UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Patrícia Miranda da Silva

Atividades biológicas de extratos de algas marinhas brasileiras

Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto

São Paulo

Data de depósito na SPG:

08/12/2009

Patrícia Miranda da Silva

Atividades biológicas de extratos de algas marinhas brasileiras

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para a obtenção de título de mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientador: Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto

São Paulo

2009

Patrícia Miranda da Silva

Atividades biológicas de extratos de algas marinhas brasileiras

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para a obtenção de título de mestre em Ciências (Bioquímica).

Aprovada em: _____

Banca examinadora

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a): _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Sem Deus eu nada seria.

Ofereço este trabalho à minha família

pelo apoio e amor que foram

fundamentais em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pio Colepicolo, por ter acreditado em mim, pela paciência e por ter me dado oportunidade de crescimento pessoal e profissional durante estes anos de trabalho.

À Prof. Dra Eliane Marinho-Soriano, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, pelas coletas de *Gracilaria domingensis* e *birdiae* e pelas dicas e informações que me ajudaram a construir esta dissertação.

À Prof. Dra Maisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão, sua aluna Emiliane Pereira Laignier e o pessoal do laboratório de Bioquímica da UNIFAL pela cooperação nos ensaios em São Paulo e em Alfenas.

À Prof. Dra Ana Campa e suas alunas por terem compartilhado comigo o laboratório e seus conhecimentos.

Aos professores de qualificação Prof. Dr. Etevilno Bechara, Prof Dra Marisa H. G. Medeiros e Prof Dra Sayuri Miyamoto pelos aconselhamentos para a conclusão deste trabalho.

Aos meus pais que sempre estiveram ao meu lado em todas as minhas decisões, nos tempos difíceis e nos momentos bons.

Aos meus irmãos Thiago e Douglas que sempre me apoiaram e se preocuparam comigo.

Ao Giovane e Mariana, amigos para sempre, que me acompanharam durante toda esta empreitada e me ajudaram a seguir em frente.

Aos amigos que conheci por meio dos laboratórios do professor Pio e do professor Ernani: João, Renato, Aline, Fabi, Paulinha, Vanessa Gressler, Felipe, Karina, Ângela, Vanessa, Thais, Lígia, Anderson, Moacir.

Ao Diogo pela grande capacidade de transmitir conhecimento.

As amigas especiais que fiz durante os tempos da USP e que levarei no coração para sempre: Luíza, Érika, Sarinha e Ana Maria.

Aos amigos do Bergamo, pelo apoio e pelos bons tempos de convivência que não esquecerei.

Aos amigos do EMS pelo apoio e paciência para que eu pudesse concluir esta etapa da minha vida.

À Sandrinha que sempre me ajudou em tudo que precisei e proporcionou bons momentos durante as conversas que tínhamos.

Ao Ednailson por estar sempre pronto a me ajudar e pela amizade.

Ao pessoal da Seção de Pós-Graduação pelo ótimo atendimento.

Ao CNPq, Capes, Fapesp pelas bolsas e auxílios concedidos.

RESUMO

Silva, PM. Atividades Biológicas de extratos de algas marinhas. 2009. 78p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

As algas são fontes importantes de matérias-primas e compostos biologicamente ativos utilizados na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia. As macroalgas vermelhas marinhas *Gracilaria birdiae* e *Gracilaria domingensis* são abundantemente encontradas no litoral nordeste brasileiro e apresentam alto potencial biológico para o fornecimento de compostos utilizados na indústria.

Após o desenvolvimento e padronização da obtenção dos extratos e frações foram avaliadas as suas atividades antioxidante *in vitro* e *in vivo*, utilizando-se diferentes técnicas. *In vitro,* foram avaliadas a atividade sequestrante de radicais DPPH, a atividade sobre o sistema Luminol-HRP- H_2O_2, o poder redutor e atividade quelante de íons ferro. As frações mais apolares apresentaram-se mais ativas. Os efeitos sobre as funções de macrófagos humanos através de ensaios sobre a atividade de “burst” repiratório, observando-se um incremento da atividade dos macrófagos na presença da fração metanólica.

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada através da metodologia de determinação da concentração inibitória mínima sobre 4 espécies de bactérias gram-negativas sendo estas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumonae* ATCC 10231, *Salmonella typhi* ATCC 19430 e 4 microrganismos gram-positivos sendo *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49 619 , *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Enterococcus faecalis ATCC 29212.* Nenhuma das frações nem o extrato aquoso bruto apresentaram

capacidade de inibição do crescimento bacteriano nas concentrações testadas (1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/mL). O ensaio antifúngico contou com 2 espécies: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 29212. Apenas o extrato protéico apresentou atividade de inibição de crescimento das leveduras testadas.

Palavras-chave: algas, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, produtos naturais.

ABSTRACT

Silva, PM. Biological activities of extracts from brazilian marine algae. 2009. 78p. Masters Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Algae are important sources of raw material and biological active compounds used in pharmaceutical, cosmetic and food industries. Marine Brazilian red macroalge, *Gracilaria birdiae* e *Gracilaria domingensis,* are found in the Brazilian northeast coast and have high potential for industries.

The aim of this work was to evaluate the antioxidant activity of the extracts by different techniques such as DPPH scavenging activity, ROS generation by the Luminol-HRP-H_2O_2 system, reducing power determination and metal quelating activity. The most apolar fraction showed highest antioxidant activity.

The effects of methanolic fractions on mice macrophages oxidative burst were evaluated by luminol-enhanced chemiluminescence assay and an increment of the respiratory burst was observed.

Algae fractions and extracts were tested for antimicrobial assays led by determining the Minimum Inhibitory Concentration - MIC. Gram-negative bacteria tested were *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumonae* ATCC 10231 and *Salmonella typhi* ATCC 19430 and four Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49 619 , *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Enterococcus faecalis ATCC 29212.* None of the extracts and fractions showed activity against these microorganisms in the concentration of 1000 µg/mL. Two fungi species were tested: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida*

parapsilosis ATCC 29212. Only the protein extract was effective against the tested fungi species.

Keywords: algae, antioxidant activity, antimicrobial activity, natural products.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – Fração de acetato de etila

BHA – Butilhidroxianisol

BHT - Butilhidroxitolueno

BSA – Albumina de soro bovino

CAT – Catalase

CIM – Concentração Inibitória Mínima

DMSO – Dimetilsulfoxido

DTT - Ditiotreitol

DPPH – 1,1-difenil-1,2-picril hidrazil

EDTA – Etilenodiaminoacetato

ERN – Espécies reativas de nitrogênio

ERO – Espécies reativas de oxigênio

ESI – Ionização por “electronspray”

G6P – Glicose 6–fosfato

6PGD – Glicose 6-fosfato desidrogenase

6PGL – Glicono-δ-lactona 6-fosfato

GPX – Glutationa peroxidase

GSH – Glutationa – forma reduzida

GSSG – Glutationa – forma oxidada

GR – Glutationa redutase

GST – Glutationa S-transferase

HEX – Fração hexânica

HRP – Peroxidase de raiz forte

MDA – Malondialdeído

MeOH – Fração metanólica

MOPS – Acido morfolino propânosulfônico

MPO – Mieloproxidase

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2 il)2,5-difenil brometo de tetrazolina)

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

PBS – Tampão fosfato Salina

PMA – Acetato de forbol Miristato

PMN – Células polimorfonucleares

RPMI – Meio utilizado para realização de testes de sensibilidade de antifúngicos

SOD – Superxido dismutase

SPE – Extração em Fase Sólida

UFC – Unidade Formadora de Colônia

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO 1

1.1 ALGAS 2
1.1.1 ALGAS: FONTE DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS 3
1.1.2 ALGAS: ATIVIDADES BIOLÓGICAS 6
1.1.2 O GÊNERO *Gracilaria* 10

1.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO 14
1.2.1 ALVOS MOLECULARES DAS ERO 17
1.2.2 "BURST" OXIDATIVO 19
1.1.3 SITEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE 21

2. OBJETIVO 24

3. MATERIAIS E MÉTODOS 26

3.1 COLETA E METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO E ANÁLISE 27
3.1.1 Coleta das Macroalgas 27
3.1.2 Metodologia de extração e fracionamento 27
3.1.3 Obtenção de extrato aquoso 29

3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE 30
3.2.1 Atividade sequestrante de radicais DPPH 30

3.2.2 Sistema H_2O_2/luminol/HRP 31
3.2.3 Atividade quelante de íons ferro II 32
3.2.4 Poder redutor 33

3.3 Ação das frações metanólicas sobre o "Burst" oxidativo 34
3.3.1 Isolamento de macrófagos 34
3.3.2 Testes de viabilidade celular 34
3.3.3 Quimiluminescência 36

3.4 Atividade antibacteriana 37
3.4.1 Microrganismos 37
3.4.2 Preparo das amostras e das placas de microdiluição 37
3.4.3 Inóculo 38
3.4.4 Inoculação nas placas de microdiluição 38
3.4.5 Leitura e interpretação dos resultados 39

3.5 Atividade antifúngica 39
3.5.1 Microrganismos 39
3.5.2 Preparo do meio de cultura do ensaio – Meio RPMI 39
3.5.3 Preparo das amostras e das placas de microdiluição 40
3.5.4 Inóculo 40
3.5.5 Inoculação nas placas de microdiluição 41
3.5.6 Leitura e interpretação dos resultados 41

3.6 Determinação de compostos fenólicos totais 42

3.7 Determinação de proteínas solúveis totais 42

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 43

4.1 Atividade antioxidante das frações 44
4.1.1 Inibição do radical DPPH 44

4.1.2 Geração de ERO através do sistema luminol-HRP- H_2O_2 47

4.3 Atividade quelante de íons ferro II **51**

4.4 Poder redutor **52**

4.4 Ação das frações sobre o "burst" oxidativo **53**
4.4.1 Viabilidade celular 53
4.4.2 Ensaio de quimiluminescência 57

4.6 Atividade antibacteriana **59**

4.7 Atividade antifúngica **61**

4.8 Determinação de compostos fenólicos totais **62**

4.9 Determinação de Proteínas Solúveis **63**

5. PRINCIPAIS CONCLUSÕES **64**

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. **66**

7. SÚMULA CURRICULAR **74**

1. INTRODUÇÃO

1.1 ALGAS

As algas compõem uma multiplicidade de espécies que vão desde organismos unicelulares microscópicos a gigantes *kelps* (conjunto de grandes algas pardas). São seres fotossintetizantes, porém não possuem folhas, raízes ou mesmo tecidos vasculares. Elas habitam os oceanos, os corpos de água doce, os solos, as rochas e até as árvores (Van den Hoeck, 1995). As algas aquáticas exercem um papel ecológico importante semelhante ao das plantas nos *habitats* terrestres, pois são os produtores primários neste ambiente (Raven *et al*., 2007).

Este grupo de organismos possui diversas divisões e classes muitas vezes baseadas na coloração dos indivíduos (Van den Hoeck, 1995). As algas azuis ou cianofíceas, atualmente conhecidas como cianobactérias, representam os organismos procariontes cujas células não possuem núcleo definido, mitocôndrias, retículo endoplasmático ou plastídios (onde os tilacoides ficam dispersos no citoplasma). A sua cor azul-esverdeada característica tem sua origem nos pigmentos ficocianina e aloficocianina (Raven *et al*., 2007).

Os organismos eucariontes são representados por diversos filos onde podemos encontrar, por exemplo, Dinophyta (dinoflagelados), Bacillariophyta (diatomáceas) e Chrysophyta (crisófitas), entre alguns outros. As macroalgas estão inseridas em três filos principais: algas pardas, verdes e vermelhas (Van den Hoeck, 1995).

As algas pardas, pertencentes ao filo Phaeophyta, incluem as algas marinhas bentônicas mais presentes nas águas temperadas, boreais e polares. Existem pelo menos 1500 espécies descritas. Além das clorofilas *a* e *c*, os cloroplastos das algas pardas também contém vários carotenóides, incluindo a

fucoxantina, responsável pela cor característica aos membros desse filo (Raven *et al*., 2007).

As algas verdes (filo Chlorophyta) incluem pelo menos 17000 espécies descritas. Embora a maioria seja aquática, elas são encontradas em uma variedade de *habitats* tais como troncos de árvores, solo e em associações simbióticas com fungos (liquens), protozoários de água doce, esponjas e celenterados. Elas possuem clorofila *a* e *b* (como as briófitas e plantas vasculares) e uma grande variedade e quantidade de carotenóides. Assim como as plantas terrestres, estas algas são capazes de armazenar amido em seus cloroplastos (Raven *et al*., 2007).

As algas vermelhas, que representam o filo Rhodophyta, dominam as águas tropicais e quentes, mas também podem ser encontradas nas regiões mais frias do mundo. São predominantemente marinhas, sendo que apenas 100 espécies, das 4000 a 6000 estimadas, habitam os corpos de água doce. A cor verde da clorofila *a* é mascarada pelo pigmento acessório ficoeritrina que fica localizado no cloroplasto, característico deste filo, que dá a cor vermelha. Também podem ser encontrados, em menor quantidade os pigmentos ficocianina e aloficocianina. As algas vermelhas possuem clorofila a e d, diversos carotenóides e o principal material de reserva é amido, que está armazenado no citoplasma (Raven *et al.,* 2007).

1.1.1 ALGAS: FONTE DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

Mesmo com o desenvolvimento dos processos sintéticos para a obtenção de novas moléculas a partir do final do século XIX, os produtos naturais sempre exerceram papel importante na pesquisa de novos compostos farmacologicamente ativos. Este fato se deve a grande complexidade estrutural de alguns de seus

princípios ativos. Atualmente, grande porcentagem dos fármacos clinicamente viáveis e comercialmente disponíveis com atividade antitumoral e antiinfecciosa, por exemplo, têm sua origem em produtos naturais (Shu, 1998).

Os estudos com produtos naturais marinhos tornaram-se atrativos devido à presença de metabólitos secundários estruturalmente muito diferentes dos encontrados em plantas terrestres, com novos esqueletos carbônicos e com combinações de grupos funcionais pouco comuns (Simões *et al.*, 2004). Os mecanismos de adaptação dos organismos às condições ambientais como: alta intensidade luminosa, raios UV, extremos de temperatura, radiações ionizantes, poluentes e patógenos originaram uma grande diversidade estrutural de metabólitos secundários durante a sua evolução, com funções ecológicas diversas. Além disso, os oceanos, responsáveis por 70% da superfície terrestre, abrigam cerca de 200.000 espécies marinhas, entre plantas, animais e microrganismos, sendo muitas delas ainda não estudadas (Mayer e Hamann, 2005).

A investigação intensa de diversas espécies do habitat marinho sugere que o mesmo é uma fonte rica em compostos bioativos. Diversas ações biológicas já foram relatadas, tais como: antimicrobiana, antiinflamatória, anticoagulante, antivirais, antioxidantes, anticancerígena, entre outras (Mayer e Hamann, 2005; Blunt *et al*., 2006).

As algas apresentam a vantagem sobre os demais organismos marinhos de apresentarem uma maior facilidade de obtenção. Kobayashi (1989) relata a dificuldade de obtenção de quantidades adequadas de produtos naturais de interesse originados de outros organismos marinhos como, por exemplo, esponjas e ascídios, em razão da limitação de coleções. Além disso, as algas apresentam um

grande potencial para cultivo, o que tem atraído o interesse das indústrias em sua exploração (Gombotz e Wee, 1998)

As algas são organismos pertencentes a uma imensa variedade de nichos ecológicos e devido às mais diversas condições ambientais, a biossíntese de metabólitos secundários tornou-se uma estratégia de sobrevivência (Cardozo *et al*., 2007). Inúmeras atividades biológicas de algas foram relatadas na literatura incluindo atividades antioxidantes, antiinflamtórias, imunomodulatórias, antivirais e antimicrobianas, entre outras, demonstrando o potencial destes organismos (Smit, 2004).

As algas também são importante fonte de compostos essenciais para a nutrição humana. Em muitos países, a indústria alimentícia consome uma grande quantidade de algas bastante conhecidas por fornecerem grande quantidade de fibras, minerais, vitaminas e antioxidantes. Nas últimas décadas, observa-se um esforço no desenvolvimento do cultivo em larga escala em detrimento da exploração indiscriminada dos bancos naturais (Cardozo *et al*., 2007).

Os compostos mais explorados são ácidos graxos e esteróis, carotenóides, ficocoloides, lectinas, micosporinas tipo aminoácidos (MAA), compostos halogenados e policetídeos (Cardozo *et al*., 2007). A Figura 1 traz alguns exemplos de compostos dessas classes.

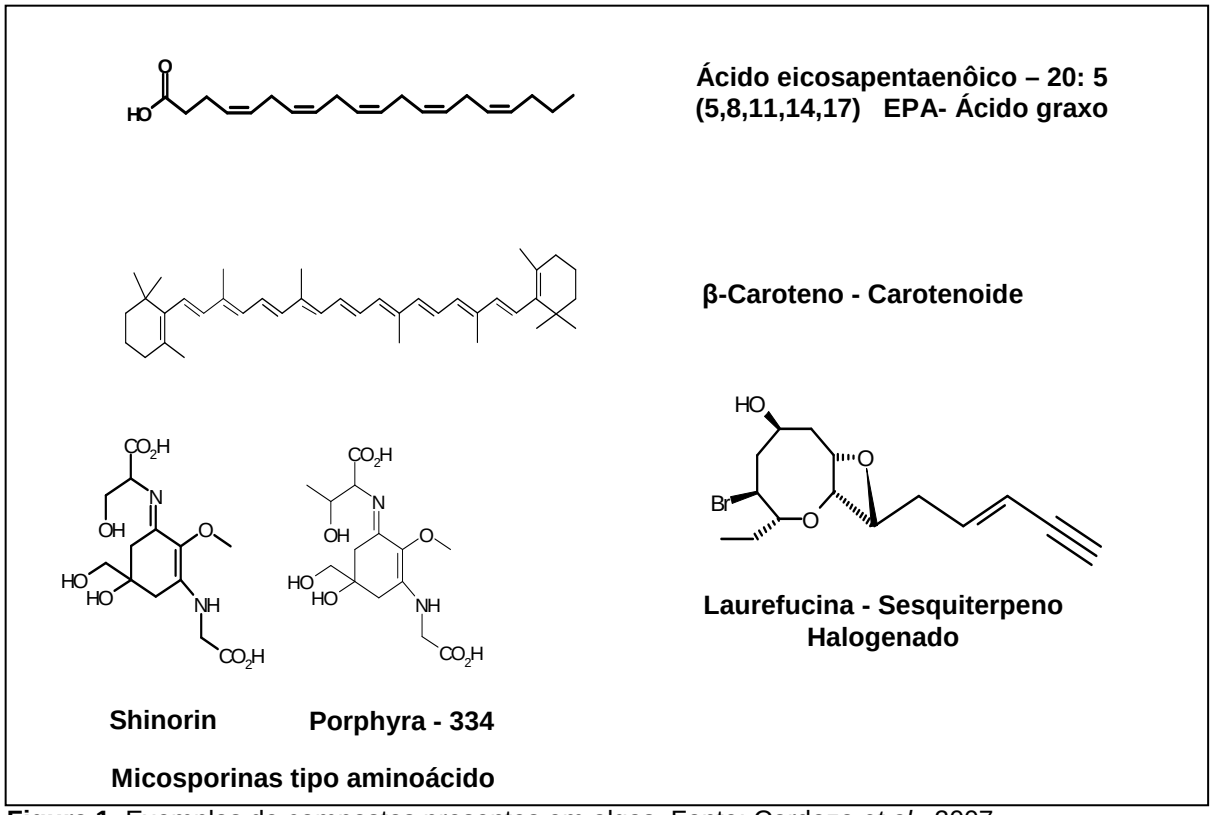


Figura 1. Exemplos de compostos presentes em algas. Fonte: Cardozo *et al*., 2007.

