee K-W, Song CB, et al (2006) Cytotoxic activities of red algae collected from Jeju Island against four tumor cell lines. *Journal of Food Science and Nutrition* 11:177–183.
140. Kim YA, Kong CS, Um YR, et al (2008) Antioxidant efficacy of extracts from a variety of seaweeds in a cellular system. *Ocean Science Journal* 43:31–37.

141. Kolanjinathan K (2011) Pharmacological effect of *Gracilaria corticata* solvent extracts against human pathogenic bacteria and fungi. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives* 2:1722–1728.
142. Kolanjinathan K (2014) *In-vitro* antibacterial activity of some red seaweed collected from the Mandapam Coastal Areas of Tamil Nadu, India. *International Journal of Current Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences* 1:224–228.
143. Kolanjinathan K, Saranraj P (2014) Pharmacological efficacy of marine seaweed *Gracilaria edulis* extracts against clinical pathogens. *Global Journal of Pharmacology* 8:268–274.
144. Kolanjinathan K, Govindarajan M, Ganesh P, Govindarajan M (2009) Antibacterial activity of ethanol extracts of seaweeds against fish bacterial pathogens. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 13:173–7.
145. Kolanjinathan K, Manigandan M (2014) Screening the in-vitro antifungal activity of certain seaweeds collected from Mandapam coast, Tamil Nadu, India. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences* 2:127–130.
146. Kumar AA, Meena VS, Chattopadhyay S, Panigrahi KCS (2012) Novel immunomodulatory effect of *Gracilaria Verrucosa* and *Potamogeton Pectinatus* extracts on *in vitro* activation of T cells. *International Journal of Life science and Pharma Research* 2:L233-L239.
147. Kumar CS, Sarada DVL, Rengasamy R (2008) Seaweed extracts contro the leaf spot disease of the medicinal plant *Gymnema sylvestre*. *Indian Journal of Science and Technology* 1:1–5.
148. Kumar IN, Barot M, Kumar R, Agardh J (2015) Phytochemical analysis and antifungal activity of selected seaweeds from Okha coast, Gujarat, India. *Journal of Coastal Life Medicine* 3:520–525.
149. Kumar KA, Rengasamy R (2000) Evaluation of antibacterial potential of seaweeds occurring along the Coast of Tamil Nadu, India against the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas oryzae* pv. *Botanica Marina* 43:409–415.
150. Kumar M, Kumari P, Trivedi N, et al (2010) Minerals, PUFAs and antioxidant properties of some tropical seaweeds from Saurashtra coast of India. *Journal of Applied Phycology* 23:797–810.
151. Kumar MR, Padhi SB (2016) Antibacterial activity of some marine macro algae from the Coastal Environments of Southern Odisha. *Journal of Pharmacy* 6:14–18.
152. Kumar P, Senthamil Selvi S, Govindaraju M, Selvi S (2013) Seaweed-mediated biosynthesis of silver nanoparticles using *Gracilaria corticata* for its antifungal activity against *Candida* spp. *Applied Nanoscience* 495–500.
153. Kumar SR, Ramanathan G, Subhakaran M, Inbaneson SJ (2009) Antimicrobial compounds from marine halophytes for silkworm disease treatment. *International Journal of Medicine and Medical Sciences* 1:184–191.
154. Lakmal C, Chaminda H (2014) Anticancer and antioxidant effects of selected Sri Lankan marine algae. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* 42:315–323.
155. Lategan C, Kellerman T, Afolayan AF, et al (2009) Antiplasmodial and antimicrobial activities of South African marine algal extracts. *Pharmaceutical Biology* 47:408–413.
156. Lavakumar V, Masilamani K, Ravichandiran V, et al (2015) Promising upshot of silver nanoparticles primed from *Gracilaria crassa* against bacterial pathogens. *Chemistry Central Journal* 9:42.
157. Lavanya R, Veerappan N (2012) Pharmaceutical properties of marine macroalgal communities from Gulf of Mannar against human fungal pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2:S320–S323.
158. Lavanya R, Veerappan N, Nadu P-T (2011) Antibacterial potential of six seaweeds collected from gulf of mannar of southeast coast of India. *Advances in Biological Research* 5:38–44.
159. Layek J, Das A, Ramkrushna GII, et al (2015) Seaweed sap: a sustainable way to improve productivity of maize in North-East India. *International Journal of Environmental Studies* 72:305–315.
160. Lee HJ, Kim YA, Ahn J-W, et al (2006) Screening of Korean marine plants for their inhibitory effect on histamine release from RPMCin vitro. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 11:80–83.
161. Lee J-H, Kim G-H (2015) Evaluation of Antioxidant Activity of marine algae-extracts From Korea. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 24:227–240.

162. Lee S, Lee J, Song D (2008) Cancer chemopreventive effects of Korean seaweed extracts. *Food Science and Biotechnology* 17:613–622.
163. Lee SH, Athukorala Y, Lee JS, Jeon YJ (2008) Simple separation of anticoagulant sulfated galactan from marine red algae. *Journal of Applied Phycology* 20:1053–1059.
164. Leelavathi MS, Prasad MP (2014) Evaluation of antioxidant properties of marine sea weed samples by DPPH method. *Indian Journal of Pure and Applied Bioscience* 2:132–137.
165. Lehnhardt Pires C, Rodrigues SD, Bristot D, et al (2013) Evaluation of macroalgae sulfated polysaccharides on the *Leishmania* (L.) *amazonensis* promastigote. *Marine Drugs* 11:934–43.
166. Leindah Devi N, Mani S (2015) Effect of seaweed saps *Kappaphycus alvarezii* and *Gracilaria* on growth, yield and quality of rice. *Indian Journal of Science and Technology* 8:326–332.
167. Leite YFMM, Silva LMCM, Amorim RCDN, et al (2005) Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochimica et Biophysica Acta* 1724:137–45.
168. León-Deniz L V., Dumonteil E, Moo-puc R, Freile-pelegrin Y (2009) Antitrypanosomal *in vitro* activity of tropical marine algae extracts. *Pharmaceutical Biology* 47:864–871.
169. Lestario LN, Sugiarto S, Timotius KH (2008) Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Red Sea Weed (*Gracilaria verrucosa* L.). *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan* XIX:2008.
170. Lim KW, Darah I (2004) Morphological and cytological changes exhibited by *Candida albicans* cells in response to exposure to *Gracilaria manilensis* extract. *Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2:*-17.
171. Lima MEP, Carneiro ME, Nascimento AE, et al (2005) Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria cornea* and its effects on the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:6414–6419.
172. Lima-Filho J, Carvalho A (2002) Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern Brazilian coast. *Brazilian Journal of Microbiology* 33:311–313.
173. Lin YC, Yeh ST, Li CC, et al (2011) An immersion of *Gracilaria tenuistipitata* extract improves the immunity and survival of white shrimp *Litopenaeus vannamei* challenged with white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology* 31:1239–1246.
174. Lin Y-H, Tsai J-S, Hung L-B, Pan BS (2011) Plasma lipid regulatory effect of compounded freshwater clam hydrolysate and *Gracilaria* insoluble dietary fibre. *Food Chemistry* 125:397–401.
175. Lin Y-H, Tsai J-S, Hung L, Pan BS (2010) Hypocholesterolemic effect of compounded freshwater clam protein hydrolysate and *Gracilaria*. *Food Chemistry* 123:395–399.
176. Lodhi KK (2015) Effect of seaweed saps on nutrient content, protein content, yield and economics of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.]. *The Ecoscan* VII:263–268.
177. Lodhi KK, Choubey NK, Dwivedi SK, et al (2015) Impact of seaweed saps on growth, flowering behaviour and yield of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.]. *The Bioscan* 10:479–483.
178. Lordan S, Smyth TJ, Soler-Vila A, et al (2013) The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food Chemistry* 141:2170–6.
179. Lustigman B, Brown C (1991) Antibiotic production by marine algae isolated from the New York / New Jersey Coast. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 46:329–335.
180. Madhiyazhagan P, Murugan K, Kumar AN, et al (2016) One pot synthesis of silver nanocrystals using the seaweed *Gracilaria edulis*: biophysical characterization and potential against the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* and the midge *Chironomus circumdatus*. *Journal of Applied Phycology*.
181. Maehira F, Motomura K, Nashiro T, et al (2004) Effects of red algae cultivated with deep-sea water on the oxidation–reduction status of liver, lung, brain, and bone metabolism in SAMP1 and SAMR1. *International Congress Series* 1260:413–416.
182. Maftuch, Kurniawati I, Adam A, Zamzami I (2016) Antibacterial effect of *Gracilaria verrucosa* bioactive on fish pathogenic bacteria. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*.

