

**UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE
DE ECOSISTEMAS COSTEIROS E MARINHOS
MESTRADO EM ECOLOGIA**

BEATRIZ SASSAKI

**AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS
EXTRATOS DE DIFERENTES POLARIDADES OBTIDOS A PARTIR DE
MACROALGAS MARINHAS PRESENTES NO LITORAL DO ESTADO DE SÃO
PAULO (BRASIL)**

SANTOS - SP

2015

BEATRIZ SASSAKI

**AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS
EXTRATOS DE DIFERENTES POLARIDADES OBTIDOS A PARTIR DE
MACROALGAS MARINHAS PRESENTES NO LITORAL DO ESTADO DE SÃO
PAULO (BRASIL)**

Dissertação apresentada à Universidade Santa Cecília, como parte dos requisitos para obtenção de Título de Mestre em Ecologia no Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, sob orientação da Profa. Dra. Luciana Lopes Guimarães.

**SANTOS - SP
2015**

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho, por qualquer que seja o processo,
exclusivamente para fins acadêmicos e científicos.

Sasaki, Beatriz.

Avaliação do perfil químico e potencial antioxidante dos extratos de diferentes polaridades obtidos a partir de macroalgas marinhas presentes no litoral do estado de São Paulo (Brasil)/ Beatriz Sasaki, 2015.

N. fls.102

Orientador: Profa. Dra. Luciana Lopes Guimarães

Dissertação de Mestrado - Universidade Santa Cecília, Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, Santos, SP, 2015.

1. Algas marinhas. 2. Antioxidante. 3. Compostos fenólicos. 4. Raman. 5. Metabólitos secundários. I - Guimarães, Luciana Lopes. II - Avaliação do perfil químico e potencial antioxidante dos extratos de diferentes polaridades obtidos a partir de diferentes macroalgas marinhas presentes no litoral do estado de São Paulo (Brasil).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às minhas filhas, Kali e Maya, que puderam compreender minha ausência e dedicação para a conclusão desta dissertação.

AGRADECIMENTOS

Às energias que me impulsionam a seguir meu caminho com coragem.

Aos meus pais Luiz Carlos Sasaki e Nicéia Vaz de Lima Sasaki por estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão Luiz Felipe Sasaki e minha cunhada Dayanne Rocha Barbosa que me sempre estão dispostos a ajudar.

Ao meu marido João Alberto Paschoa dos Santos, meu maior incentivador, que acima de tudo torna minha vida mais fácil e simplifica todos os momentos difíceis que tivemos ao longo deste trabalho. Se não fosse ele jamais teria iniciado e concluído esta dissertação. Meu agradecimento especial a você.

Às minhas filhas Kali e Maya, sem elas nada teria sentido. Por entenderem a minha ausência e me apoiarem em minhas escolhas mesmo ainda não entendendo ao certo a necessidade de tamanha ausência.

À minha orientadora profa. Dra. Luciana Lopes Guimarães, minha mestra, sempre disposta a me ajudar, me ensinando, sendo paciente e compreensiva. Sempre com palavras de incentivo e nunca me deixando perder o ritmo do trabalho.

Ao prof. Msc. André Luiz Faccini, que foi fundamental para a conclusão deste trabalho, além de todos os ensinamentos agregou grande conhecimento a esta pesquisa.

À equipe do Laboratório Central de Biologia da Unisanta, sem exceção, foram impecáveis quanto a organização e auxílio durante as pesquisas.

Ao prof. Dr. Landulfo Silveira que me auxiliou e disponibilizou o equipamento Raman para que pudesse ser realizada uma parte desta pesquisa.

“Sonho que se sonha só, é só um sonho que se sonha só. Mas sonho que se sonha junto, torna-se realidade.”

Raul Seixas

RESUMO

As macroalgas marinhas são amplamente distribuídas no Brasil e possuem grande potencial para o desenvolvimento de estudos que visam à caracterização de seus compostos, bem como o detalhamento de suas atividades biológicas, ecológicas e farmacológicas. Neste contexto, pode-se destacar a descoberta de compostos para elucidação de novas drogas, que possam auxiliar na terapia de doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Esta dissertação teve por objetivo avaliar o perfil de componentes químicos e potencial antioxidante das macroalgas marinhas *Ulva fasciata*, *Ulva linza*, *Padina gymnospora* e *Jania adhaerens* presentes no litoral do estado de São Paulo. Macroalgas *in natura* foram coletadas no município de Guarujá (São Paulo, Brasil), identificadas e desidratadas em estufa. Em seguida, as algas foram trituradas e submetidas aos processos de maceração exaustiva por 7 dias, com solventes de diferentes polaridades (Hexano, Clorofórmio, Metanol e Água). Para as análises químicas foram empregados ensaios cromáticos para a identificação de metabólitos secundários e também foram realizadas análises químicas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Espectroscopia Raman. A avaliação do potencial antioxidante dos extratos foi realizada através do emprego do método do DPPH em CCD (Autografia). Os resultados obtidos evidenciaram a presença de flavonóides em todas as algas estudadas; saponinas nas algas verdes *U. fasciata* e *U. linza*; alcaloides, taninos e esteroides/terpenóides nas algas *U. fasciata*, *U. linza* e *P. gymnospora*. A intensa fluorescência presente nas amostras exerceu forte influência na obtenção de espectros Raman com boa resolução. Em relação à presença de compostos com potencial antioxidante, a alga *P. gymnospora* apresentou 04 compostos com atividade antioxidante nos extratos hexânico e metanólico. A alga *U. fasciata* apresentou 01 composto com atividade antioxidante no extrato aquoso e a alga *Ulva linza* apresentou 02 compostos com potencial antioxidante nos extratos hexânico e metanólico. Os resultados obtidos no presente estudo abrem perspectivas para a utilização dos extratos obtidos a partir das algas *U. linza*, *U. fasciata* e *P. gymnospora* em estudos que visam a descobertas de novos fármacos com potencial antioxidante.

Palavras Chave: Macroalgas. Antioxidante. Raman. Metabólitos secundários.

ABSTRACT

The seaweeds are widely distributed in Brazil and have great potential for the development of studies that aim will characterization of theirs compounds as well as the details of biological, ecological and pharmacological activities. In this context, we can highlight the discovery of new compounds for elucidation of new drugs that can help in diseases related to oxidative stress therapy. This work aimed to evaluate the profile of chemical components and antioxidant potential of marine macroalgae *Ulva fasciata*, *Ulva linza*, *Padina gymnospora* e *Jania adhaerens* present on the coast of São Paulo. The macroalgae were collected in the city of Guarujá (São Paulo, Brazil), identified, dried and then subjected to maceration extraction for 7 days with solvents of different polarities. Chromatic assays were employed for the identification of secondary metabolites and chemical analyzes were also carried out by Thin Layer Chromatography (TLC) and Raman spectroscopy. The evaluation of the antioxidant potential of extracts was performed using the method of DPPH in TLC (autography). The secondary metabolite flavonoid were found in all algae; saponins were identified the in green algae *U. fasciata* and *U. linza*; alkaloids, tannins and steroids/ terpenoids were found in *U. fasciata*, *U. linza* and *P. gymnospora*. The intense fluorescence in the samples exerted a strong influence in obtaining Raman spectra with good resolution. Regarding the presence of compounds with antioxidant potential, the algae *P. gymnospora* showed 04 compounds with antioxidant activity in hexane, chloroform and methanol extracts. The seaweed *U. fasciata* presented 01 compound with antioxidant activity in the aqueous fraction and the alga *Ulva linza* showed 02 compounds with antioxidant potential in hexane and methanol extracts. The search for new molecules with antioxidant potential has increased in recent decades when it was discovered a direct relationship between oxidative stress in the etiology of various diseases such as atherosclerosis and some cancers. Accordingly, antioxidants may become very important in the prevention and / or treatment of these pathologies. The results of this study create perspectives for the use of hexane and methanol extracts obtained from algae *U. linza*, *U. fasciata* and *P. gymnospora* in studies that seek the discovery of new drugs with antioxidant potential.

Keywords: Macroalgae. Antioxidant. Raman. Secondary metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Algas verdes coletadas para o estudo.	18
Figura 2 – Grupos funcionais isolados a partir de algas verdes.	19
Figura 3 – <i>Jania adhaerens</i> Lamouroux.	20
Figura 4 – Oxylipinas presentes em algas vermelhas (Divisão Rhodophyta).	22
Figura 5 – Monoterpenos halogenos isolados de algas vermelhas das famílias Plocamiaceae e Rhizophyllidaceae.	22
Figura 6 – Acetogeninas isoladas de algas vermelhas do gênero <i>Laurencia</i> .	23
Figura 7 – Terpenóides isolados do gênero <i>Laurencia</i> , sesquiterpenoides, diterpenóides halogenados e sesterpenóide halogenado.	23
Figura 8 – Floratinos e compostos fenólicos presentes em algas pardas.	26
Figura 9 – Acil-floroglucinóis, quinonas, hidroquinonas preniladas de algas pardas.	27
Figura 10 – Sesquiterpenos estendidos de algas pardas.	27
Figura 11 – Metabólitos secundários sintetizados pelo gênero <i>Laurencia</i> .	29
Figura 12 – Estrutura química da Briostatina.	32
Figura 13 – Imagem da região de coleta do material biológico no município do Guarujá.	41
Figura 14 – Imagem da praia do Guaiuba.	42
Figura 15 – Imagem da praia de Pernambuco.	42
Figura 16 – Amostra das algas coletas nas praias do Guaiuba e Pernambuco para obtenção dos extratos.	43
Figura 17 – Fluxograma Processo extrativo fracionado.	45
Figura 18 – Placa de cromatografia em fase de processamento	46

Figura 19 – Sistema Raman dispersivo utilizado para obtenção dos espectros das algas.	53
Figura 20 – Rendimento dos extratos.	55
Figura 21 – Resultados das análises de Flavonóides (teste de cloreto férrico para Chalconas).	57
Figura 22 – Resultado das análises de saponinas.	59
Figura 23 – Perfil cromatográfico sob a luz natural.	67
Figura 24 – Perfil cromatográfico sob a luz UV 254 nm.	67
Figura 25 – Perfil cromatográfico sob a luz 365 nm.	68
Figura 26 – Atividade antioxidante do extrato hexânico (Painel A) e extrato metanólico (Painel B) da alga <i>U. linza</i> .	71
Figura 27 - Atividade antioxidante do extrato aquoso da alga <i>U. fasciata</i> .	71
Figura 28 – Atividade antioxidante de componentes presentes nos extratos hexânico (Hex), e metanólico (Met) da alga <i>P. gymnospora</i> .	72
Figura 29 – Espectro Raman do extrato aquoso da alga verde <i>Ulva fasciata</i> .	75
Figura 30 – Espectro Raman do extrato aquoso da alga verde <i>Ulva linza</i> .	75
Figura 31 – Espectro Raman do extrato aquoso da <i>Padina gymnospora</i> .	76
Figura 32 – Espectro Raman do extrato aquoso da <i>Jania adhaerens</i> .	76
Figura 33 – CCD da alga <i>U. lactuca</i> utilizada na técnica de TLC-Raman .	79
Figura 34 – Espectro Raman da <i>Ulva lactuca</i> , extrato hexânico	80
Figura 35 – Espectro Raman da <i>Ulva lactuca</i> , extrato aquoso.	80
Figura 36 - Espectro Raman da <i>Ulva lactuca</i> , extrato clorofórmico.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação do material coletado, as respectivas datas, locais de coleta e número de acesso das exsiccatas depositadas no herbário da Universidade Santa Cecília.	44
Tabela 2 – Identificação e classificação filogenética do material biológico.	44
Tabela 3 – Massa dos extratos com polaridades diferentes de cada alga.	55
Tabela 4 – Resultados das análises de metabólitos secundários.	66
Tabela 5 – Rf's dos componentes presentes nas algas.	69
Tabela 6 – Metabólitos com atividade antioxidante detectados nas algas estudadas	82

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAO – Atividade Antioxidante

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CO₂ – Dióxido de Carbono

DPPH-1,1 –difetil – 2 – picrilhidrazil, radical livre

EMEC - extrato metanólico para os ensaios cromáticos

EAEC – extrato aquoso para os ensaios cromáticos

EROs – Espécies reativas de oxigênio

HCl – Ácido clorídrico

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

mL – mililitro

O₂⁻ - Superóxido

OH⁻- Radical Hidroxila

O₂ – Oxigênio

R_f – Fator de retenção

SERS – Surface-enhanced Raman spectroscopy

TLC – Thin-Layer Chromatography

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 CHLOROPHYTA.....	17
2.2 RHODOPHYTA.....	19
2.3 OCHROPHYTA (PHAEOPHYCEAE).....	24
2.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	28
2.5 FÁRMACOS E ALGAS MARINHAS.....	30
2.6 ALGAS E A BIODIVERSIDADE.....	33
2.7 DOENÇAS RELACIONADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO.....	35
2.8 CULTIVO DE ALGAS.....	38
3. OBJETIVOS.....	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 LOCAL ESTUDADO.....	41
4.2 IDENTIFICAÇÃO E PROCESSAMENTO INICIAL.....	43
4.2.1 MATERIAL PARA ANÁLISE MORFOLÓGIA E CONFIRMAÇÃO DA ESPÉCIE	44
4.3 PROCESSO EXTRATIVO.....	44
4.4 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	45
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	46
4.6 AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ATRAVÉS DE ENSAIOS CROMÁTICOS E/OU DE PRECIPITAÇÃO.....	47
4.6.1 FLAVONÓIDES.....	47
4.6.2 SAPONINAS.....	48
4.6.3 ALCALÓIDES.....	49
4.6.4 TANINOS.....	50
4.6.5 ANTRAQUINONAS.....	51
4.6.6 ESTERÓIDES/TERPENÓIDES.....	52
4.7 ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	52
4.7.1 TLC-RAMAN.....	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS.....	55
5.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	56
5.2.1 FLAVONÓIDES.....	57
5.2.2 SAPONINAS.....	58
5.2.3 ALCALÓIDES.....	60
5.2.4 TANINOS.....	62
5.2.5 ANTRAQUINONAS.....	63
5.2.6 ESTERÓIDES/TERPENÓIDES.....	63
5.3 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	66
5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	69
5.5 ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	74
5.5.1 TLC RAMAN.....	78
5.6 RELAÇÃO METABÓLITOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	82
6. CONCLUSÕES.....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

1. INTRODUÇÃO

Os biomas marinhos ocupam cerca de 70% da biosfera os quais detêm uma diversidade taxonômica e bioquímica importante sendo uma importante fonte de metabólitos bioativos (HOLDT & KRAAN, 2011).

Algas marinhas são os organismos aquáticos mais antigos, havendo evidências de sua existência no período pré-cambriano (3,5 bilhões de anos, aproximadamente). São seres uni ou pluricelulares fotossintetizantes que são distintos das plantas por não possuírem tecidos especializados e embrião. Desempenham um papel ecologicamente semelhante àquele exercido pelas plantas terrestres, sendo responsáveis pela maior produtividade de oxigênio do planeta (BICUDO & BICUDO, 1970).

Por serem responsáveis pela estruturação da atmosfera terrestre, possibilitam a vida de todos os seres vivos aeróbicos sobre a superfície do planeta pela produção de oxigênio molecular e a consequente formação da camada de ozônio. São organismos eucariotos que apresentam clorofila e um talo não diferenciado em raiz, caule ou folhas. No ambiente aquático, as algas podem fazer parte dos bentos (indivíduos fixos no substrato) ou plâncton (indivíduos suspensos na água) (HORTA, 2000).

As macroalgas são classificadas em três grandes grupos: Ochrophyta (Phaeophyceae) (algas pardas), Rhodophyta (algas vermelhas) e Chlorophyta (algas verdes). As características entre elas diferem com relação a fisiologia e aos compostos presentes (SOARES *et al.*, 2012). Algumas possuem um maior conteúdo mineral, outras um maior teor proteico, e algumas apresentam alto conteúdo de fibras. Além disso, são excelentes fontes de vitaminas A, B1, B12, C, D e E, riboflavina, niacina, ácidos pantotênico e fólico e minerais, tais como Ca, P, Na e K (DHARGALKAR & VERLECAR, 2009).

As algas são fontes de compostos fitoquímicos biologicamente ativos, que incluem carotenoides, ficobilinas, ácidos graxos, polissacarídeos, vitaminas, esteróis de tocoferol e ficocianinas, entre outros. Muitos desses compostos foram reconhecidos pela atividade biológica benéfica para a saúde humana e animal. Alguns dos potenciais benefícios incluem o controle de hiperlipidemia, trombose, tumores e obesidade (PLAZA *et al.*, 2008).

Além das abordagens sobre ação defensiva de extratos ou substâncias puras, alguns trabalhos com macroalgas marinhas no Brasil exploraram a variabilidade na produção destas defesas químicas. O entendimento da variabilidade qualitativa e quantitativa na produção dos metabólitos secundários é um aspecto essencial em estudos de ecologia química, uma vez que influencia a evolução das interações (PEREIRA & DA GAMA, 2008).

Muitos desses organismos sintetizam substâncias a partir de suas dietas e as utilizam em eventos para sua proteção, esses metabólitos são definidos como substâncias orgânicas produzidas por vias sintéticas derivadas do metabolismo primário e secundário, os quais estão envolvidos em processos vitais e de adaptação das espécies ao meio ambiente (TEIXEIRA, 2002).

As algas podem estar associadas ao estágio evolutivo superior, levando à produção de metabólitos secundários diversificados e conseqüentemente à expressão de inúmeras atividades biológicas. São capazes de sintetizar metabólitos halogenados que podem pertencer à praticamente todas as classes químicas, desde hidrocarbonetos de cadeia curta, cetonas simples, fenóis e acetogeninas até sofisticados terpenos (CARVALHO & ROQUE, 2000).

A procura por novas substâncias antioxidantes, especialmente de origem natural, tem sido objeto de vários estudos (OLIVEIRA *et al.*, 2009; PESSUTO *et al.*, 2009). O interesse inicial pelo estudo de substâncias com atividade antioxidante (AAO) surgiu no Japão a partir do isolamento dos fosfolipídeos presentes em algas verdes, vermelhas e pardas, na busca de novos aditivos para alimentos, em substituição àqueles antioxidantes sintéticos utilizados, como o hidroxianisol butilado (BHA) e o hidroxitolueno butilado (BHT), os quais mostravam efeitos carcinogênicos, alterações enzimáticas e lipídicas em animais (FUJIMOTO & KANEDA, 1980).

Como qualquer organismo fotossintético, encontram-se expostas à grande quantidade de luz e altas concentrações de oxigênio, combinação que origina radicais livres, assim como, outros potentes oxidantes. A ausência de danos oxidativos nos ácidos graxos poli-insaturados estruturais das membranas algais sugere que elas possuem compostos e mecanismos antioxidantes (MATSUKAWA *et al.*, 1997). Fatores ambientais como a poluição, altos índices de radiação ultravioleta, que caracterizam qualquer estresse são capazes de gerar um aumento na produção das defesas químicas das macroalgas (RENAUD *et al.*, 1990).

No Brasil, as pesquisas com produtos naturais de origem marinha, particularmente as algas, tiveram início na década de 60. Naquela época, houve grande investimento por parte das indústrias farmacêuticas na busca de substâncias bioativas a partir dos organismos que vivem nos oceanos. Pode-se dizer que a química de produtos naturais marinhos, incipiente na década de 1970, desenvolveu-se rapidamente nos anos 80 e amadureceu na década de 90 (FAULKNER, 2000). No entanto, a maioria das informações científicas refere-se à composição química e à aplicabilidade desses organismos, muitos dos quais são espécies endêmicas. Devido à diversidade de espécies, há grande potencial de pesquisa para a área, principalmente com relação à atividade biológica apresentada pelas algas (PINTO *et al.*, 2002).