1.1.2 ALGAS: ATIVIDADES BIOLÓGICAS

1.1.2.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os primeiros interessados em verificar a atividade antioxidante de algas foram os japoneses com o objetivo de obter novos aditivos antioxidantes em alimentos em substituição aos antioxidantes sintéticos tais como o butilhidroxianisol (BHA) e do butilhidroxitolueno (BHT) que se mostravam carcinogênicos. Apesar do alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, muitas algas marinhas secas podem ser estocadas por longos períodos sem perigo de deterioração oxidativa. Este fato despertou o interesse de pesquisadores em relação ao mecanismo antioxidante presentes nas algas (Rocha, *et al*., 2007).

Zhang e colaboradores (2007) testaram 28 extratos algais e destacaram o extrato de acetato de etila da alga vermelha *Symphyocladia latiuscula* como sendo o mais ativo nos ensaios de capacidade de inibição do radical DPPH e do Sistema β-caroteno-linoleato. Também foram determinados o conteúdo de compostos fenólicos e a capacidade redutora dos extratos dessas algas.

Zubia e Robledo (2007) realizaram o estudo da capacidade antioxidante frente a vários ensaios de extratos de 48 macroalgas marinhas encontradas no litoral do México (17 Clorófitas, 8 Pardas e 23 vermelhas). A alga parda *Lobophora variegata*, a alga verde *Avrainvillea longicaulis* e a alga vermelha *Chondria baileyana* destacaram-se como as mais ativas através do método de DPPH. A capacidade antioxidante destas algas equiparou-se a de antioxidante comerciais importantes como BHT, BHA, α-tocoferol e ácido ascórbico.

Muitas classes de compostos foram identificados como sendo responsáveis pela atividade antioxidante como meroditerpenoides e florotaninos (estes presentes em algas pardas) (Foti, *et al.*, 1994 e Yan *et al.*, 1996), carotenoides (Le Tutuor, 1998), polissacarídeos hidrossolúveis (Xue *et al.*, 1998), compostos fenólicos (Zhang, 2007 e Zubia e Robledo, 2007).

Embora a literatura demonstre um alto potencial para fornecimento de substâncias antioxidantes das algas marinhas, evidenciado pelo grande número de publicações a esse respeito, existem poucos estudos publicados relatando a potencialidade das algas brasileiras

Raymundo e colaboradores (2004) determinaram a atividade antioxidante *in vitro* de algumas macroalgas verdes do litoral catarinense e chegaram à conclusão de que compostos fenólicos, carotenóides e clorofilas foram abundantemente

encontrados nas espécies analisadas, relacionando estes compostos à atividade antioxidante encontrada.

Recentemente, muitos artigos descreveram a atividade antiinflamatória de extratos ou mesmo de moléculas já isoladas de algas. Guzmán e colaboradores (2001) relataram atividade antiinflamatória, analgésica e antioxidante de extratos aquosos das microalgas *Chlorella stigmatophora* e *Phaedactylum tricornutum.* O mesmo grupo estudou a atividade antiinflamatória e imunomodulatória de polissacarídeos extraídos dessas mesmas algas (Guzmán *et al.*, 2003).

Okai e Higashi-Okai (1997) avaliaram a ação antiinflamatória da feofitina, uma substância relacionada à clorofila derivada da alga verde comestível *Enteromorpha prolifera,* muito comum no Japão. Em estudos anteriores, esta substância, bem como a pirofeofitina, já haviam demonstrado capacidade antioxidante (Cahyana *et al*.,1992).

Romay e colaboradores (1998a e 1998b) estudaram as propriedades antioxidantes e antiinflamatórias do pigmento C-ficocianina presente em cianobactérias e mais tarde Reddy e colaboradores (2003) descreveram o mecanismo de ação antiinflamatório da C-ficocianina.

1.1.1.2 ATIDADE ANTIMICROBIANA

Os últimos anos registram o aparecimento de microrgansimos cada vez mais resistentes aos antimicrobianos existentes. Este fato denota a necessidade constante de pesquisa e desenvolvimento de novas substâncias biologicamente ativas (Raffa *et al*., 2005).

As algas são potenciais fontes de substâncias antibacterianas e antifúngicas. Os primeiros relatos da atividade antibiótica de compostos provenientes de algas datam da segunda década do século XX (Khaleafa *et al*., 1975).

Del Val e colaboradores (2001) e Hellio e colaboradores (2000) realizaram estudos sobre a atividade antimicrobaina de uma grande variedade de macroalgas pertencentes aos três grandes grupos (algas verdes, pardas e vermelhas). Estes autores demonstraram que a capacidade de síntese de compostos antimicrobianos não se restringe a apenas um grupo de algas.

A literatura relata a existência de compostos antimicrobianos de estruturas variadas como policetídeos, florotaninos, terpenos halogenados, aglutininas, etc., encontrados não somente em macroalgas, mas também em microalgas eucarióticas e cianobactérias (Findlay e Patil,1984; Bennamara *et al.*, 1999; König *et al.*, 1999; Nagayama *et al.*, 2002; Khaleafa *et al.*, 1975).

Vairappan e colaboradores (2004) demonstraram a atividade antibacteriana de oito compostos halogenados isolados de cinco espécies da alga vermelha *Laurência*. Estes compostos apresentaram amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas, inclusive cepas resistentes aos antibióticos vigentes mais utilizados tais como penicilina e vancomicina.

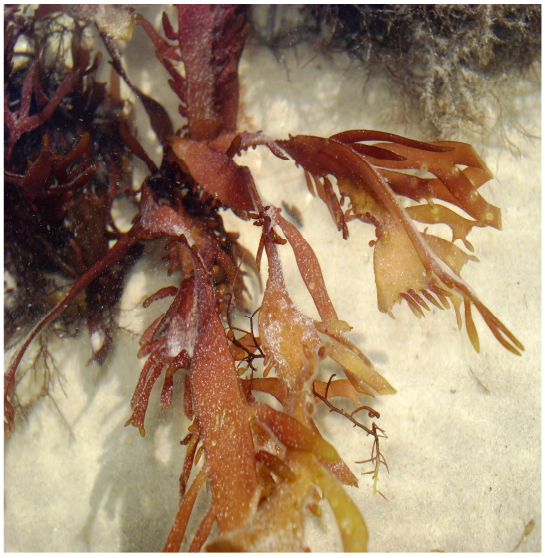
A maioria dos estudos foi realizada a partir de extratos orgânicos tais como metanólicos, acetônicos, etéreos, cloroformicos (Cordeiro *et al.*, 2006), porém pesquisadores brasileiros demonstraram a atividade antifúngica de extratos protéicos de algas vermelhas. Mello e colaboradores (1997) e Cordeiro e colaboradores (2006) avaliaram as propriedades antifúngicas de proteínas (aglutininas) da alga vermelha *Hypnea musciformis* revelando resultados promissores.

1.1.2 O GÊNERO *Gracilaria*

O filo Rhodophyta é a fonte mais importante e mais estudada de compostos secundários devido a sua maior variedade e raridade estruturais. Entre os compostos característicos encontram-se os compostos halogenados voláteis, acetogeninas halogenadas, monoterpenos halogenados, sesquiterpenos halogenados e não halogenados, fenóis halogenados e indois halogenados (Simões *et al.*, 2004).

As algas vermelhas possuem algumas diferenças em relação às outras algas eucarióticas, como ausência de estágios flagelados, presença de ficobilinas e clorofila d, tilacóides não agregados nos cloroplastos e reprodução sexuada oogâmica envolvendo células femininas (carpogônio) e masculinas (espermácio) (Van den Hoeck, 1995 citado por Lhullier *et al.,* 2006). Estas características poderiam estar associadas a um maior estágio evolutivo e consequentemente a produção de metabólitos secundários diversificados (Lhullier *et al.*, 2006).

As duas macroalgas vermelhas estudadas neste trabalho, *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira e *Gracilaria domingensis* (Sonder ex Kützing) Dickie (Figura 2), apresentam a seguinte classificação biológica: divisão Rhodophyceae, classe Florideophyceae e ordem Gracilariales. A alga vermelha *Gracilaria domingensis* é uma espécie comumente encontrada na costa brasileira, ocorrendo desde o litoral do Estado do Ceará até Santa Catarina (Oliveira, 1998), frequentemente em associação com outras espécies de *Gracilaria* na zona intertidal (Guimarães *et al*., 2003). A alga *Gracilaria domingensis* também é utilizada como alimento *in natura* na dieta humana, sendo coletada e exportada para o mercado alimentício japonês (Oliveira, 1998).



Gracilaria domingensis **(Kützing) Sonder ex Dickie**

Gracilaria birdiae **Plastino & Oliveira**

Figura 2. As duas macroalgas estudadas, *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira e *Gracilaria domingensis* (Sonder ex Kützing) Dickie.

Atualmente, a principal atividade econômica relacionada a estas duas algas é a exploração de ágar, um ficocolóide de alto valor econômico.

Os principais ficocolóides extraídos de algas são ágar, carragenana, e alginato (Figura 3). Ficocolóides são polissacarídeos de alto peso molecular compostos por polímeros de açúcar. São os principais componentes estruturais da parede celular das algas (Cardozo, *et al.*, 2007).

Ágar e carragenana (presentes em macroalgas vermelhas) são polissacarídeos sulfatados. O alginato (extraído de algas pardas) é um poliuronídeo binário constituído pelo ácido manurônico e ácido gulorônico (Cardozo, *et al.*, 2007). Estes compostos são muito importantes economicamente devido a sua capacidade geleificante, viscosificante e emulsificante. A sua maior utilidade encontra-se na indústria de alimentos, de papel, têxtil, cosmética, farmacêutica e biotecnológica (Jensen, 1993; Mchugh, 2003).

Atualmente, o gênero Gracilaria é a principal fonte de ágar (Armisen e Galactas, 1987).

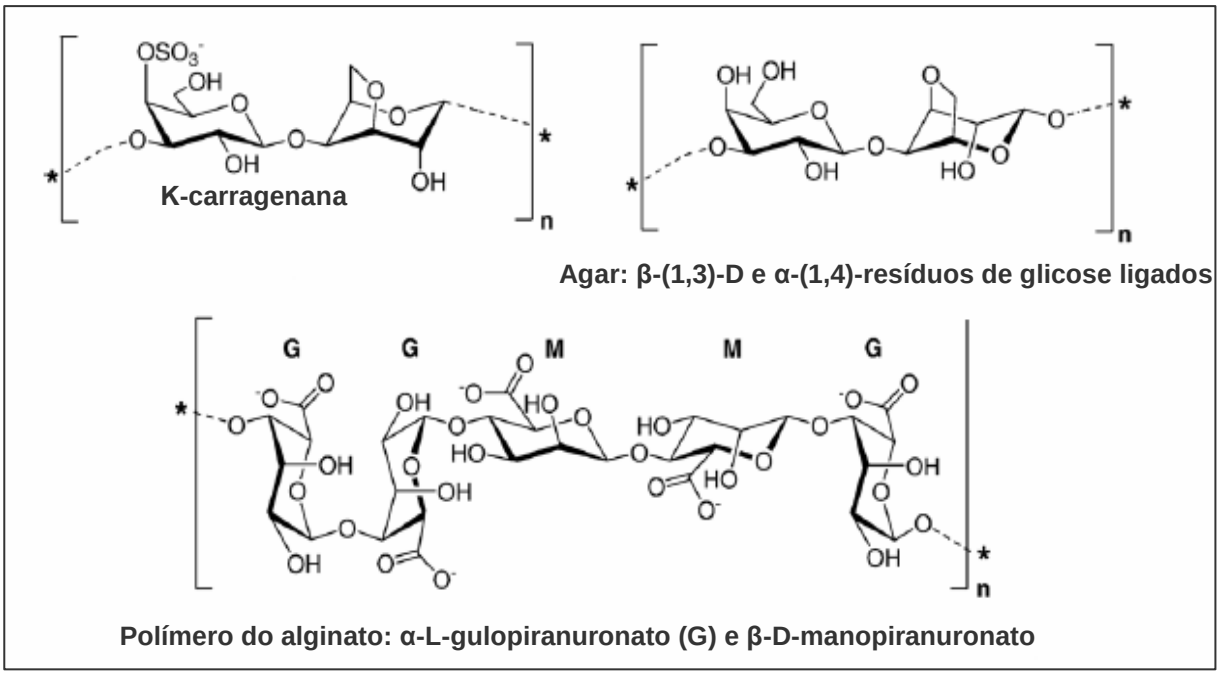


Figura 3. Estruturas moleculares: carragena, ágar e alginatos. Fonte: Cardoso, *et al.*, 2007 (a).

Apesar do mercado de ficocolóides movimentar bilhões de dólares anualmente, somente Chile, Taiwan e Nanímibia alcançaram sucesso nas técnicas de cultivo de algas do gênero *Gracilaria* (Macchiavello, 1999).

A China, Coréia e Japão são os maiores consumidores e também produtores de algas do mundo. Grande parte dessa produção se concentra em algas utilizadas na alimentação humana como as algas pardas *Laminaria* e *Undaria* e a alga vermelha *Porphyra*. Em outros países, como na Malásia ou mesmo Brasil, o consumo de algas na alimentação se restringe às populações das áreas costeiras (Critchley, 1997).

Além dos ficocolóides, existem estudos demonstrando que várias espécies de algas podem ser fontes significativas de proteínas, vitaminas e minerais essenciais para a nutrição humana. Elas também são ricas em fibras e apresentam baixas calorias.

Nesse sentido, algas do gênero *Gracilaria* também vêm sendo estudadas, com relação às aplicações de seus compostos. Norziah e Ching (2000) estudaram a composição de aminoácidos, concentração de β-caroteno, Vitamina A e ácidos graxos livres de *Gracilaira changgi*. Wen e colaboradores (2006) estudaram além dos nutrientes anteriormente citados, os níveis de vitamina C, E B2 e minerais essenciais como cálcio, ferro, manganês, zinco, cobre, fósforo selênio e iodo de *Gracilaria lemaneiformis*.

As algas são uma importante fonte de uma grande variedade e quantidade de carotenóides. A literatura relata a presença de carotenóides, principalmente β-caroteno, em macroalgas do gênero *Gracilaria* (Pinto, 2002).

Dotados de conhecida atividade antioxidante, os carotenóides são caracterizados estruturalmente por uma longa cadeia de duplas ligações conjugadas. São divididos em dois grupos: os carotenos que são constituídos por apenas carbono e hidrogênio e as xantofilas que contém um ou mais grupos funcionais como hidroxila, carbonila, éter, acetato e epóxido (Neto, 2007).

Em algas e plantas superiores, estes compostos exercem papéis múltiplos e essenciais na fotossíntese. Funcionam como pigmentos antena transferindo a energia absorvida para clorofilas e destas em direção aos centros de reação fotoquímicos. Mantém a estrutura e função dos complexos fotossintéticos, funcionam como quencher de clorofilas no estado triplete, scanvager de ERO. Quando as vias fotossintéticas estão saturadas, a energia em excesso é transferida para estes fotopigmentos e a dissipam na forma de calor (Del Campo *et al.*, 2007).

Ultimamente o gênero *Gracilaria* também se apresenta como importante fonte de diferentes substâncias interessantes. Cardozo e colaboradores (2006) apresentaram estudos de caracterização estrutural de compostos com alta absorção

na região do ultravioleta, os micosporinas tipo aminoácidos (MAA) (cujos exemplos de estruturas encontram-se na Figura 3 isoladas a partir de *Gracilaria tenuistipitata* Chang e Xia.

Cardozo (2007) demonstrou resultados interessantes para *Gracilaria domingensis* e *Gracilaria birdiae.* As MAA são compostos polares de baixo peso molecular (< 400 $g.mol^{-1}$) e apresentam absorção máxima entre 310 e 360 nm. Sugere-se que estes compostos conferem proteção contra a radiação ultravioleta na região de UVA e UVB. Estas características tornam estas moléculas potenciais componentes de filtros solares de grande interesse para a indústria farmacêutica.

1.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Um radical livre é definido como uma espécie de existência independente que contém um ou mais elétrons desemparelhados sozinhos num orbital atômico ou molecular. Assim, os radicais livres podem ser formados pela adição ou perda de um elétron de uma espécie não-radicalar. Porém, existem compostos igualmente reativos que não possuem elétron desemparelhado na última camada (Halliwell, 1996).

Reações de oxidação e redução são essenciais no metabolismo normal de todos os seres vivos. As células são as menores entidades biológicas capazes de obter energia do ambiente e convertê-la numa forma biologicamente utilizável, o ATP, essencial para a manutenção dos processos vitais. Neste processo, o oxigênio é o aceptor final dos elétrons provenientes dos nutrientes e coletados sob a forma de NADH e $FADH_2$ através de reações redox. Estes elétrons são transportados por uma série de complexos multiprotéicos até o complexo da citocromo c oxidase e

entregues ao oxigênio. Durante este processo, prótons são bombardeados para o espaço intermembranas da mitocôndria, gerando energia para a síntese de ATP. Porém, elétrons podem escapar de determinados sítios (Complexo I e coenzima Q) provocando a redução univalente de O_2 (Augusto, 2006).

Estima-se que cerca de 0,1 a 1% do O_2 utilizado durante a respiração mitocondrial forme $O_2^{\bullet-}$ devido ao escape de elétrons dos complexos que compõem a cadeia respiratória conforme mostra a Figura 4 (Augusto, 2006).