183. Mahajan R V, Bhale VM, Deshmukh JP, et al (2016) Effect of foliar nutrition of seaweed sap on growth and yield of greengram. *National Academy of Agricultural Science* 34:601–605.
184. Maithili SS, Thangadurai G, Ramanathan G (2014) Isolation of secondary metabolites from marine algal bacterial population against foot ulcer associated pathogens. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3:196–205.
185. Makkar F, Chakraborty K (2016) Antidiabetic and anti-inflammatory potential of sulphated polygalactans from red Seaweeds *Kappaphycus alvarezii* and *Gracilaria opuntia*. *International Journal of Food Properties* 2012:1–12.
186. Manikandan S, Ganesapandian S, Ganesapand S, et al (2011) Antimicrobial activity of seaweeds against multi drug resistant strains. *International Journal of Pharmacology* 7:522–526.
187. Manilal A, Thajuddin N (2011) *In vitro* mosquito larvicidal activity of marine algae against the human vectors, *Culex quinquefasciatus* (Say) and *Aedes aegypti* (Linnaeus)(Diptera: Culicidae). *International Journal of Zoological Research* 7:272–278.
188. Maningas MBB, Gonzalez PG, Obias MM, et al (2013) Immune response of *Macrobrachium rosenbergii* immersed in hot-water extract of *Gracilaria edulis*. *Philippine Science Letters* 6:147–152.
189. Manjula E, Rangaiah GS, Lakshmi P (2010) Antimicrobial activity of seaweeds *Gracilaria*, *Padina* and *Sargassum* sps. on clinical and phytopathogens. *International Journal of Chemical and Analytical Science* 1:114–117.
190. Manoharan N, Sampathkumar P, Dheeba B, et al (2008) Potential hepatoprotective effect of aqueous extract of *Gracilaria corticata* in AFB induced hepatotoxicity in wistar rats. *Journal of Biological Sciences* 8:1352–1355.
191. Mansuya P, Aruna P, Sridhar S, et al (2010) Antibacterial activity and qualitative phytochemical analysis of selected seaweeds from Gulf of Mannar Region. *Journal of Experimental Sciences* 1:23–26.
192. Mariana NS, Nik K, Neela VK, et al (2011) *In vivo* evaluation on Malaysian coastal isolates of *Gracilaria changii* and *Stichopus badionotus* through heat-burn methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection animal model. *African Journal of Microbiology Research* 5:1379–1382.
193. Martins CDL, Ramlov F, Nocchi Carneiro NP, et al (2012) Antioxidant properties and total phenolic contents of some tropical seaweeds of the Brazilian coast. *Journal of Applied Phycology* 25:1179–1187.
194. Mazumder S, Ghosal PPK, Pujol C a, et al (2002) Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *International Journal of Biological Macromolecules* 31:87–95.
195. Megha M, Sabale AB (2013) Antioxidant potential of seaweeds from Kunakeshwar along the West Coast Maharashtra. *Asian Journal of Biomedical & Pharmaceutical Sciences* 3:45–50.
196. Mendes M, Pereira R, Sousa Pinto I, et al (2013) Antimicrobial activity and lipid profile of seaweed extracts from the North Portuguese Coast. *International Food Research Journal* 20:3337–3345.
197. Miao C, Du J, Jeong I, et al (2008) Apoptotic activity of fatty acid derivatives may correlate with their inhibition of DNA replication. *International Journal of Oncology* 33:1291–1298.
198. Minicante SA, Michelet S, Bruno F, et al (2016) Bioactivity of phycocolloids against the mediterranean protozoan *Leishmania infantum*: an inceptive study. *Sustainability* 8:1131.
199. Moein S, Moein M, Ebrahimi N, et al (2015) Extraction and determination of protein content and antioxidant properties of ten algae from Persian Gulf. *International Journal of Aquatic Science* 6:29–38.
200. Moein M, Nazemosadat Z, Erfani N (2015) Cytotoxic activity of ten algae from the Persian Gulf and Oman Sea on human breast cancer cell lines; MDA-MB-231, MCF-7, and T-47D. *Pharmacognosy Research* 7:133.
201. Mohapatra L, Bhattamisra SK, Panigrahy RC, Parida SK (2016) Evaluation of the antioxidant, hypoglycaemic and antidiabetic activities of some seaweed collected from the east coast of India. *Biomedical and Pharmacology Journal* 9:365–375.
202. Monteiro VS, Teles FB, Coura CO, et al (2016) Involvement of the GABAergic system in the anxiolytic effect of sulfated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Journal of Applied Phycology* 28:1997–2004.