Cerca de quatro milhões de toneladas de macroalgas são colhidas anualmente em todo o mundo, sendo os principais produtores a China e o Japão, seguidos pelos Estados Unidos e Noruega (ZEMKE-WHITE & OHNO, 1999). A partir das algas são obtidos produtos imprescindíveis para a vida do homem moderno, com valores que ultrapassam alguns bilhões de dólares anuais, entre eles podemos citar a produção de alimentos pela indústria de laticínios (iogurtes, sorvetes, achocolatados) e embutidos (salsichas, presuntos) produtos obtidos a partir da indústria não alimentícia como têxtil, tintas e de perfumes, e na indústria farmacêutica com produtos anticoagulantes e anti-inflamatórios (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

Em vista destes fatos, tornam-se essenciais estudos que visem à avaliação dos componentes químicos presentes nas macroalgas marinhas. O presente estudo objetivou avaliar o perfil de componentes químicos e analisar o potencial antioxidante de macroalgas marinhas dos grupos Chlorophyta, Rhodophyta, Ochrophyta (Phaeophyceae) do litoral do estado de São Paulo (Brasil).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CHLOROPHYTA

As algas verdes são uma linhagem antiga e muito diversificada (YOON, 2004), ainda com poucas informações sobre o seu genoma. Existem apenas oito genomas completos de Chlorophyceae, no *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information*) sendo todas da ordem Chlamydomonadales.

Segundo critérios ultraestruturais estão subdivididas em quatro classes (Prasynophyceae, Charophyceae, Ulvophyceae e Chlorophyceae) (LEE, 2008). Dentre essas, a classe Ulvophyceae possui cinco ordens (Ultrichales, Ulvales, Cladophorales, Bryopsidales e Dasycladales (WYNNE, 2005), são de habitat marinho, em particular, na região entremarés e estão bem representadas na flora brasileira por 29 gêneros, sendo a clorofila a e b as mais abundantes (PEDRINI, 2011).

A divisão em ordens e famílias tende a ser bem definido, a partir de características facilmente observáveis, como formação de colônias, formato celular, presença ou não de flagelos. Entretanto o delineamento de gêneros e espécies é uma tarefa trabalhosa, devido a semelhança morfológica e a plasticidade fenotípica destes organismos (FUCIKOVÁ *et al.*, 2011).

A morfologia desta classe é muito diversificada, encontrando-se organismos unicelulares, coloniais, cocoides, palmelóide e filamentosos, e até multicelulares (LEWIS & MCCOURT, 2004).

São conhecidas como produtoras de sesquiterpenos e diterpenos, em sua maioria, produzidos por espécies de *Caulerpales* (PEREIRA & DA GAMA, 2008). Outros poucos gêneros (com destaque para *Avrainvillea*, *Cymopolia* e *Neomeris*) também produzem metabólitos halogenados (BLUNT, 2011).

As macroalgas pertencentes ao gênero *Ulva*, da classe Ulvophyceae apresentam ampla distribuição em todo o mundo proliferando-se geralmente em águas costeiras eutrofizadas (figura 1). Possuem um polissacarídeo solúvel em água denominado de ulvana, podendo ser extraído da parede celular e representa de 8-29% do peso seco da alga. Os principais componentes da ulvana são resíduos sulfatados de ramnose ligados a ácidos urônicos (LAHAYE & ROBIC, 2007).

Algas dessa classe (pertencentes ao gênero *Caulerpa*) são capazes de se desenvolver em qualquer tipo de substrato e sua multiplicação é favorecida pela sua capacidade de sintetizar algumas toxinas, como a caulerpina (GALGANI *et al.*, 1996). Outros terpenóides bioativos foram isolados de outros gêneros da ordem *Bryopsidales*, como o halimedatrial, isolado de representantes do gênero *Halimeda* e o udoteal de espécies de *Udotea* (PAUL, 1986).

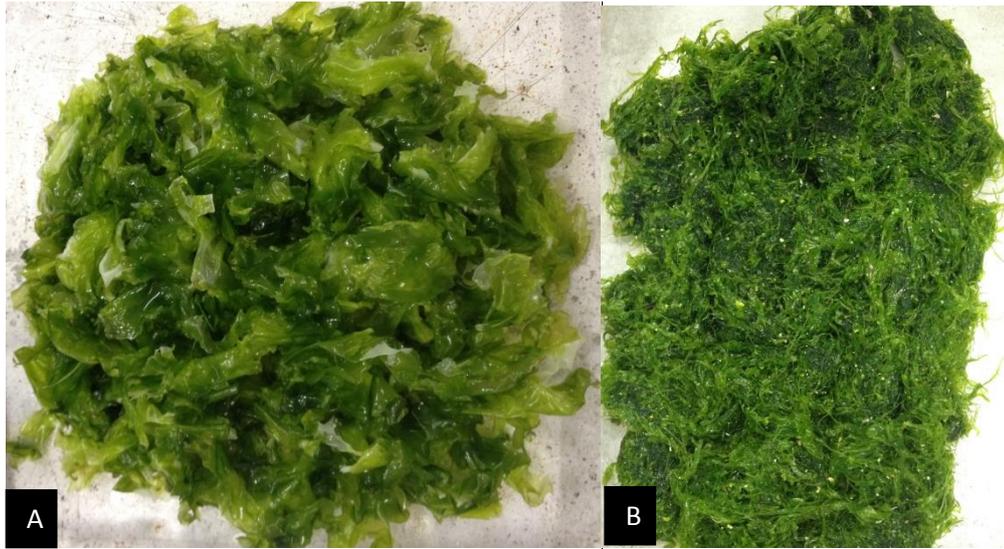


Figura 1. Algas verdes coletadas para o estudo. Painel A, *U. fasciata* Delile e Painel B, *U. linza* Linnaeus.

Fonte: Arquivo pessoal

Em áreas de elevada produtividade de algas (mares temperados e frios), os estudos químicos em algas verdes não revelaram em geral a presença de metabolitos secundários. Em contraste, em águas tropicais, espécies de certas famílias de algas verdes são capazes alguns compostos biologicamente ativos e relacionados com a defesa química das algas frente a herbivoria (BLUNT, 2011).

As algas verdes marinhas são pouco estudadas quanto à química de produtos naturais no mundo e, principalmente, no Brasil. Dentre os representantes das *Ulvophyceae*, são interessantes as algas tropicais e subtropicais da ordem *Bryopsidales*. Estas são caracterizadas pela produção de terpenos contendo o grupamento 1,4-diacetoxibutadieno e seus derivados (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

As espécies de algas verdes quimicamente ricas pertencem geralmente a três famílias típicas de águas tropicais: *Caulerpáceae*, *Udoteáceae* e *Dasycladaceae*. As duas primeiras famílias (em particular os gêneros *Caulerpa*, *Udotea*, *Chlorodesmis* e *Rhipocephalus*) produzem geralmente terpenóides (sesqui-o diterpenóides), muitas

vezes com grupos funcionais característicos e muito reativos como aldeídos, bis-enolacetatos e furanos (figura 2).

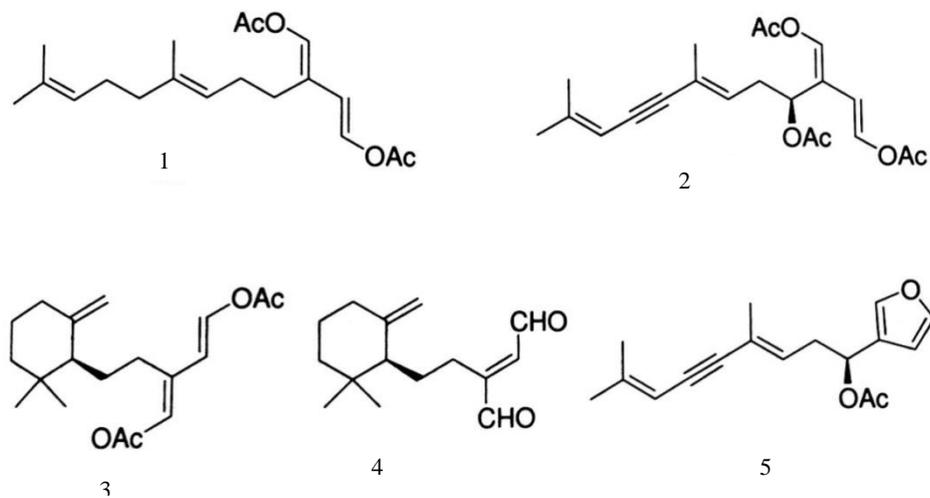


Figura 2. Grupos funcionais isolados a partir de algas verdes.

Fonte: PALERMO, 2010

Das 97 espécies de algas pertencentes ao gênero *Ulva* já identificadas e catalogadas no mundo (Algaebase, 2015), somente a *U. fasciata*, *U. lactuca*, *U. rigida*, *U. olivascens* e *U. reticulata* foram objeto de algum estudo fitoquímico relativo a atividade biológica que foi investigada em extratos preparados com diferentes solvente.

2.2 RHODOPHYTA

As Rhodophyta (algas vermelhas) possuem a clorofila a, mas produzem pigmentos vermelhos, as ficoeritrinas, como os mais abundantes, conferindo-lhes à coloração vermelha (figura 3). Constituem o grupo com o maior número de espécies na costa brasileira, sendo a ordem Ceramiales a mais representativa. São quase exclusivamente macroscópicas, marinhas e bentônicas. Podem ter coloração rósea, vermelha, violeta, roxa, esbranquiçada pela impregnação de carbonato de cálcio (calcárias), preta ou até mesmo esverdeada, quando em águas superficiais ou em sistemas continentais de água doce (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

São capazes de sintetizar metabólitos secundários biologicamente ativos, que podem pertencer a praticamente todas as classes químicas, inclusive fenóis e

terpenos (FENICAL & NORRIS, 1975). Dentre as Rhodophyta, o gênero *Laurencia* J.V. Lamouroux, consiste no maior produtor de metabólitos secundários (ERICKSON, 1983), destacando-se como fonte para síntese de produtos naturais. É a partir das algas vermelhas que se extraem ficocoloides usados como aditivos alimentares e na produção de meio de cultura bacteriano (MAURICIO *et al.*, 2011). As algas vermelhas são eficientes na produção de polissacarídeos sulfatados, como as carragenas e o ágar que chegam a representar mais de 70% do seu peso e têm razoável valor comercial (VAN DEN HOEK *et al.*, 1997).



Figura 3. *Jania adhaerens* Lamouroux.
Fonte: Arquivo pessoal.

Também são descritas por possuir compostos indutores de resistência em plantas e dentre as macroalgas uma das espécies mais estudadas é a *Hypnea musciformis*, que é fonte do polissacarídeo carragenana. A I-carragenana, um polissacarídeo sulfatado encontrado na parede celular de algas marinhas vermelhas, é um composto elicitador que induz o acúmulo de ácido salicílico e de outros compostos (MERCIER *et al.*, 2001).

O estudo de produtos naturais marinhos de algas vermelhas apresenta algumas peculiaridades em relação às demais algas. Embora constitua um grande número de espécie, mas com biomassa bem menor que a biomassa das algas pardas, algumas são cultivadas na costa de inúmeros países, inclusive no Brasil, que podem servir de fonte para a obtenção de produtos (TEIXEIRA, 2013).

As principais algas produzidas experimentalmente no Brasil são espécies de *Gracilaria* e *Hypnea*. Recentemente, a alga *Kappaphycus alvarezii*, originária das Filipinas e introduzida no Brasil em 1995, teve seu cultivo liberado pelo IBAMA para a região entre a Baía de Sepetiba, RJ, e Ilha Bela, SP (CAVALI, 2010).

As espécies de *Gracilaria domingensis* e *Gracilaria birdiae*, foram cultivadas na costa brasileira e os extratos apolares contendo carotenoides, ácidos graxos, colesterol e sitosterol apresentaram atividade antioxidante. Em outro estudo, os extratos polares dessas algas também apresentaram atividade antioxidante (SOUZA *et al.*, 2010). A espécie de *Plocamium* caracteriza-se pela produção de monoterpenos halogenados (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

No Brasil, os produtos naturais das espécies do gênero *Laurencia* coletadas na costa brasileira são os mais estudados, em particular, os sesquiterpenos e acetogeninas (DAVYT *et al.*, 2001; SUDATTI *et al.*, 2011). Várias atividades biológicas foram empregadas para os seus produtos naturais, como antitripanossômica (VEIGA *et al.*, 2010) antileishmania (DOS SANTOS *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 2011) antiviral contra o vírus HSV-1, antifúngica (STEIN, 2011) citotóxica (STEIN *et al.*, 2011) e anti-helmíntica (DAVYT *et al.*, 2001). Uma das atividades mais interessantes de utilização industrial estabelecida foi a de anti-incrustante do elatol, produto majoritário de *Laurencia dendroidea*. Esses estudos abrangem o isolamento e identificação dos produtos naturais, diversas atividades biológicas, o seu papel ecológico e o uso como marcadores taxonômicos.

Do ponto de vista da variedade e raridade dos compostos que produzem, as algas vermelhas são as mais importantes e as mais estudadas. Entre os compostos característicos encontram-se: compostos halogenados voláteis, acetogeninas halogenadas, monoterpenos halogenados, sesquiterpenos halogenados e não halogenados, fenóis halogenados, índoles halogenados (figuras 4, 5, 6 e 7) (SIMÕES *et al.*, 2010).

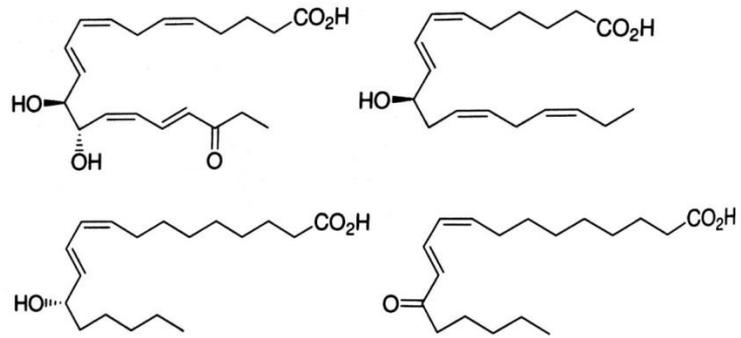


Figura 4. Oxylipinas presentes em algas vermelhas da divisão Rhodophyta.

Fonte: PALERMO, 2010

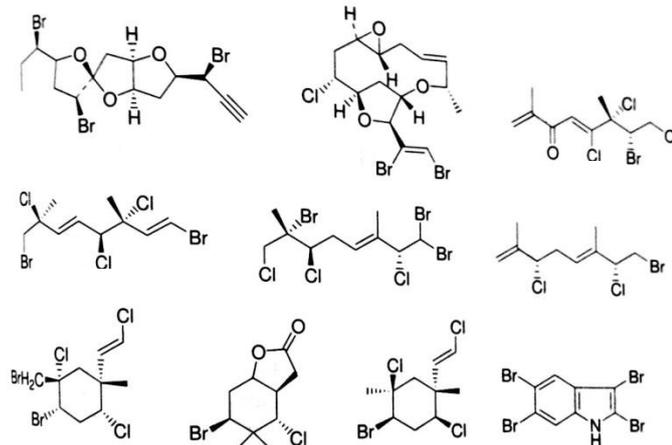


Figura 5. Monoterpenos halogenos isolados de algas vermelhas das famílias Plocamiaceae e Rhizophyllidaceae.

Fonte: PALERMO, 2010

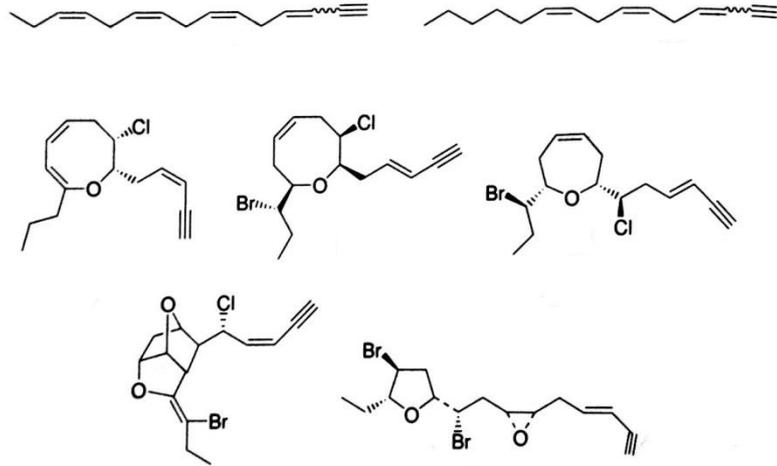


Figura 6. Acetogeninas isoladas de algas vermelhas do gênero *Laurencia*.

Fonte: PALERMO, 2010

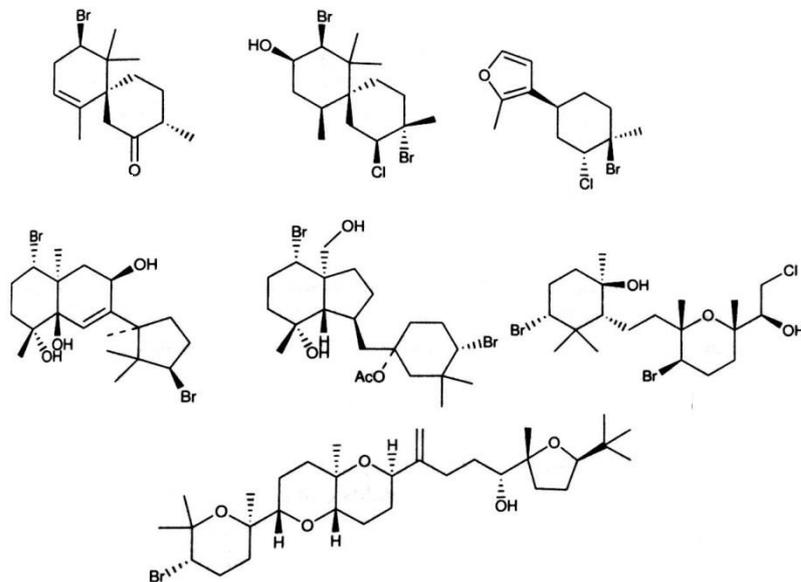


Figura 7. Terpenóides isolados do gênero *Laurencia*, sesquiterpenoides, diterpenóides halogenados e sesterpenóide halogenado.

Fonte: PALERMO, 2010

2.3 OCHROPHYTA (PHAEOPHYCEAE)

As Phaeophyceae (algas pardas) constituem um grupo bem estudado no Brasil em algumas linhas de pesquisa: isolamento de novas moléculas, estudo de suas potenciais atividades biológicas, ecologia química, taxonomia, filogenia e biogeografia baseadas em dados químicos de seus produtos naturais. Elas são fontes ricas de iodo e ferro, além disso, são bastante utilizadas como alimento humano. Possuem clorofilas a e c, mas os carotenóides são os seus pigmentos mais abundantes (TEIXEIRA *et al.*, 2014). A classe possui 98% de espécies marinhas e estão representadas, na costa brasileira, por espécies de oito ordens, em especial, Dictyotales e Fucales (VALLIM *et al.*, 2005).