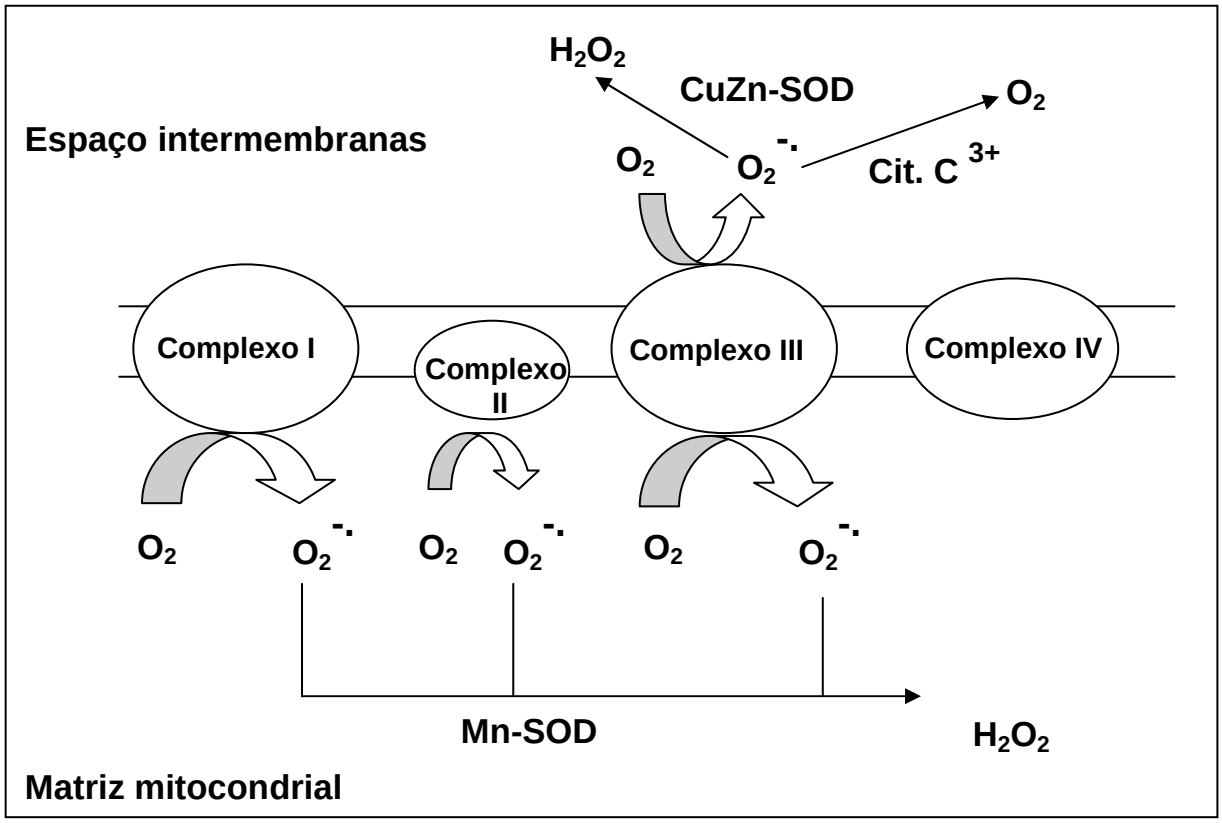


Figura 4. Formação de espécies reativas de oxigênio na cadeia de transporte de elétrons. Modificado de Cerqueira *et al.*, 2007.

As espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são termos que abrangem todas as formas reativas do oxigênio e nitrogênio, incluindo radicais e não-radicais que participam da iniciação e progressão das reações em cadeia envolvendo a formação de espécies radicalares (Cerqueira *et al.*, 2007).

As principais ERO são as radicalares: oxigênio (O_2), ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($HO^{\bullet}$), radical peroxila orgânico ($ROO^{\bullet}$), radical alcoxila ($RO^{\bullet}$) e radical hidroperoxila ($HOO^{\bullet}$). As não-radicalares: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete $^1\Delta g$ O_2, ozônio (O_3) e ácido hipocloroso (HOCl). Estão classificadas entre as ERN, o óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (Halliwell e Gutteridge, 2006).

A reatividade destes compostos com biomoléculas é variável, sendo alguns estáveis e pouco reativos, como por exemplo, o $O_2^{\bullet-}$ ou o próprio O_2 ($k = 10^1\ M^{-1}\ s^{-1}$) e outros altamente reativos, como $HO^{\bullet}$, ($k \sim 10^9\ M^{-1}\ s^{-1}$) (Augusto, 2006).

Além da respiração mitocondrial, existem outras fontes de espécies reativas. Inúmeras oxigenases e monoxigenases e outras moléculas consomem de 10 a 15% do O_2 presentes em células aeróbias. São exemplos: as enzimas D-aminoácido-oxidase (utiliza O_2 para oxidar D-aminoácidos), a xantina oxidase (oxida xantina a ácido úrico), tirosina hidroxilase que é responsável pela síntese de epinefrina e noraepinefrina e enzimas do sistema citocromo P450 (ativas no metabolismo de xenobióticos). As células de defesa do organismo, os fagócitos (neutrófilos, macrófagos, eosinófilos), produzem grandes quantidades de $O_2^{\bullet-}$ ajudando no combate a microrganismos invasores (Halliwell, 1996, Halliwell e Gutteridge, 2006, Augusto, 2006).

Embora o $O_2^{\bullet-}$ não atravesse as membranas biológicas e tenha velocidade de reação muito baixa com biomoléculas, ele pode reagir com outros radicais e com grupamentos ferro-enxofre de proteínas (Halliwell e Gutteridge, 2006).

O $O_2^{\bullet-}$ pode ser espontaneamente decomposto a O_2 e H_2O_2 ou, preferencialmente no meio celular, através da catálise enzimática pela enzima superóxido dismutase (Halliwell, 1996).

O H_2O_2 é pouco reativo, porém é uma molécula difusível entre membranas. O H_2O_2 também pode ser gerado por diversas enzimas como xantina, urato e aminoácido oxidases. Reagindo com $O_2^{\bullet-}$, origina $HO^{\bullet}$ através da reação de Fenton (Figura 5).

$$O_2^{\bullet-} + Fe\ (III) \longrightarrow Fe\ (II) + O_2$$

$$Fe\ (II) + H_2O_2 \longrightarrow OH^{\bullet} + OH^{-} + Fe\ (III)$$

Figura 5. Reação de Fenton

O radical $HO^{\bullet}$ é o mais deletério ao organismo devido a sua alta reatividade ($k \sim 10^9\ M^{-1}\ s^{-1}$). Além da reação de Fenton, este radical também pode ser gerado pela fissão homolítica de H_2O_2 induzida por radiação UV ($H\text{-}O\text{-}O\text{-}H \xrightarrow{UV} 2HO^{\bullet}$). Este radical frequentemente ataca moléculas por abstração de hidrogênio, adição a insaturações ou compartilhamento de elétrons (Barreiros e David 2006).

1.2.1 ALVOS MOLECULARES DAS ERO

A interação de ERO com diversas macromoléculas pode levar ao mal funcionamento de organelas e influenciar diretamente a viabilidade celular e levar a morte celular.

Os ácidos graxos poliinsaturados são os alvos mais importantes das ERO devido à sua abundância nas células e sua susceptibilidade pela presença de grupos metilênicos entre duplas ligações. A peroxidação lipídica resulta do ataque á bicamada lipídica de qualquer substância capaz de abstrair um átomo de hidrogênio bis-alílico de um ácido graxo poliinssaturado, tais como $HO^{\bullet}$, $HO_2^{\bullet}$, $^{\bullet}NO_2$, $RO^{\bullet}$ e $RO_2^{\bullet}$.

Quanto maior o número de duplas ligações maior a facilidade de remoção do hidrogênio (Halliwell e Chirico, 1993).

A peroxidação de ácidos graxos pode induzir à conversão de vários deles em hidroperóxidos por reações em cadeia. Os hidroperóxidos também podem gerar produtos não radicalares menos reativos como aldeídos, cetonas e epóxidos que podem atingir pontos mais distantes do local em que se formaram (Loureiro *et al*., 2002). Estes podem se ligar covalentemente a grupos nucleofílicos presentes em DNA, peptídeos e proteínas, provocando alterações nas funções dessas moléculas (Figura 6).

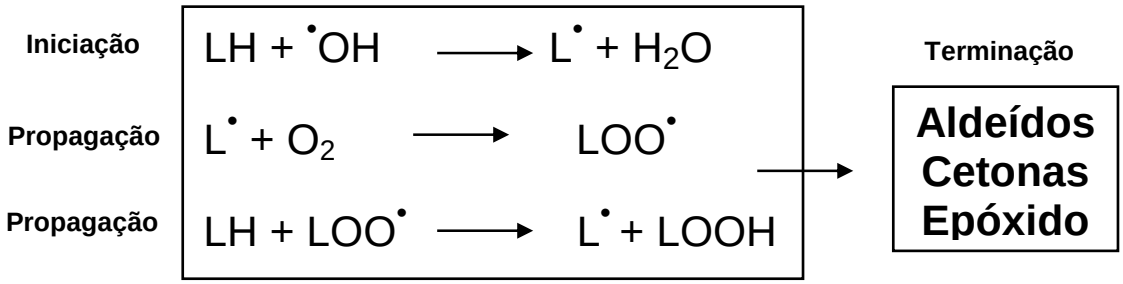


Figura 6. Representação das fases da peroxidação lipídica. (LH: ácido graxo insaturado; L•: radical lipídico; LOO•: radical peroxila e LOOH: hidroperóxido lipídico)
Modificado de Guaratini *et al.*, 2007).

A lipoperoxidação em membranas biológicas leva a perda das funções da membrana celular, mudanças na fluidez, inativação de receptores de membrana e enzimas e o aumento da permeablidade celular a íons, táis como Ca^{+2} (Halliwell e Chirico, 1993).

O DNA pode ser danificado por inúmeras fontes tais como, ERO e ERN, produtos da peroxidação lipídica, radiação UV, radiação iononizante, radioisótopos de ocorrência natural e muitas substâncias químicas genotóxicas presentes naturalmente ou como contaminantes na dieta e no ar (Loureiro, 2002). Essas lesões podem ocorrer devido à oxidação direta dos ácidos nucléicos, que podem

levar à formação de quebras das cadeias do DNA, ou devido à formação de adutos com outras moléculas como aldeídos, cetonas e epóxidos (Berra, 2006; Loureiro, 2002). Modificações no DNA são potencialmente mutagênicas, contribuindo para o câncer, envelhecimento e doenças neurodegenerativas.

Os produtos de oxidação de guanina são encontrados em maior número, em relação aos de outras bases, devido ao baixo potencial de oxidação desta. A oxidação de guanina resulta na formação de 7,8-diidro-8-oxoguanina (8-oxo-G) que é produzida abundantemente in vivo e é utilizada como biomarcador do dano oxidativo (Kim *et. al*., 2004). Esta modificação leva a transversões G → T, muito encontradas em genes supressores de tumor e proto-oncogenes mutados (Loureiro, 2002).

O dano a proteínas pode ocorrer pelo ataque direto de ERO/ERN ou por produtos da lipoperoxidação, por exemplo, como o MDA. Estes danos podem levar a inativação de enzimas, receptores de membrana e proteínas transportadoras (Halliwell e Gutteridge, 2006).

1.2.2 "BURST" OXIDATIVO

O processo inflamatório é um elaborado sistema de defesa nos quais os fagócitos (PMN, eosinófilos e fagócitos mononucleares) são os principais responsáveis (Babior, 2000). Este processo fisiológico pode ser desencadeado por agentes biológicos, químicos ou físicos, sendo dividido em inflamação aguda e crônica (Mizel e Jarret, 1985).

Os PMN são as primeiras células a migrarem para o foco inflamatório (Burg e Pillinger, 2001). Quando o fator lesivo não é eliminado ocorre o recrutamento de

monócitos circulantes, que se infiltram na área lesada e diferenciam-se em macrófagos, caracterizando a inflamação crônica (Mizel e Jarret, 1985; Camarero *et al*., 1990).

Os macrófagos desempenham importante papel na resposta imune inata e específica. Sua principal função é fagocitar partículas estranhas, sejam elas micróbios, macromoléculas, antígenos ou mesmo os próprios tecidos que foram injuriados ou estão mortos. Além disso, eles produzem citocinas que recrutam outras células inflamatórias, aumentando assim a resposta inflamatória (Abbas, 1993).

Durante o engolfamento de material particulado ou quando estimulados por uma variedade de compostos, os fagócitos utilizam-se de dois mecanismos distintos para a destruição do invasor. Inicialmente ocorre a produção de ERO (mecanismo oxidativo). Em seguida há a liberação de proteínas digestivas e microbicidas (mecanismo não-oxidativo) no fagossoma que incluem lisozima, proteases e proteínas geradoras de canais em membranas bacterianas. O mecanismo microbicida oxidante de fagócitos ocorre através de uma produção abrupta de ERO no fagossoma, através de um sistema denominado NADPH oxidase, no qual a primeira dessas espécies formadas é o ânion superóxido (Sbarra e Karnovisk, 1959).

Este evento induz um aumento exacerbado do consumo de oxigênio molecular (não relacionado à respiração celular), aumento da velocidade da via de hexose-fosfato e mudança do potencial de membrana é denominado “burst” oxidativo (Babior, 1984). Tal mecanismo ocorre de acordo com a seguinte estequiometria:

$$NADPH + 2O_2 \xrightarrow{\text{NADPH oxidase}} NADP^+ + 2O_2^{\bullet -} + H^+$$

O $O_2^{\bullet-}$ sofre reações subseqüentes que levam a formação de ERO mais eficientes como microbicidas. No fagossoma, o $O_2^{\bullet-}$ sofre dismutação, resultando na produção de H_2O_2 que é um potente oxidante para várias espécies de bactérias devido a sua alta permeabilidade a membranas. Através da reação de Fenton, na presença de metais como Fe^{+2} ou Cu^{+2}, o H_2O_2 origina $HO^{\bullet}$. O $O_2^{\bullet-}$ pode ainda, sofrer protonação em meio ácido, originando a forma altamente reativa $HO_2^{\bullet}$. O óxido nítrico ($^{\bullet}NO$), também é produzido por PMN e macrófagos, no fagossoma, através da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) tem a capacidade de causar a morte de diferentes microrganismos (Haliwell e Gutteridge, 2006).

Os fagócitos também contam com a ação da enzima mieloperoxidase (MPO), presente no cistoplasma. Em presença de H_2O_2, esta enzima catalisa a formação de HClO (ácido hipocloroso), conferindo alto poder microbicida às células de defesa (Babior, 1984).

1.1.3 SITEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE

Em organismos aeróbicos saudáveis, a produção de ERO é aproximadamente balanceada com os sistemas de defesa antioxidante (Halliwell, 2007). O estresse oxidativo resulta do aumento da concentração das ERO devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes levando à injúria ou mesmo à morte celular. Acredita-se que o estresse oxidativo contribua efetivamente com doenças relacionadas ao envelhecimento como aterosclerose, doenças neurodegenerativas, artrite reumatóide, diabetes e câncer (Halliwell e Whiteman, 2004).

Segundo Halliwell e Gutteridge (2006), um antioxidante é qualquer substância que atrasa, previne ou remove o dano oxidativo de uma molécula alvo.

Os organismos se valem de diversos mecanismos enzimáticos e não enzimáticos para se defenderem dos danos oxidativos. Enzimas como a superóxido dismutase (SOD) que remove o $O_2^{\bullet-}$ através da aceleração de sua dismutação em O_2 e H_2O_2 e a catalase (CAT), por sua vez, converte H_2O_2 em H_2O e O_2 (Halliwell, 1996).

Outra enzima que atua na remoção de H_2O_2 é a enzima glutationa peroxidase (GPX). Na presença de H_2O_2, a molécula da glutationa (GSH) é oxidada a GSSG pela ação da GPX (Babior, 1997). A glutationa reduzida é regenerada pela ação da enzima glutationa redutase (GR) com gasto de NADPH. O NADPH pode ser gerado por diversas rotas metabólicas, sendo particularmente relevante a via das pentoses através da conversão de glicose 6-fosfato (G6P) a Glicono-δ-lactona 6-fosfato (6PGL) pela enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD). A GSH também está envolvida na detoxificação de eletrófilos endógenos e exógenos (X) através da conjugação via glutationa-S-transferases (GST). Estes conjugados, bem como a própria GSH podem ser transportados para fora da célula (Maher, 2006). GSH também está envolvida metabolismo de lipoperóxidos e é uma potente sequestradora de alguns ERN como o $ONOO^-$ (Halliwell, 1996). A figura 7 representa o metabolismo da GSH.

Dentre os antioxidantes biológicos de baixo peso molecular, podem ser destacados os de origem endógena como GSH, a bilirrubina e o ácido úrico. Os de origem exógena de destaque são carotenóides, tocoferóis e o ácido ascórbico (vitamina C) (Babior, 1997).

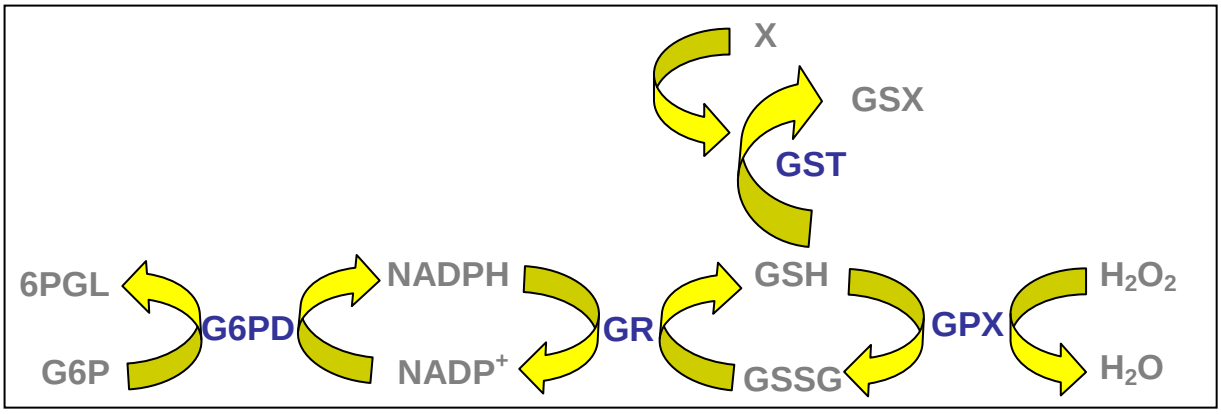


Figura 7. Metabolismo da Glutationa.
Modificado de Maher, 2006.

2. OBJETIVO

Devido a evidências da potencialidade das macroalgas da costa brasileira serem importantes organismos sintetizadores de compostos secundários bioativos, os objetivos deste trabalho foram:

- padronização da metodologia de extração e obtenção de frações;
- determinação da atividade antioxidante das frações obtidas por diferentes técnicas;
- realização de ensaios de viabilidade celular de macrófagos na presença das frações HEX, AC e MeOH
- Estudo da ação das frações sobre o “burst” oxidativo;
- realização de ensaios antimicrobioanos através da metodologia de Concentração Inibitória Mínima.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA E METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO E ANÁLISE

3.1.1 Coleta das Macroalgas

Foram utilizadas as macroalgas vermelha marinha *G. domingensis* e *G. birdiae* obtidas diretamente do mar coletadas na praia do Cotovelo, em Natal-RN, em colaboração com a Profa. Dra. Eliane Marinho-Soriano, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Departamento de Oceanografia e Limnologia). As algas foram congeladas em freezer e posteriormente levadas em gelo seco ao Instituto de Química da USP e armazenadas em freezer -20℃ até a realização dos ensaios.