203. Moo-puc R, Robledo D, Freile-Pelegrin Y, Harvey J (2008) Evaluation of selected tropical seaweeds for *in vitro* anti-trichomonal activity. *Journal of Ethnopharmacology* 120:92–7.
204. Movahedinia A, Heydari M (2014) Antioxidant activity and total phenolic content in two alga species from the Persian Gulf in Bushehr. *International Journal of Science and Research* 3:954–958.
205. Muñoz-Ochoa M, Murillo-Álvarez JI, Zermeno-Cervantes LA, et al (2010) Screening of extracts of algae from Baja California sur, Mexico as reversers of the antibiotic resistance of some pathogenic bacteria. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 14:739–47.
206. Murakami A, Ishida H, Kubo K, et al (2005) Suppressive effects of okinawan food items on free radical generation from stimulated leukocytes and identification of some active constituents: Implications for the prevention of inflammation-associated carcinogenesis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 6:437–448.
207. Murugan K, Iyer VV V. (2012) Antioxidant and Antiproliferative Activities of Marine Algae, *Gracilaria edulis* and *Enteromorpha lingulata*, from Chennai Coast. *International Journal of Cancer Research* 8:15–26.
208. Murugan K, Iyer V V. (2013) Antioxidant and antiproliferative activities of extracts of selected red and brown seaweeds from the Mandapam Coast of Tamil Nadu. *Journal of Food Biochemistry* 49:1-10.
209. Naik K, Sb P (2016) Utilization of seaweed extracts for growth and yield of flowering plant: *Tagetes erecta*. *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences* 5:1763–1770.
210. Nair R, Kalariya T, Chanda S (2005) Antibacterial activity of some selected Indian medicinal flora. *Turkish Journal of Biology* 29:41–47.
211. Nair RR, Chabhadiya R, Chanda S (2007) Marine algae: screening for a potent antibacterial agent. *Journal of Herbal Pharmacotherapy* 7:73–86.
212. Namvar F, Baharara J, Mahdi a. a. (2013) Antioxidant and anticancer activities of selected Persian Gulf algae. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 29:13–20.
213. Nara T, Kamei Y, Tsubouchi A, et al (2005) Inhibitory action of marine algae extracts on the *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase activity and on the protozoan growth in mammalian cells. *Parasitology International* 54:59–64.
214. Narasimha Rao GM, Chatterjee R (2014) Effect of seaweed liquid fertilizer from *Gracilaria Textorii* and *Hypnea Musciformis* on seed germination and productivity of some vegetable crops. *Universal Journal of Plant Science* 2:115–120.
215. Narasimhan MKM, Pavithra SKS, Krishnan V, Chandrasekaran M (2013) *In vitro* analysis of antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activity of *Enteromorpha antenna*, *Enteromorpha linza* and *Gracilaria corticata* extracts. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 8:151–159.
216. Narayani CCGS, Arulpriya M, Ruban P, et al (2011) *In vitro* antimicrobial activities of seaweed extracts against human pathogens. *Journal of Pharmacy Research* 4:2076–2077.
217. Natarajan S, Shanmugiahthevar KP, Kasi PD (2009) Cholinesterase inhibitors from *Sargassum* and *Gracilaria gracilis*: seaweeds inhabiting South Indian coastal areas (Hare Island, Gulf of Mannar). *Natural Product Research* 23:355–369.
218. Naveena BE, Prakash S (2013) Biological synthesis of gold nanoparticles using marine algae *Gracilaria corticata* and its application as a potent antimicrobial and antioxidant. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 6:179–182.
219. Neves S a, Dias-Baruff M, Freitas a L, Roque-Barreira MC (2001) Neutrophil migration induced in vivo and *in vitro* by marine algal lectins. *Inflammation research* 50:486–490.
220. Nithya P, Dhanalakshmi B (2016) Antibacterial activity of methanol extracts from selected seaweed of south east coast of India. *International Journal of Applied Research* 2:714–718.
221. Noda H, Amano H, Arashima K, Nisizawa K (1990) Antitumor activity of marine algae. *Hydrobiologia* 204/205:577–584.
222. Okamoto R, Hori K, Miyazawa K, et al (1990) Isolation and characterization of a new hemagglutinin from the red alga *Gracilaria bursa-pastoris*. *Experientia* 46:975–977.

223. Omar HH, Shiekh HM, Gumgumjee NM, et al (2012) Antibacterial activity of extracts of marine algae from the Red Sea of Jeddah, Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology* 11:13576–13585.
224. Omar HH, Gumgumji NM, Shiek HM, et al (2012) Inhibition of the development of pathogenic fungi by extracts of some marine algae from the red sea of Jeddah, Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology* 11:13697–13704.
225. Omar HH, Abdullatif BM, Al-Kazan MM, et al (2015) Various applications of seaweed improves growth and biochemical constituents of *Zea Mays* L. and *Helianthus Annuus* L. *Journal of Plant Nutrition* 38:28–40.
226. Osman HE, Salem OMA (2011) Effects of seaweed extracts as foliar spray on sunflower yield and oil content. *Egyptian Journal of Phycology* 12:59–72.
227. Osuna-Ruiz I, López-Saiz C-M, Burgos-Hernández A, et al (2016) Antioxidant, antimutagenic and antiproliferative activities in selected seaweed species from Sinaloa, Mexico. *Pharmaceutical Biology* 209:1–15.
228. Oumaskour K, Boujaber N, Etahiri S, Assobhei O (2013) Anti-inflammatory and antimicrobial activities of twenty-tree marine red algae from the coast of Sidi Bouzid (El Jadida-Morocco). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5:145–149.
229. Pal A, Dwivedi SK, Kanwar PC (2015) Effect of seaweed saps on increase yield, nutrient uptake and soil nutrient balance sheet of rice (*Oryza sativa* L.). *The Bioscan* 9:531–535.
230. Paramsivam R, Sudevan S, Sundar S (2016) Study on metabolic compounds of *Gracilaria salicornia* against anti-inflammatory activity. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 5:202–211.
231. Park I, Lee S, Kim S-K, et al (2011) Effects of seaweeds on matrix metalloproteinases derived from normal human dermal fibroblasts and human fibrosarcoma cells. *Journal of Life Science* 21:1501–1510.
232. Parthiban C, Saranya C, Girija K, et al (2013) Evaluation of *in vitro* antioxidant properties of some selected seaweeds from Tuticorin coast. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2:64–73.
233. Patra S, Muthuraman MS (2013) *Gracilaria edulis* extract induces apoptosis and inhibits tumor in Ehrlich ascites tumor cells in vivo. *BMC complementary and alternative medicine* 13:331.
234. Peixoto MJ, Salas-Leitón E, Brito F, et al (2016) Effects of dietary *Gracilaria* sp. and *Alaria* sp. supplementation on growth performance, metabolic rates and health in meagre (*Argyrosomus regius*) subjected to pathogen infection. *Journal of Applied Phycology*.
235. Peres J, Carvalho L (2012) Evaluation of antifungal activity of seaweed extracts. *Ciência e Agrotecnologia* 36:294–299.
236. Piao M, Kim K, Zheng J (2014) *Gracilaria bursa-pastoris* (Gmelin) Silva extract attenuates uvb-radiation-induced oxidative stress in human keratinocytes. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 33:33–43.
237. Pise NM, Sabale A (2010) Effect of seaweed concentrates on the growth and biochemical constituents of *Trigonella foenum-graecum* L. *Journal of Phytology* 2:50–56.
238. Praiboon J, Bhumibhamon O, Chirapart A, Akakabe Y (2012) Anticancer activities of cold water polysaccharide extracted from *Gracilaria edulis* (S. G. Gmelin) P. C. Silva. *KKU Science Journal* 40:254–264.
239. Prajapati A, Patel CK, Singh N, et al (2016) Evaluation of seaweed extract on growth and yield of potato. *Environment & Ecology* 34:605–608.
240. Pramanick B, Brahmachari K, Ghosh A, Zodape ST (2014) Foliar nutrient management through *Kappaphycus* and *Gracilaria* saps in rice-potato-green gram crop sequence. *Journal of Scientific and Industrial Research* 73:613–617.
241. Pramanick B, Brahmachari K, Ghosh. A (2014) Efficacy of *Kappaphycus* and *Gracilaria* sap on growth and yield improvement of sesame in new alluvial soil. *Journal of Crop and Weed* 10:77–81.