Algumas espécies deste grupo podem chegar a 70m de comprimento, formando os conhecidos *Kelps* (algas gigantes) (RAVEN *et al.*, 1996). Possuem um teor maior de compostos bioativos, dentre eles a fucoxantina, taninos e outros metabólitos (HOSAKAWA *et al.*, 2006). Apresentam diversos compostos antioxidantes, como ácido ascórbico, tocoferóis, catequinas, entre outros (ZUBIA, 2009; O'DOHERTY *et al.*, 2010; GUPTA & ABU-GHANNAM, 2011).

São reconhecidas pelo seu grande tamanho, servindo de fonte de alimento de inúmeros animais marinhos, como *Macrocystis pyrifera*, que é responsável por criar autênticas florestas no Oceano Pacífico, podendo crescer 30 cm por dia e ir até aos 65 m de comprimento. No Brasil, não há algas pardas tão grandes, destacando-se entre as maiores, a alga *Laminaria abyssalis*, cujo extrato mostrou-se ativo no combate ao vírus herpes simples (SANTOS *et al.*, 1999).

Os florotaninos, grupo de compostos fenólicos restritos a polímeros do floroglucinol, têm sido identificados em muitas famílias de algas pardas, tais como Alariaceae, Fucaceae e Sargassaceae. Vários estudos têm mostrado que os florotaninos são o único grupo fenólico detectado em algas pardas (KOIVIKKO *et al.*, 2007).

A química de produtos naturais de algas pardas marinhas abrange desde hidrocarbonetos voláteis que atuam como feromônios sexuais como o dictyopterenol C' (KAJIWARA *et al.*, 1991) a compostos com enxofre que conferem aroma típico a algumas espécies (SCHINITZLER *et al.*, 1998), polifenóis (PEREIRA *et al.*, 1989), carotenóides (TEIXEIRA *et al.*, 1990), esteróis e terpenóides (TEIXEIRA *et al.*, 2009).

Metabólitos esteroidais são estudados desde 1812, a determinação desses metabólitos deu-se devido a sua ampla distribuição na natureza e em seus organismos. Investigações pioneiras de Henze (1904) resultaram no isolamento do primeiro esterol marinho, o espongosterol, obtido a partir da esponja *Suberites domuncula*. O que foi de extrema relevância pois grupos esteroidais são tão característicos em organismos marinhos, incluindo-se as algas que são propostos como marcadores taxonômicos (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

Diversos trabalho de marcadores taxonômicos em algas pardas vem sendo realizados. Os diterpenos revelaram-se bons marcadores para algas do gênero *Dictyota* (TEIXEIRA & KELECOM, 1988; TEIXEIRA & KELECON, 1987; TEIXEIRA *et al.*, 1985; KELECON & TEIXEIRA, 1986), e para separação dos representantes da ordem Dictyotales (IKEKAWA & MORISAKI, 1966; KNIGHTS, 1970). O uso dos hidrocarbonetos odoríferos, assim como os polifenóis (floratinos) e carotenóides vem sendo empregados como marcadores taxonômicos e filogenético nas ordens de Phaeophyceae (PITOMBO *et al.*, 1989; TEIXEIRA *et al.*, 1990).

Os polifenóis, os carotenoides, os terpenos e os esteróis foram analisados como marcadores taxonômicos. Os diferentes tipos de polifenóis observados nas algas pardas, como fucóis, floretóis, acil-fenóis, e outros estão relacionados às diferentes ordens de feofíceas (PEREIRA *et al.*, 1989) sendo, portanto, marcadores em um nível hierárquico mais alto. Os carotenoides, por sua vez, foram utilizados como marcadores taxonômicos e filogenéticos para todos os grupos de algas. Os resultados obtidos mostraram que esses importantes pigmentos caracterizam a capacidade de síntese de cada grupo (KAJIWARA *et al.*, 1991).

Os esteróis encontrados em algas pardas são marcadores do grupo, sendo os mais abundantes o fucosterol e o isofucosterol, distintos dos esteróis principais de outras de algas (FLEURY *et al.*, 1996).

Os terpenos constituem os produtos naturais mais estudados no mundo e no Brasil. São substâncias que atuam nas relações ecológicas como minimizadores de herbivoria e como anti-incrustantes. Eles possuem potencial para diversas atividades biológicas e servem como marcadores taxonômicos e biogeográficos para alguns gêneros ou famílias. Os produtos naturais de algas pardas marinhas têm um grande potencial para diversas atividades biológicas, em relação à química de produtos naturais (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

Muitas espécies de algas pardas são conhecidas comercialmente por possuírem polissacarídeos. Estas espécies em geral não produzem muitos metabólitos secundários, em muitos casos sua defesa química está na presença de floratinos, compostos fenólicos poliméricos (figura 8). Quase todas as famílias de algas pardas produzem hidrocarbonetos pequenos (de C7 a C12), sendo que especificamente o C11, é relativamente volátil, encontra-se protegido e participa do processo de reprodução das algas, são considerados compostos insolúveis em água. (SIMÕES *et al.*, 2010).

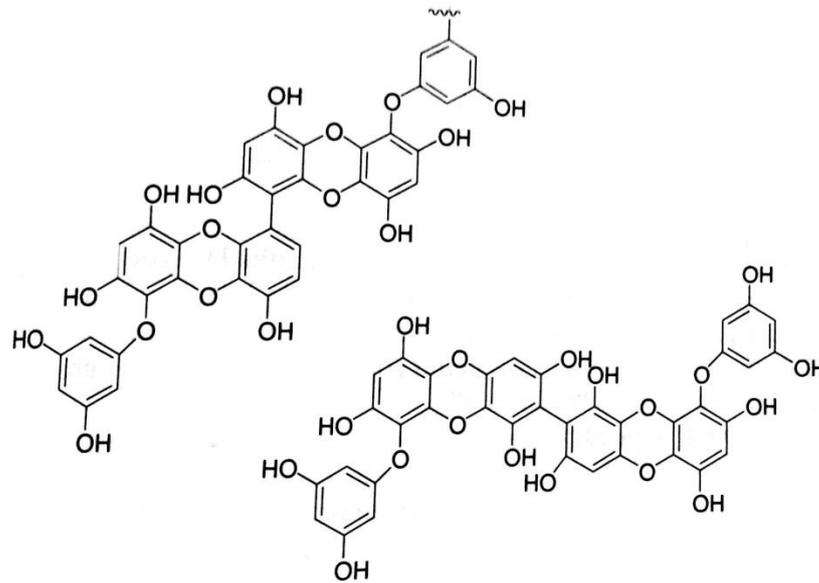


Figura 8. Floratinos e compostos fenólicos presentes em algas pardas.

Fonte: PALERMO, 2010

O floroglucinol é a unidade estrutural básica dos floratinos. A condensação deste composto e outros fenóis simples com ácidos graxos poli-insaturados leva a formação dos ácido-floroglucinol (de 6-7 átomos de carbono), típicos dos gêneros *Cystophora* e *Zonaria*. Outra série de compostos típicos de algas pardas são as quinonas, hidroquinonas preniladas e outros compostos relacionado a biossíntese mista, muitos estão relacionados com o α -tocoferol, que são típicos da família Sargassaceae (figura 9) (PALERMO, 2010).

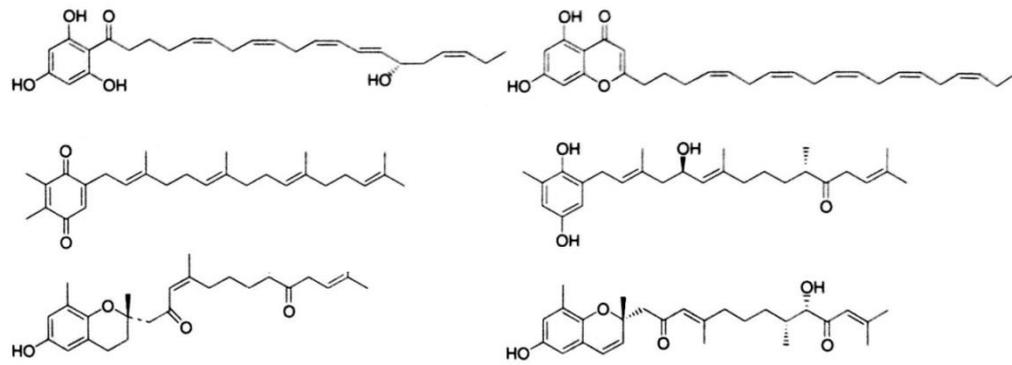


Figura 9. Acil-floroglucinóis, quinonas, hidroquinonas preniladas de algas pardas.

Fonte: PALERMO, 2010

Contudo os compostos mais característicos das algas pardas são os diterpenóides cíclicos, geralmente encontrados na família Dictyotaceae. Em alguns casos os esqueletos carbonados desses diterpenos correspondem a sesquiterpenos agregados com uma unidade adicional de isopreno conhecido como extensão (figura 10) (DE SILVA & SCHEUER, 1980).

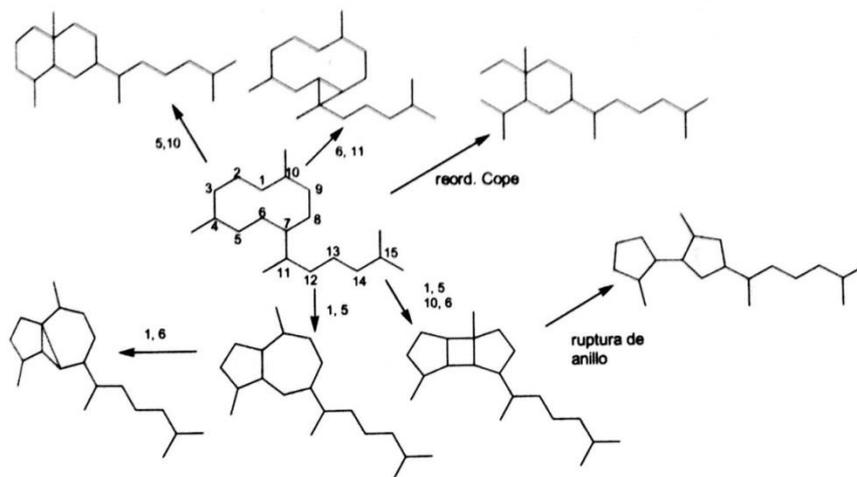


Figura 10. Sesquiterpenos estendidos de algas pardas.

Fonte: PALERMO, 2010

2.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os produtos naturais ou metabólitos secundários são mediadores de interações ecológicas e ocorrem em grupos específicos de organismos. No Brasil o seu estudo está relacionado a várias linhas de pesquisa, de biólogos, bioquímicos a químicos. Estes estudos envolvem o isolamento e a elucidação estrutural de novas moléculas, a obtenção de substâncias com atividades biológicas para o favorecimento humano como fármacos e anti-incrustante o seu papel ecológico, a sua importância evolutiva e o seu uso como marcadores taxonômicos, filogenéticos e biogeográficos (TEIXEIRA et al., 2014).

A maioria dos produtos marinhos descritos tem sido isolada de invertebrados tais como esponjas, tunicados, moluscos, briozoários e algas enquanto que os microrganismos como as cianobactérias, bactérias e fungos são uma fonte rica de novos e/ou metabólitos biologicamente ativos (GALGANI et al., 1996). Algas, esponjas, ascídias, corais e outros organismos sésseis, frequentemente competindo para sobreviver em um ambiente inóspito, produzem uma diversificada gama de metabólitos secundários que, na maioria dos casos, diferem fundamentalmente dos terrestres (BLUNT et al., 2009).

A diversidade estrutural é ampliada quando se trata de metabólitos isolados originados em alguns casos por meio de rotas biossintéticas (vias metabólicas responsáveis pela produção dos produtos naturais por um determinado organismo) mistas, que podem estar relacionadas à simbiose (ROCHA et al., 2007).

Estudos recentes descreveram as possíveis rotas biossintéticas destas substâncias bioativas de origem marinha. Mais de metade dos metabólitos secundários de macroalgas relatados até o momento são isoprenóides: terpenos, esteroides e carotenoides (MASCHEK & BAKER, 2008).

Até o momento, existem duas rotas descritas para biossíntese de terpenos: a dependente do mevalonato e a independente do mevalonato. Apesar de estudos indicarem que estas duas vias são encontradas em plantas e algas e que, em algas vermelhas podem ocorrer simultaneamente, os mecanismos pelos quais os metabólitos secundários são produzidos ainda não foram devidamente esclarecidos (PARADAS, 2013).

Além das abordagens sobre ação defensiva de extratos ou substâncias puras, alguns trabalhos com macroalgas marinhas exploraram a variabilidade na produção destas defesas químicas. O entendimento da variabilidade qualitativa e quantitativa na produção dos metabólitos secundários é um aspecto essencial em estudos de ecologia química, uma vez que influencia a evolução das interações (PEREIRA & DA GAMA 2008).

A composição e concentrações químicas das populações de algas naturais são influenciadas por interações abióticas espaciais e temporais nos parâmetros ambientais, incluindo luz, temperatura, nutrientes e salinidade e também intervenções antropogênicas, bem como interações bióticas (STENGEL et al., 2011).

Dentre as substâncias oriundas da biota marinha, as classes mais estudadas compreendem terpenóides, ácidos graxos (gorduras), policetídeos, acetogeninas, polifenólicos (conhecidos também como aromáticos), alcalóides, peptídeos e macrolídeos, dentre outros (TEIXEIRA et al., 2014).

Estudos realizados com diversas espécies de *Laurencia* mostraram que estas são capazes de sintetizar diferentes classes de substâncias, como sesquiterpenos halogenados (1) ou não (2), diterpenos (3), triterpenos (4) e acetogeninas (5), totalizando mais de quinhentos metabólitos secundários (figura 11) (FAULKNER, 1996; FAULKNER, 2002). Vários destes representam tipos estruturais exclusivos, ainda não observados em outros organismos, contribuindo significativamente para o aumento do número de substâncias com esqueletos carbônicos novos e fornecendo subsídios para proposições sobre a biogênese de produtos naturais do mar (PEREIRA & TEIXEIRA, 1999).

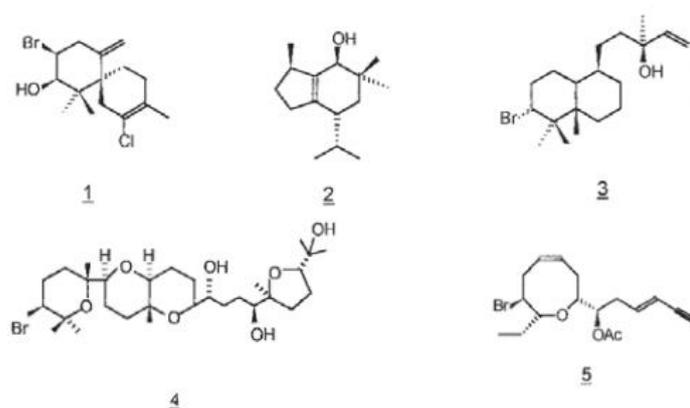


Figura 11. Metabólitos secundários sintetizados pelo gênero *Laurencia*.

Fonte: PEREIRA & TEIXEIRA, 1999

Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, inter e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (HARTMANN, 1996).

De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais (KUTCHAN, 2001).

2.5 FÁRMACOS E ALGAS MARINHAS

O ecossistema marinho representa 95% da biosfera e, dos 31 filos animais conhecidos, 12 são exclusivamente marinhos e nunca foram encontrados além dos oceanos. Eles forneceram produtos naturais notáveis, os quais foram utilizados diretamente ou após modificações químicas, para o desenvolvimento de novos medicamentos (BOEUF, 2011). Todavia, o potencial farmacêutico do ambiente marinho, em grande parte foi negligenciado até meados do século passado e, até o presente momento, a biodiversidade encontrada nesse ambiente ainda permanece em grande parte inexplorada e subutilizada (ROBERTS, 2002).

Produtos naturais são substâncias frequentemente constituídas por estruturas químicas complexas e com uma orientação espacial bem definida. Estes produtos naturais, também denominados metabólitos secundários, são característicos e até mesmo únicos para determinados grupos específicos de organismos, e são sintetizados para interagir com eficácia com seus alvos biológicos, o que os torna atrativos para a descoberta de novos fármacos (KINGSTON, 2011).

As pesquisas com produtos naturais marinhos no Brasil tiveram início na década de 60 no Centro de Pesquisas de Produtos Naturais na Faculdade de Farmácia da UFRJ (KELECOM, 1997).

Algumas das atividades mais comumente atribuídas aos produtos naturais marinhos são as de mediação na reprodução, de defesa contra potenciais predadores, patógenos, bioincrustação ou competidores de substrato (MC CLINTOCK *et al.*, 2001).

Trabalhos realizados por alguns grupos no Brasil, onde podemos citar o centro de Pesquisas de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da UFRJ, dá ênfase à avaliação da função ecológica e/ou atividade farmacológica de substâncias isoladas de algas e invertebrados marinhos. No aspecto ecológico, os trabalhos têm sido direcionados à procura de metabólitos fagoinibidores, inibidores de crescimento de bactérias marinhas patogênicas, inibidores de bioincrustação e na descoberta de mediadores da reprodução. Quanto à atividade farmacológica, neurotoxinas e substâncias com atividade anticâncer, antiviral, anticoagulante e antitrombótica têm sido isoladas e identificadas (PINTO *et al.*, 2002).

Dentre as espécies marinhas responsáveis por fornecer produtos naturais quimicamente intrigantes, as cianobactérias marinhas são possivelmente as mais bem-sucedidas com relação à produção de novos quimiotipos com potente atividade biológica (SHAH & ORLOWSKI, 2009).

Produtos naturais de algas marinhas bentônicas são estudados com o objetivo de se buscar novas substâncias de valor industrial, para o conhecimento de seu papel ecológico e como uma ferramenta poderosa no estabelecimento dos limites taxonômicos de espécies, gêneros e famílias de algas marinhas. As algas marinhas são citadas como organismos usados como matéria-prima de produtos como medicamentos, combustíveis, cosméticos, além de servirem como alimento animal e humano. São usadas para branquear papel, na composição do envoltório de cápsulas de medicamentos, na fabricação de tintas e de cosméticos e como aditivos na indústria alimentícia (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

Um exemplo histórico do desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais marinhos teve origem no isolamento dos nucleosídeos espongoiridina e espongotimidina por Bergmann e colaboradores nos anos 50. Isoladas da esponja *Tethya crypta*, estas substâncias possuem atividade antiviral e o estudo de análogos sintéticos levou ao desenvolvimento de agentes antivirais e anticâncer, tais como ARA-A e ARA-C (NEWMAN *et al.*, 2001). Outros exemplos de protótipos de fármacos isolados de organismos marinhos são o esterol antiasmático contignasterol e o diterpeno anti-inflamatório pseudopterosina A (WRIGHT *et al.*, 2000).

Especula-se que a atividade de produtos naturais em bioensaios farmacológicos (celulares ou enzimáticos) está relacionada às propriedades de defesa

do organismo produtor. Como exemplo, a briostatina (Figura 12), agente anticâncer em fase de testes clínicos, atua no briozoário *Bugula neritina* (do qual foi isolada) como inibidor do ciclo celular, impedindo a proliferação de organismos estranhos (HUNG, 1996).