3.1.2 Metodologia de extração e fracionamento

A alga foi descongelada, lavada com água destilada e seca em papel absorvente. Após este processo, ela foi triturada em nitrogênio líquido e submetida ao processo de liofilização por aproximadamente 48 horas. À massa algal seca foi adicionado etanol absoluto a uma proporção de 10 mL por grama da alga seca. O macerado em presença do solvente foi acondicionado em um shaker em temperatura ambiente por 24 horas. A extração foi repetida por 4 vezes. O extrato bruto etanólico foi filtrado em papel Watman e concentrado em *speed vac.* O processo de extração está representado na figura 8.

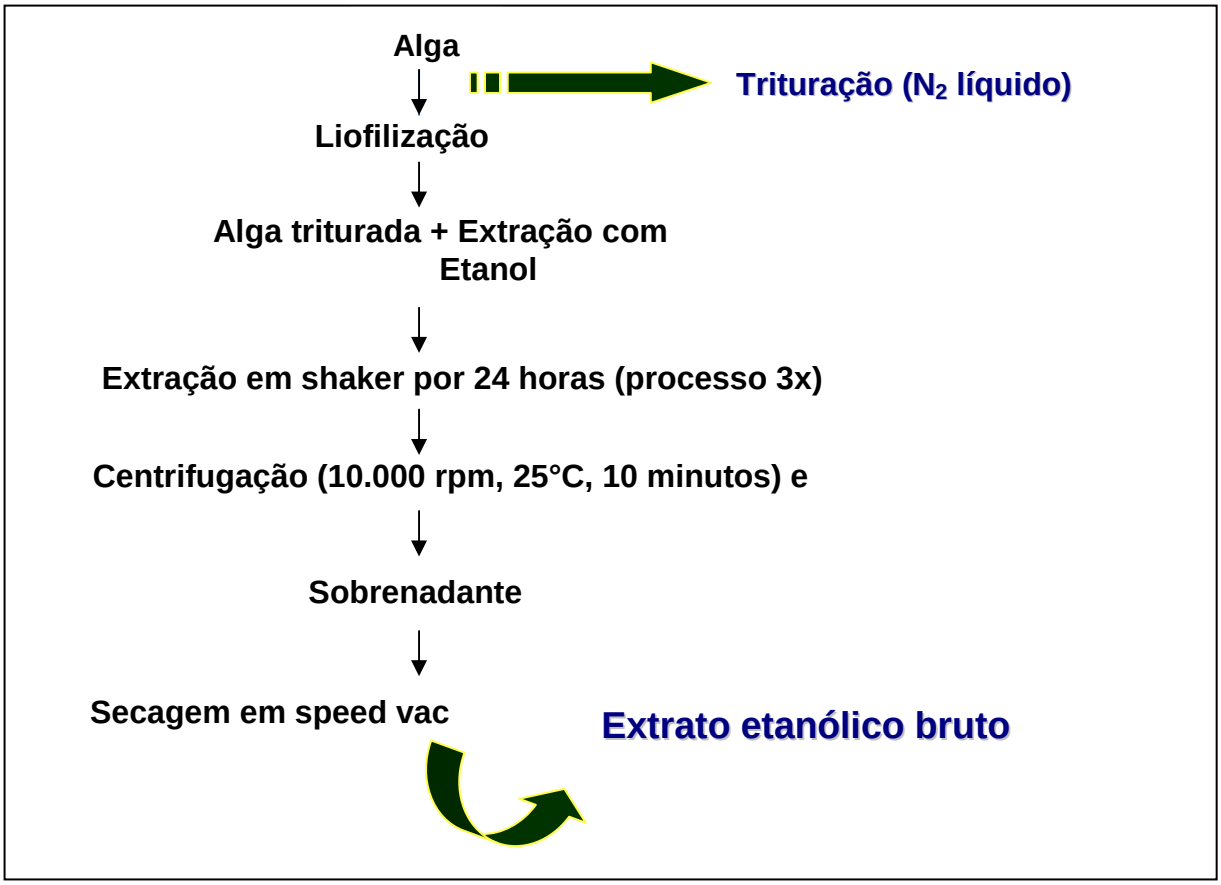


Figura 8. Processo de obtenção do extrato etanólico bruto.

O extrato bruto etanólico seco foi ressuspenso em diclorometano na concentração de 10mg/mL e submetido à extração em fase sólida. O processo utilizou cartuchos Sep Pak Sílica. Foram aplicados 400 µL da solução sobre o cartucho. A eluição se deu inicialmente por 5,0 mL de hexano, seguido por 5,0 mL acetato de etila e 10,0 mL de metanol (MeOH) em um fluxo de 2,0 mL/minuto, obtendo-se respectivamente os extratos HEX, AC e MeOH. As frações foram coletadas, secas sob atmosfera de nitrogênio, liofilizadas por 24 horas e armazenadas em freezer a -20 ℃. O processo de ext ração em fase sólida está representado na figura 9.

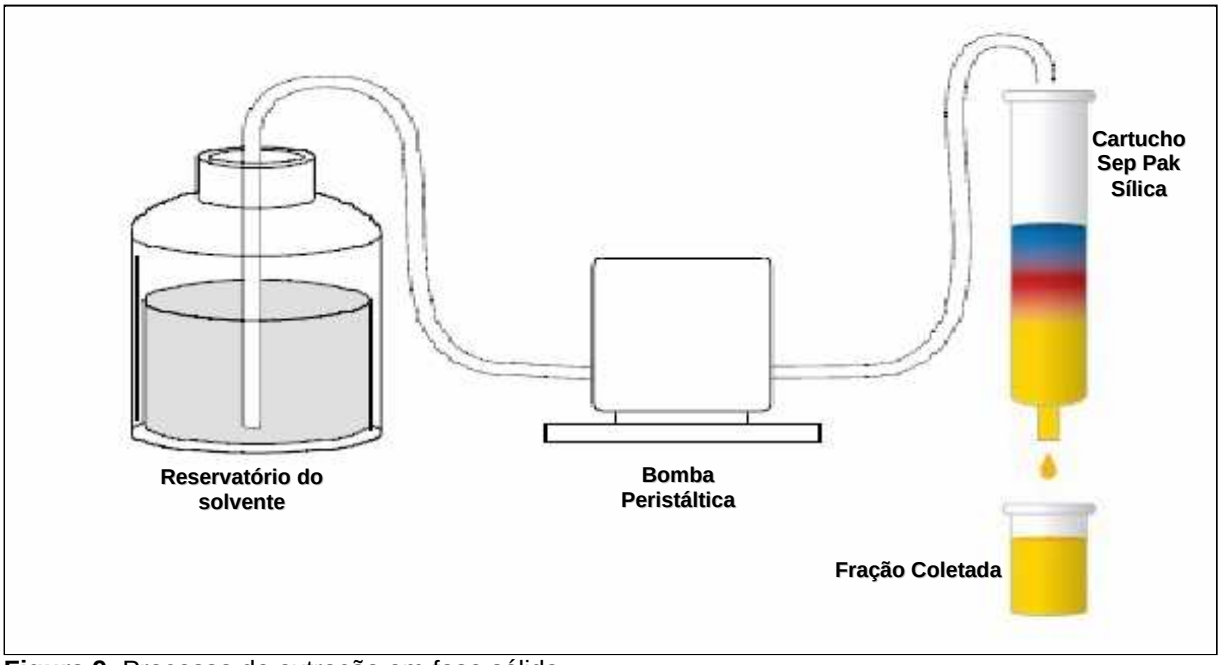


Figura 9. Processo de extração em fase sólida.

3.1.3 Obtenção de extrato aquoso

Para a realização dos ensaios de atividade antifúngica e antibacteriana também foram testados extratos aquosos

As algas foram descongeladas, lavadas para eliminação de impurezas e secas em papel absorvente. Após este processo, foram trituradas em almofariz em presença de nitrogênio líquido. Estas foram usadas para extração na proporção de 1 g de alga para 5 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0. Em seguida, ficaram em banho de ultrasom com controle de temperatura (± 20 ℃) por 1 hora e depois ficaram sob agitação por mais duas horas em temperatura ambiente. O macerado foi então centrifugado a 9200 x g por 30 minutos a 4 ℃. O extrato límpido foi obtido para determinação da concentração protéica e de atividade antimicrobiana.

3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.2.1 Atividade sequestrante de radicais DPPH

A atividade sequestrante de radicais DPPH é considerada um método clássico simples e rápido de avaliação da atividade antioxidante, adequado para extratos vegetais (Sánchez-Moreno, 2002). O método baseia-se na redução do radical DPPH (roxo) na sua hidrazina correspondente (amarela), através da sua reação com doadores de hidrogênio (RH) ou outros radicais ($A^{\bullet}$) (Figura. 10) (Brand-Williams, 1995).

A redução do radical à sua hidrazina é caracterizada pela mudança da cor da solução de roxo para amarelo. A reação é monitorada verificando-se decréscimo da absorbância determinado espectrofotometricamente na faixa de 515 a 528 nm.

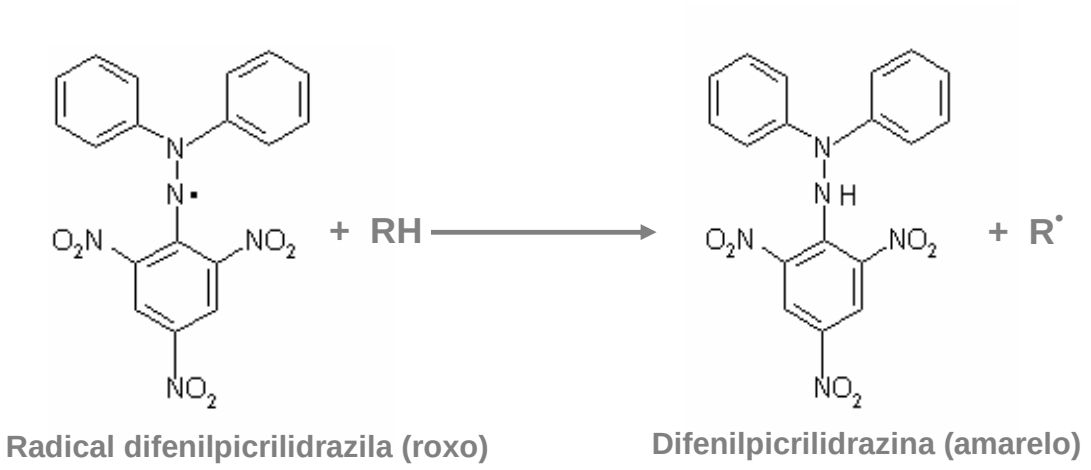


Figura 10. Possível reação com o radical DPPH.

A atividade sequestrante de radicais DPPH foi determinada de acordo com o método de Burits e Bucar (2000), com modificações. Adicionou-se 20 µL de uma solução metanólica de DPPH 0,004% a 100 µL das soluções das amostras dissolvidas em metanol obtendo-se um volume final de 200 µL (a reação foi

realizada em placas de 96 poços de fundo chato). Para obtenção do controle negativo utilizou-se 100 µL de metanol no lugar da solução de amostra. A preparação foi agitada e incubada no escuro, sob temperatura ambiente por 30 minutos. Decorrido o tempo, as absorbâncias foram determinadas a 517 nm no leitor de microplacas multimodular Infinite M200, marca Tecan. Foram utilizados vitamina E (faixa de concentração de faixa de concentração de 1 a 2000 µg/mL) e ácido gálico (faixa de concentração de faixa de concentração de 0,1 a 2000 µg/mL) como controles positivos.

O cálculo da atividade sequestrante de DPPH seguiu a equação:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(\text{Abs}_{\text{controle negativo}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}) \times 100}{\text{Abs}_{\text{controle negativo}}}$$

3.2.2 Sistema H_2O_2/luminol/HRP

A atuação dos extratos e suas frações sobre a intensidade de quimiluminescência no sistema H_2O_2/luminol/HRP foi determinada de acordo com Marquele e colaboradores (2005) e Kabeya e colaboradores (2007), com modificações. A cada poço de uma placa de Elisa branca de 96 poços foram adicionados 125 µL da amostra (dissolvida em DMSO:tampão fosfato 0,1M pH 7,4 10:90) ou DMSO:tampão fosfato 0,1M pH 7,4 10:90 (controle), 25 µL de luminol (concentração final 1,13 x 10^4 M), 25 µL de H_2O_2 (concentração final de 5 x 10^5 M) e 50 µL de PBS 0,1M pH 7,4. A reação foi iniciada com a adição de 25 µL de HRP a uma concentração final de 0,2 UI/mL chegando a um volume final de reação de 250 µL. A quimiluminescência foi monitorada a 25℃ por 15 minutos pelo leitor de microplacas (item 3.2.1) gerando um gráfico URL (Unidades Relativas de Luz) x

Tempo (segundos). Os valores das áreas sob a curva foram determinados com o auxílio do programa origin 6.0. Foi utilizado ácido gálico como controle positivo.

A inibição de quimiluminescência promovida pelas amostras foi expressa em percentagens de inibição através do seguinte cálculo:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(1 - \text{AUC das amostras testes}) \times 100}{\text{AUC do controle}}$$

3.2.3 Atividade quelante de íons ferro II

A atividade quelante de íons ferro II foi realizada segundo metodologia descrita por Kumaran e Karunakaran (2006), com modificações. Ferrozina é um composto amplamente utilizado na determinação de Fe^{2+}. Na presença de Fe^{2+}, a ferrozina forma um complexo vermelho, cuja absorbância é determinada em 562 nm. Na presença de agentes quelantes, menos íons Fe^{2+} estarão disponíveis para a formação do complexo com ferrozina o que resulta num decréscimo da absorbância.

Uma alíquota de 220 µL de amostra foi diluída em etanol:água (125:95) e foi transferida para cada poço de uma placa de 96 poços de fundo chato. Adicionou-se 10 µL de uma solução de sulfato ferroso 1 mM e 20 µL de ferrozina 2,5mM. A mistura foi agitada no próprio aparelho leitor de microplacas multimodular (item 3.2.1) e passados 20 minutos, a leitura foi feita em 562 nm. Foi utilizado EDTA (agente quelante) como controle positivo. A atividade quelante (AQ) das amostras foi calculada segundo a equação:

$$\% \text{ AQ} = \frac{Ab - Aa}{Ab} \times 100$$

Onde Ab é absorbância do branco (solução de $FeSO_4$, ferrozina e solução hidroalcoólica) e Aa é a absorbância da solução contendo o controle positivo ou as frações testadas.

3.2.4 Poder redutor

O poder redutor foi testado segundo metodologia descrita por Kumaran e Karunakaran (2006), com modificações. Uma alíquota de 0,2 mL de amostra, diluída em etanol P.A., foi transferida para tubo tipo eppendorf de 2 mL. À amostra foram adicionados 0,5 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6) e 0,5 mL de solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ 1%. Esta solução foi incubada em banho-maria a 50 ℃ por 30 minutos. Passado este período, foi adicionado 0,5 mL de uma solução de ácido tricloroacético 10 % p/v a solução incubada e agitou-se por alguns segundos. Em seguida, a solução foi centrifugada a 300 g por 10 minutos. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante da solução centrifugada foi transferida para outro tubo tipo eppendorf e a este tubo foram adicionados 0,5 L de água destilada e 0,1 mL de uma solução de $FeCl_3$ 0,1 % p/v. Foi utilizado BHTcomo controle positivo na faixa de concnetrção de 25 a 500 µg/mL.

A leitura foi realizada a 700 nm em espectrofotômetro Shimadzu. Quanto maior a absorbância maior o poder redutor.

3.3 Ação das frações metanólicas sobre o “Burst” oxidativo

3.3.1 Isolamento de macrófagos

Foram utilizados 60 camundongos machos da linhagem Swiss, com idade entre seis e nove semanas, mantidos no biotério do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ/USP), com ração peletizada e água *ad libitum*, em regime de luz/escuro de 12h/12h, com temperatura 25 ± 2℃.

Os experimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética m Cuidados e Uso Animal (CECUA) do IQ-USP em 28/07/2006.

Os macrófagos foram isolados da cavidade peritoneal de animais segundo metodologia descrita por De Pierre e Karnovsky (1974). Para desencadear as condições de inflamação crônica, foi injetado 1,0 mL de caseínato de sódio 12% m/v em solução salina na cavidade peritoneal de cada animal (Rabadji *et al.*, 1996). Após 4 dias, os animais foram sacrificados por deslocamento da coluna cervical. Foram injetados 5,0 mL de PBS gelado na cavidade peritoneal de cada animal, sendo os lavados sugados com seringa plástica, reunidos e centrifugados a 270 x *g* por 10 minutos a 4℃ (Camarero *et al.,* 1990).

3.3.2 Testes de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio com MTT segundo o método de Kujbida *et al*. (2006). O método implica na conversão do MTT, um pigmento amarelo e hidrossolúvel, em formazan que é insolúvel e de cor roxa. Para esta conversão ocorrer é necessária à redução do MTT que ocorre pelo H^+ vindo do

NADH das células vivas. A quantificação de formazan foi obtida realizando-se a leitura das soluções em 540 nm, em espectrofotômetro.

As frações foram dissolvidas em DMSO:Tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 (glicosado, ou seja, contendo glicose 1 mg/mL) 10:90 de forma a obter concentrações finais de (25 - 500 µg/mL). As suspensões celulares estavam na concentração de 2 x 10^6 células/mL em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 glicosado.

Os ensaios foram realizados em triplicatas. As células foram incubadas em estufa a 37 ℃ com 5% de CO_2 por 30 minutos apenas com o tampão fosfato glicosado, ou com o veículo de dissolução das frações ou com as diferentes concentrações das amostras.

Decorridos os 30 minutos de incubação, MTT (12 mM) foi adicionado e as suspensões celulares continuaram incubadas por 1,5 horas nas mesmas condições descritas acima. Foi realizado um experimento controle no qual o MTT foi incubado com a maior concentração das frações pra verificar se estas reduziam o MTT por si só.

Após as 1,5 horas de incubação o sobrenadante foi desprezado e ao precipitado formado foi adicionado 50 µL de DMSO. Após incubação por 24 horas a solução foi novamente centrifugada e o sobrenadante submetido à leitura em 540 nm no leitor de microplacas (item 3.2.1).

3.3.3 Quimiluminescência

O método baseia-se na amplificação da quimiluminescência natural das ERO (oxigênio singlete, produtos de lipoperoxidação, dióxidos de etanos, etc.) conseguida através da adição de luminol à suspensão celular.

Os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando-se microplacas brancas com poços 96 de 0,3 mL. A leitura foi feita no leitor de microplacas multimodular (item 3.2.1) com controle de temperatura para 37℃.

Cada poço continha 1 x 10^6 células/mL em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 glicosado. O ensaio valeu-se de quatro grupos testes a fim de se verificar a validade dos resultados obtidos.

- Branco: Macrófagos (1 x 10^6 células/mL) + luminol (1 mM) + tampão fosfato glicosado 0,1 M pH 7,4;
- Controle: Macrófagos (1 x 10^6 células/mL) + luminol (1 mM) + PMA (40 ng/ ensaio) + tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 glicosado;
- Teste: Macrófagos (1 x 10^6 células/mL) + luminol (1 mM) + fração metanólica + PMA (40 ng/ ensaio) + tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 glicosado;
- Controle falso-positivo: luminol (1 mM) + fração metanólica + tampão fosfato glicosado 0,1 M pH 7,4 (Verificação da probabilidade de reação entre extrato e Luminol levando a um resultado falso-positivo).