242. Pramanick B, Brahmachari K, Ghosh A, Zodape ST (2016) Effect of seaweed saps derived from two marine algae *Kappaphycus* and *Gracilaria* on growth and yield improvement of blackgram. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 45:789–794.
243. Pramanick B, Brahmachari K, Ghosh A, Zodape ST (2014) Effect of seaweed saps on growth and yield improvement of transplanted rice in old alluvial soil of west bengal. *Bangladesh Journal of Botany* 43:53–58.
244. Prasad K, Das AK, Oza MD, et al (2010) Detection and quantification of some plant growth regulators in a seaweed-based foliar spray employing a mass spectrometric technique sans chromatographic separation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:4594–601.
245. Primich-Zachwieja S, Minocha SC (1991) Induction of virulence response in *Agrobacterium tumefaciens* by tissue explants of various plant species. *Plant Cell Reports* 10:539–544.
246. Priyadharshini RI, Prasannaraj G, Geetha N, Venkatachalam P (2014) Microwave-mediated extracellular synthesis of metallic silver and zinc oxide nanoparticles using macroalgae (*Gracilaria edulis*) extracts and its anticancer activity against human PC3 cell lines. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 174:2777–2790.
247. Puglisi MP, Engel S, Jensen PR, et al (2007) Antimicrobial activities of extracts from Indo-Pacific marine plants against marine pathogens and saprophytes. *Marine Biology* 150:531–540.
248. Pujol C a, Ray S, Ray B, Damonte EB (2012) Antiviral activity against dengue virus of diverse classes of algal sulfated polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules* 51:412–6.
249. Radhika D, Veerabahu C, Priya R (2013) *In vitro* studies on antioxidant and haemagglutination activity of some selected seaweeds. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5:152–155.
250. Radhika DD, Mohaideen A (2016) Effect of utilization of seaweeds as an immunostimulant in *Aeromonas hydrophila* infected *Cyprinus carpio*. *World Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences* 5:851–857.
251. Radhika D, Ameer M (2015) Fourier transform infrared analysis of *Ulva Lactuca* and *Gracilaria Corticata* and their effect on antibacterial activity. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 1:1–2.
252. Radhika D, Veerabahu C, R. P (2013) Anti-inflammatory activities of some seaweed collected from the gulf of Mannar Coast, Tuticorin, South India. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 4:39–44.
253. Rahelivao M, Gruner M, Andriamanantoanina H, et al (2015) Red algae (Rhodophyta) from the Coast of Madagascar: preliminary bioactivity studies and isolation of natural products. *Marine Drugs* 13:4197–4216.
254. Rajan R, Selvaraj M, Palraj S, Subramanian G (2016) Studies on the anticorrosive & antifouling properties of the *Gracilaria edulis* extract incorporated epoxy paint in the Gulf of Mannar Coast, Mandapam, India. *Progress in Organic Coatings* 90:448–454.
255. Rajasekar T, Deivasigamani B, Kumaran S, et al (2012) Antibacterial activity of cultivated marine seaweeds against fish pathogenic bacteria *Vibrio harveyi*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 3:1–5.
256. Ramah S, Etwarysing L, Auckloo N, et al (2014) Prophylactic antioxidants and phenolics of seagrass and seaweed species: a seasonal variation study in a Southern Indian Ocean Island, Mauritius. *Internet Journal of Medical Update* 9:27–37.
257. Ramalingam A, Amutha C (2013) Antibacterial activity of four seaweeds collected from Thondi Coast, Tamilnadu, India. *International Journal of Research in Biological Sciences* 3:60–64.
258. Ramalingam A, Amutha C (2013) Antibacterial activity of bacteria associated with red seaweeds against pathogenic bacteria of poultry and cattle. *International Journal of Advanced Life Sciences* 1966:22–25.
259. Rasooli S, Sattari M, Ramezanpour Z, Namin JI (2015) Antibacterial activities of bioactive compounds extracted from Marine algae *Gracilaria salicornia* against *Aeromonas hydrophila*. *International Journal of Aquatic Biology* 3:155–160.
260. Ratnasooriya WD, Premakumara G a, Tillekeratne LM (1994) Post-coital contraceptive activity of crude extracts of Sri Lankan marine red algae. *Contraception* 50:291–9.