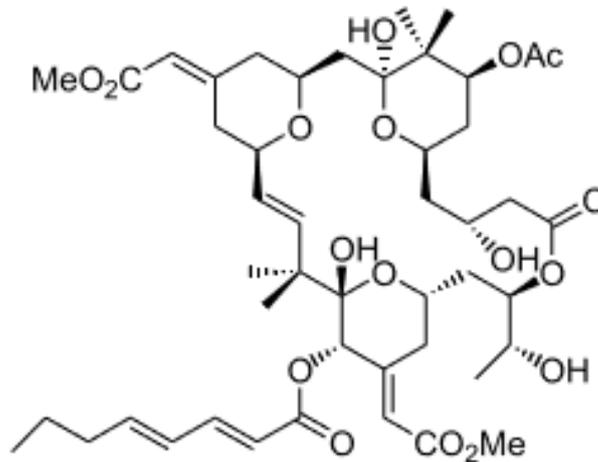


Figura 12. Estrutura química da Briostatina.

Fonte: PALERMO, 2010

O estudo das substâncias químicas produzidas pelas espécies marinhas é uma ferramenta fundamental para a compreensão da evolução e da manutenção das comunidades marinhas nos diferentes oceanos (HAY & FENICAL, 1997). Nos últimos 50 anos cerca de 10.000 produtos naturais marinhos foram descobertos, muitos com atividade farmacológica, incluindo acetogeninas, policetídeos, terpenos, alcalóides, peptídeos e metabólitos de origem biossintética mista (FAULKNER, 2002).

Apesar das variações relativas à definição do que são produtos naturais, estes se destacam como fonte e inspiração para aproximadamente 25 a 50% dos fármacos atualmente comercializados, levando, assim, os produtos naturais a serem considerados por uma grande parcela da comunidade científica como alicerce da indústria farmacêutica (KINGSTON, 2011).

Novos modelos e novos mecanismos de ação de substâncias multifuncionais de alto valor podem trazer novas soluções para resolver alguns dos problemas de saúde pública do século XXI. Devido à necessidade da produção desses metabólitos em larga escala, o cultivo *ex situ* de invertebrados (cultivo fora do mar), em tanques especiais fechados, permite a otimização dos parâmetros de crescimento, controle de

temperatura da água, níveis de luz e fotoperíodos, disponibilidade de alimentos, equilíbrio nutricional e adição de precursores metabólicos de interesse (SASHIDHARA *et al.*, 2009).

Ainda são poucas as informações, documentadas em artigos científicos, sobre as substâncias isoladas e a atividade biológica de produtos naturais de organismos marinhos coletados ao longo dos 7500 km de litoral brasileiro. As poucas informações existentes sobre a química desses organismos, muitos dos quais são espécies endêmicas, indicam um grande potencial de pesquisa para a área no Brasil (PINTO *et al.*, 2002).

2.6 ALGAS E A BIODIVERSIDADE

Vive-se em um planeta coberto por grandes extensões de águas, doces ou marinhas, cuja herança obriga-nos a preservar. Nesta imensa “solução” destacou a diversidade de organismos, de certa forma relacionada à diversidade das comunidades de algas.

São organismos capazes de ocupar todos os meios que lhes ofereçam luz e umidade suficientes, temporárias ou permanentes; assim, são encontradas em águas doces, na água do mar, sobre os solos úmidos ou mesmo sobre a neve. Quer sejam uni ou pluricelulares, as algas retiram todos os nutrientes que precisam do meio onde estão – solução ou umidade - e, portanto, são organismos fundamentalmente aquáticos (BRATTACHARYA & MEDLIN, 1998).

As algas marinhas apresentam importância, tanto sob o ponto de vista econômico, como ambiental e social, podendo realizar a manutenção do equilíbrio biológico nos ambientes aquáticos, ocasionando a continuidade da fauna existente, que pode ser utilizada pela humanidade como fonte de alimento e de matéria-prima (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

Algumas espécies de algas encontram uso na avaliação da qualidade dos sistemas aquáticos, para os quais, inclusive, já foi sugerido um “índice de poluição” baseado nos gêneros de algas presentes: quanto menos diversificada a população, maior a poluição do sistema (TRAINOR, 1983).

Nos sistemas aquáticos as algas incorporam energia solar em biomassa, produzem o oxigênio que é dissolvido na água e usado pelos demais organismos aquáticos, atuam na mineralização e no ciclo dos elementos químicos, e servem como

alimento para animais herbívoros e onívoros. Ao morrerem, seus constituintes químicos sofrem transformações nos sedimentos, são solubilizados e reciclados na água. Estas diferentes “funções” desempenhadas pelas algas nos sistemas aquáticos dependem da temperatura, da intensidade da radiação solar, da concentração de nutrientes na água e da alimentação dos animais presentes no sistema (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

O manejo ecológico de doenças pode ser definido como produção econômica de culturas de alta qualidade, utilizando métodos de cultivo ecologicamente seguros e utilizando métodos de manejo que garantam a saúde dos seres vivos e a preservação do ambiente. Portanto, a adoção do manejo ecológico não é uma alternativa, mas uma necessidade para a conservação do meio ambiente e a própria sobrevivência da humanidade (STADNIK & PAULERT, 2008).

As comunidades de algas são controladas por muitos fatores ambientais, bióticos e abióticos, os quais podem, por sua vez, ser afetados por espécies químicas estranhas ao meio (contaminantes), produzindo mudanças na estrutura e no funcionamento da comunidade. Alguns exemplos podem ser apresentados, evidenciando a íntima relação entre uma comunidade de algas e o ambiente em que se encontram como por exemplo: a Interações com macrófitas, zooplâncton, substâncias orgânicas, íons metálicos, luz (BOYLE, 2004).

Estas interações, que variam entre espécies diferentes, podem resultar em mudanças nas espécies dominantes de algas em um sistema aquático particular, afetando todo o ecossistema. Experimentando essa íntima interação com o ambiente que lhes mantém a vida e no qual exercem funções decisivas, as algas surgem como elementos-chaves nos estudos ambientais. A diversidade de organismos em um sistema aquático está relacionada à diversidade das comunidades de algas, a qual favorece a estabilidade do ecossistema já que um maior número de espécies funcionalmente equivalentes, mas com capacidades de tolerância a fatores ambientais diferentes, resiste melhor às alterações do meio, inclusive aquelas causadas pela atividade humana (CHAPIN *et al.*, 1997).

No Brasil, a região costeira compreendida entre o estado do Ceará e o norte do estado do Rio de Janeiro abriga a flora algal mais diversificada do país. No tocante à exploração de espécies com fins comerciais, a atividade de maior porte corresponde à coleta de algas vermelhas (*Gracilaria* e *Hypnea*) no litoral do Nordeste,

principalmente na costa entre os estados do Ceará e da Paraíba. A coleta da *Gracilaria* vem sendo feita desde a década de 60, por arrancamento manual ou através de mergulho livre, para fins de exportação e também para processamento no próprio país, na produção do ágar. Já a *Hypnea* tem sido exportada como matéria prima ou já processada para a indústria de carragenana; neste caso, a biomassa é coletada em algas arribadas nas praias, e não diretamente nos locais de crescimento. Entre o estado do Espírito Santo e a região de Búzios, RJ, uma característica marcante é a presença de vasta área coberta por fundos de algas calcárias, com teor em carbonatos superior a 90%, estendendo-se por várias dezenas de metros de profundidade e aflorando nas marés baixas. Este banco de algas calcárias tem despertado interesse e vem sendo explorado para a produção de adubos e aditivos de rações (OLIVEIRA, 1992).

Trabalhos mais atuais realizados por Horta (2000), Guimarães (2006) e em levantamento no site *Algaebase* (GUIRY & GUIRY, 2015), mostram que essa revisão realizada por Oliveira (1992), permanece pertinente. Um estudo realizado em 2012 por Soares & Fujii, mostrou a ocorrência de novas espécies de macroalgas para o litoral do estado de Pernambuco constatando que quatro (*Boodlea composita*, *Ceramium corniculatum*, *Chondracanthus cf. saundersii* e *Cladophora laetevirens*) tiveram sua distribuição consideravelmente ampliada no litoral brasileiro, mas que precisam ainda de mais estudos para avaliar a ocorrência em outras regiões e quais fatores levaram para ocorrência desse evento.

As algas apresentam uma importância ecológica significativa, são produtores primários que sustentam a vida nos mares e oceanos desempenhando, assim, um papel ecológico fundamental na manutenção destes ecossistemas e importância econômica: grandes variedades de espécies de algas encontram uso bastante diversificado em vários países no mundo, da indústria alimentícia à de medicamentos, da cosmética à agricultura. Apresentam ainda importância bio-histórica pois existem organismos, com origem há mais de 3 bilhões de anos, que são responsáveis pela estruturação da atmosfera terrestre tal como a conhecemos, possibilitando a vida sobre a superfície da Terra de todos os seres vivos aeróbicos (DUVE, 1996).

2.7 DOENÇAS RELACIONADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO

Há vários séculos que o Homem se interroga sobre o processo do envelhecimento e procura conhecer quais as suas causas, tendo surgido ao longo dos

anos várias teorias para explicá-lo. Entre as teorias propostas para explicar o envelhecimento biológico, a teoria do envelhecimento pelo stress oxidativo tem sido uma das mais aceitas e estudadas (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

Em 1956, o médico Denham Harman (1916-2014) propõe, pela primeira vez, a teoria do envelhecimento dos radicais livres, segundo a qual os radicais livres produzidos durante a respiração aeróbia originam lesões cumulativas nas moléculas biológicas conduzindo a lesões celulares irreversíveis que resultam num declínio funcional global (HARMAN, 1956).

O envelhecimento biológico é um processo fisiológico normal, não patológico, que corresponde ao declínio gradual e progressivo da função física, acompanhado pela diminuição da fertilidade e que termina na morte em praticamente todas as espécies (SEO *et al.*, 2010). O processo de envelhecimento caracteriza-se por ser irreversível, extensível a praticamente todas as espécies pluricelulares, está intimamente relacionado com a idade de maturação reprodutiva, associa-se a um aumento do risco de doença e à diminuição de capacidade de adaptação e por evoluir a uma velocidade relativamente constante dentro de cada espécie (COFFEY *et al.*, 2011).

O mecanismo exato do envelhecimento ainda não é atualmente conhecido, existindo teorias de diversas áreas que o tentam explicar as teorias do envelhecimento biológico dividem-se em dois grandes grupos: as teorias do envelhecimento programado e as teorias do envelhecimento estocástico. Segundo as primeiras, o envelhecimento é regulado por relógios biológicos que atuam ao longo do tempo de vida e que são geneticamente determinados enquanto que, de acordo com a segunda, o envelhecimento é atribuído ao impacto que os fatores ambientais têm na indução de lesões cumulativas nos organismos vivos a vários níveis (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

Das várias teorias propostas para explicar o mecanismo do envelhecimento biológico, a teoria do estresse oxidativo é das mais populares, encontrando-se englobada no grupo das teorias do envelhecimento estocástico (SEO *et al.*, 2010).

A teoria do envelhecimento do stress oxidativo pode ainda ser denominada de “o paradoxo do oxigênio”, tal como proposto por Kelvin Davies em 1995, aludindo ao contrassenso do oxigênio ser essencial para a vida aeróbica mas ser também uma ameaça direta para todos os organismos, No metabolismo celular normal, durante o

processo de conversão energética mitocondrial, há formação de espécies reativas de oxigênio que são maioritariamente eliminadas pelo sistema de defesa antioxidante da célula, havendo em condições ideais de homeostasia, um equilíbrio entre o stress oxidativo e os mecanismos protetores antioxidantes (DAVIES, 1995).

O oxigênio durante o transporte de elétrons na mitocôndria pode ser reduzido parcialmente gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-). Quando ocorre a perda do equilíbrio entre produção e eliminação de EROs, o que é chamado de estresse oxidativo, podem ocorrer danos ao DNA, RNA, lipídios e proteínas. Além de fragmentação do DNA, as EROs podem causar o mal funcionamento do sistema de reparo do DNA, contribuindo para o desenvolvimento de doenças, como o câncer. As EROs são reguladoras de diversas vias de transdução de sinais, podendo participar de diversas etapas da transformação e progressão tumoral, como a autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais antiproliferativos, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão e metástase, metabolismo e inflamação (SOSA *et al.*, 2013).

O sistema nervoso central é especialmente susceptível ao stress oxidativo uma vez que contém quantidades elevadas de ferro, ascorbato, glutamato e de ácidos insaturados facilmente peroxidáveis, consome grande volume de oxigênio (cerca de 20% do consumo corporal) e tem um sistema de defesa antioxidante relativamente baixo, apresentando tendência a ser afetado por níveis elevados de stress oxidativo em períodos de maior estimulação cognitiva (DIKAKOV, 2011).

Nas últimas décadas diversos estudos têm relacionado o stress oxidativo com as doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, a doença de Huntington e a esclerose lateral amiotrófica (MARTIN, 2012).

Entre os processos patológicos em que já foi descrita a participação do estresse oxidativo estão às doenças cardiovasculares, neurológicas, o diabetes e o câncer. Diversos tumores humanos, incluindo melanoma, leucemias, carcinomas gástrico, prostático, mamário e de cólon, apresentam níveis elevados de EROs (REUTER *et al.*, 2010). Células tumorais estão comumente expostas a condições de estresse, como hipóxia (baixos níveis de oxigênio), perda de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, desequilíbrio no metabolismo oxidativo e diversos fatores ambientais (DHILLON, 2007).

A procura por novas substâncias antioxidantes que possam auxiliar no tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, especialmente de origem natural, tem sido objeto de diversos estudos (OLIVEIRA *et al.*, 2009; PESSUTO *et al.*, 2009).

Substâncias antioxidantes podem atuar através de mecanismos variados como capturar ou regenerar radicais livres, decompor peróxidos, extinguir O₂, inibir enzimas envolvidas no processo de formação de radicais livres, inibir a cascata de reação dos radicais livres, entre outros (REUTER *et al.*, 2010).

Compostos antioxidantes de produtos naturais vêm tendo, atualmente, amplas aplicações terapêuticas são de grande interesse em diversas áreas, incluindo alimentos (conservantes) e farmacologia (proteção do organismo contra o dano oxidativo), pois podem auxiliar na proteção do organismo contra as doenças degenerativas (VELLOSA *et al.*, 2007).

2.8 CULTIVO DE ALGAS

A utilização de algas tem sido de extrema relevância para diversas áreas, como alimento no cultivo de invertebrados, fertilizante, biofiltro, alimentação tradicional, pesquisa de novos fármacos, biodiesel entre outros (PAVÃO, 2014). Por conta do seu baixo rendimento extrativo, estudos estão sendo realizados para o cultivo de grandes massas algais sem gerar degradação do meio e um possível desequilíbrio ecológico.

O crescimento das algas é modulado pela capacidade de sobreviverem em ambientes instáveis, com variações significativas de fatores como luz, temperatura, salinidade e nutrientes (PEREIRA *et al.*, 2006).

Têm sido efetuados estudos ao crescimento de diversas espécies de algas (*Ulva rigida*, *Pelvetiopsis limitata*, *Hypnes musciformis*, *Macrocystis pyrifera*, *Chaetomotpha linum*, *Porphyra dioica*) em condições controladas de temperatura e luz, onde se manipula o meio, enriquecendo-o com macronutrientes. O enriquecimento do meio tem sido feito, predominantemente, por adição de NH₄⁺ e NO₃⁻, dado serem formas de N de fácil absorção para a comunidade algal (HAINES & WHEELER, 1978; FUJITA *et al.*, 1989; MENÉNDEZ *et al.*, 2002; NALDI & WHEELER, 2002; PEREIRA *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2008).

Esses cultivos podem ser realizados de diversas formas, em diversos volumes de cultura e são mais vantajosos que os cultivos de plantas terrestres por alguns fatores tais como:

- Um cultivo de algas é um sistema biológico eficiente na utilização da energia solar para a produção de matéria orgânica, sendo que muitas espécies crescem mais rapidamente que as plantas terrestres por unidade de área, fato que possibilita maiores rendimentos de biomassa (maior produtividade) (WESOFF, 2009).

- Sua natureza unicelular assegura uma biomassa com mesma composição bioquímica, o que não ocorre nas plantas terrestres que apresentam compostos localizados em partes específicas: nos frutos, folhas, sementes ou raízes (WESOFF, 2009).

- Por manipulação das condições ambientais de cultivo (luz, temperatura, nutrientes), muitas espécies podem ser induzidas a sintetizar e acumular altas concentrações de proteínas, carboidratos, lipídios etc. Tais compostos apresentam um elevado valor comercial, principalmente por serem produtos naturais (WESOFF, 2009).

- Podem crescer bem em regiões com extremas condições climáticas.

Os cultivos podem ser desenvolvidos com água marinha ou de estuários, a qual não pode ser convencionalmente empregada no cultivo de plantas com valor para a agricultura, ou com água proveniente de diversos processos de produção (agropecuária industrial e dejetos domésticos, por exemplo) (WESOFF, 2009).

Os cultivos de algas vêm sendo estudados desde o século XIX no mundo inteiro e, a partir da metade do século XX, no Brasil. As microalgas podem ser cultivadas em ambientes controlados para fins comerciais, especialmente para a extração de compostos bioquímicos como ácidos graxos poli-insaturados, corantes e enzimas, (DERNER, 2006).

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o perfil de componentes químicos e potencial antioxidante das macroalgas marinhas *Ulva fasciata*, *Ulva linza*, *Padina gymnospora* e *Jania adhaerens* presentes no litoral do estado de São Paulo.

Os objetivos específicos consistiram em:

- Obter extratos de diferentes polaridades a partir das algas através método de maceração exaustiva e avaliar o rendimento do processo extrativo para cada alga estudada;
- Avaliar nos diferentes extratos a presença dos metabólitos secundários: alcalóides, flavonóides, saponinas, taninos, antraquinonas e também terpenos e esteróis;
- Obter o perfil cromatográfico dos diferentes extratos através do método de cromatografia em camada delgada (CCD);
- Obter através da análise por espectroscopia RAMAN informações químicas dos componentes presentes nos diferentes extratos;
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos através do emprego do método de DPPH em CCD (Autografia).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE ESTUDO

As coletas das macroalgas foram realizadas no município do Guarujá, localizado no litoral do estado de São Paulo no mês de outubro de 2014. Os locais foram escolhidos pois não apresentam influência do Porto de Santos e situam-se em regiões mais abertas.

As coletas foram realizadas na praia de Pernambuco, denominados no presente estudo de pontos 1 ($23^{\circ}58'23.75''S$ $46^{\circ}11'13.97''O$) e 2 ($23^{\circ}58'24.10''S$ $46^{\circ}11'12.01''O$). Foram também realizadas coletas na praia do Guaiuba, sendo denominados de pontos 3 ($24^{\circ}0'56.98''S$ $46^{\circ}17'42.39''O$) e 4 ($24^{\circ}0'57.26''S$ $46^{\circ}17'45.37''O$). Imagens da região de coleta dos materiais biológicos podem ser visualizadas nas figuras 13, 14 e 15. De acordo com o boletim de qualidade de água emitido pela CETESB, as praias de Pernambuco e do Guaiuba obtiveram a classificação Regular no ano de 2014 (CETESB, 2015).



Figura 13. Imagem da região de coleta do material biológico no município do Guarujá. As setas vermelhas destacam os pontos 1 e 2 localizados na praia de Pernambuco e pontos 3 e 4 localizados na praia do Guaiúba.