Para que fosse constatada uma atividade de inibição ou estímulo do “burst” oxidativo, o grupo teste deveria apresentar uma diminuição ou aumento estatisticamente significativo em relação ao grupo controle (método adaptado por Punchard *et al*., 1996).

3.4 Atividade antibacteriana

3.4.1 Microrganismos

Utilizou-se 4 espécies de bactérias gram-negativas sendo estas, a *Escherichia coli* ATCC 25922, a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, a *Klebsiella pneumonae* ATCC 10231 e a *Salmonella typhi* ATCC 19430. Os microrganismos gram-positivos testados foram o *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, o *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, o *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e o *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

A metodologia desenvolvida seguiu as normatizações do documento de referência M7-A6 (NCCLS, 2003).

3.4.2 Preparo das amostras e das placas de microdiluição

Os extratos e frações foram dissolvidos em solução de DMSO:H_2O (10:90). O antibiótico padrão utilizado como controle tetraciclina também foi dissolvido da mesma forma. Antes da realização do ensaio com extratos foi realizado um experimento controle para verificar se o veículo não apresentou capacidade de inibir o crescimento bacteriano por si só.

As soluções de amostra e padrão de tetraciclina foram diluídas em série de modo a obter volume final de 50 µL e as concentrações finais testadas encontram-se na tabela 1. Foram utilizadas placas de microdiluição com 96 poços e fundo em U.

Tabela 1. Concentrações dos extratos e frações e do padrão tetraciclina para o ensaio de CIM.

Diluição	Extratos e frações testadas (µg/mL)	Tetraciclina (µg/mL)
Diluição 1	1000	1280
Diluição 2	500	640
Diluição 3	250	320
Diluição 4	125	160
Diluição 5	62,5	80
Diluição 6	31,25	40

3.4.3 Inóculo

A partir de uma cultura de bactéria congelada a -80 ℃ foi feita uma inoculação em placa de petri contendo ágar nutriente mantida em estufa a 35 ℃ por 24 horas para o desenvolvimento das colônias. Com uma alça de platina estéril transferiu-se de 3 a 4 colônias para tubos de ensaio de 15 mL contendo caldo Mueller Hinton II cátion ajustado pH 7,2 a 7,4. A suspensão foi incubada em estufa por 2 a 3 horas a 35℃. Ajustou-se o número de célu las/mL segundo a escala Mcfarland em espectrofotômetro (λ= 625 nm) obtendo-se uma absorbância de 0,08 a 0,1 (concentração bacteriana de 1 x 10^6 UFC/mL).

3.4.4 Inoculação nas placas de microdiluição

A suspensão de bactérias na concentração de 1x10^6 UFC/mL foi diluída na proporção de 1:1000 com Mueller Hinton II cátion ajustado pH 7,2 a 7,4 e então 50 µL foi adicionado a cada poço da placa de microdiluição obtendo-se uma concentração final de 1 x 10^5 UFC/mL.

O controle positivo ou de crescimento continha 50 µL de Caldo Mueller Hinton II cátion ajustado pH 7,2 a 7,4 e 50 µL do inóculo.

O controle de esterilidade do meio continha 100 µL de meio Caldo Mueller Hinton cátion ajustado pH 7,2 a 7,4.

As placas de microdiluição foram incubadas a 35 ℃, sem agitação por 20 a 24 horas.

3.4.5 Leitura e interpretação dos resultados

A leitura foi feita visualmente sendo que a CIM foi determinada como sendo a menor concentração do extrato capaz de inibir completamente o crescimento da bactéria detectado a olho nu.

3.5 Atividade antifúngica

3.5.1 Microrganismos

Foram utilizadas 2 espécies de leveduras sendo *Candida albicans* ATCC 10231 e *Candida parapsilosis* ATCC 29212.

A metodologia desenvolvida seguiu as normatizações do documento de referência M27-A2 (NCCLS, 2002).

3.5.2 Preparo do meio de cultura do ensaio – Meio RPMI

Foi utilizado o meio sintético RPMI 1640 com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e com indicador de pH vermelho de fenol. O meio foi tamponado com ácido

morfolino propanossulfônico (MOPS) em concentração final de 0,165 mol/L, pH 7,0. A esterilização do meio foi feita por filtração em membrana com poros de 0,22 µm.

3.5.3 Preparo das amostras e das placas de microdiluição

Os extratos e frações foram dissolvidos em solução de DMSO:H_2O_2 (10:90). O antifúngico padrão utilizado como controle, Fluconazol, também foi dissolvido da mesma forma. Antes da realização do ensaio com extratos verificou-se se o veículo não apresentou capacidade de inibir o crescimento bacteriano por si só.

As soluções de amostra e padrão foram diluídas em série de modo a obter volume final de 50 µL e as concentrações finais testadas encontram-se na tabela 2. Foram utilizadas placas de microdiluição com 96 poços de fundo chato.

Para o ensaio com o extrato aquoso foram adicionados 10 µL deste em 90 µL de meio RPMI na primeira fileira de poços com diluição seriada para os próximos poços.

Tabela 2. Concentrações dos extratos e frações e do padrão fluconazol para o ensaio de CIM.

Diluição	Extratos e frações testadas (µg/mL)	Tetraciclina (µg/mL)
Diluição 1	1000	64
Diluição 2	500	32
Diluição 3	250	16
Diluição 4	125	8
Diluição 5	62,5	4
Diluição 6	31,25	2

3.5.4 Inóculo

A partir de uma cultura dos fungos congelados a -80 ℃ foi feita inoculação em placa de petri contendo meio ágar Sabouraud-dextrose e mantida em estufa a 35 ℃ por 24 horas. Com uma alça de platina estéril tr ansferiu-se 5 colônias para tubos

de ensaio contendo 5 mL de solução de NaCl 0,85% estéril. A suspensão resultante foi colocada em agitador vórtex por 15 segundos e a densidade celular foi ajustada em espectrofotômetro, acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância equivalente de uma solução padrão de McFarland 0,5, em comprimento de onda 530 nm. Este procedimento forneceu uma suspensão de levedura contendo 1×10^6 a 5×10^6 células/mL.

3.5.5 Inoculação nas placas de microdiluição

A suspensão foi diluída 1:50 e depois 1:20 em meio RPMI 1640 (Sigma, EUA), resultando numa concentração de 1×10^3 a 5×10^3 UFC/mL. Adicionou-se 50 µL desta suspensão a cada poço da placa de microdiluição obtendo-se uma concentração final de $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

O controle positivo ou de crescimento continha 50 µL de meio RPMI 1640 e 50 µL do inóculo.

O controle negativo ou de esterelidade do meio continha 100 µL de meio RPMI 1640.

As placas foram incubadas a 35 ℃, sem agitação por 48 horas.

3.5.6 Leitura e interpretação dos resultados

A leitura da turbidez resultante do crescimento dos inóculos, em cada poço das placas de microdiluição foi realizada em leitor de microplacas multimodular (item 3.2.1) em comprimento de onda de 492 nm.

O ponto final de leitura para obtenção do valor de CIM foi definido como a menor concentração na qual ocorre 50 % de inibição do crescimento do inóculo.

3.6 Determinação de compostos fenólicos totais

Os extratos etanólicos secos de *G. Birdiae* e *G domingensis* foram ressuspensos em metanol a uma concentração de 7,5 mg/mL. Em tubo de ensaio de 10 mL foram adicionados 3,0 ml de água Milli-Q, 250 µL de reagente de Folin Ciocalteu e 200 µL da solução de extrato e agitou-se por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 1 mL de uma solução de Na_2CO_3 15% e agitou-se por mais 30 segundos e adicionou-se 650 µL de água ultrapurificada perfazendo um volume total de 5 mL. Após 2 horas, as amostras e padrões foram filtrados em filtro millex 0,45 µm e suas absorbâncias foram medidas em 750 nm utilizando espectrofotômetro Shimadzu tendo como branco metanol e todos os reagentes menos os extratos.

O teor de fenólicos totais foi determinado pela interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (1 a 5 µg/mL) e expresso como miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato. Análises foram realizadas em triplicata.

3.7 Determinação de proteínas solúveis totais

O conteúdo de proteínas solúveis presentes no extrato protéico utilizado no ensaio antifúngico foi determinado pelo método de Bradford utilizando-se BSA como padrão (Bradford, 1976). As absorbâncias foram medidas em 595 nm utilizando o leitor de microplacas multimodular (item 3.2.1).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade antioxidante das frações

4.1.1 Inibição do radical DPPH

As frações obtidas das algas, preparadas em diferentes concentrações, foram testadas frente à sua capacidade de redução do radical DPPH. Os resultados podem ser vistos na figuras 11 e 12.

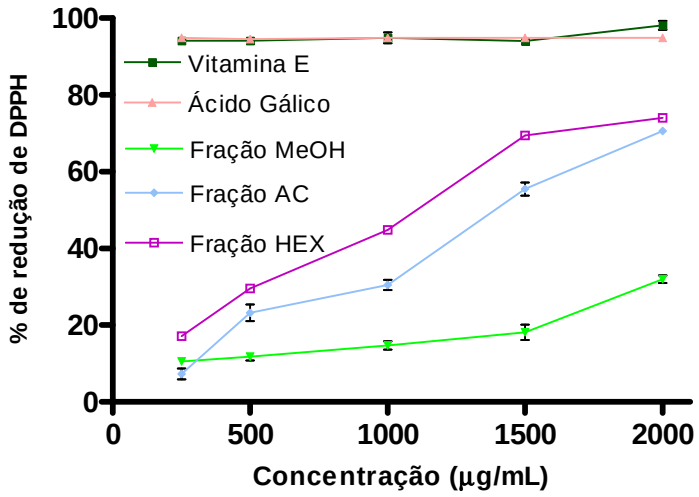


Figura 11. Capacidade de redução do DPPH para diferentes concentrações das frações de *G. birdiae* e dos padrões Vitamina E e Ácido Gálico. Os resultados representam média ± desvio padrão (n=3).

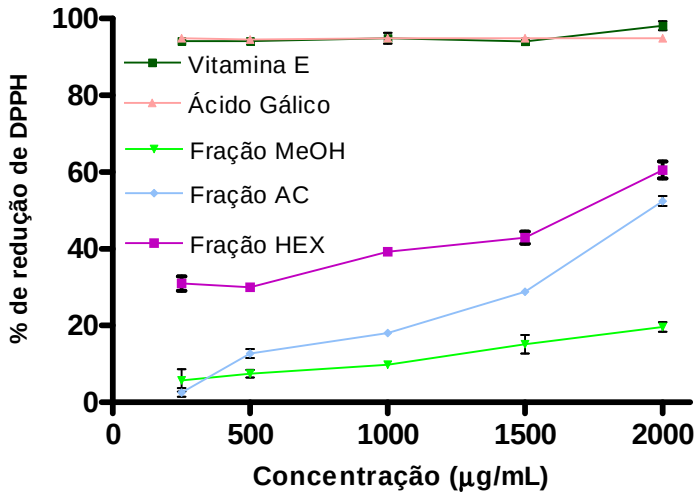


Figura 12. Capacidade de redução do DPPH para diferentes concentrações das frações de *G. domingensis* e dos padrões Vitamina E e Ácido Gálico. Os resultados representam média ± desvio padrão (n=3).

Neste modelo experimental, as frações mais apolares das algas mostraram-se mais ativas. Dentre todas as frações testas, a fração hexânica obtida da macroalga *G. birdiae* apresentou-se como a mais ativa com IC 50 de 1020 µg/mL. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Guaratini (2008), que constatou maior atividade antioxidante dos extratos mais apolares de *G. birdiae*.

Os padrões de vitamina E e ácido gálico, cujos resultados são visualizados na figura 13, alcançaram atividade redução do radical DPPH em uma concentração muito menor que a das frações testadas, com IC 50 de 8,35 e 1,02 µg/mL, respectivamente.

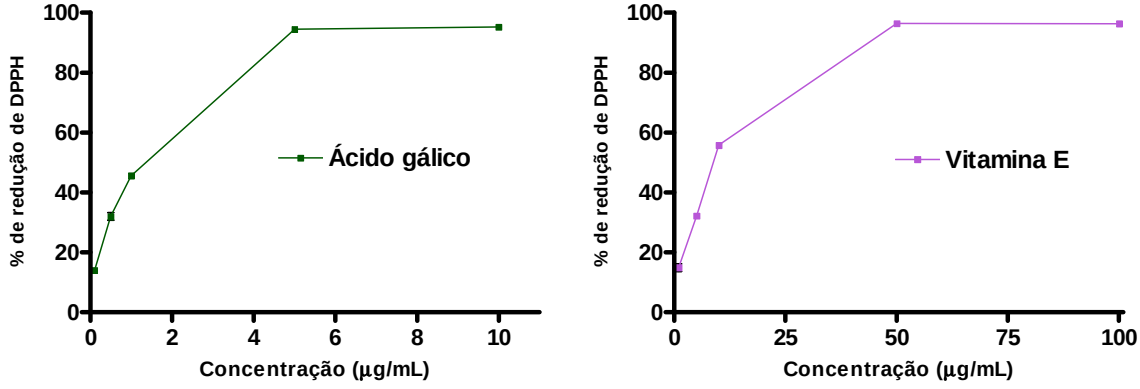


Figura 13. Capacidade de redução do DPPH para diferentes concentrações de substâncias com atividade sequestrante de radicais DPPH conhecida: vitamina E e ácido gálico. Os resultados representam média ± desvio padrão (n=3).

Zubia e Robledo (2007) verificaram a capacidade de redução de DPPH de 48 espécies de algas, sendo 23 Rodophytas, 8 Phaeophytas e 17 Clorophytas. O estudo foi realizado a partir do extrato de diclorometano:metanol na proporção de 2:1. Dentre as Rodophytas, a alga *Chondria baileyana* foi a que apresentou a maior atividade antioxidante com IC 50 de 2,84 mg/mL. O gênero *Gracilaria* apresentou atividade antioxidante discreta em comparação com outros gêneros. A alga mais potente foi *Gracilaria tikvahiae* com IC 50 de 28,94 mg/mL, atividade 10 vezes menor que a obtida com *Chondria baileyana*.

Embora os resultados obtidos por Zubia e Robledo (2007) indiquem baixa atividade antioxidante do gênero *Gracilaria*, as comparações entre estudos tornam-se difíceis devido à utilização de protocolos de extração diferentes bem como variações períodos de coleta e localização.

4.1.2 Geração de ERO através do sistema luminol-HRP- H_2O_2

A reação de quimiluminescência é um termo utilizado para descrever qualquer reação química na qual um dos produtos é a emissão de luz. A quimiluminescência ocorre quando uma molécula, em seu estado eletronicamente excitado, relaxa ao seu estado de menos energia (Dodeigne *et al*., 2000). Para que a reação ocorra, o estado eletronicamente excitado deve perder energia na forma de fóton ou transferir energia para outra molécula capaz de emitir luz (Hastin e Wilson, 1976).

As peroxidases constituem uma variedade de enzimas distribuídas pelo reino animal e vegetal. A enzima HRP (peroxidase de raiz forte) está presente na raiz de rábano da espécie *Aromacia rusticana*. É uma glicoproteína cujo grupamento prostético ferriprotoporfirina IX (Fe^{3+} protoporfirínico) está ligado não covalentemente à porção protéica da enzima.

A reação enzimática da HRP ocorre em três etapas distintas como demonstram as seguintes equações:

$$HRP(Fe^{3+}) + ROOH \rightarrow \text{Composto-I} + ROH$$

$$\text{Composto-I} + AH_2 \rightarrow \text{Composto-II} + AH^{\bullet}$$

$$\text{Composto-II} + AH_2 \rightarrow HRP(Fe^{+3}) + AH^{\bullet} + H_2O$$

Na primeira etapa, a enzima reduz ROOH formando um composto oxidado intermediário (Composto-I). A forma oxidada da enzima é então, reduzida à sua forma nativa em duas etapas, sendo que em cada etapa uma substância orgânica é oxidada (Ruzgas *et al*., 1996; Jantschko *et al*., 2002).

A molécula de luminol e seus derivados podem sofrer reações que geram quimiluminescência como pode ser visto na figura 14. A molécula intermediária chave é um α-hidroperóxido obtido pela oxidação do anel heterocíclico. A decomposição deste intermediário leva a formação do íon aminoftalato com emissão de luz. Em meio solventes próticos (água, mistura de água e outros solventes), vários derivados de oxigênio (O_2, peróxidos, $O_2^{\bullet-}$) são capazes de oxidar o luminol a partir de reações enzimáticas (Dodeigne *et al*., 2000).

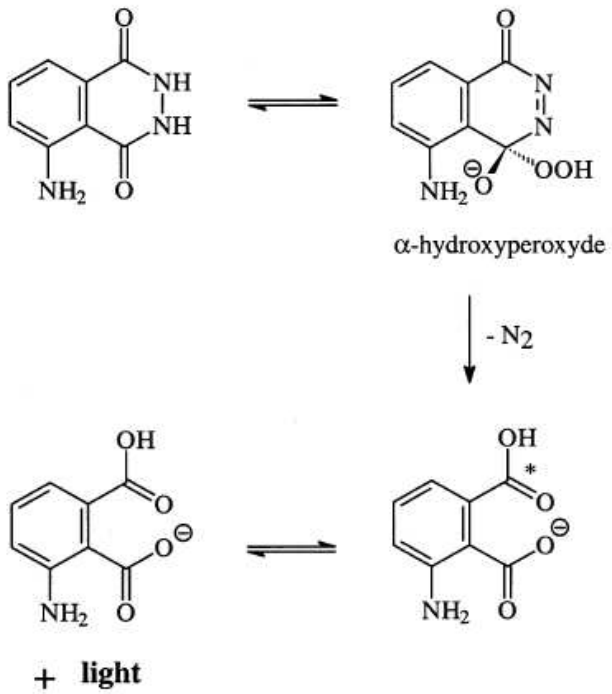


Figura 14. Mecanismo simplificado de reação do luminol. Fonte: Dodeigne, *et al*. (2000).

A oxidação do luminol catalisada pela HRP na presença de H_2O_2 é um modelo experimental muito utilizado na pesquisa de novas moléculas com atividade antioxidante. Isto ocorre devido à alta sensibilidade, ao procedimento relativamente simples e ao baixo custo. Além disso, demonstra-se muito útil na avaliação da atividade antioxidante de compostos naturais (Kabeya *et al.*, 2007).

As frações obtidas das algas, preparadas em diferentes concentrações, foram testadas frente à sua capacidade sequestrante de ERO geradas pelo sistema luminol-HRP-H_2O_2. Os resultados apresentados nas figuras 15 e 16 demonstram uma maior atividade de inibição de emissão de luz dos extratos hexânicos de ambas as algas.