261. Ratnasooriya WD, Premakumara GAS, Tillekeratne LMV (1991) Hypotensive activity of crude extract of marine red alga, *Gracilaria* sp. in rats. *Vidyodaya Journal of Science* 3:35–39.
262. Raverkar KP, Pareek N, Chandra R, et al (2016) Impact of foliar application of seaweed saps on yield, nodulation and nutritional quality in green gram (*Vigna radiata* L). *Legume Research - An International Journal* 39:315–318.
263. Ravikumar S, Anburajan L, Ramanathan G, Kaliaperumal N (2002) Screening of seaweed extracts against antibiotic resistant post operative infectious pathogens. *Seaweed Research and Utilization* 24:95–99.
264. Ravikumar S, Ramanathan G, Gnanadesigan M, et al (2011) *In vitro* antiplasmodial activity of methanolic extracts from seaweeds of South West Coast of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 4:862–5.
265. Ravikumar S, Jacob Inbaneson S, Suganthi P (2011) Seaweeds as a source of lead compounds for the development of new antiplasmodial drugs from South East Coast of India. *Parasitology Research* 109:47–52.
266. Rizvi MA, Medicine U, Kützing BDS, et al (2010) comparative antibacterial activities of seaweed extracts from Karachi Coast, Pakistan. *Pakistan Journal of Pharmacology* 27:53–57.
267. Rizvi MA, Shameel M (2006) *In vitro* nematocidal activities of seaweed extracts from Karachi Coast. *Pakistan Journal of Botany* 38:1245–1248.
268. Rogers DJ (1985) Anticoagulant activity in extracts of British marine algae. *Botanica Marina* XXVIII:333–338.
269. Ruangsomboon S, Pumnuan J (2016) Acaricidal activities of algal extracts against the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart). *Journal of the Acarological Society of Japan* 25:169–178.
270. Rudtanatip T, Asuvapongpatana S, Withyachumnarnkul B, Wongprasert K (2014) Sulfated galactans isolated from the red seaweed *Gracilaria fisheri* target the envelope proteins of white spot syndrome virus and protect against viral infection in shrimp haemocytes. *Journal of General Virology* 95:1126–1134.
271. Rudtanatip T, Withyachumnarnkul B, Wongprasert K (2015) Sulfated galactans from *Gracilaria fisheri* bind to shrimp haemocyte membrane proteins and stimulate the expression of immune genes. *Fish & Shellfish Immunology* 47:231–238.
272. Sabeena Farvin KH, Jacobsen C (2013) Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chemistry* 138:1670–1681.
273. Sabina H, Aliya R (2011) Bioactive assessment of selected marine red algae against *Leishmania* major and chemical constituents of *Osmundea pinnatifida*. *Pakistan Journal of Botany* 43:3053–3056.
274. Sabina H, Tasneem S, Kausar Y, et al (2005) Antileishmanial activity in the crude extract of various seaweed from the coast of Karachi, Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 37:163–168.
275. Sachindra NM, Airanthi MKW a, Hosokawa M, Miyashita K (2010) Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of extracts from Indian seaweeds. *Journal of Food Science and Nutrition* 47:94–9.
276. Saeidnia S, Gohari A, Shahverdi A, et al (2009) Biological activity of two red algae, *Gracilaria salicornia* and *Hypnea flagelliformis* from Persian Gulf. *Pharmacognosy Research* 1:428–431.
277. Sakthivel R, Muniasamy S, Archunan G, Devi KP (2016) *Gracilaria edulis* exhibit antiproliferative activity against human lung adenocarcinoma cell line A549 without causing adverse toxic effect in vitro and in vivo. *Food Function* 7:1155–1165.
278. Salvador N, Garreta AG, Lavelli L, Ribera MA (2007) Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. *Scientia Marina* 71:101–113.
279. Sam N, Palanichamy S, Chellammal S (2015) Antifouling effects of silver nano particles synthesized from tropical seaweeds. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 4:1029–1042.
280. Sangeetha S, Dhayanithi NB, Sikakumar N (2014) Antibacterial activity of *Sargassum longifolium* and *Gracilaria corticata* from Gulf of Mannar against selected common shrimp pathogens. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 5:76–82.

281. Sanger G, Widjanarko S (2013) Antioxidant activity of metanol extract of sea weeds obtained from North Sulawesi. *Food Science and Quality Management* 19:63–70.
282. Saraswaty V, Mozef T, Risdian C, Rasyid A (2015) Bioactivity of Polysaccharide from *Gracilaria verrucosa* as α - Glucosidase Inhibitor. *Procedia Chemistry* 16:687–693.
283. Sasidharan S, Darah I, Jain K (2008) In Vivo. and In Vitro. Toxicity Study of *Gracilaria changii*. *Pharmaceutical Biology* 46:413–417.
284. Sasidharan S, Darah I, Jain K (2011) *In vitro* and in situ antiyeast activity of *Gracilaria changii* methanol extract against *Candida albicans*. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 15:1020–6.
285. Sasidharan S, Darah I, Jain K (2008) Antimicrobial activity and wound healing potential on infected rat of *Gracilaria Changii* methanolic extract. *Pharmacologyonline* 670:661–670.
286. Sasidharan S, Darah I, Kassim M, et al (2010) *In vitro* antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* and acute oral toxicity of marine algae *Gracilaria changii*. *New Biotechnology* 27:390–6.
287. Sasidharan S, Darah I, Kassim M, et al (2008) Preliminary isolation and in vitro antiyeast activity of active fraction from crude extract of *Gracilaria changii*. *Indian Journal of Pharmacology* 40:227–229.
288. Sasidharan S, Darah I, Kassim M, et al (2009) Screening antimicrobial activity of various extracts of *Gracilaria changii*. *Pharmaceutical Biology* 47:72–76.
289. Sasidharan S, Sains U, Ibrahim D, et al (2007) Free radical scavenging activity and total phenolic compounds of *Gracilaria changii*. *International Journal of Natural and Engineering Sciences* 1:115–117.
290. Sastry VMVS, Rao GRK (1994) Antibacterial substances from marine algae: successive extraction using benzene, chloroform and methanol. *Botanica Marina* 37:357–360.
291. Satish L, Rameshkumar R, Rathinapriya P, et al (2015) Effect of seaweed liquid extracts and plant growth regulators on in vitro mass propagation of brinjal (*Solanum melongena* L.) through hypocotyl and leaf disc explants. *Journal of Applied Phycology* 27:993–1002.
292. Satish L, Rathinapriya P, Rency AS (2016) Somatic embryogenesis and regeneration using *Gracilaria edulis* and *Padina boergerenii* seaweed liquid extracts and genetic fidelity in finger millet (*Eleusine coracana*). *Journal of Applied Phycology* 2083–2098.
293. Seedeve P, Sudharsan S, Kanagarajan U, et al (2013) Studies on pharmacological potential of the marine macro-alga, *Gracilaria debilis* [J. Agardh] from Tamil Nadu Coast of India. *Asian Journal of Marine Sciences* 1:34–38.
294. Senthil KA, Murugan A (2013) Antiulcer, wound healing and hepatoprotective activities of the seaweeds *Gracilaria crassa*, *Turbinaria ornata* and *Laurencia papillosa* from the southeast coast of India. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 49:669–678.
295. SenthilKumar P, SenthilKumar P (2012) Evaluation of alpha-amylase and alphasglucosidase inhibitory properties of selected seaweeds from Gulf of Mannar. *International Research Journal of Pharmacy* 3:128–130.
296. Shah MT, Zodape ST, Chaudhary DR, et al (2013) Seaweed sap as an alternative liquid fertilizer for yield and quality improvement of wheat. *Journal of Plant Nutrition* 36:192–200.
297. Shanmughapriya S, Manilal A, Sujith S, et al (2008) Antimicrobial activity of seaweeds extracts against multiresistant pathogens. *Annals of Microbiology* 58:535–541.
298. ShaoChi W, SheenKye K, Kazlowski B, et al (2012) Antivirus and prebiotic properties of seaweed-oligosaccharide-lysates derived from agarase AS-II. *Journal of the Fisheries Society of Taiwan* 39:11–21.
299. Sheeja L, Lakshmi D, Bharadwaj S, Parveen KS (2016) Anticancer activity of phytol purified from *Gracilaria edulis* against human breast cancer cell line (MCF-7). *International Journal of Current Science* 19:36–46.
300. Shola TA, Wins JA, Murugan M (2014) Screening on bioactive compounds of selected marine and its antifungal activity. *International Journal of Research in Engineering and Bioscience* 2:34–38.