Fonte: GOOGLE EARTH, 2015

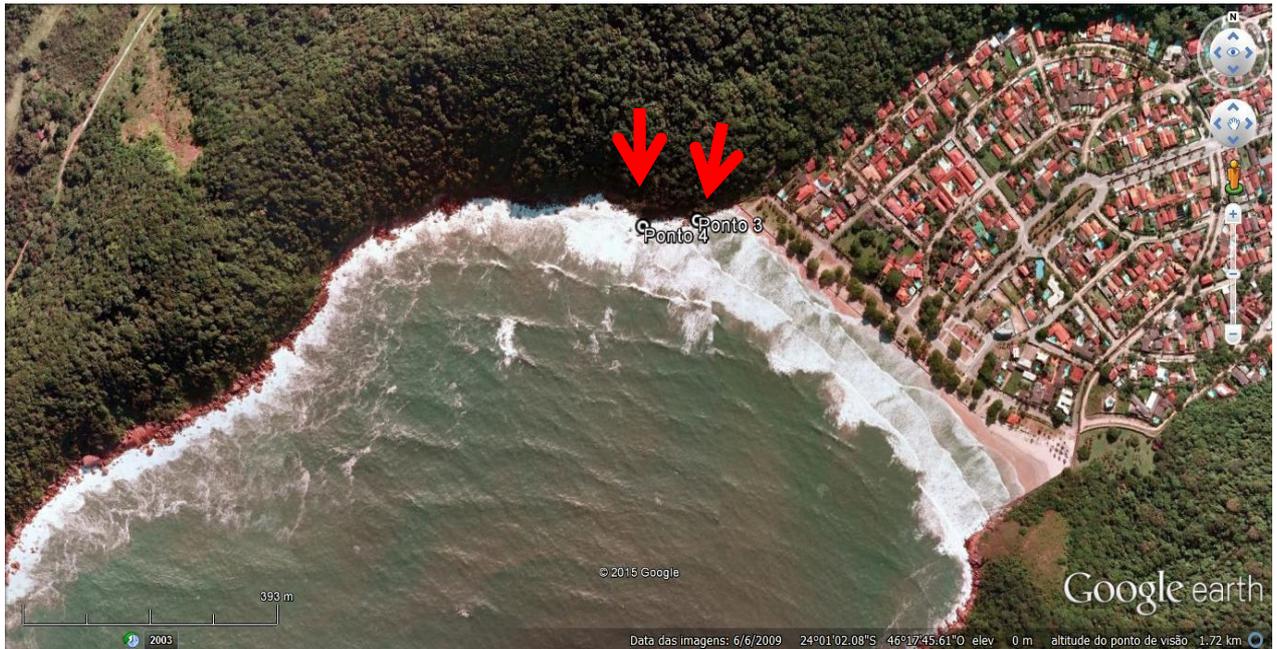


Figura 14. Imagem da praia do Guaiúba. As setas vermelhas destacam os pontos 3 e 4

Fonte: GOOGLE EARTH, 2015



Figura 15. Imagem da praia de Pernambuco. As setas vermelhas destacam os pontos 1 e 2.

Fonte: GOOGLE EARTH, 2015

4.2 IDENTIFICAÇÃO E PROCESSAMENTO INICIAL

As coletas das algas foram realizadas na zona de entremarés em dias com uma maré de -0,1m conforme estabelecido pela Marinha do Brasil, na Tábua de marés. As amostras foram coletadas com o auxílio de uma espátula para retirada do material com apressório que a mantém presa ao costão rochoso e não causar nenhum dano ao material que pudesse interferir na identificação. As algas foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e transportadas em isopor com gelo até o laboratório da Universidade Santa Cecília.

Nos pontos 1 e 2 foi coletada a espécie *Padina gymnospora*, ambos localizados na Praia de Pernambuco. No ponto 3 foi coletada a espécie *Ulva linza* no ponto 4 foram coletadas as espécies: *Ulva fasciata* e *Jania adhaerens*, ambos localizados na Praia do Guaiúba (figura 16).

As algas coletadas foram submetidas à triagem com água destilada para eliminação das epífitas. Alguns exemplares foram separados para realização de exsicatas e depositados no Herbário da Universidade Santa Cecília, Santos (SP) para servirem de testemunho (tabela 1). Enquanto outros exemplares serviram para identificação taxonômica, sendo a maior parte do material biológico destinado para a preparação dos extratos.

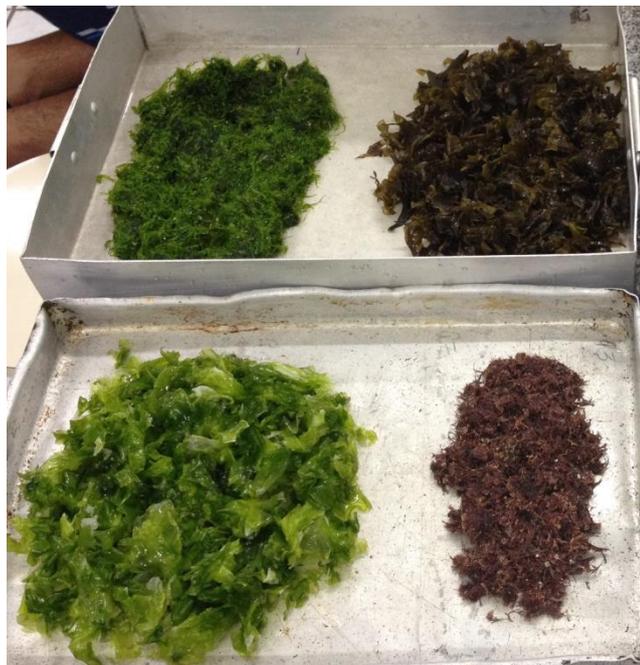


Figura 16. Amostra das algas coletas nas praias do Guaiuba e Pernambuco para obtenção dos extratos.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 1. Relação do material coletado, as respectivas datas, locais de coleta e número de acesso das exsicatas depositadas no herbário da Universidade Santa Cecília.

ESPÉCIES DE ALGAS	PRAIA	DATA DA COLETA	NÚMERO DE ACESSO	PESO DA AMOSTRA (seca)
Amostra 1	Guaiuba	08/10/2014	9153	10,06g
Amostra 2	Pernambuco	08/10/2014	9155	11,46g
Amostra 3	Guaiuba	08/10/2014	9156	22,53g
Amostra 4	Guaiuba	08/10/2014	9154	20,31g

4.2.1 Material para análise morfológica e confirmação da espécie

As amostras destinadas às análises morfológicas e identificação das espécies foram fixadas em formol a 4% e acondicionadas em potes plásticos. A identificação foi realizada pelo taxonomista prof. Msc André Luís Faccini e está representada na Tabela 2. As descrições foram feitas levando-se em conta o aspecto geral, as estruturas vegetativas e reprodutivas em vista superficial e dos cortes verticais e longitudinais dos talos.

Tabela 2. Identificação e classificação filogenética do material biológico.

Amostra	FILO	CLASSE	ORDEM	FAMILIA	GÊNERO	ESPÉCIE
1	Chlorophyta	Ulvophyceae	Ulvales	Ulvaceae	Ulva	<i>Ulva fasciata</i> Delile
2	Ochrophyta	Phaeophyceae	Dictyotales	Dictyotaceae	Padina	<i>Padina gymnospora</i> Kützinger
3	Chlorophyta	Ulvophyceae	Ulvales	Ulvaceae	Ulva	<i>Ulva linza</i> Linnaeus
4	Rhodophyta	Florideophyceae	Corallinales	Corallinaceae	Jania	<i>Jania adhaerens</i> Lamouroux

4.3 PROCESSO EXTRATIVO

Para obtenção dos extratos de diferentes polaridades, o material algal foi seco em estufa ventilada a 40°C, durante 7 dias. Após a secagem, as algas foram trituradas em liquidificador de aço inox até obter-se pó, e pesadas em balança de precisão. Em seguida, o material foi submetido a um processo extrativo fracionado por maceração exaustiva por 7 dias (com agitação ocasional), utilizando-se solventes de polaridade crescente: hexano, clorofórmio, metanol e água, respectivamente, na proporção de 10g de material seco/100mL de solvente.

Os extratos obtidos foram filtrados em papel *Whatman* e secos em rotaevaporador e, ao final do processo extrativo, foram obtidos quatro extratos com as seguintes polaridades: baixa (extrato hexânico), baixa/intermediária (extrato clorofórmico), intermediária (extrato metanólico) e alta (extrato aquoso) (STEIN et al., 2011). O processo extrativo está representado no fluxograma da Figura 17.

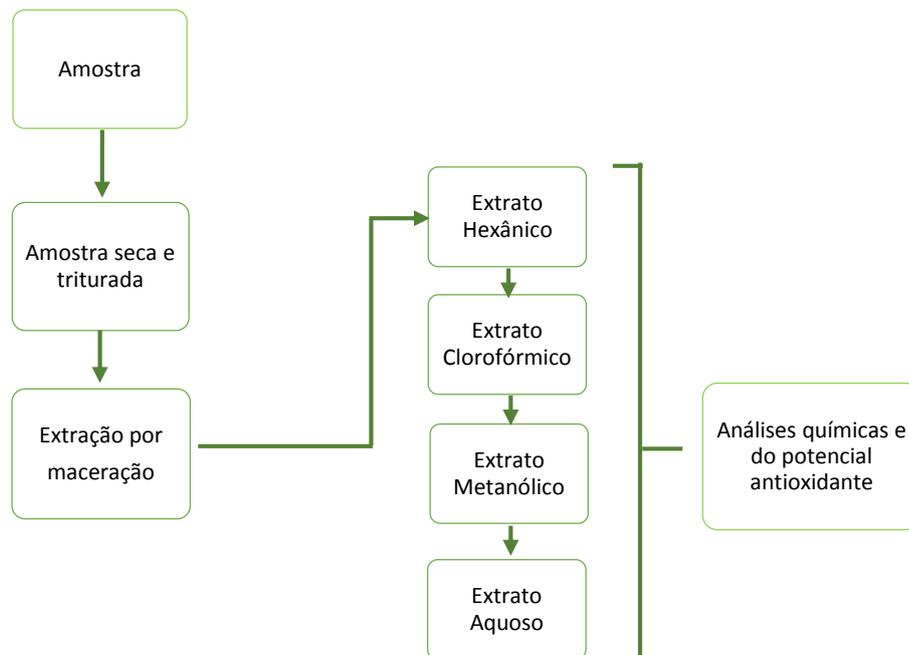


Figura 17. Fluxograma do processo extrativo fracionado.

4.4 CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD)

Os componentes presentes em cada extrato foram separados por CCD em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ 10 x 20 cm (Merck) desenvolvida na seguinte fase móvel: acetato de etila/metanol/água (80:10, 8:10; v/v/v) (KOTZE & ELOFF, 2002) (Figura 18). As bandas presentes nas amostras foram visualizadas com o auxílio de gabinete com luz ultravioleta de 254nm e 365nm, sendo foram devidamente marcadas. O fator de retenção (Rf), foi calculado para as bandas através da equação (1) (COLLINS, 2007)

$$R_f = dp/dm \quad (1)$$

Sendo: dp: distância percorrida pelos componentes (bandas); dm: distância percorrida pela fase móvel.

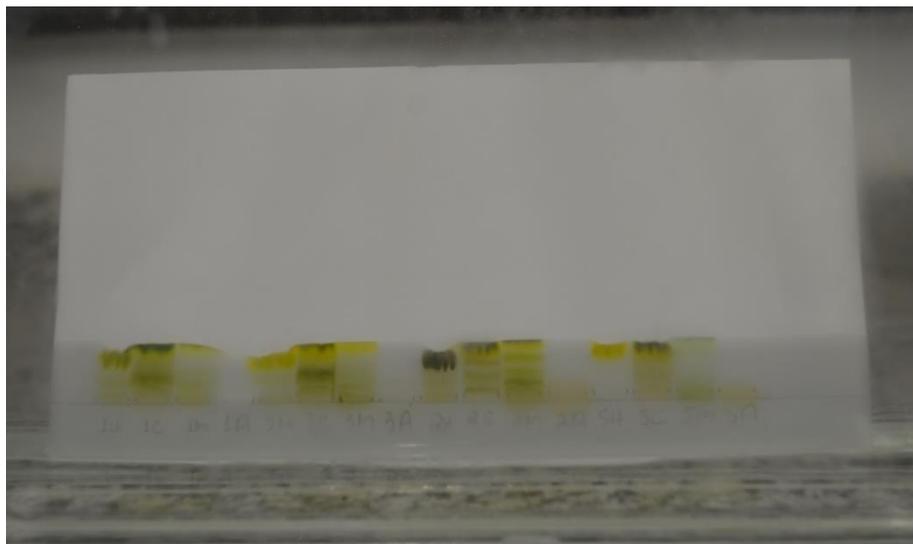


Figura 18. Placa de cromatografia em fase de processamento.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação do potencial antioxidante dos extratos foi realizada através do emprego do método do DPPH em CCD (Autografia). Esse método consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila – DPPH. Os radicais livres de DPPH, que inicialmente apresentam cor roxa por possuírem elétron livre, perdem esta cor quando um radical hidrogênio doado por uma molécula antioxidante entra em ressonância com a molécula de DPPH, diminuindo-se, assim, a absorbância. O DPPH é um radical estável e com baixa taxa de deterioração e reatividade com a maioria dos compostos. Assim sendo, apenas reagentes redutores fortes são capazes de reagir com estes radicais estáveis em um modo estequiométrico. A baixa absorbância indica atividade sequestrante de radicais livres (SANTOS *et al.*, 2007).

As placas de CCD desenvolvidas nas mesmas condições descritas no item 4.4 foram nebulizadas com uma solução metanólica de DPPH 0,2% (2,2-difenil-1-picrilidrazina, radical livre) e incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos, no escuro. A atividade antioxidante (antiradicalar) é observada com o surgimento de bandas amarelo-esbranquiçadas sobre um fundo roxo e, desta forma, permitindo a análise das bandas que apresentam atividade antioxidante em cada extrato (MASOKO & ELOFF, 2007).

4.6 AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ATRAVÉS DE ENSAIOS CROMÁTICOS E/OU DE PRECIPITAÇÃO

4.6.1 FLAVONÓIDES

Para a detecção de Flavonóides nas algas estudadas, inicialmente foi realizado o processo extrativo de cada amostra utilizando-se 3,0g do extrato seco de alga tratado com 20 mL de éter de petróleo. Em seguida agitou-se durante 10 minutos e aqueceu-se ocasionalmente em banho-maria.

Após a sedimentação do pó no béquer, retirou-se o líquido sobrenadante com auxílio de uma pipeta de Pasteur, descartando-o. Adicionou-se então ao pó que ficou dentro do béquer, 20 mL de metanol e aqueceu-se em banho-maria por 10 minutos, solubilizando com um bastão de vidro ocasionalmente. O material foi filtrado ainda quente (utilizando algodão no funil) e obteve-se então o **extrato metanólico para os ensaios cromáticos (EMEC)** de cada alga.

EMEC foi evaporado na chapa de aquecimento e ao resíduo foram adicionados 15 mL de etanol, solubilizando com um bastão de vidro. As reações de caracterização de flavonóides foram realizadas, através de reações cromáticas descritas nos procedimentos a seguir.

Para controle, utilizou-se um tubo de ensaio com a solução descrita acima (sem a adição dos reagentes), para ser comparado com as soluções das reações de caracterização (SIMÕES *et al.*, 2004).

Reações de Shinoda ou Cianidina

Foram colocados em diferentes tubos de ensaio 2mL da solução de EMEC de cada amostra e adicionados fragmentos de magnésio. Em seguida, adicionaram-se cuidadosamente 5 gotas de HCl concentrado e observou-se a efervescência e a coloração obtida. O resultado é considerado positivo com a formação de coloração com tonalidade avermelhada (laranja, rosa, vermelho) comparada ao tubo controle (COSTA, 2002).

Reações com Hidróxido de Sódio

Foram colocados em diferentes tubos de ensaio 2mL da solução de EMEC de cada amostra e adicionados 2mL de solução de hidróxido de sódio 2%. Observou-se

a coloração obtida. Considera-se o resultado positivo com a formação de coloração amarela comparada ao tubo controle (COSTA, 2002).

Reações com Cloreto Férrico

Foram colocados em diferentes tubos de ensaio 2mL da solução de EMEC de cada amostra e adicionadas 3 gotas da solução de cloreto férrico a 4,5%. Observou-se a coloração obtida. Considera-se o resultado positivo com a formação da coloração amarela, verde, verde – castanho ou violeta comparada o tubo controle (COSTA, 2002).

Reações com Ácido Sulfúrico concentrado

Foram colocados em diferentes tubos de ensaio 2mL de EMEC de cada amostra e adicionadas algumas gotas de ácido sulfúrico concentrado. Observou-se a coloração obtida. Considera-se resultado positivo para flavonas e flavonóis com a formação de coloração fortemente amarelada. Para flavononas, o resultado é positivo com o aparecimento de coloração que podem variar de laranja a vermelho, e as chalconas e auronas formam coloração que variam do vermelho ao carmim (SIMÕES *et al.*, 2004).

4.6.2 SAPONINAS

Para análise de saponinas, realizou-se inicialmente o seguinte tratamento com as amostras secas das algas estudadas. Foi pesado em um béquer 1g de cada amostra e diluí-se com 50 mL de água destilada. Levou-se então a solução até a fervura, filtrou-se utilizando um funil com algodão e completou-se o volume para 50 mL com água destilada para obtenção **dos extratos aquosos para os ensaios cromáticos (EAEC)**. Para controle, tubos com o EAEC sem adição de reagentes ou outro tratamento foram mantidos para comparação visual (COSTA, 2002).

Determinação do índice de espuma

Foram colocados 5mL de EAEC em um tubo de ensaio, vedou-se com o polegar e agitou-se vigorosamente para determinação do índice de espuma. A reação é considerada positiva com o surgimento de um anel de espuma (mantido por 15 segundos) (SIMÕES *et al.*, 2004; GAMBETA, 2008).

Teste de ação superficial

Em tubos de ensaio contendo EAEC de cada amostra foi realizada agitação energética para determinação da permanência da espuma. O teste é considerado positivo com a permanência da espuma mesmo com a adição de um ácido mineral diluído (HCl 10%) (WAGNER & WISENAUER, 2006).

Análise qualitativa para saponina

Foram adicionadas 5mL de ácido clorídrico concentrado (P.A.) em 25 mL de cada EAEC. Aqueceu-se por 10 minutos, esperou-se esfriar e então transferiu-se o líquido para um funil de extração contendo 20 mL de clorofórmio.

Foi realizada a partição líquido-líquido, reservando a fase clorofórmica para as análises. Foram colocados 5mL da fase clorofórmica em tubo de ensaio e adicionou-se cuidadosamente pelas paredes do tubo (sem agitar) 2mL do reagente de Salkowski (H₂SO₄ concentrado). O surgimento de um anel de coloração vermelha ou pardo-avermelhada caracteriza resultado positivo para saponinas que contenham o núcleo triterpênico, enquanto que, o anel de coloração rósea a violeta indica resultado positivo para saponinas que contenham núcleo esteroidal como parte de sua estrutura química (SIMÕES *et al.*, 2004).

4.6.3 ALCALÓIDES

Reação de Dragendorff

Foram adicionados 5mL de HCl 1% em 10 mL de EAEC e também foram adicionados em outro tubo de ensaio 5mL de HCl 1% em 10 mL de EMEC. Deixou-se então as misturas em banho maria por 30 min, de modo que os alcaloides que estiverem na forma de “base livre” (não-ionizada) passasse para forma de “sal” (ionizada), aumentando assim a solubilidade. Esperou-se esfriar e filtrou-se cada amostra em funil de vidro com um filtro de papel *Whatman*. Colocou-se algumas gotas do filtrado (de EAEC e EMEC) e 3 gotas do Reagente de Dragendorff sobre uma lâmina de vidro para cada amostra. Para controle foram colocadas 3 gotas do filtrado sobre uma lâmina e realizou-se a comparação visual. A reação é considerada positiva com o aparecimento de precipitado marrom avermelhado. (GAMBETA, 2008).