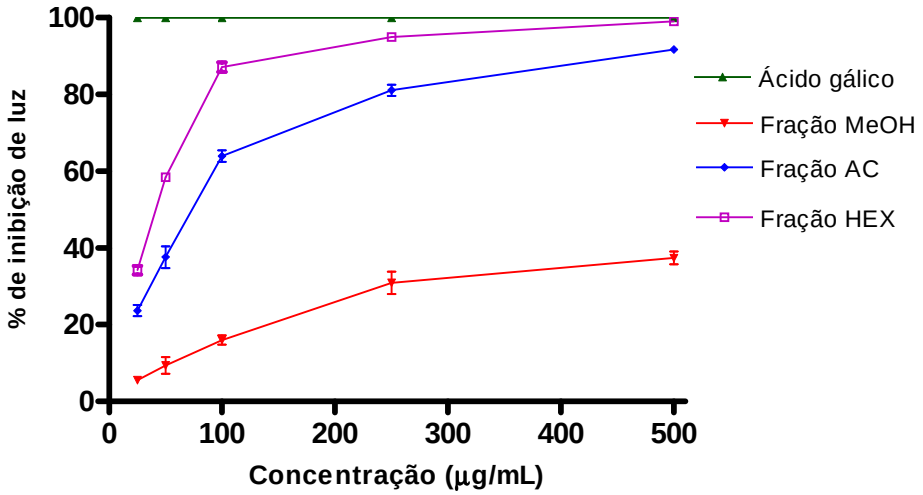


Figura 15. Inibição da emissão de luz a partir das reações luminescentes do sistema Luminol-HRP-H_2O_2 para diferentes concentrações de das frações de *G. birdiae*. Os resultados representam média ± desvio padrão (n=3).

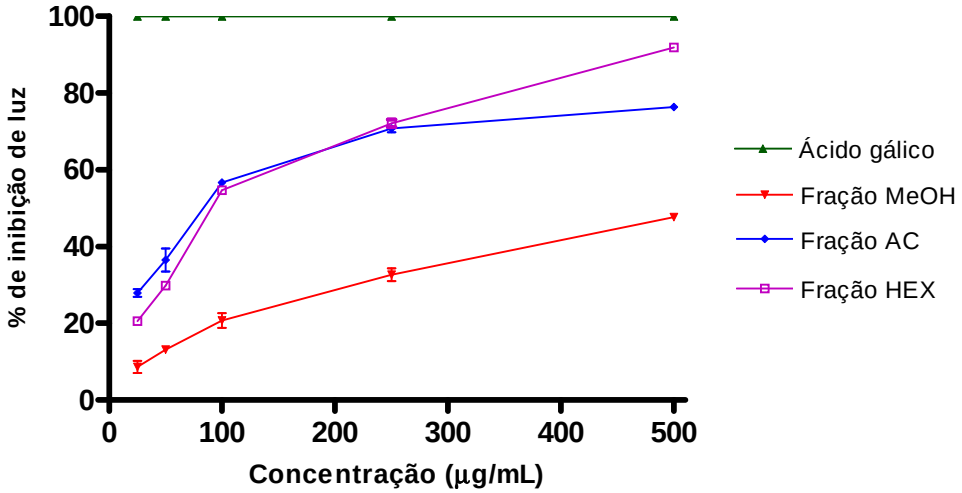


Figura 16. Inibição da emissão de luz a partir das reações luminescentes do sistema Luminol-HRP-H_2O_2 para diferentes concentrações das frações de *G. domingensis*. Os resultados representam média ± desvio padrão (n=3).

Foi realizada uma curva dose resposta do padrão ácido gálico, cujos resultados são visualizados na figura 17. O IC 50 encontrado para o ácido gálico foi de 0,11 µg/mL.

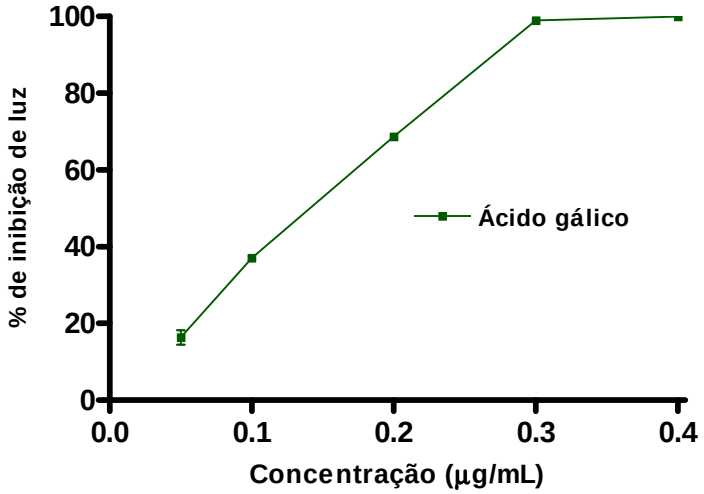


Figura 17. Inibição da emissão de luz a partir das reações luminescentes do sistema Luminol-HRP-H_2O_2 para diferentes concentrações de substância com atividade antioxidante conhecida: Ácido gálico. Os resultados representam média ± desvio padrão (n=3).

Os resultados obtidos no ensaio do sistema luminol-HRP- H_2O_2 corroboram os obtidos com a atividade de redução de DPPH. Os dois ensaios antioxidantes relatados demonstram uma maior capacidade antioxidante das frações mais apolares (extrato HEX). Para este ensaio o extrato hexânico de *G. birdiae* apresentou-se mais ativo com IC 50 de 33,3 µg/mL enquanto que *G. domingensis* apresentou IC 50 de 97,2 µg/mL.

4.3 Atividade quelante de íons ferro II

O ferro tem importante papel biológico e está presente em processos de geração de ERO. Este metal pode estimular a lipoperoxidação via reação de Fenton.

A ferrozina utilizada nos experimentos é um composto muito utilizado na determinação de ferro. Na presença de Fe^{+2} ocorre a formação de um complexo vermelho com absorção em 562 nm. Quando da adição de um agente quelante, menos ferro estará disponível para a formação do complexo e consequentemente haverá uma diminuição da absorbância em 562 nm.

As frações da alga *G. birdiae* não alteraram a absorbância em 562 nm mostrando não possuírem atividade quelante detectável. Porém, as frações da alga *G. domingensis* já apresentam atividade quelante detectável, principalmente a fração metanólica, como mostra a figura 18.

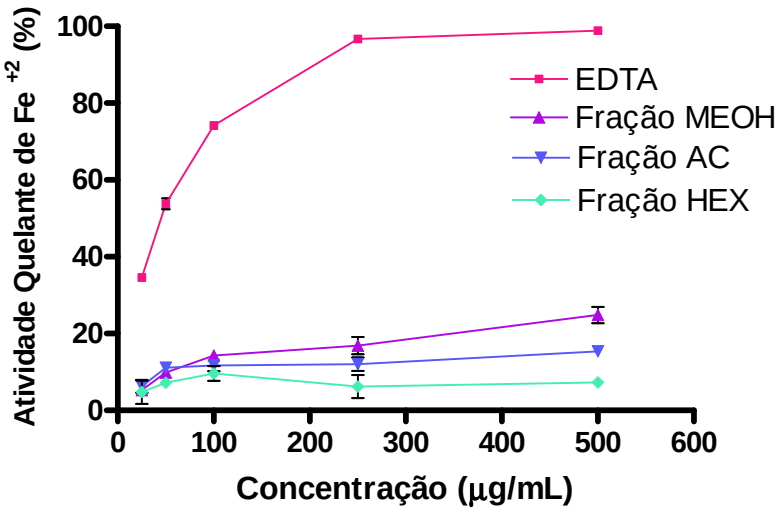


Figura 18. Atividade quelante íons Fe^{+2} das frações de *G. domingensis* e de EDTA em diferentes concentrações. Os resultados representam média ± desvio padrão (n=3).

Vários trabalhos associam compostos fenólicos à atividade quelante. Posteriormente, o item 4.8 desta dissertação relata uma maior concentração de

compostos fenólicos presentes na alga *G. domingensis.* Tal fato pode explicar o fato de as frações de *G domingensis* terem apresentado atividade quelante detectável.

4.4 Poder redutor

O ensaio de poder redutor baseia-se na redução do Fe^{+3}, presente no ferrocianeto de potássio, a Fe^{+2}. Com a redução, forma-se um complexo azul conhecido com azul da Prússia. Quanto maior o poder redutor, maior a formação do complexo azul e maior a absorbância a 700 nm.

Os resultados apresentados nas figuras 19 e 20 demonstram que todas as frações de ambas as algas não apresentaram atividade de poder redutor significativa em comparação com os padrões BHT e ácido ascórbico. Apesar da baixa atividade, o aumento da concentração resultou num discreto incremento do poder redutor.

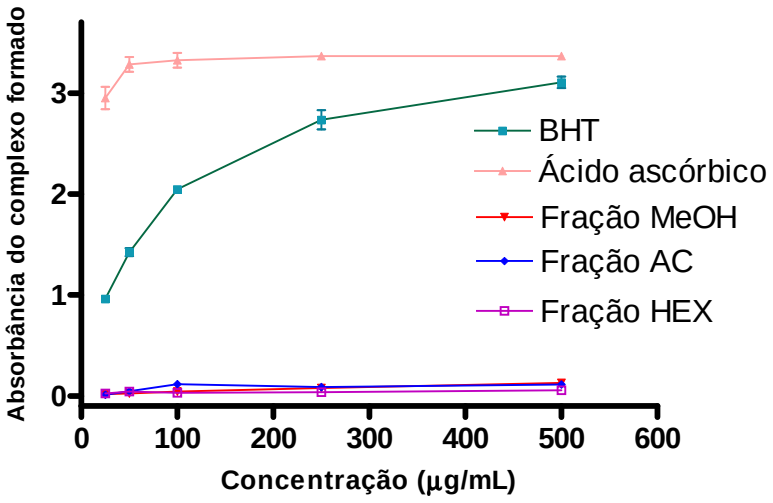


Figura 19. Poder redutor das frações de *G. birdiae* e dos padrões BHT e ácido ascórbico concentrações. Os resultados representam média ± desvio padrão (n=3).

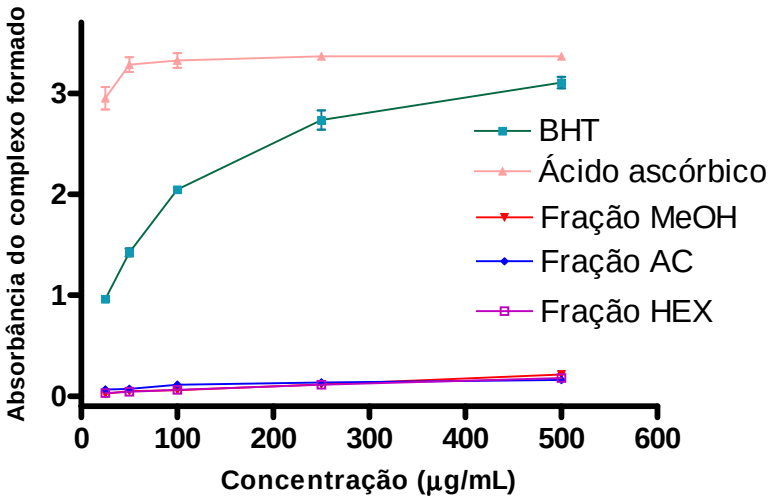


Figura 20. Poder redutor das frações de *G. birdiae* e dos padrões BHT e ácido ascórbico em diferentes concentrações. Os resultados representam média ± desvio padrão (n=3).

4.4 Ação das frações sobre o "burst" oxidativo

4.4.1 Viabilidade celular

A viabilidade celular dos macrófagos foi determinada pelo método de redução do MTT, que determina a funcionalidade de desidrogenases celulares. As figuras abaixo demonstram que a incubação por 30 minutos com as frações metanólicas de ambas as algas (25-500 µg/10^6 macrófagos) não alteraram a viabilidade celular dos macrófagos (Figuras 21 e 22).

Porém, a incubação com as frações AC e HEX apresentaram queda na viabilidade celular proporcionalmente ao aumento da concentração, indicando interferência nos ensaios do "burst" oxidativo (Figuras 21 a 26).

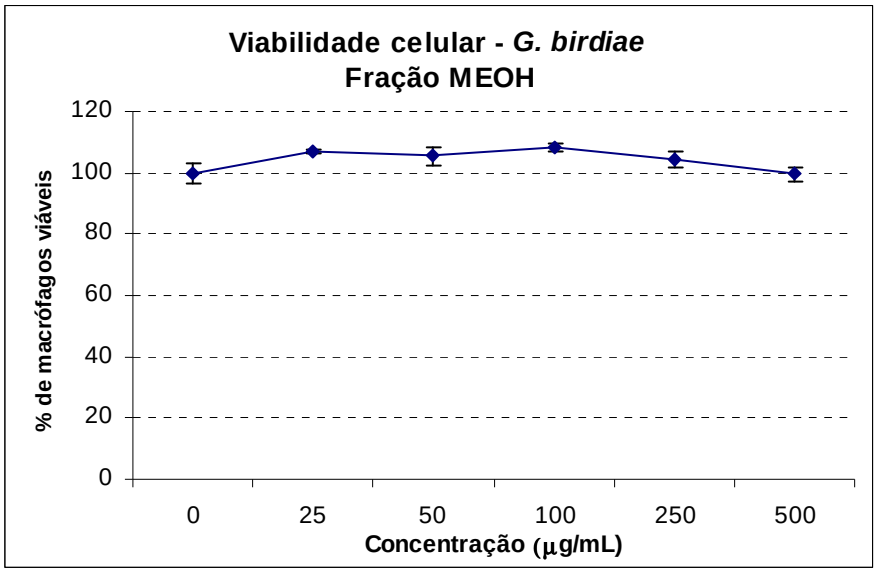


Figura 21. Ensaio de viabilidade celular de macrófagos tratados com fração metanólica de *G. birdiae* (0-500 µg/10^6 macrófagos, 37℃, 30 min). Alíquotas (2 x 10^5 células/mL) foram submetidas à determinação de viabilidade celular pela redução de MTT. Os resultados representam média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados cada um em triplicata.

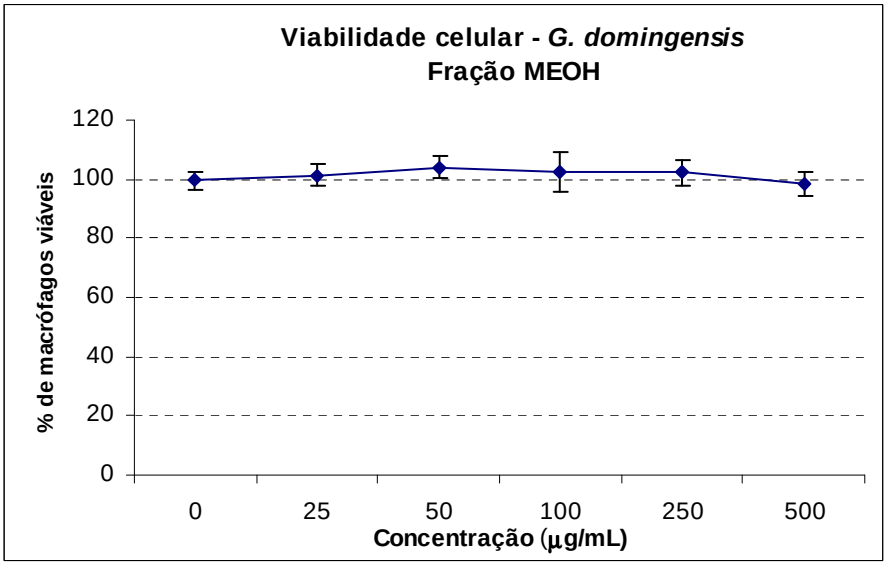


Figura 22. Ensaio de viabilidade celular de macrófagos tratados com fração metanólica de *G. domingensis* (0-500 µg/10^6 macrófagos, 37℃, 30 min)). Alíquotas (2 x 10^5 células/mL) foram submetidas à determinação de viabilidade celular pela redução de MTT. Os resultados representam média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados cada um em triplicata.

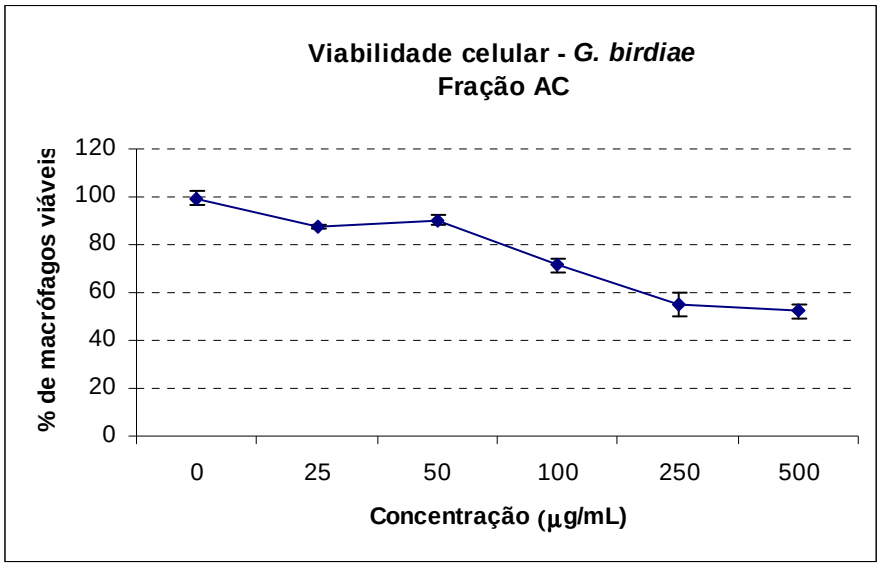


Figura 23. Ensaio de viabilidade celular de macrófagos tratados com fração AC de *G. birdiae* (0-500 µg/10^6 macrófagos, 37℃, 30 min)). Alíquotas (2 x 10^5 células/mL) foram submetidas à determinação de viabilidade celular pela redução de MTT. Os resultados representam média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados cada um em triplicata.

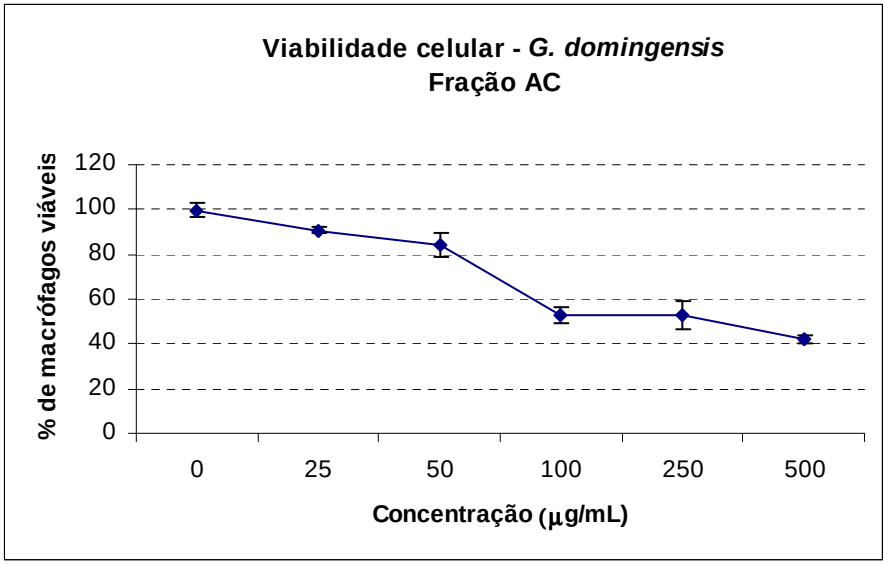


Figura 24. Ensaio de viabilidade celular de macrófagos tratados com fração AC de *G. domingensis* (0-500 µg/10^6 macrófagos, 37℃, 30 min)). Alíquotas (2 x 10^5 células/mL) foram submetidas à determinação de viabilidade celular pela redução de MTT. Os resultados representam média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados cada um em triplicata.