301. Shu M-H, Appleton D, Zandi K, AbuBakar S (2013) Anti-inflammatory, gastroprotective and anti-ulcerogenic effects of red algae *Gracilaria changii* (Gracilariales, Rhodophyta) extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13:61.
302. Sikdar P, Ramana MV (2016) In-vitro antioxidant activity of hydroalcoholic extract of *Gracilaria edulis* (Gmelin). *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences* 6:20–22.
303. Silva RO, dos Santos GMP, Nicolau LAD, et al (2011) Sulfated-polysaccharide fraction from red algae *Gracilaria caudata* protects mice gut against ethanol-induced damage. *Marine Drugs* 9:2188–200.
304. Silva R, Santana A, Carvalho N, et al (2012) A sulfated-polysaccharide fraction from seaweed *Gracilaria birdiae* prevents naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. *Marine Drugs* 10:2618–2633.
305. Singh D, Tanwar A, Agrawal P (2015) Screening of anticandidal and antidermatophytic activities of *Gracilaria edulis* and *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyceae) from the Gulf of Mannar, Manappad Coast, Tamilnadu. *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research* 4:67–70.
306. Singh MJ, Raadha CK (2015) Studies on the antimicrobial potency of the marine algae - *Gracilaria corticata* var *cylindrica* and *Hydroclathrus clathratus*. *Advances in Life Sciences and Health* 2:50–55.
307. Singh SK, Thakur R, Singh MK, et al (2015) Effect of fertilizer level and seaweed sap on productivity and profitability of rice (*Oryza sativa*). *Indian Journal of Agronomy* 60:420–425.
308. Singh S, Singh MK, Pal SK, et al (2016) Sustainable enhancement in yield and quality of rain-fed maize through *Gracilaria edulis* and *Kappaphycus alvarezii* seaweed sap. *Journal of Applied Phycology* 28:2099–2112.
309. Singh S, Singh MK, Pal SK, et al (2015) Use of seaweed sap for sustainable productivity of maize. *The Bioscan* 10:1349–1355.
310. Singh S, Singh MK, Pal SK, et al (2015) seaweed sap as productivity booster of maize. *The Bioscan* 10:1303–1305.
311. Sirirustananun N, Chen JC, Lin YC, et al (2011) Dietary administration of a *Gracilaria tenuistipitata* extract enhances the immune response and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology* 31:848–855.
312. Sivanandhan G, Arunachalam C, Selvaraj N (2015) Plant Physiology and Biochemistry Expression of important pathway genes involved in withanolides biosynthesis in hairy root culture of *Withania somnifera* upon treatment with *Gracilaria edulis* and *Sargassum wightii*. *Plant Physiology et Biochemistry* 91:61–64.
313. Sivasankari S, Venkatesalu V, Anantharaj M, Chandrasekaran M (2015) Effect of seaweed extracts on The growth and biochemical constituents of wheat. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 8:283–287.
314. Soares A, Robaina M (2012) Antiviral activity of extracts from Brazilian seaweeds against herpes simplex virus. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 22:714–723.
315. Soundariya M, Babujanathanam R, Prasad TNVKV, Supraja N (2016) Synthesis, characterization and dose dependent antimicrobial and anti-cancerous activity of phycogenic silver nanoparticles against human hepatic carcinoma (HepG2) cell line. *AIMS Bioengineering* 3:425–440.
316. Souza BWS, Cerqueira MA, Martins JT, et al (2011) Antioxidant potential of two red seaweeds from the Brazilian coasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:5589–94.
317. Souza BWSS, Cerqueira M a., Bourbon AI, et al (2012) Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Food Hydrocolloids* 27:287–292.
318. Souza RB, Frota AF, Sousa RS, et al (2016) Neuroprotective Effects of sulphated agaran from marine alga *Gracilaria cornea* in rat 6-hydroxydopamine Parkinson's Disease model: behavioural, neurochemical and transcriptional alterations. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*.
319. Souza RB, Queiroz INL De, Silva Neto AA Da, et al (2015) Analysis of two precipitation methods on the yield, structural features and activity of sulfated polysaccharides from *Gracilaria cornea* (Rhodophyta). *Acta Scientiarum Biological Sciences* 37:31.