4.6.4 TANINOS

Foram retirados 2mL das soluções de EAEC e EMEC de cada amostra e transferidos para tubos de ensaios. Realizaram-se as reações descritas a seguir para a identificação de taninos. Para o controle, utilizou-se tubos de ensaios contendo somente as soluções de EMEC e EAEC sem a adição de nenhum reagente, para a comparação visual com os testes.

Testes com Sais de Chumbo (acetato)

Foram colocadas para cada tubo de ensaio algumas gotas de uma solução aquosa de acetato de chumbo (10%, p/v) em 2mL das soluções de EMEC e EAEC. O surgimento de um precipitado volumoso e denso caracteriza resultado positivo para taninos (COSTA, 2002).

Reação com Sais de Cobre (acetato)

Foram adicionadas para cada tubo de ensaio algumas gotas de uma solução aquosa de acetato de cobre (3%, p/v) em 2mL das soluções de EMEC e EAEC. O aparecimento do precipitado castanho escuro caracteriza resultado positivo para taninos (COSTA, 2002).

Reação com Sais de Ferro

Em 2mL das soluções de EMEC e EAEC, foram adicionados 5 mL de água destilada e algumas gotas de uma solução de cloreto férrico a 2% para observação de mudança de coloração. Nesta reação os taninos classificados como hidrolisáveis produzem coloração azul-violeta e os taninos classificados como condensados coloração esverdeada (COSTA, 2002).

Reação com Acetato de Chumbo

Foram adicionados 10 mL de ácido acético (P.A.) em 5mL das soluções de EMEC e EAEC e, em seguida adicionados 5mL de uma solução de acetato de chumbo 10%. Esta reação é considerada positiva para taninos mediante surgimento de um precipitado. Nestas circunstâncias, o ácido acético conserva dissolvidos os catequinataninos evitando sua precipitação (COSTA, 2002).

4.6.5 ANTRAQUINONAS

A reação de caracterização deste grupo de substâncias (Reação de Borntraeger) exige algumas condições estruturais dos compostos a serem analisados, tais como: a presença de hidroxilas nas posições 1 e 8 do núcleo antraquinônico, fazendo-se necessário caso as hidroxilas não estejam livres, um tratamento hidrolítico (O-heterosídeos) e oxidativo (C-heterosídeos) (COSTA, 2002).

Ocorrência da genina livre

Agitou-se 0,3 g de extrato seco algal pulverizado com 5mL de éter etílico. Esperou-se sedimentação, e separou-se o extrato etéreo para tubos de ensaio. Repetiu-se o procedimento, com a mesma amostra, totalizando 10 mL de extrato etéreo. Adicionou-se ao extrato etéreo 1mL de uma solução aquosa de hidróxido de amônio (10%, v/v), tampou-se o tubo de ensaio e agitou-se para observação da coloração. A coloração com tonalidades de vermelho (rosa, laranja), na fase aquosa, indica a presença da parte aglicônica livre na amostra analisada (REAÇÃO DE BORNTAEGER).

Ocorrência de O-heterosídeo

Agitou-se 0,3 g de extrato seco algal pulverizado com 5mL de éter etílico. Esperou-se sedimentação, e separou-se o extrato etéreo para tubos de ensaio. Repetiu-se o procedimento, com a mesma amostra, totalizando 10 mL de extrato etéreo. Ao pó de cada amostra extraída com éter foi adicionado 40 mL de água destilada e aqueceu-se até a fervura, mantendo-a por 10 minutos.

Filtrou-se cada amostra utilizando um funil com algodão para um erlenmeyer, esperou-se esfriar e, após resfriamento, foram adicionados 5mL de HCl (P.A.). As amostras foram levadas novamente a ebulição para a hidrólise dos O-heterosídeos.

Após a ebulição, as amostras foram filtradas utilizando um papel de filtro, e então esperou-se esfriar e transferiu-se o extrato aquoso para um funil de extração. Extraiu-se a solução aquosa com 3 porções de 15 mL de éter etílico. Agitou-se uma alíquota da solução etérea ($\frac{1}{2}$ do volume do tubo de ensaio) com 2mL de uma solução aquosa de hidróxido de amônio (10%, v/v) e observou-se a coloração. A coloração com tonalidades de vermelho (rosa, laranja), na fase aquosa alcalina, indica a presença de O-heterosídeos na amostra analisada (REAÇÃO DE BORNTAEGER).

Ocorrência de C-heterosídeo

Adicionou-se à solução ácida obtida através do processo para determinação da ocorrência de O-heterosídeo, 5mL de uma solução de cloreto férrico (25%, p/v) e ferveu-se as amostras por 15 minutos para oxidação dos C-heterosídeos.

Após fervura filtrou-se a solução utilizando papel de filtro, esperou-se esfriar e então os extratos foram transferidos para um funil de extração. Realizou então uma partição líquido-líquido, adicionando-se 20 mL de clorofórmio. A fase clorofórmica foi separada com o auxílio de um funil de extração e lavada duas vezes com 10 mL de água destilada.

Agitou-se uma alíquota da fase clorofórmica ($\frac{1}{2}$ do volume do tubo de ensaio) com 2mL de uma solução aquosa de hidróxido de amônio (10%, v/v) para observação da coloração. O surgimento de uma coloração com tonalidades de vermelho (rosa, laranja) na fase aquosa alcalina, indica a presença de C-heterosídeos na droga analisada (REAÇÃO DE BORNTAEGER).

4.6.6 ESTERÓIDES/TERPENÓIDES

Os testes para esteróides/terpenóides foram realizados pela reação de Lieberman-Burchard, tomando-se 2mL da solução de EMEC e misturando-o a 2 mL de clorofórmio. Em seguida, a solução clorofórmica foi filtrada gota a gota em um funil com algodão coberto com alguns decigramas de Na_2SO_4 anidro.

Em tubo de ensaio, adicionou-se 1mL de anidrido acético (P.A.), agitando-se suavemente, e então foram acrescentados cuidadosamente três gotas de H_2SO_4 concentrado (P.A.), agitando-se suavemente os tubos. O surgimento de uma coloração azul evanescente seguida de verde indica presença de esteroides e terpenóides, respectivamente (SILVA *et al.*, 2010).

4.7 ESPECTROSCOPIA RAMAN

Para obtenção de espectros Raman das algas estudadas, uma pequena porção de cada extrato seco (item 4.3) foi separada e levada para as análises.

Para as análises por espectroscopia Raman, foi utilizado um sistema Raman dispersivo portátil (*Dimension P-1 Raman system, Lambda Solutions, Inc., MA, EUA*) com excitação de 830 nm e laser ajustável com potência de até 250 mW. A resolução espectral utilizada foi de $0,5 \text{ cm}^{-1}$ num intervalo de $400\text{-}1800 \text{ cm}^{-1}$. O espectrômetro

foi ligado a uma sonda de Raman (*Vector probe, Lambda Solutions, Inc. MA, EUA*) de 3 m de comprimento, com filtro passa-banda e de rejeição. O espectrômetro possui uma câmera CCD (1320 × 100 pixels), resfriada a -75°C para diminuir o ruído térmico (figura 19).

Para a aquisição dos espectros, as amostras foram acondicionadas em um porta-amostras de alumínio, com poços de 5 mm de diâmetro e capacidade de 100 µL e, em seguida, a sonda foi colocada a uma distância de 10 mm, perpendicularmente à superfície da amostra. O sinal espalhado por cada amostra foi então coletado pela sonda e acoplado ao espectrômetro Raman para a dispersão e detecção. Os sinais Raman foram coletados em varreduras de 10s para todas as amostras. Finalmente, os espectros brutos foram calibrados, pré-processados (filtragem da fluorescência) e armazenados para posterior análise (TOMA *et al.*, 2014).



Figura 19. Sistema Raman dispersivo utilizado para obtenção dos espectros das algas.

Fonte: GUIMARÃES *et al.*, 2014

A espectroscopia Raman é considerada uma técnica espectroscópica vibracional relativamente simples, reproduzível, não destrutiva para o tecido. Com apenas pequenas quantidades de material (nanogramas para microgramas) com uma preparação mínima da amostra a técnica já pode ser realizada. Além disso, esta técnica fornece informações em nível molecular, permitindo a investigação de grupos funcionais, tipos de ligação, e conformações moleculares. As bandas espectrais em espectros vibracionais são moléculas específicas e fornecem informações diretas sobre a sua composição bioquímica. A posição dos picos espectrais atribuídos juntamente com detecção precisa do pico de definição é de crucial importância (MOVASAGUI *et al.*, 2007).

A técnica baseia-se na dispersão não elástica de fótons incidentes por átomos e moléculas numa amostra. Os fótons incidentes entram em um estado de energia virtual quando interagem com a amostra. O comprimento de onda de fótons dispersos pode ser determinado através do cálculo dos momentos de dipolo induzido nas moléculas devido a deslocamentos vibracionais. Se o estado fundamental final tem mais energia do que o estado inicial, fótons emitidos serão deslocados para menor frequência. Esta dispersão é chamada como dispersão Stokes. Se o estado final é mais enérgico do que inicial, o fóton emitido será deslocado para maior frequência, resultando em dispersão anti-Stokes. Dependendo da quantidade de fótons dispersos, o espectro Raman mostrará vários picos que sofrerão alterações. Estes picos característicos podem ser utilizados para identificar os componentes estruturais ou a composição química de uma amostra (PARAB & TOMAR, 2012).

Em condições normais, a intensidade de dispersão de Raman de um componente ativo depende da frequência do laser incidente. A intensidade de um pico característico é linearmente proporcional à escala de concentração da molécula que produz o espectro (SMITH & DENT, 2005). No entanto, o espalhamento ressonante só ocorre quando o máximo de absorção de uma molécula está próximo da frequência do laser incidente (ou energia de excitação) (HUANG *et al.*, 2009).

4.7.1 TLC-RAMAN

Para melhorar a resolução dos picos dos espectros Raman das amostras foi empregado no presente estudo a técnica de thin-layer chromatography acoplada a espectroscopia Raman (TLC-Raman), que consiste na obtenção do espectro Raman sobre as bandas geradas na placa de CCD. As placas de CCD foram desenvolvidas na mesma fase móvel descrita no item 4.4 e as bandas foram presentes nas amostras foram visualizadas com o auxílio de gabinete com luz ultravioleta de 254nm e 365nm, sendo foram devidamente marcadas. Para obtenção dos espectros, o feixe de luz foi localizado centralmente às bandas e os espectros Raman foram gerados sob as mesmas condições analíticas descritas no item 4.7 (ZHU *et al.*, 2014). Para efeitos de comparação, também registrados espectros Raman correspondentes à sílica que recobre a placa de CCD (sem amostra).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS

Foram obtidos quatro extratos de diferentes polaridades das algas *U. fasciata*, *P. gymnospora*, *U. linza*, e *J. adhaerens* e na tabela 3 e figura 20 estão apresentados os rendimentos para cada extrato obtido.

Tabela 3. Massa dos extratos com polaridades diferentes de cada alga.

ESPÉCIE	MASSA INICIAL	MASSA SECA	EXTRATO			
			HEXANO	CLOROFÓRMIO	METANOL	ÁGUA
<i>Ulva fasciata</i>	57,48g	10,06g	0,04g	0,35g	0,42g	0,7g
<i>Padina gymnospora</i>	58,88g	11,46g	0,18g	0,45g	0,69g	0,49g
<i>Ulva linza</i>	69,95g	22,53g	0,12g	0,47g	0,14g	0,21g
<i>Jania adhaerens</i>	67,73g	20,31g	0,03g	0,44g	0,24g	0,17g

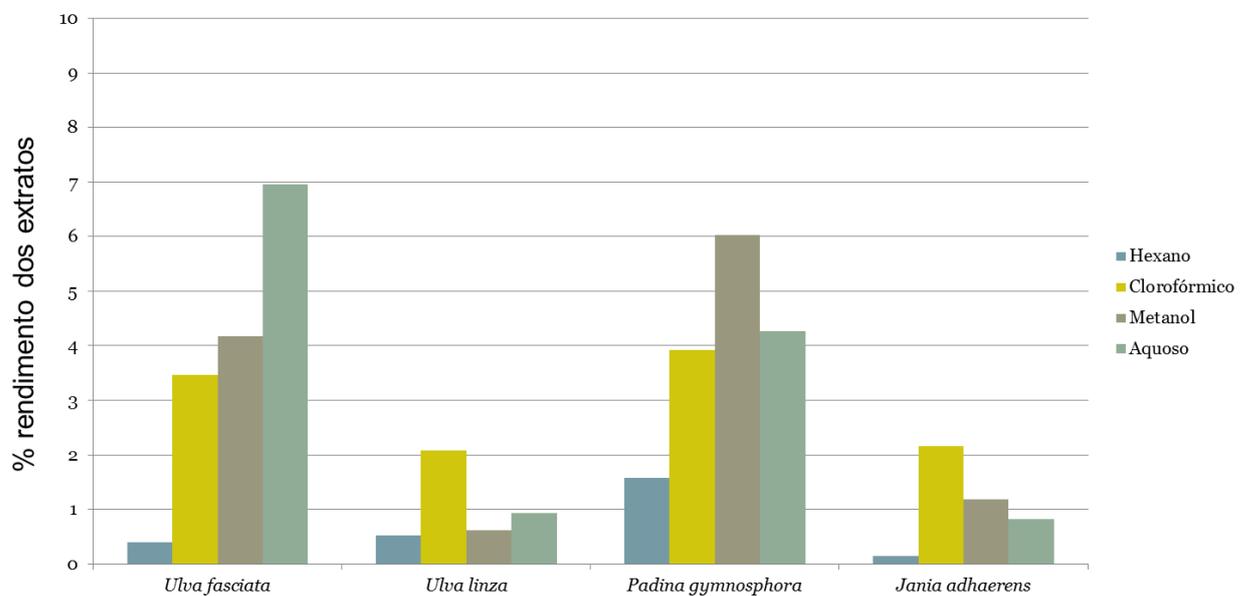


Figura 20. Rendimento dos extratos.

A metodologia extrativa empregada no presente estudo apresentou melhor rendimento para as algas *U. fasciata*, *P. gymnospora*, extratos metanólicos e aquosos. Vários métodos são empregados na extração de componentes de algas marinhas, tais como enzimáticos, ácidos e aquosos (ZHANG *et al.*, 2008). Segundo Dos Santos *et al.* (2010), procedimentos clássicos para obtenção dos extratos permitem estudos com

custo relativamente baixo, tendo uma abordagem que permite a incorporação de resultados científicos em escala produtiva. Os procedimentos clássicos são conduzidos em sistemas abertos, ou seja, sem controle da presença de oxigênio ou de temperatura, normalmente com fases estacionárias polares (CORREIA *et al.*, 2007).

Extrações de componentes de diferentes espécies de algas marinhas podem influenciar nos seus rendimentos (TORRES, 2005). Em um levantamento realizado por Rodrigues *et al.* 2009 para a extração de polissacarídeos sulfatados presente em algas é possível observar a grande variação nos rendimentos de diferentes espécies e metodologias empregadas. Extrações de polissacarídeos utilizando as algas marinhas vermelhas *Gracilaria cornea* (MELO *et al.*, 2002), *Champia feldmannii* (TORRES, 2005) e uma outra espécie do gênero *Halymenia* (RODRIGUES, 2006) apresentaram rendimentos superiores daquele obtido da alga verde *Caulerpa sertularioides* por Bezerra-Neto (2005), mas foram semelhantes às algas pardas *Lobophora variegata* (ALENCAR, 2007) e *Spatoglossum shröderi* (LIMA, 2007).

Algumas das desvantagens de se trabalhar com extratos de produtos naturais são as pequenas quantidades disponíveis para testes, a variação entre lotes e a complexa identificação e isolamento de seus componentes, que torna difícil atribuir a atividade biológica descoberta a uma única molécula, o que não acontece para substâncias químicas sintéticas obtidas em laboratório (FREARSON & COLLIE, 2009). Alternativamente, as metodologias de cultivo de algas poderão ser empregadas no intuito de se obter maior quantidade de material além da possibilidade de controle das condições de crescimento. Condições que possivelmente diminuiriam a variabilidade na produção de moléculas biologicamente ativas, como por ex. a produção de metabólitos secundários.

5.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os ensaios cromáticos e/ou de precipitação consistem em análises fitoquímicas que tem por objetivo avaliar a presença de metabólitos secundários em espécies vegetais. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica pode indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes (biologicamente ativos) nestas espécies (SIMÕES *et al.*, 2010). Para todas as algas

foram realizados ensaios para avaliar a presença dos metabólitos secundários Flavonóides, Taninos, Antraquinonas, Alcalóides, Saponinas e Esteróis/terpenóides devido à sua importância no contexto da pesquisa de novas moléculas biologicamente/farmacologicamente ativas.

5.2.1 FLAVONÓIDES

Os Flavonóides constituem um grupo de pigmentos vegetais de ampla distribuição na natureza, sua presença nos vegetais pode estar relacionada com funções de defesa (proteção contra raios ultravioleta, ações antifúngica, e antibacteriana). O esqueleto básico dos Flavonóides, dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três átomos de carbono (C6-C3-C6), resulta de rotas biossintéticas separadas: a do ácido chiquímico e a do acetato, via ácido malônico. Representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Podem-se encontrar flavonoides em diversas formas estruturais, que são formados a partir da sua biossíntese (SIMÕES *et al.*, 2010).

Para as algas avaliadas, todas as espécies apresentaram resultado positivo apenas para a reação com cloreto férrico, o que indica presença de Chalconas nestas amostras (figura 21).

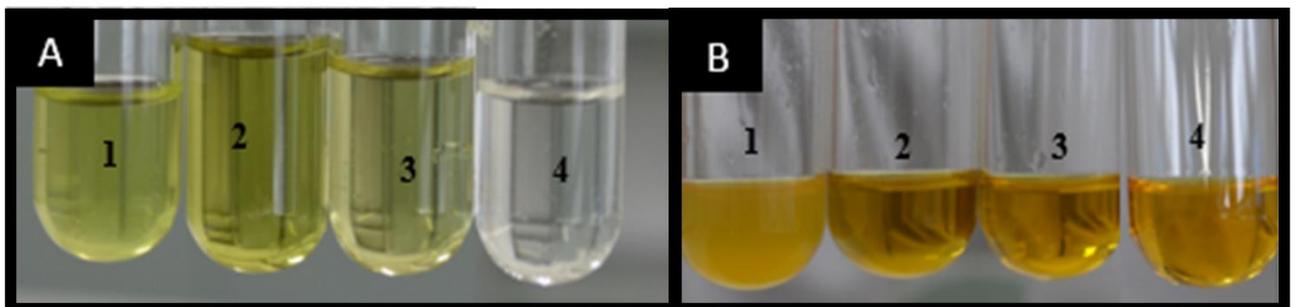


Figura 21. Resultados das análises de Flavonóides (teste de cloreto férrico para Chalconas). Painel A, tubos controle para a reação de cloreto férrico. Painel B, Reação positiva para presença de Chalconas nas diferentes espécies de algas. Tubo 1, *U. fasciata*; tubo 2, *U. linza*; tubo 3, *P. gymnospora*; tubo 4, *J. adhaerens*.