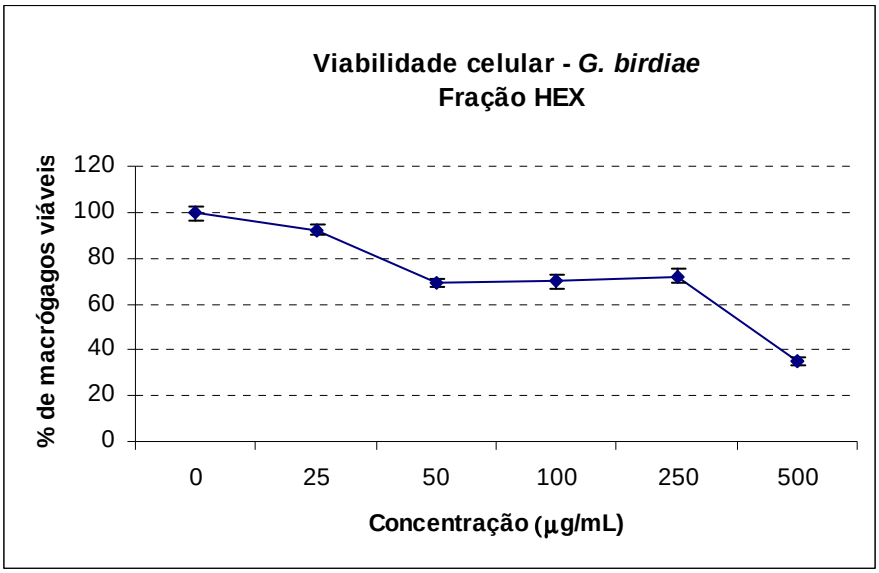


Figura 25. Ensaio de viabilidade celular de macrófagos tratados com fração HEX de *G. birdiae* (0-500 µg/10^6 macrófagos, 37℃, 30 min)). Alíquotas (2 x 10^5 células/mL) foram submetidas à determinação de viabilidade celular pela redução de MTT. Os resultados representam média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados cada um em triplicata.

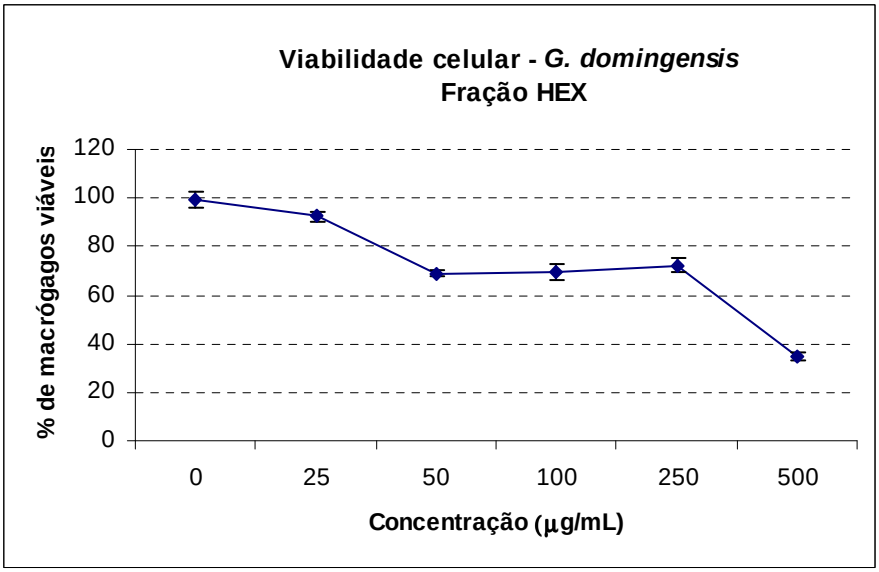


Figura 26 Ensaio de viabilidade celular de macrófagos tratados com fração HEX de *G. domingensi* (0-500 µg/10^6 macrófagos, 37℃, 30 min)). Alíquotas (2 x 10^5 células/mL) foram submetidas à determinação de viabilidade celular pela redução de MTT. Os resultados representam média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados cada um em triplicata.

Em consequência dos resultados encontrados, foram testadas apenas as frações MEOH de *G. birdiae* e *G. domingensis* sobre a função do “burst” oxidativo de macrófagos.

4.4.2 Ensaio de quimiluminescência

Apenas as frações metanólicas foram testadas quanto à sua ação sobre o "burst" oxidativo por terem demonstrado não interferir na viabilidade celular de macrófagos.

O ensaio de quimiluminescência do luminol é comumente utilizado para avaliar o "burst" oxidativo quando fagócitos são ativados pela adição de um estímulo como PMA (Rodrigues *et al*., 2002).

Os macrófagos estimulados por PMA eficientemente catalisaram a oxidação de luminol na presença de H_2O_2 como demonstra a cinética de emissão de luz apresentada na figura 27.

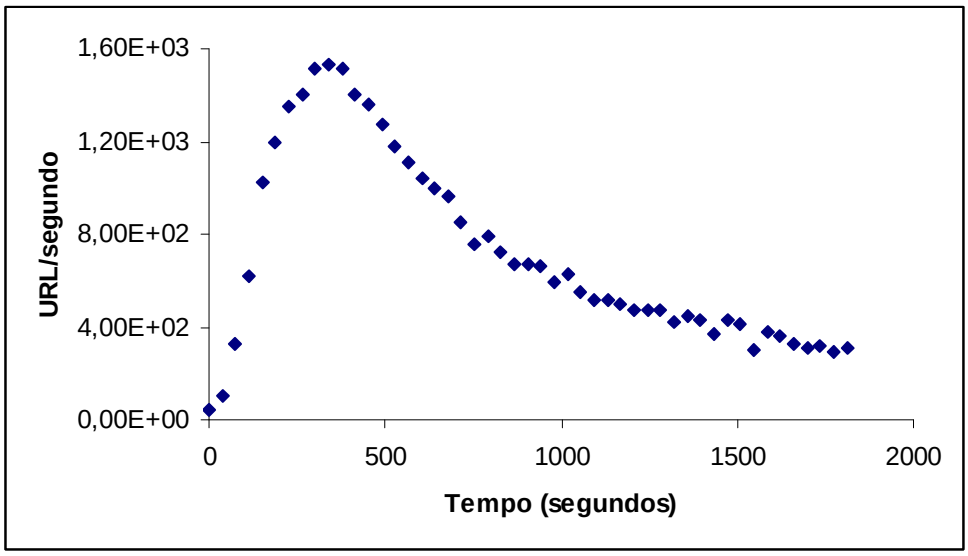


Figura 27. Cinética de emissão de luz da reação de luminol (1mM) com macrófagos ($1x10^6$/mL) estimulados com PMA (40ng/ensaio) incubados com tampão fosfato glicosado pH 7,4 a 37℃.

A partir da cinética de reação apresentada foi calculado o valor da área sob a curva de cada experimento após 30 minutos de reação. A adição das frações metanólicas de *G birdiae e G. domingensis* ao sistema de reação relevou um aumento da atividade do "burst" oxidativo na faixa de concentração de 25 a 100 µg/mL em relação ao controle (Figuras 28 e 29).

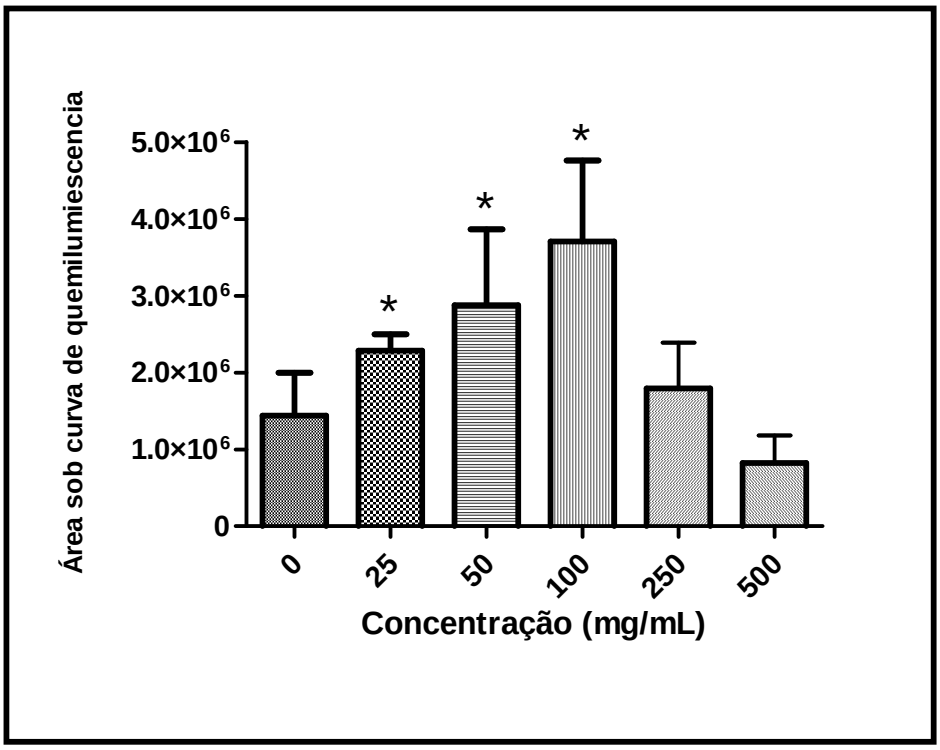


Figura 28. Ação da fração metanólica de *G. birdiae*, em diferentes concentrações, sobre o "burst" oxidativo de macrófagos monitorado através de ensaio de quimiluminescência. Os resultados representam média ± desvio padrão (n=6).

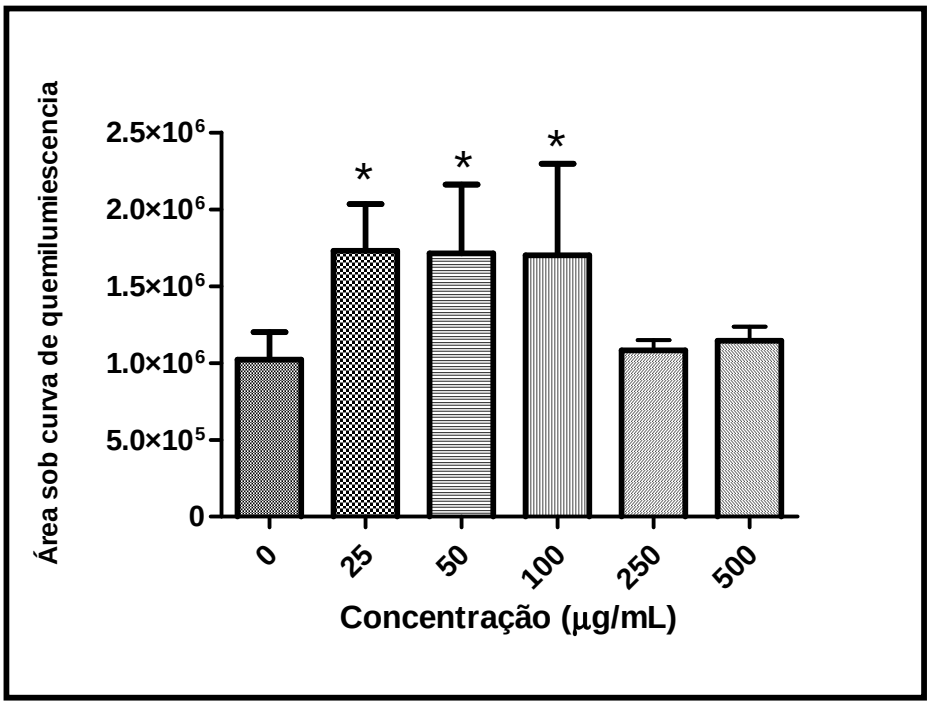


Figura 29. Ação da fração metanólica de *G. domingensis*, em diferentes concentrações, sobre o "burst" oxidativo de macrófagos monitorado através de ensaio de quimiluminescência. Os resultados representam média ± desvio padrão (n=6).

O ensaio mostra que nas concentrações de 250 e 500 µg/mL não foi percebido um aumento no “burst” oxidativo. Tal fato pode ser explicado pela atividade antioxidante razoável destas frações encontradas nos experimentos de redução de DPPH e do sistema luminol-HRP- H_2O_2.

Em concentrações menores, a ação de incremento do “burst” oxidativo provocado pelas frações MEOH se sobreporia à atividade de seqüestro dos radicais formados durante a reação.

4.6 Atividade antibacteriana

As tabelas 3 e 4 abaixo demonstram que todas as frações testadas e os extratos protéicos de *G. domingensis* e *G. birdiae* não apresentaram inibição do crescimento bacteriano em nenhuma das concentrações testadas para nenhuma das bactérias. O padrão de tetraciclina utilizado apresentou CIM dentro do preconizado pela NCCLS validando os experimentos realizados.

Tabela 3. Atividade dos extratos e frações de *G. birdiae* frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

		G. birdiae				
		Extrato etanólico bruto	**Fração MEOH**	**Fração AC**	**Fração HEX**	**Extrato aquoso**
Bactérias Gram-negativas	***Escherichia coli***	-	-	-	-	-
	Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-	-
	Klebsiella pneumonae	-	-	-	-	-
	Salmonella typhi	-	-	-	-	-
Bactérias Gram-negativas	***Staphylococcus aureus***	-	-	-	-	-
	Streptococcus pneumoniae	-	-	-	-	-
	Bacillus subtilis	-	-	-	-	-
	Enterococcus faecalis	-	-	-	-	-

Tabela 4. Atividade dos extratos e frações de *G. domingensis* frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

		G. domingensis				
		Extrato etanólico bruto	**Fração MEOH**	**Fração AC**	**Fração HEX**	**Extrato aquoso**
Bactérias Gram-negativas	***Escherichia coli***	-	-	-	-	-
	Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-	-
	Klebsiella pneumonae	-	-	-	-	-
	Salmonella typhi	-	-	-	-	-
Bactérias Gram-negativas	***Staphylococcus aureus***	-	-	-	-	-
	Streptococcus pneumoniae	-	-	-	-	-
	Bacillus subtilis	-	-	-	-	-
	Enterococcus faecalis	-	-	-	-	-

O comportamento das frações das macroalgas frente ao ensaio de sensibilidade de microrganismos está de acordo com Del Val e colaboradores (2001) que realizaram um extenso estudo com macroalgas das três classes provenientes das ilhas Canárias. Neste estudo foi demonstrado que dentro da classe das Rhodophytas, os extratos metanólicos da ordem Gigartinales (a qual pertecem *G. domingenses e G. birdiae*) não apresentaram atividade contra um largo espectro de microrganismos. Além disso, Lima-Filho e colaboradores (2002) testaram o extrato bruto hexânico de *G. domingensis* contra uma série de microrganismos gram-positivos e negativos e não encontrou atividade antibacteriana.

4.7 Atividade antifúngica

Todas as frações testadas de *G. domingensis* e *G. birdiae* não apresentaram inibição do crescimento das leveduras em nenhuma das concentrações testadas, conforme demonstra a tabela 5.

Tabela 5. Atividade dos extratos e frações de *G. birdiae* e *G. domingensis* frente às leveduras *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

Microrganismos	Extrato etanólico bruto	Fração MEOH	Fração AC	Fração HEX	Extrato aquoso
C. albicans	-	-	-	-	+
C. parapsilosis	-	-	-	-	+

Porém, os extratos aquosos das duas algas apresentaram atividade antifúngica. A metodologia apresentou-se dentro dos padrões determinados pela NCCLS sendo que o fluconazol apresentou CIM dentro do preconizado para as cepas de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*. Os resultados são apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Atividade antifúngica do extrato aquoso de *G. birdiae* e *G domingensis.*

Microorganismo	*G. domingensis*	*G. birdiae*	Controle: Fluconazol CIM (µg/mL)
C. albicans	1 diluição	3 diluição	0,5
C. parapsilosis	3 diluição	4 diluição	1,0

Os resultados demonstram que a alga *G. birdiae* apresentou-se mais ativa, pois seu extrato aquoso apresentou capacidade de redução de crescimento de 50% para *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* na terceira e quarta diluição, respectivamente. Ou seja, o extrato aquoso foi ativo para *Candida albicans* a 25% de sua concentração inicial e a 12,5% para *Candida parapsilosis*.

Cordeiro e colaboradores (2006) atentaram-se para o potencial antimicrobiano das proteínas das algas e determinaram a atividade antifúngica de uma fração protéica da alga *Hypnea musciformis* (Wulfen) lamouroux coletada no nordeste brasileiro. A atividade antifúngica foi associada à presença de lecitinas.

Os resultados com *Gracilarias* encontrados neste trabalho sugerem a investigação do composto responsável pela atividade antifúngica e a extensão dos estudos para outras espécies de fungos não só de importância médica como também de importância na agricultura, por exemplo.

4.8 Determinação de compostos fenólicos totais

O método de Folin–Ciocalteau para determinação de compostos fenólicos totais são extensivamente utilizados em análise de plantas e alimentos. Este método foi utilizado para a determinação do conteúdo total de compostos fenólicos dos extratos etanólicos brutos de *G. birdiae* e *G. domingensis*.

A Equação da curva de calibração do ácido gálico foi C = 0,1327A - 0,0083,onde C é a concentração do ácido gálico, A é a absorbância a 750 nm e o coeficiente de correlação R = 0,999.

A Tabela 7 demonstra que as duas espécies de *Gracilaria* apresentaram baixa concentração de compostos fenólicos em relação a plantas. Souza e colaboradores (2007) obtiveram valores bem mais elevados para plantas do cerrado brasileiro chegando a concentrações de 763,63 mg de equivalentes de ácido gálico/1 g de extrato etanólico.

Tabela 7. Compostos fenólicos totais do extrato etanólico de *G. birdiae* e *G domingensis.*

Amostra	Rendimento do Extrato etanólico (%)	Compostos Fenólicos totais (mg EAG/g extrato)
G. birdiae	2,12	7,43
G. domingensis	1,29	14,50

Raymundo e colaboradores (2004) encontraram valores semelhantes ao obtidos neste trabalho, porém, o alvo de estudo foram algas verdes do litoral do Estado de Santa Catarina.