320. Sreejamole KL, Greeshma PM (2013) Antioxidant and brine shrimp cytotoxic activities of ethanolic extract of red alga *Gracilaria corticata* (J. Agardh) J. Agardh. *Indian Journal of Natural Products and Resources* 4:233–237.
321. Sridhar S, Kumar J, Babu S (2010) Pharmacognostical and antifungal activity of selected seaweeds from Gulf of Mannar region. *Recent Research in Science and Technology* 2:115–119.
322. Srikong W, Mittraparp-arthorn P, Rattanaporn O, Bovornreungroj N (2015) Antimicrobial activity of seaweed extracts from Pattani, Southeast coast of Thailand. *Food and Applied Bioscience Journal* 3:39–49.
323. Stein EM, Machado LP, Roffato HK, et al (2015) Antischistosomal activity from Brazilian marine algae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 25:663–667.
324. Stella D, Kolanjinathan K (2009) Antibacterial activity of marine macro algae against human pathogens. *Recent Research in Science and Technology* 1:20–22.
325. Subashini S, Pugalendi KV, Baskaran K, Ganesan K (2015) Evaluation of anti-hyperglycemic effect of *Gracilaria corticata* extract in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Chemical Biology Letters* 2:6–11.
326. Subramanian A, Kannan L, Pugalendhi T, Muruganantham A (1997) Heparin from seaweeds. *Current Science* 73:566.
327. Sudhakar MP, Arunkumar K, Perumal K (2016) A preliminary study on antioxidant and antimicrobial activities of phycoerythrin from different *Gracilaria* species. *Seaweed Research and Utilization* 38:49–54.
328. Sudharsan S, Subhapradha N, Seedeve P, et al (2015) Antioxidant and anticoagulant activity of sulfated polysaccharide from *Gracilaria debilis* (Forsskal). *International Journal of Biological Macromolecules* 81:1031–1038.
329. Suganthi A (2014) Aqueous seaweed sprays for enhancement of growth and yield of sunflower hybrid CO2. *International Journal of Agriculture Innovations and Research* 2:959–962.
330. Suganthi N, Karutha Pandian S, Pandima Devi K (2010) Neuroprotective effect of seaweeds inhabiting South Indian coastal area (Hare Island, Gulf of Mannar Marine Biosphere Reserve): Cholinesterase inhibitory effect of *Hypnea valentiae* and *Ulva reticulata*. *Neuroscience Letters* 468:216–9.
331. Sugiura Y, Takeuchi Y, Kakinuma M, Amano H (2006) Inhibitory effects of seaweeds on histamine release from rat basophile leukemia cells (RBL-2H3). *Fisheries Science* 72:1286–1291.
332. Sujatha K, Vijayalakshmai V, Suganthi A (2015) Comparative efficacy of brown, red and green seaweed extracts on low vigour sunflower (*Helianthus annuus* L.) var. TN (SUF) 7 seeds. *African Journal of Agricultural Research* 10:2165–2169.
333. Sundaram M, Patra S, Maniarasu G (2012) Antitumor activity of ethanol extract of *Gracilaria edulis* (Gmelin) Silva on Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. *Chinese Journal of Integrative Medicine* 10:430–435.
334. Süzgeaç-Selaçuk S, Meriaçli AH, Güven KCKC, et al (2011) Evaluation of Turkish seaweeds for antiprotozoal, antimycobacterial and cytotoxic activities. *Phytotherapy Research* 783:778–783.
335. Taheri A (2016) Antioxidant activity in some Iranian seaweed species from Chabahar. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 15:802–817.
336. Takahashi Y, Katagiri S (1987) Seasonal variation of the hemagglutinating activities in the red alga *Gracilaria verrucosa*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53:2133–2137.
337. Tavares Estevam AC, Alonso Buriti FC, de Oliveira TA, et al (2016) Effect of aqueous extract of the seaweed *Gracilaria domingensis* on the physicochemical, microbiological, and textural features of fermented milks. *Journal of Food Science* 81:C874–C880.
338. Tello-Ireland C, Lemus-Mondaca R, Vega-Gálvez A, et al (2011) Influence of hot-air temperature on drying kinetics, functional properties, colour, phycobiliproteins, antioxidant capacity, texture and agar yield of alga *Gracilaria chilensis*. *LWT - Food Science and Technology* 44:2112–2118.
339. Thinakaran T, Sivakumar K (2013) Antifungal activity of certain seaweeds from Puthumadam Coast. *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences* 3:341–350.

340. Thirunavukkarasu R, Pandiyan P, Balaraman D, et al (2013) Isolation of bioactive compound from marine seaweeds against fish pathogenic bacteria *Vibrio alginolyticus* (VA09) and characterisation by FTIR. *Journal of Coastal Life Medicine* 1:26–33.
341. Titlyanov EA, Titlyanova TV (2013) Algal fouling of underwater structures at lobster farms in Nha Trang Bay (Vietnam). *Russian Journal of Marine Biology* 39:321–330.
342. Tseng CK, Lin CK, Chang HW, et al (2014) Aqueous extract of *Gracilaria tenuistipitata* suppresses LPS-induced NF- κ B and MAPK activation in RAW 264.7 and rat peritoneal macrophages and exerts hepatoprotective effects on carbon tetrachloride-treated rat. *PLOS ONE* 9:e86557.
343. Tuney I, Cadirci BH, Unal D, Sukatar A (2006) Locational and organic solvent variation in antimicrobial activities of crude extracts of marine algae from the Coast of Izmir (Turkey). *Fresenius Environmental Bulletin* 16:428–434.
344. Vallinayagam K, Arumugam R, Kannan RRR, et al (2009) Antibacterial activity of some selected seaweeds from Pudumadam Coastal regions. *Global Journal of Pharmacology* 3:50–52.
345. Van TTT, Hieu VMN, Vi TNH, et al (2013) Antioxidant activities and total phenolic content of macroalgae from central coast of Vietnam. *Asian Journal of Chemistry* 25:6639–6642.
346. Vanderlei E de SO, De Araújo IWF, Quinderé ALG, et al (2011) The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Inflammation Research* 60:1121–1130.
347. Vanitharani J, Thomas N, Jeyapraha L, et al (2013) Effect of chosen immunostimulant induced immunological changes in common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Theoretical and Experimental Biology* 10:1–20.
348. Vasanthi HR, Jaswanth A, Krishnaraj V, et al (2003) *In vitro* snake venom detoxifying action of some marine algae of Gulf of Mannar, South-east Coast of India. *Phytotherapy Research* 17:1217–1219.
349. Vijaya Sankar M AS (2015) *In-vitro* Screening of antidiabetic and antimicrobial activity against green synthesized AgNO₃ using seaweeds. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology* s6:S6 (1-5).
350. Vijayalakshmi S (2015) Screening for antibacterial activity of marine bacteria from seaweeds. *Science, Technology and Arts Research Journal* 4:185.
351. Vijayavel K, Martinez JA (2010) *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of two Hawaiian marine Limu: *Ulva fasciata* (Chlorophyta) and *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta). *Journal of Medicinal Food* 13:1494–9.
352. Vinoth S, Gurusaravanan P, Jayabalan N (2014) Optimization of somatic embryogenesis protocol in *Lycopersicon esculentum* L. using plant growth regulators and seaweed extracts. *Journal of Applied Phycology* 26:1527–1537.
353. Vinoth S, Gurusaravanan P, Jayabalan N (2012) Effect of seaweed extracts and plant growth regulators on high-frequency *in vitro* mass propagation of *Lycopersicon esculentum* L (tomato) through double cotyledonary nodal explant. *Journal of Applied Phycology* 24:1329–1337.
354. Vlachos V, Critchley ATT, Von Holy A (1997) Antimicrobial activity of extracts from selected southern African marine macroalgae. *South African Journal of Science* 93:328–332.
355. Vonthron-Sénécheau C, Kaiser M, Devambez I, et al (2011) Antiprotozoal activities of organic extracts from French marine seaweeds. *Marine Drugs* 9:922–33.
356. Widowati I, Lubac D, Puspita M, Bourgougnon N (2014) Antibacterial and antioxidant properties of the red alga *Gracilaria Verrucosa* from the North Coast of Java, Semarang, Indonesia. *International Journal of Latest Research in Science and Technology* 3:179–185.
357. Wongprasert K, Rudtanatip T, Praiboon J (2013) Immunostimulatory activity of sulfated galactans isolated from the red seaweed *Gracilaria fisheri* and development of resistance against white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. *Fish & Shellfish Immunology* 36:52–60.
358. Woo MS, Choi HS, Lee OH, Lee BY (2013) The Edible red Alga, *Gracilaria verrucosa*, inhibits lipid accumulation and ROS production, but improves glucose uptake in 3T3-L1 cells. *Phytotherapy Research* 27:1102–1105.