Fonte: Arquivo pessoal

Chalcona é um termo utilizado para caracterizar uma família de compostos possuindo como núcleo fundamental o 1,3-diarilpropano, modificado pela presença de uma ligação olefínica, de um grupamento cetona e/ou de um grupamento hidroxila.

São compostos precursores da via da biossíntese dos flavonoides, possuem um papel importante em sistemas ecológicos em função das cores que produzem nos vegetais, apresentam uma grande variedade de atividades biológicas, sendo as mais comuns edulcorantes ou protetores contra o calor e luz (SIMÕES *et al.*, 2010).

Em um trabalho realizado por Felix (2014) com algas cultivadas na ausência de agentes estressantes (salinidade e cádmio) o teor de flavonóides foi menor quando comparado às algas submetidas a condições de estresse, indicando que este composto atua efetivamente como elemento de proteção.

Guo *et al.* (2008) isolou metabólitos secundários em micro-organismos endófitos, que são fungos associados a algas compreendendo uma relação de protocooperação, onde estes possuem habilidade em biossintetizar substâncias ativas que foram inicialmente descobertas em suas plantas hospedeiras, entre essas substâncias destacaram-se a presença de flavonoides, terpenóides, alcaloides entre outros; A associação entre algas e fungos apresenta-se bem estabelecida cientificamente mas ainda necessita de mais estudos pois essa área oferece potencial praticamente ilimitado a ser explorado (FELÍCIO, 2010). Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de composto é amplamente distribuída no reino vegetal, porém é quase ausente em algas, sendo alguns representantes identificados em briófitas, existindo relatos de ocorrência em fungos (SIMÕES *et al.*, 2010).

5.2.2 SAPONINAS

Somente a alga *U. fasciata* apresentou resultado positivo em todos os testes para a presença de saponinas, enquanto a *U. linza*, apresentou resultado positivo aos testes de determinação do índice de espuma e para análise qualitativa para saponinas (figura 22). As algas *P. gymnospora* e a *J. adhaerens* apresentaram resultado negativo para saponinas em todos os testes.

Saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos. Esse tipo de estrutura possui característica lipofílica (triterpenos ou esteroides) e outra parte hidrofílica (açúcares), determinando a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergente e emulsificante. O isolamento de saponinas, bem como a sua elucidação estrutural, pode ser muito difíceis, pois são substâncias com

elevada massa molecular, que possuem misturas complexas devido à presença concomitante de estruturas com um número variado de açúcares com cadeia linear ou ramificada ou ainda a presença de agliconas. As saponinas mais frequentes encontradas na natureza possuem 30 átomos de carbono e núcleo triterpênico, apresentando distribuição diferenciada no reino vegetal (SIMÕES *et al.*, 2010).

Saponinas fazem parte da composição básica de várias espécies de algas. (PADILHA *et al.*, 2014). Por seu comportamento anfifílico possuem propriedades biológicas como: hipocolesteremiante (FERREIRA *et al.*, 1997), anti-inflamatória (SAFAYHI & SAILER, 1997) e antiviral (SIMÕES *et al.*, 1999). As saponinas em soluções aquosas formam espuma persistente na presença de ácidos. Essa característica detergente deve-se a sua estrutura, composta de uma parte lipofílica apolar (aglicona ou sapogênica) e uma parte hidrofílica polar (açúcares). O teste de formação da espuma baseia-se na característica físico-química dessas substâncias: diminuição da tensão superficial e formação de espuma (SCHENKEL *et al.*, 2007).

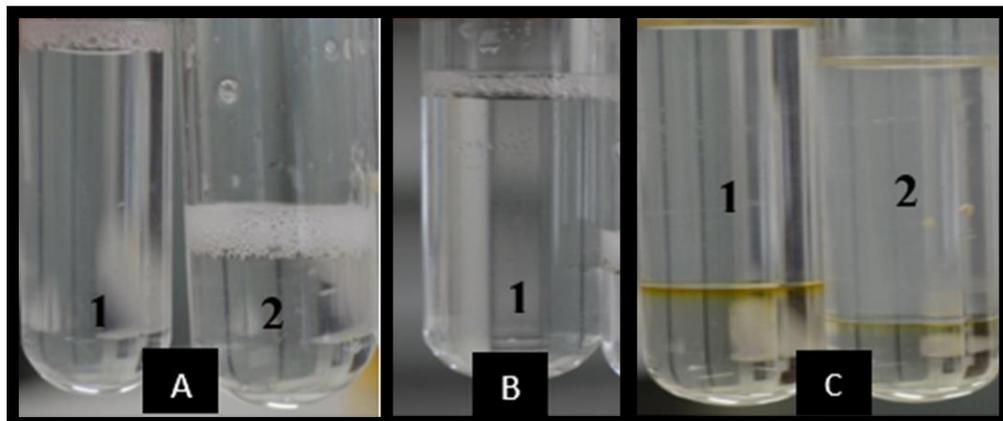


Figura 22. Resultados das análises de saponinas. Painel A, resultados positivos para o teste de determinação do índice de espuma, sendo tubo 1 *U. fasciata* e tubo 2 *U. linza*. Painel B, resultado positivo para o teste de ação superficial para *U. fasciata*. Painel C, resultado positivo para análise qualitativa para saponinas, sendo o tubo 1 *U. fasciata* e tubo 2 *U. linza*.

Fonte: Arquivo pessoal

A ocorrência de saponinas em algas também foi detectada em um trabalho realizado com a *U. fasciata* por Alencar (2010), onde através da análise do extrato étereo a ocorrência de saponinas foi verificada através da formação de uma espuma persistente e confirmada com a precipitação de agliconas hidrolisadas.

Vários efeitos biológicos têm sido atribuídos a esta substância: agentes antimicrobianos, anticancerígeno, imunoestimulantes, entre outros (Francis *et al.*, 2002). Este componente é muito importante na vida marinha, uma vez que está diretamente relacionado à dieta nos peixes, uma vez que se verificou que as algas prolíficas do gênero *Caulerpa* (*Chlorophyta*), pode conter cerca de 10-20% de saponinas na sua constituição e promover um bom crescimento e desenvolvimento em peixes, no entanto um rendimento de mais de 30% de saponinas em *Caulerpa* é muito elevado (ZINADAH *et al.*, 2013).

Saponinas foram encontradas no trabalho de Padilha *et al.* (2014), que avaliou a presença desse metabólito com a espécie *Caulerpa racemosa*, pertencente ao gênero *Caulerpa* (*Chlorophyta*) corroborando com os resultados positivos para saponinas encontrados nesse trabalho. Para algas vermelhas, um estudo realizado por Salamanca (2007) avaliou a presença de metabólitos secundários na espécie *Bostrychia calliptera* (*Rhodophyta*) em extrato de diferentes polaridades, sendo apolar (hexano), media polaridade (cloreto de metileno) e polar (etanol), na Costa Pacífica Colombiana, detectando-se a presença de saponinas nesta alga.

5.2.3 ALCALÓIDES

Diferentes reativos cromogênicos tais como Dragendorff, podem ser utilizados para caracterizar alcaloides (HARBONE, 1998). A reação de Dragendorff realizada nas amostras evidenciou a presença de alcaloides para as algas *U. fasciata*, *U. linza* e *P. gymnospora*.

Alcalóides também foram detectados em *U. fasciata* em ensaio com reagente Dragendorff no trabalho de Alencar (2010). Para algas verdes do gênero *Caulerpa*, os trabalhos de Macedo *et al.* (2012); Guven *et al.* (2010), elucidaram pequenas quantidades de alcaloides.

Em outro trabalho realizado com a espécie *Caulerpa racemosa* diversos metabólitos secundários foram avaliados, sendo os alcaloides o segundo grupo mais abundante, detectado nos extratos étereo e metanólico (SÁNCHEZ, 2012).

A presença de alcaloides na macroalga marinha verde *U. fasciata* foi relatada por Alencar (2010), que estudou a presença de dois alcaloides, a histamina (alcaloide imidazólico) e a tiramina, onde foi detectada a presença de histamina em uma

quantidade inferior 0,01 mg kg⁻¹ de alga desidratada. A tiramina não foi encontrada na *U. fasciata*, mas foi encontrada em algas pardas *Laminaria saccharina* (KNEIFEL *et al.*, 1977), algas vermelhas *Palmaria palmata* (SAKER-SAMPAIO, 1997), *Chondrus crispus* e *Polysiphonia urceolata* (HARTMAN & AUFERMAN, 1973).

O número de produtos descritos, sua diversidade estrutural e sua gama de atividades farmacológicas, fazem dos alcaloides um dos grupos mais importantes dentro das substâncias de origem natural com interesse terapêutico (BRUNETON, 2001). Segundo Pelletier (1988), um alcaloide seria uma substância orgânica, de origem natural, cíclica, contendo um nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos.

Os alcaloides constituem um vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural, comparável àquela dos terpenóides, representando cerca de 20% das substâncias naturais descritas (SIMÕES *et al.*, 2010). Podem ser encontrados em todas as partes de um vegetal, contudo em um ou mais órgãos haverá um acúmulo preferencial dessas substâncias, como tecido com crescimento ativo, células epidérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos (EVANS, 1996).

Tem sido observado que alcaloides são sintetizados em vegetais para conferir proteção contra animais e insetos, detoxificação de substâncias nocivas, geradas pelo metabolismo primário, reserva de nitrogênio, hormônios reguladores de crescimento (SIMÕES *et al.*, 2010).

A hordenina foi o primeiro alcaloide isolado a partir de alga marinha em 1969 (GUVEN *et al.*, 1969; GUVEN *et al.*, 1970), atualmente aproximadamente duzentos alcaloides são conhecidos, eles ocorrem abundantemente em plantas terrestres e raramente em algas marinhas, onde podemos citar os grupos: Feniletilamina alcaloides, Indólicos e alcaloides Indólicos Halogenados e outros alcaloides (GUVEN *et al.*, 2010).

Embora muito poucos alcalóides tenham sido isolados a partir de algas marinhas quando comparados com o número de estudos em plantas terrestres, podemos citar: a β /2-feniletilamina identificado em algumas algas pardas e vermelhas, que agem no cérebro humano como um neurotransmissor e neuromodulador; a dopamina foi isolado pela primeira vez na alga verde *Monostroma fuscum*; e a caulerpina que foi identificada em várias espécies de algas verdes e vermelhas, sendo

encontrada principalmente em algas *Caulerpa*. Compostos cíclicos halogenados contendo nitrogênio em sua estrutura são englobados no termo alcaloide, os quais são específicos dos organismos marinhos e algas marinhas (GUVEN *et al.*, 2010).

5.2.4 TANINOS

A presença de taninos foi observada na reação de sais de ferro para EMEC das algas *U. fasciata*, *U. linza* e *P. gymnospora*. A presença de taninos em *U. fasciata* corrobora com o trabalho de Alencar (2010) que detectou a presença desses compostos nessa mesma alga no extrato étereo.

Trabalhos como o de Blunden *et al.* (1986) com 33 espécies de Phaeophyceae demonstrou que a atividade hemaglutinante era devida a presença de taninos, sendo sugerido que as publicações anteriores com Phaeophyceae sobre hemaglutinação pode ser devido à presença desses compostos e não da lecitina.

No trabalho realizado por Perez-Lorenzo (1998), onde foram comparados os níveis de taninos presentes em *P. gymnospora* (Phaeophyceae) e *Gymnogongrus tenuis* (Rhodophyta), foi constatado que a *Padina gymnospora* contém mais taninos quando comparados com a espécie *Gymnogongrus tenuis*.

Apesar deste grupo de metabólitos não ser muito encontrado em algas verdes, é normalmente encontrada em algas pardas, sendo denominada de floratinos (ROCHA *et al.*, 2007). Os taninos são conhecidos por sua ação antioxidante, devido a sua capacidade de capturar radicais livres, reforçando assim suas propriedades medicinais (ALENCAR, 2010). Estudos mostram que vários taninos atuam como captadores de radicais, assim como os encontrados no presente trabalho, os quais interceptam o oxigênio ativo formando radicais estáveis, como por exemplo, em situações de bloqueio da peroxidação de lipídeos em mitocôndrias hepáticas; bloqueio da lipoxigenase em leucócitos; bloqueio da xantinoxidase e a repressão da formação de radicais de ânion superóxido (MOURE *et al.*, 2001).

Taninos são compostos fenólicos hidrossolúveis que possuem massa molecular que compreende entre 500 e 3.000 Dalton, apresentam junto com as reações clássicas de fenóis, a propriedade de precipitar alcaloides e algumas proteínas (BRUNETON, 2001). A complexação entre taninos e proteínas é a base para suas propriedades como fatores de controles de fungos, bactérias tanto quanto para suas atividades farmacológicas (SIMÕES *et al.*, 2010). Suas atividades

farmacológicas incluem tratamento da hipertensão arterial, reumatismo, gastrite, problemas renais e processos inflamatórios e antitumoral (DUFRESNE & FARNWORTH, 2001).

Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos são devidas, em parte, a três características gerais que são comuns em maior ou menor grau aos dois grupos de taninos (condensados e hidrossolúveis): complexação com íons metálicos, habilidade de complexar com outras moléculas incluindo proteínas e polissacarídeos e atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres (SIMÕES, 2010).

5.2.5 ANTRAQUINONAS

As quinonas naturais possuem suas ligações duplas conjugadas com um anel de benzeno (benzoquinonas), ou aqueles com um sistema aromático policíclico condensado: naftaleno (naftoquinonas), antraceno (antraquinonas), 1,2-benzantraceno (antracilinas), naftodiantreno (naftodiantronas), perileno e fenantreno. Antraquinonas podem ser classificadas como compostos orgânicos oxigenados com caráter aromático, que podem ser considerados como produtos da oxigenação de fenóis (BRUNETON, 2001).

Organismos vegetais são estudados desde a antiguidade por suas atividades biológicas ou como fonte de corantes (THOMSON, 1971). Em 1993, Decosterd et al. demonstraram a atividade inibitória da replicação do vírus HIV através do isolamento de uma quinona, a naftoquinona trimérica conocurvona (*Conospermum incurvum* Lindl.). No estudo de Itogawa et al. (2001) a naftoquinona de *Avicennia*, demonstrou potente atividade quimioprotetora contra carcinogênese. Estas e outras substâncias do grupo podem vir a tornarem-se alternativas na terapia e prevenção de diversas patologias (SIMÕES et al., 2010).

Para avaliação de antraquinonas o teste da genina livre apresentou resultado negativo para todas as amostras algais.

5.2.6 ESTERÓIDES E TERPENÓIDES

Esteróides e Terpenóides são sintetizados a partir dos mesmos precursores, constituem o mais amplo conjunto conhecido de metabólitos secundários dos vegetais. A imensa maioria dos terpenos é específica do reino vegetal, diterpenos são encontrados em organismos marinhos (Celentéreos, Espongiários) (BRUNETON, 2001). Os testes empregados para a detecção de esteroides e terpenóides no

presente estudo, através da reação de Lieberman Burchard, foram positivos para as algas *U. fasciata*, *U. linza* e *P. gymnospora*.

A presença de triterpenóides foi relatada pela primeira vez no estudo realizado por ALENCAR (2010) com a *Ulva fasciata*, porém a literatura registra o isolamento de outras estruturas terpenóides em outras espécies do gênero *Ulva*, como diterpenos labdanos (CHAKRABORTY *et al.*, 2010), sesquiterpenos (CHAKRABORTY & PAULRAJ, 2010), tetraterpenos (PIRES *et al.*, 2008) e esteroides (AWAD, 2000).

Estudos das atividades biológicas realizados com os extratos de alga verde do gênero *Ulva*, além de pesquisas que isolaram os constituintes químicos revelando classes de compostos como: terpenos, esteroides, compostos fenólicos e ácidos graxos (ALENCAR, 2010), corroboram com os resultados positivos encontrados para as amostras de *Ulva fasciata* e *Ulva linza*.

Os terpenos estão incluídos em uma diversificada classe de substâncias naturais de origem vegetal, sendo formados a partir de unidades de cinco átomos de carbonos, denominados de isopreno. Os terpenos são classificados de acordo com o número de unidades de isoprenos que podem ser: monoterpenos (C₁₀); sesquiterpenos (C₁₅); diterpenos (C₂₀); sesterterpenos (C₂₅); triterpenos (C₃₀); tetraterpenos ou carotenoides (C₄₀) e esteroides (C₁₈ a C₂₉) (HANSON, 2003; HUMPHREY & BEALE, 2006; MANN, 2005).

A investigação de metabólitos secundários de algas marinhas já resultou no isolamento de diversos compostos terpenóides, a macroalga verde tropical *Caulerpa taxifolia* é um desses exemplos. Ela ficou conhecida pelos seus danos ao ecossistema, devido à liberação de um sesquiterpeno tóxico chamado caulerpenina (MOZZACHIODI *et al.*, 2001). A caulerpenina (1,4-diacetoxibuta-1,3-dieno; segundo a IUPAC) é um composto acíclico e em sua estrutura encontramos 3 grupos acetoxi (AMICO *et al.*, 1978). Semelhantemente foi encontrado em *Caulerpa prolifera*, outro sesquiterpeno conhecido como furocaulerpina, com a presença de um anel furano (NAPOLI *et al.*, 1981).

O esterol predominante nas algas verdes é clionasterol, Dzeha *et al.* (2013), mostraram que essa substância é letal para larvas de mosquitos. Nesse mesmo ano foram realizadas extrações etanólicas com alga *Caulerpa racemosa* frente às espécies *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, indicando que

o produto natural marinho tinha potencial biológico (ALI *et al.*, 2013). As macroalgas pardas (Phaeophyceae) comumente produzem terpenóides, polifenóis, substâncias de origem biossintética mista, terpenos aromáticos, e hidrocarbonetos voláteis como seus metabólitos secundários mais comuns (BLUNT *et al.*, 2011).

Um estudo realizado por Pereira *et al.* (2002) mostrou que a mistura de dois diterpenos (isolinearol e linearol) presentes na espécie de alga parda *Canistrocarpus cervicornis* possui ação defensiva frente ao consumo do gastrópodo *Astraea latispina*, mostrando que esses compostos podem proteger a alga de uma possível herbivoria.

A forte ação defensiva dos vários diterpenos isolados em espécies de *Dictyota* parece estar diretamente relacionada com características estruturais e químicas importantes para o perfil defensivo destas substâncias (GARCIA *et al.*, 2009). Em geral, os estudos realizados no Brasil, ampliaram o conhecimento sobre outros tipos estruturais ou moleculares de diterpenos que podem atuar como defesa. Outra espécie de alga parda a *Stypopodium zonale*, também é quimicamente defendida, uma vez que seu extrato bruto é rico em meroditerpenos (PEREIRA *et al.*, 2008).

Estudos realizados mostram que as algas pardas das espécies *Sargassum furcatum*, *Dictyopteris justii* e *Spatoglossum schroederi*, possuem em sua composição química esteróides monohidroxilados, onde segundo Fleury *et al.* (1996), esse metabólito não possuem ação frente a herbivoria, porém um estudo mais recente desenvolvido por Teixeira *et al.* (2006), mostra que a sinergia gerada por esteróis isolados nas macroalgas pardas *Dictyopteris justii* e *Spatoglossum schroederi*, inibiu consumo pelo caranguejo *Pachygrapsus transversus*.