4.9 Determinação de Proteínas Solúveis

Os extratos aquosos ativos no ensaio antifúngico foram submetidos à determinação de proteínas solúveis. Os resultados são apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Dosagem de proteína do extrato protéico de *G. birdiae* e *G domingensis.*

Amostra	Concentração de proteínas solúveis (µg de proteína/mg de massa alga fresca)
G. birdiae	8,96
G. domingensis	7,32

5. PRINCIPAIS CONCLUSÕES

Neste trabalho foi feia uma extensa busca por bioativos de *G. domingensis* e *G. birdiae* a partir de extratos brutos e frações de diferentes polaridades. Pode-se observar que:

- Todas as frações das algas *G. birdiae* e *G. domingensis* apresentaram atividade antioxidante frente aos experimentos testados. A fração mais apolar (HEX) de ambas as algas foi a mais ativa. A alga *G. birdiae* mostrou-se com maior potencial antioxidante em todos os ensaios;

- As frações HEX e AC de ambas as algas alteraram a viabilidade celular de macrófagos nas concentrações testadas. A fração MeOH de ambas as algas não apresentou alteração na viabilidade celular nas concentrações testadas;

- A fração MeOH de ambas as algas apresentou capacidade de inibição do "burst" oxidativo apenas nas concentrações de 250 e 500 µg/mL. Em concentrações inferiores, o "burst" oxidativo foi estimulado;

- Nenhuma das frações testadas, nem o extrato aquoso foram capazes de inibir o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas de importância médica;

- Nenhuma das frações testadas foi capaz de inibir o crescimento das leveduras *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*. O extrato aquoso de *G. birdiae* e *G. domingensis,* porém demonstrou-se ativo contra esses dois fungos de importância médica, sendo que *G. domingensis* foi mais ativa.

6. Referências Bibliográficas.

Abbas AK, Licihtman AH, Pober JS. Cellular and molecular Immunology, W.B. SAUNDERS COMPANY; 3 ed., 1997. 494 p.

Armisen R, Galactas F. Production, properties and uses of agar. In: McHugh, DJ (Ed.). Production and utilization of products from commercial seaweeds. FAO Fish. Tech Pap. 1987; 288: 1-57.

Augusto, O. Radicais Livres: bons, maus e naturais. São Paulo: Oficina de Textos. 2006; 115p.

Babior BM. Superoxid: a two-edge sword. Braz J Med Biol Res. 1997; 30: 141-155.

Babior BM. The respiratory urst of phagoytes. J Clin Invest. 1984; 73: 599-601.

Barreiros ALBS, David JM. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. Quim Nova. 2006; 29 (1): 113-123.

Bennamara A, Abourriche A, Berrada M, Charrouf M, Chaib N, Boudouma M, et al Methoxybifurcarenone: an antifungal and antibacterial meroditerpenoid from the brown alga Cystoseira tamariscifolia. Phytochemistry. 1999; 52: 37-40.

Berra CM, Menck CFM, Di Mascio P. Estresse Oxidativo, lesões no genoma e processso de sinalização no controle do ciclo celular. Quim Nova. 2006; 29 (6): 1340-4.

Blunt JW, Copp BR, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR. Marine Natural Products. Nat Prod Rep. 2006; 23: 26-78.

Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quatities of protein utilizing the principle of proteins-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248-254).

Brand-Williams W, Cuvelier, ME, Berset, C. Use of a free radical Method to evaluate antioxidant activity. Lebenson Wiss Technol. 1995; 28: 25-30.

Burg ND, Pillimger MH. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. Clin Immunol. 99: 7-17.

Burits M, Bucar F. Antioxidant Activity of *Nigella sativa* essential oil. Phytother Res. 2000; 14: 323-8.

Cahyana AH, SHUTO Y, KINOSHITA Y. Pyropheophytin a as an antioxidative substance from the marine alga, arame (Eisenia bicyclis). Biosci Biotechnol Biochem. 1992; 56: 1533-5.

Camarero VC, Junqueira VB, Colepicolo P, Karnovisky ML, Mariano M. Epithelial macrophaeges secrete a deactivating factor for superoxide release. J Cell Physiol. 1990; 145 (3): 481-487.

Cardozo KHM. Estudo de compostos fotoprotetores da radiação ultravioleta em algas: aminoácidos tipo micosporinas (MAAs). [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007.

Cardozo KHM, Carvalho VM, Pinto E, Colepicolo P. Fragmentation of mycosporine-like amino acids by hidrogen/deuterium exchange and electrospray ionisation tandem mass espectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2006; 20: 253-8.

Cardozo KHM, Guaratini T, Barros MP, Falcão VR, Tonon AP, Lopes N, et al. Metabolites from algae with economical impact. Comp Biochem Physiol C - Toxicol Pharmacol. 2007; 146: 60–78.

Cerqueira FM, Medeiros MHG, Augusto O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. Quim Nova. 2007; 30 (2): 441-9.

Cordeiro RA, Gomes VM, CarvalhoAFU, Melo VMM. Effect of proteins from seaweed Hypnea musciformis (Wulfen) Lamouroux on thr growth of human pathogen yeasts. Braz Arch Biol Technol. 2006; 49 (6): 915-92.

Critchley, A. T. & Ohno, M. (eds). Seaweed resources of the world. Japan International Cooperation Agency. Yokosuka, Japan. 366-371pp.

Del Campo JA, García-Gonzales M, Guerrero MG. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current states and perspectives. Apll Microbiol Biotechnol. 2007; 74: 1763-1774.

De Pierre, JW, Karnovisky, ML. Plasma membranes of mammalian cells: a review of methods for their characterization and isolation. J Cell Biology. 1973; 56: 275-303.

Del Val AG, Platas G, Basilio A, Cabello A, Gorrochategui J, Suay I, et al Screeninf of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). Int Microbiol. 2001; 4: 35-40.

Dodeigne C, Thunus L, Lejeune R. Chemiluminescence as diagnostic tool. A review. Talanta. 2000; 51: 415-439.

Findlay, JA; Patil, SD. Antibacterial constituintes of the diatom *Navicula delognei***.** J Nat Prod. 1984; 47 (5): 815-8.

Foti M, Piattelli M, Amico V, Ruberto G. Antioxidante activity of phenolic meroditerpenoids from marine algae. J Photochem Photobiol B - Biol. 1994; 26: 159-164.

Gombotz WR, Wee SF. Protein release from alginates matrices. Adv Drug Deliv Rev. 1998; 31 (3): 267-285.

Guaratini T. Antioxidantes de macroalgas marinhas: Caracterização química e Atividade in vitro. [Tese] São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.

Guaratini T, Medeiros MHG, Colepicolo P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. Quim Nova. 2007; 30 (1): 206-213.
Guimarães M, Plastino EM, Destombe C. Green mutant frequency in natural population of *Gracilaria domingensis* (Gracilariales, Rhodophyta) from Brazil. Eur J Phycol. 2003; 38: 165-9

Guzmán S, Gato A, Calleja JM**.** Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum.* Phytother Res. 2001: 15: 224–230.

Guzmán S, Gato A, Lamela M, Freire-Garabal M, Calleja JM**.** Anti-inflammatory and Immunomodulatory Activities of Polysaccharide from *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum.* Phytother Res. 2003; 17: 665–670.

Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanisms, measurement, and significance. Am J Clin Nutr. 1993; 57 (7): 715S-725S.

Halliwell B. Antioxidants in human health and desease. Annu Rev Nutr. 1996; 16; 33-50.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 4 ed. New york: Oxford University Press; 2006. 704p.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results means. Br J Pharmacol. 2004; 142: 231-255.

Halliwell B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide. Trends Biochem Sci. 2006; 31: 509-515.

Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. Biochem Soc Trans. 2007; 35: 1147-1150.

Hasting, JW, Wilson, T. Bioluminescence and chemiluminescence. Photochem Photobiol. 1976; 23: 461-473.

Hellio C, Bremer G, Pons AM, Gal YL, Bourgougnon. Inhibition of the development of microorganisms (bacteria and fungi) by extracts of marine algae from Brittany, France. Appl Microbiol Biotechnol. 2000; 54: 543-9.

Jantschko W, Furtmüller PG, Allegra M, Livrea MA, Jakopitsch C, Regesberger G, Obinger C. Redox Intermediates of Plant and Mammalian Peroxidases: A comparative Transient-Kinetic Study of Their Reactivity Toward Indole Derivatives. Arch Biochem Biophys. 2002; 398 (1): 12-22

Jensen A. Present and future needs for algae and algae products. Hydrobiologia. 1993; 260/261: 15-23.

Kim J-E, Choi S, Yoo J-A, Chung M-G. 8-Oxoguanine induces intramolecular DNA damage but free 8-oxoguanine protects intermolecular DNA from oxidative stress. 2004; (1-3):104-110.

Kabeya LM, de Marchi AA, Kanashiro A, Lopes NP, da Silva CHTP, Tupo MT, Lucisano-Valim YM. Inhibition of horseradish peroxidase catlytic by new 3-pheylcoumarin derivatives: syntesis and structure activity relationships. Bioorg Med Chem. 2007; 15: 1516-1524.

Khaleafa AF, Kharboush MAM, Metwalli A, Mohsen AF, Serwi A. Antibiotic (fungicidal) action from extracts of some seaweeds. Botanica Marina. 1975; 23: 163-165.

Kobayashi J, Murayama T, Ohizumi Y, Ohta T, Nozoe S, Sasaki T. Metachromin C, a new cytotoxic sesquiterpenoid from the Okinawan marine sponge hzppospngza metachromza. J Nat Prod. 1989; 52 (5): 1173-7

König GM, D. Wright, AD, Linden A. *Plocamium hamatum* and its monoterpenes: chemical and biological investigations of the tropical marine red alga. Phytochemistry. 1999; 52: 1047-1053.

Kujbida P, Hatanaka E, Campa A, Colepicolo P, Pinto E. Effects of microcystins on human polymorphonuclear leukocytes. Biochem Bioph Res Co. 2006; 341: 273-7.

Kumaran A, Karunakaran RJ. Antioxidant ans free radical scavenging activity of na aqueous extract of Coleus aromaticus. Food Chem. 2006. 97: 109-114.

Le Tutuor B. Antioxidant and pro-oxidant activities of the brow algae *Laminaria digitaba, Himanthalia elongate, Fucus vesiculosus, Fucus serratus* and *Ascophyllum nodosum.* J Appl Phycol. 1998; 10: 121-9.

Lhullier C, Horta PA, Falkenberg M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para Artemia salina. Rv Bras Farmacogn. 2006; 16 (2): 156-163.

Lima-Filho JVM, Carvalho AFFU, Freitas SM, Melo VMM. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern brazilian coast. Braz J Microbiol. 2002; 33: 311-3.

Loureiro APM, Di Mascio P, Medeiros MHG. Formação de adutos hexocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. Quim Nova. 2002; 25 (5): 777-793.

Macchiavello J, Saito R, Garófalo G, Oliveira EC. A comparative analysis of agarans from commercial species of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) grown *in vitro*. Hydrobiologia. 1999; 398/399: 397-400.

Maher, P. Redox control of neural function: Background, mechanisms, and significance. Antioxid Redox Signal. 2006; 8 (11-12): 1941-1970.

Marinho-Soriano E. Agar polysaccharides from *Gracilaria* species (Rhodophyta, Gracilariaceae). J Biotechnol. 2001; 89: 81-4.

Marquele FD, Di Mambro VM, Georgetti SR, Casagrande R, Valim YML, Fonseca MJV. Assessment of the antioxidant activities of Brasilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. J Pharm Biom Anal. 2005; 39: 455-462.

Mayer AMS, Hamann MT. Marine pharmacology in 2001–2002: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. Comp Biochem Phys C. 2005; 140: 265-286.

McHugh D. A guide to the seaweed industry. Roma: FAO Fisheries Tech; 2003. 441p.

Melo, VMM; Medeiros, DA; Rios, FJB; Castelar, LIM; Carvalho, ADFFU. Antifungal properties of proteins (agglutinins) from the red alga *Hypnea musciformis*. Bot Mar. 1997; 40: 281-4.

Mizel SB, Jaret P. Self defense. San Diego: Harcourt Brace Jovanovich, 1985. 240 pp.

Nagayama K, Iwamura Y, Shibata T, Hirayama I, Nakamura T. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. J Antimicrob Chemother. 2002; 50: 889-893.

National Commitee for clinical Laboratpory Standards (NCCLS). Reference method for broth dilution antimicrobial susceptibility testein: Aproved standard – second edition. NCCLS document M6-A7. USA, Wayne, Pennsylvania. 2002. v.22, n.15.

National Committee Clinical Laboratory Standarts (NCCLS). Reference method for broth diluition antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard. NCCLS document M27-A2, Wayne, PA, 2002.

Neto, A.M.P. (2007). Efeito dos poluentes metálicos nos níveis de pigmentos fotossintéticos presentes em algas marinhas e avaliação do papel estrutural dos carotenos em membranas miméticas. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Norziah MH, Ching CY Nutritional composition of edible seaweed *Gracilaria changgi*. Food Chem. 2000; 68: 69-76.

Okai Y, Higashi-Okai KI. Potent anti-inflammatory activity of pheophytin a derived from edible green alga, *Enteromorpha Prolifera* (SUJIAO-NORI). Int J Immunopharmacol. 1997; 19 (6): 355-8.

Pinto E. (2002). Modulação dos níveis de pigmentos e ácidos graxos em algas marinhas: função dos carotenóides e efeitos do estresse ambiental. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Punchard NA, Kelly FJ. Free radicals: a pratical aproach. London: Oxford University Press; 1996.

Rabadji, RC; Brigagão, MRPL; Camarero, VCPC, Colepicolo, P. Oscillation of reactive oxygen species released by activated neutrophils. Biol Rhythm Res. 1996; 27 (3): 269-281.

Raffa RB, Iannuzzo JR, Levine DR, Saeid KK, Schwartz RC, Sucic NT, et al Bacterial Communication "Quorum Sensing" via Ligands and Receptors: A Novel Pharmacologic Target for the Design of Antibiotic Drugs. J Pharmacol Exp Ther. 2004; 312 (12): 417-423.

Raymundo MS, Horta P, Fett, R. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). Braz J Pharma Sci. 2004; 40 (4): 495-503.

Raven PH, Evert RF, Curts H. Biologia Vegetal 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. 906p.

Rodrigues ME, Rodriguez D, Russo M, Campa A. Macrophage activation include high intracelular myeloperoxidase activity. Biochem Biophys Res Commun. 2002; 292: 869-873.

Rocha FD, Pereira RC, Kaplan MAC, Teixeira VL. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. Rv Bras Farmacogn. 2007; 17(4): 631-9.

Romay C, Armesto J, Remirez D, González R, Ledon N, Garcia I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. Inflamm Res. 1998[a]; 47: 36-41.

Romay C, Ledon N, González R. Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation. Inflamm Res. 1998[b]; 47: 334-8.

Ruzgas T, Csöregi E, Emnéus J, Gorton L, Marko-Varga G. Anal. Chim. Acta. 1996; 330 (2-3): 123-138.

Sánchez-Moreno, C. Review: Methods use to evaluate the free radical scavanging activity in foods and biological systems. Food Sci Tech Int. 2002; 8 (3): 121-137.

Sbarra AJ, Karnovisk ML. The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. J Biol Chem. 1959; 234 (6): 1355-1362.

Shu YZ. Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. J Nat Prod. 1998; 61: 1053-1071.

Simões COM, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 5 ed.; 2004.

Smit AJ. Medicinal and Pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. J Appl Phycol. 2004; 16: 245-262.

Souza, CM de M, Silva HR, Vieira-jr GM, Ayres MCV, Costa CLS, Araújo DS, et al. Fenois totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Quim Nova. 2007; 30 (2): 351-5.

Ursi S, Plastino, EM. Crescimento *in vitro* de linhagens de coloração vermelja e verde clara de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) em dois meios de cultura: análise de diferentes estágios reprodutivos. Rev Brasil Bot. 2001; 24 (4): 587-594.

Van Den Hoek C, Mann DG e Jahns HM. Algae: An introduction to phycology. Cambridge: Cambridge University Press. 1995. 623p.

Vairappan CS, Kawamoto T, Miwa H., Suzuki M. Potent antibacterial activity halogenated compounds against antibiotic resistant bacteria. Planta Med. 2004; 70: 1087-1090.

Xue CH, yu G, Hirata T, Terao J, Lin H. Antioxidative activitiee of seveal marine polysssacharides evaluetad in a phosphadylcholine-lipossomal suspension and organic solvents. Biosci Biotech Bioch. 1998; 62: 206-9.

Yan X, Xiancui L, Xiao F. Prevention of fish oil rancidity by phlorotanin from Sargassum kjellmanianum. J Apll Phycol. 1996; 8: 201-3.

Zhang Wei-Wei, Duan Xiap-Juan, Huang Hai-Lan, Zhang Y, Wang Bin-Gui. Evaluation of 28 marine algae from the Qindao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from *Symphyocladia latiuscula* (Rhodomelaceae). J Apll Phycol. 2007; 19 (2): 97-108.

Zubia M, Robledo D. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula. J Apll phycol. 2007; 19: 449-458.

Wen X, Peng C, Zhou H, Lin Z, Lin G, Chen S, Li P. Nutritional composition and assesment of *Gracilaria lemaneiformis* Bory. J Integr Plant Biol. 2006; 48 (9): 1047-1053.

7. Súmula curricular

Dados pessoais

Patrícia Miranda da Silva
Alfenas-MG, 19 de Janeiro de 1982

Educação

2006 – 2009: Mestranda em Ciências, Área de Bioquímica, Instituto de Química – USP, São Paulo, SP. Bolsa: CNPq
2000 – 2004: Graduação em Farmácia, Modalidade de Fármacos e Medicamentos. Universidade Federal de Alfenas, Alfenas - MG.
1993 – 1999: Escola Estadual Dr. Emílio da Silveira, Alfenas - MG.
1988 – 1992: Escola Estadual Coronel José Bento, Alfenas - MG.

Ocupação

Pesquisadora e Supervisora de Projetos, EMS. Campinas-SP.

Participação em eventos científicos

- *XXXVII Reunião anual da Sociedade brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular* (17 a 20 de maio de 2008, Águas de Lindóia, SP, Brasil): Antioxidant activities of Gracilaria domingensis and Gracilaria birdiae (pôster).

- *XXXVI Reunião anual da Sociedade brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular* (21 a 25 de maio de 2007, Salvador, BA, Brasil): Modulation of neutrophil activation by extracts o Gracilaria domingensis (pôster).

- *XVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE.* (28 a 31 de agosto de 2002, Salvador, BA, Brasil): Análise Bioquímica de fígado de ratos submetidos à ingestão crônica de etanol e vitamina E (pôster).

- *LIV Reunião Anual da SBPC.* (7 a 12 de Junho de 2002, Goiânia, GO, Brasil): Lipoperoxidação hepática e dosagem de enzimas séricas em ratos submetidos à ingestão crônica de etanol e vitamina E (pôster).