359. Xiancui L, Rongli N, Xiao F, et al (2005) Macroalgae as a source of alpha-glucosidase inhibitors. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 23:354–356.
360. Xu N, Fan X, Yan X, Tseng C (2004) Screening marine algae from China for their antitumor activities. *Journal of Applied Phycology* 451–456.
361. Yan X, Nagata T, Fan X (1998) Antioxidative activities in some common seaweeds. *Plant Foods for Human Nutrition* 52:253–262.
362. Yang J-I, Yeh C-C, Lee J-C, et al (2012) Aqueous extracts of the edible *Gracilaria tenuistipitata* are protective against H₂O₂-induced DNA damage, growth inhibition, and cell cycle arrest. *Molecules* 17:7241–54.
363. Yangthong M, Hutadilok-Tawatana N, Phromkunthong W (2009) Antioxidant activities of four edible seaweeds from the southern Coast of Thailand. *Plant Foods for Human Nutrition* 64:218–23.
364. Yegdaneh A, Ghannadi A, et al (2012) Acetylcholinesterase inhibitory activity of some seaweeds from Persian Gulf, Iran. *Research in Pharmaceutical Sciences* 7:775.
365. Yeh C, Huang H, Wu Y, et al (2015) Antioxidant potential of solvent partitioned extraction from aqueous extract of *Gracilaria Tenuistipitata*. *Current Organic Chemistry* 19:39–44.
366. Yeh C-C, Li K-T, Tang J-Y, et al (2016) Butanol-partitioned extraction from aqueous extract of *Gracilaria tenuistipitata* inhibits cell proliferation of oral cancer cells involving apoptosis and oxidative stress. *DNA and Cell Biology* 35:210–216.
367. Yeh C-C, Tseng C-N, Yang J-I, et al (2012) Antiproliferation and induction of apoptosis in Ca9-22 oral cancer cells by ethanolic extract of *Gracilaria tenuistipitata*. *Molecules* 17:10916–27.
368. Yeh C-C, Yang J, Lee J-C, et al (2012) Anti-proliferative effect of methanolic extract of *Gracilaria tenuistipitata* on oral cancer cells involves apoptosis, DNA damage, and oxidative stress. *BMC complementary and alternative medicine* 12:142.
369. Yeh ST, Chen JC (2009) White shrimp *Litopenaeus vannamei* that received the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* showed earlier recovery in immunity after a *Vibrio alginolyticus* injection. *Fish & Shellfish Immunology* 26:724–730.
370. Yeh ST, Li CC, Tsui WC, et al (2010) The protective immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* that had been immersed in the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* and subjected to combined stresses of *Vibrio alginolyticus* injection and temperature change. *Fish & Shellfish Immunology* 29:271–278.
371. Yeh ST, Lin YC, Huang CL, Chen JC (2010) White shrimp *Litopenaeus vannamei* that received the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* showed protective innate immunity and up-regulation of gene expressions after low-salinity stress. *Fish & Shellfish Immunology* 28:887–894.
372. Yi Z, Hai-sheng L (2002) Screening of agglutinins in marine algae from Fujian Coast of China. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 20:256–260.
373. Yi Z, Yin-shan C, Hai-sheng L (2001) Screening for antibacterial and antifungal activities in some marine algae from the Fujian coast of China with three different solvents. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 19:327–331.
374. Yildiz G, Dere E, Dere Ş (2014) Comparison of the antioxidative components of some marine macroalgae from Turkey. *Pakistan Journal of Botany* 46:753–757.
375. Yildiz G, Vatan Ö, Çelikler S, Dere Ş (2011) Determination of the phenolic compounds and antioxidative capacity in red algae *Gracilaria bursa-pastoris*. *International Journal of Food Properties* 14:496–502.
376. Yoshizawa Y, Tsunehiro J, Nomura K, et al (1996) *In vivo* macrophage-stimulation activity of the enzyme-degraded water-soluble polysaccharide fraction from a marine alga (*Gracilaria verrucosa*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 60:1667–1671.
377. Young-Beom P, In-Soo K, Sung-Jae Y, et al (1996) Elucidation of anti-tumor initiator and promoter derived from seaweed-1: antitumor promoting activity of seaweed extracts. *Journal of the Korean Fisheries Society* 29:917–919.

378. Yuvaraj N, Arul V (2014) Preliminary screening of anti-biofilm, anti-larval settlement and cytotoxic potential of seaweeds and seagrasses collected from Pondicherry and Rameshwaram Coastal Line, India. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 6:169–175.
379. Zandi K, Salimi M, Sartavi K (2007) *In vitro* antiviral activity of the red marine alga from Persian Gulf, *Gracilaria salicornia*, against herpes simplex virus type 2. *Journal of Biological Sciences* 7:1274–1277.
380. Zandi K, Tajbakhsh S, Nabipour I, et al (2010) *In vitro* antitumor activity of *Gracilaria corticata* (a red alga) against Jurkat and Molt-4 human cancer cell lines. *African Journal of Biotechnology* 9:6787–6790.
381. Zbakh H, Chiheb H, Bouziane H (2012) Antibacterial activity of benthic marine algae extracts from the Mediterranean coast of Morocco. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 2:219–228.
382. Zenteno-Savín T (2013) Antioxidant substances and trace element content in macroalgae from a subtropical lagoon in the West Coast of the Baja California Peninsula. *Vitamins & Trace Elements* 2:1–5.
383. Zhang W-W, Duan X-J, Huang H-L, et al (2006) Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao Coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from *Symphycladia latiuscula* (Rhodomelaceae). *Journal of Applied Phycology* 19:97–108.
384. Zubia M, Fabre MSMS, Deslandes E, et al (2009) Antioxidant and cytotoxic activities of some red algae (Rhodophyta) from Brittany Coasts (France). *Botanica Marina* 52:268–277.
385. Zubia M, Robledo D, Freile-pelegrin Y (2007) Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Applied Phycology* 19:449–458.

APÊNDICE II

Espectros de massas obtidos em CG-EM (capítulo II) dos principais metabólitos identificados em *Gracilaria caudata* e *Gracilaria domingensis* a partir de amostras derivatizadas .

Ácidos carboxílicos aromáticos:

Aminoácidos:

Aminoácidos:

Ésteres de ácidos graxos: **Esteróis:**

Ácidos graxos livres:

Ácidos dicarboxílicos: **Ácidos tricarboxílicos:**

Ácido sulfônico: **Alcaloide:** **Alcano:** **Glicerol:**

Heterosídeos: **Monossacarídeos:**

Terpenoides: **Vitaminas:**

Espectros de RMN para os extratos aquosos de *Gracilaria caudata*.

1) ESPECTRO DE RMN – ^1H

2) ESPECTRO DE RMN – ^{13}C

Espectros de RMN para os extratos aquosos de *Gracilaria domingensis*.

1) ESPECTRO DE RMN – ^1H

2) ESPECTRO DE RMN – ^{13}C