As macroalgas verdes são conhecidas como produtoras de sesquiterpenos e diterpenos, em sua maioria, produzidos por espécies de *Caulerpales* (PEREIRA & DA GAMA 2008). Outros poucos gêneros (com destaque para *Avrainvillea*, *Cymopolia* e *Neomeris*) também produzem metabólitos halogenados (HARPER *et al.*, 2001; BLUNT *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos nas análises de metabólitos secundários estão resumidos na tabela 4.

Tabela 4. Resultado das análises de metabólitos secundários.

	<i>Ulva fasciata</i>	<i>Ulva linza</i>	<i>Padina gymnospora</i>	<i>Jania adhaerens</i>
FLAVONÓIDES	(+)	(+)	(+)	(+)
SAPONINAS	(+)	(+)	(-)	(-)
ALCALÓIDES	(+)	(+)	(+)	(-)
TANINOS	(+)	(+)	(+)	(-)
ANTRAQUINONAS	(-)	(-)	(-)	(-)
ESTERÓIDES TERPENÓIDES	(+)	(+)	(+)	(-)

(+) presença ; (-) ausência

5.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A cromatografia ocupa um lugar de destaque devido à facilidade com que efetua a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, espectrometria de massa. A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que um deles é seletivamente repetido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes (COLLINS, 2007).

A CCD foi desenvolvida em 1938 pelos pesquisadores russos Izmailov e Sharaib e consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. O grande desenvolvimento dessa técnica é consequência natural das múltiplas vantagens que ela oferece, como fácil compreensão e execução, separações rápidas, versatilidade, grande repetibilidade e baixo custo (LOPES, 2007).

Após obtenção dos extratos foi realizada a CCD para todas as amostras. Os perfis cromatográficos em ordem crescente de polaridade das bandas geradas através da separação dos componentes estão representados na figura 23 com luz natural, na

figura 24 com exposição de lâmpada de irradiação de 254 nm e na figura 25 com exposição de lâmpada de irradiação de 365 nm.

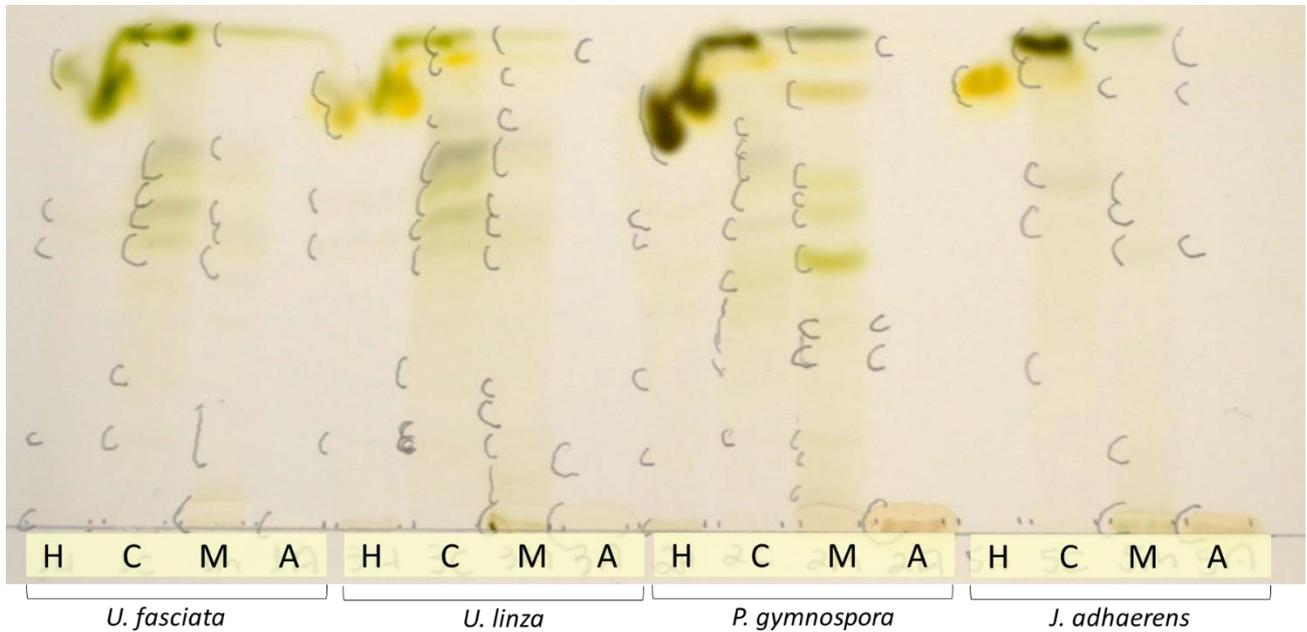


Figura 23. Perfil cromatográfico sob a luz natural. H, extrato hexânico; C, extrato clorofórmico; M, extrato metanólico; A, extrato aquoso.

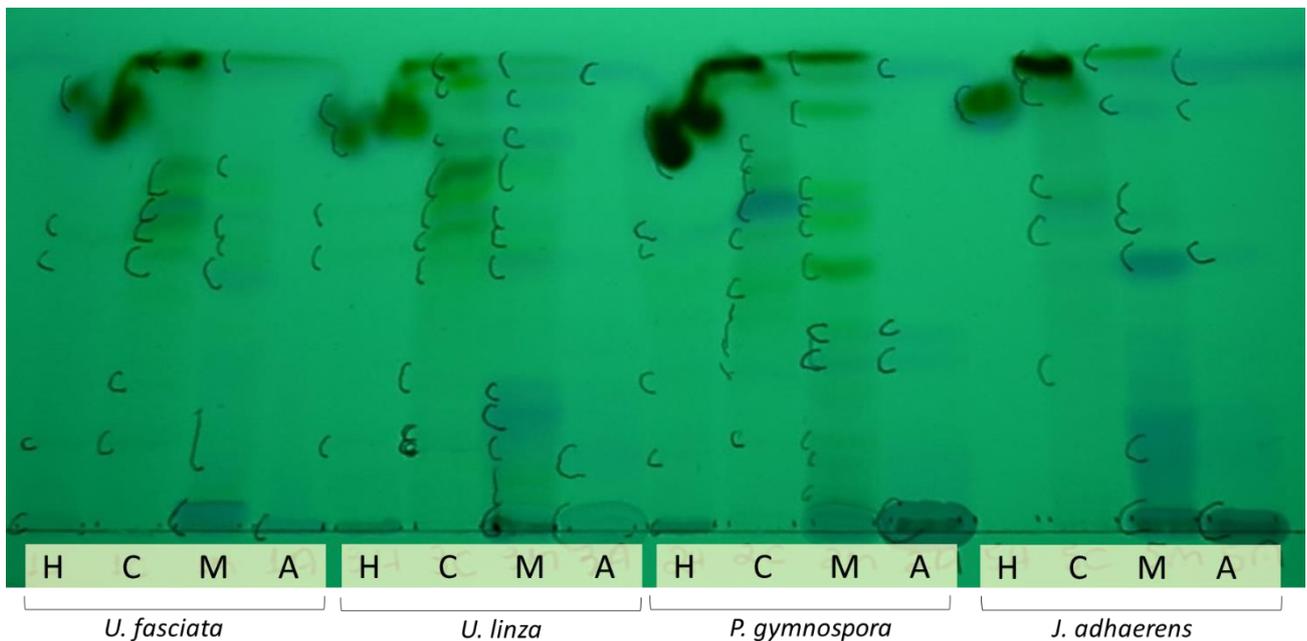


Figura 24. Perfil cromatográfico em camada delgada sob luz UV 254 nm. H, extrato hexânico; C, extrato clorofórmico; M, extrato metanólico; A, extrato aquoso.

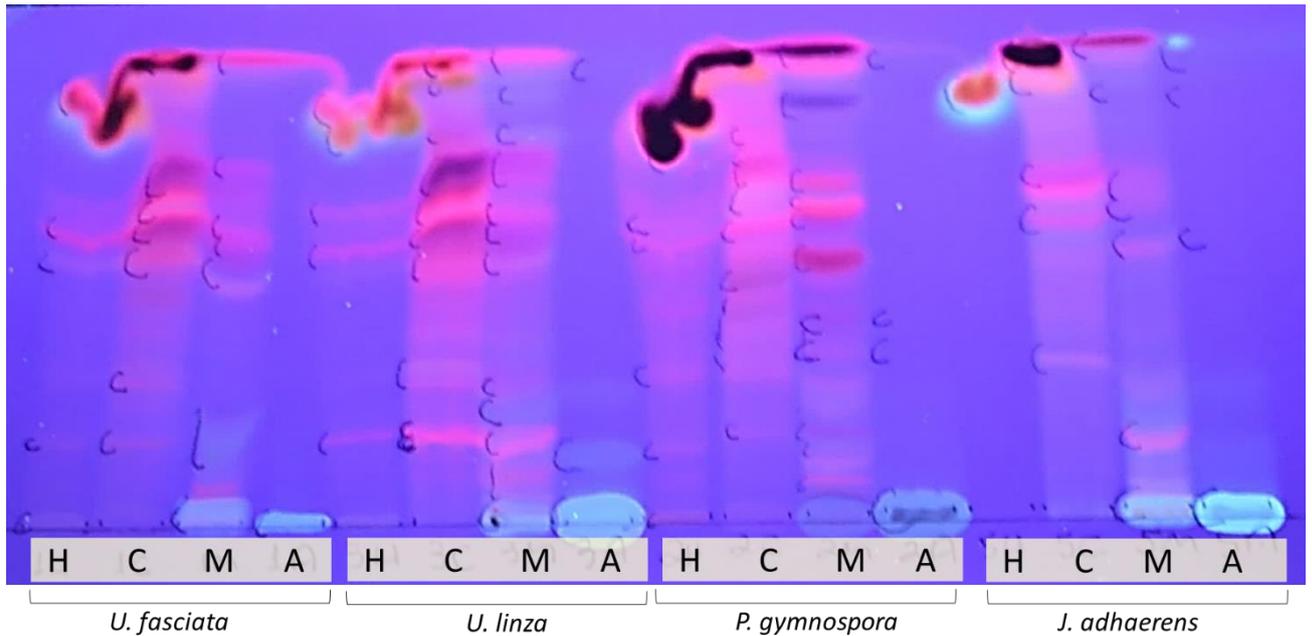


Figura 25. Perfil cromatográfico em camada delgada sob a luz 365 nm. H, extrato hexânico; C, extrato clorofórmico; M, extrato metanólico; A, extrato aquoso.

Todas as bandas visíveis na placa cromatográfica, tanto na luz visível, quanto com o auxílio de luz UV (254nm e 365nm) foram devidamente marcadas para realização do cálculo de seus respectivos R_f (Tabela 5). A partir dos resultados de CCD, pode-se observar um maior número de componentes químicos de polaridade intermediária, presentes nos extratos clorofórmicos e metanólicos.

Tabela 5. Rfs dos componentes presentes nas algas.

EXTRATOS				
	HEXANO	CLOROFÓRMIO	METANOL	ÁGUA
<i>Ulva fasciata</i>	0,01	0,13	0,02	0,02
	0,14	0,24	0,06	
	0,43	0,43	0,13	
	0,49	0,49	0,15	
	0,68	0,54	0,18	
		0,60	0,41	
			0,50	
			0,57	
			0,60	
			0,79	
<i>Ulva linza</i>	0,02	0,15	0,02	0,02
	0,16	0,17	0,06	0,14
	0,51	0,27	0,09	
	0,60	0,30	0,16	
	0,73	0,49	0,21	
	0,80	0,54	0,27	
		0,60	0,50	
		0,65	0,56	
		0,73	0,59	
		0,84	0,67	
	0,87	0,70		
		0,74		
		0,83		
		0,90		
<i>Padina gymnospora</i>	0,01	0,17	0,02	0,02
	0,14	0,30	0,07	
	0,28	0,36	0,14	
	0,52	0,38	0,17	
	0,57	0,41	0,32	
	0,70	0,47	0,38	
		0,57	0,50	
		0,62	0,57	
		0,69	0,60	
		0,71	0,65	
	0,74	0,81		
		0,90		
<i>Jania adhaerens</i>	0,78	0,01	0,03	0,02
	0,82	0,30	0,15	0,53
		0,58	0,51	0,80
		0,62	0,59	0,91
		0,65	0,63	
		0,83	0,76	
	0,89	0,91		

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Embora as plantas que realizam fotossíntese estejam, em sua maioria, expostas à combinação de fatores (como altas concentrações de oxigênio e luz) que levam à formação de radicais livres e outros agentes oxidantes fortes, as algas

raramente sofrem algum dano oxidativo grave *in vivo* (AHN *et al.*, 2004), podendo ser um indicio da presença de compostos antioxidante para esses organismos.

Entre os métodos colorimétricos utilizados para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais, destacam-se aqueles que relacionados à habilidade dos antioxidantes em neutralizar radicais como DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) ou ABTS [sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico)] (BORGES *et al.*, 2011). Entre os métodos biológicos existem aqueles que avaliam a capacidade do antioxidante na proteção a peroxidação lipídica e oxidação protéica (HOTTA *et al.*, 2001).

O teste de DPPH é um dos métodos indiretos para se determinar a atividade antioxidante mais antigo sendo sugerido originalmente em 1950 para se descobrir os doadores de hidrogênio em matérias naturais. Mais tarde foi quantificado para determinar o potencial antioxidante de compostos fenólicos isolados e alimentos tão bem como amostras biologicamente relevantes (ROGINSKY & LISSI, 2005). Uma característica desse método é que ele não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação (SILVA *et al.*, 1999). O DPPH pode reagir com compostos fenólicos, bem como com ácidos aromáticos contendo apenas um grupamento (SANTOS *et al.*, 2007). O método de DPPH é muito utilizado para se determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas como: compostos fenólicos (SOUSA *et al.*, 2007), fenilpropanóides, fenólicos totais, flavonóis (LEJA *et al.*, 2007), cumarinas (VOGEL *et al.*, 2005), quitosana com diferentes pesos moleculares (KIM & THOMAS, 2006), antocianinas, antocianidinas (LEJA *et al.*, 2007; DE LIMA *et al.*, 2007), carotenóides (AJILA *et al.*, 2007), rutina, kaempferol (SILVA *et al.*, 2005).

Para todas as amostras algais foram realizados os testes frente a ação antioxidante através da inibição radicalar com DPPH, onde pode-se observar resultado positivo para as algas *U. fasciata* e *U. linza* e *P. gymnospora*.

Para a alga verde *U. linza* estão presentes componentes com atividade antioxidante no extrato hexânico (Rf0,02) e no extrato metanólico (Rf0,16), conforme figura 26.

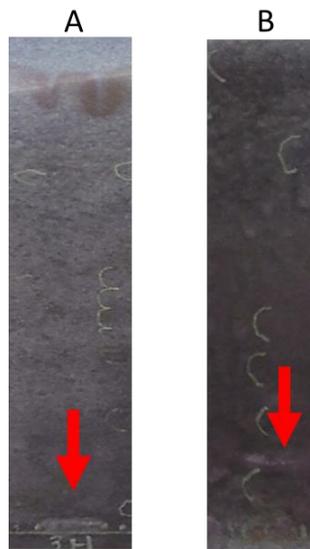


Figura 26. Atividade antioxidante do extrato hexânico (Painel A) e extrato metanólico (Painel B) da alga *U. linza*.

Para a *Ulva fasciata* o extrato aquoso apresentou resultado positivo para inibição radicalar com R_f 0,02, conforme figura 27.



Figura 27. Atividade antioxidante do extrato aquoso da alga verde *U. fasciata*.

Para a alga *P. gymnospora* observou-se componentes com atividade antioxidante no extrato hexânico (R_f 0,28) e metanólico (R_f 0,14) (figura 28).



Figura 28. Atividade antioxidante de componentes presentes nos extratos hexânico (Hex) e metanólico (Met) da alga *P. gymnospora*.

No estudo de Nagai e Yukimoto (2003) onde avaliaram o potencial antioxidante de quatro algas dentre elas a alga verde *U. pertusa* pelos métodos de avaliação da atividade antioxidante sobre a peroxidação lipídica do ácido linoleico, atividade neutralizadora do radical O_2 no sistema xantina/xantina-oxidase, atividade redutora do radical DPPH, nesse trabalho os autores concluíram que a alga *U. pertusa* apresenta atividade antioxidante para todos os métodos avaliados.

Já para a pesquisa de Yan et al. (1998) trabalhando com diversas espécies algais testaram os extratos metanólicos de duas espécies de *Ulva*, a *U. lactuca* e a *U. pertusa*. Os resultados obtidos com o método DPPH revelaram atividade de 8% para a *U. lactuca* e 15% para a *U. pertusa* frente ao radical formado. Os autores também encontraram atividade sequestradora de radicais, em menor proporção, nos outros extratos testados. No mesmo estudo, duas espécies de *Enteromorpha*, a *E. intestinalis* e a *E. prolifera*, foram testadas e os extratos metanólicos apresentaram atividade sequestradora de radicais de 15% e 7%, respectivamente. Atualmente o gênero *Enteromorpha* foi incorporado ao gênero *Ulva*.

Segundo o estudo de Raymundo et al. (2004) os extratos metanólicos algais foram capazes de sequestrar o peróxido de hidrogênio, mas o efeito foi bastante reduzido variando entre 1,26 e 20,01%. Os extratos mais efetivos foram aqueles das espécies de alga verde *Chaetomorpha anteninna* (1,26% a 20,01%) e *Enteromorpha*

intestinalis (1,18% a 13,16%) para os volumes testados (10 µL–400 µL). Elevada habilidade em sequestrar o peróxido de hidrogênio está relacionada à presença de antioxidantes, no extrato, capazes de reagir com radicais livres.

O potencial antioxidante através do método DPPH dos extratos aquosos e metanólicos de 10 espécies de macroalgas marinhas verde (Chlorophyta) e 25 espécies de macroalgas marinhas pardas (Phaeophyceae), foram avaliados no trabalho de Heo et al. (2005) onde puderam verificar a atividade antioxidante em todos os extratos sendo que os extratos metanólicos apresentaram maior concentração de antioxidante do que os extratos aquosos.

Em 2010 Chakraborty e Paulraj isolaram cinco sesquiterpenóides como constituintes majoritários da alga verde *Ulva fasciata*, esses compostos foram testados quanto à atividade antioxidante comparado com um antioxidante sintético Trolox. Nesse trabalho foi concluído que os compostos isolados da macroalga possuem maior atividade antioxidante que o antioxidante sintético.

O teste realizado com a *Padina gymnospora* apresentou atividade antioxidante para os extratos hexânico e metanólico e não apresentou no extrato aquoso, corroborando como estudo de Ahn et al. (2004) que investigaram a atividade de sequestro de radical livre pelo método do DPPH em extratos solúveis em água, obtidos pela hidrólise enzimática com proteases e carboidrases de algas pardas da espécie *Scytosiphon lomentaria*, onde não foram encontradas atividade antioxidante satisfatória nos extratos hidrolisados de algas marinhas e salientaram que apesar da vantagem da solubilidade em água, há a necessidade de maiores estudos para viabilizar o uso desses tipos de extratos como antioxidantes naturais.

As algas também são sempre submetidas a rápidas variações de intensidade de luz e concentrações de O₂ e CO₂ ao longo da coluna de água, combinação que origina radicais livres, bem como outros potentes oxidantes. Assim, a ausência de danos oxidativos e sua sobrevivência dependem da resposta eficiente ao estresse oxidativo. Por essa razão, tais organismos podem representar importante fonte de substâncias antioxidantes naturais tanto para as indústrias alimentícias como para as farmacêuticas (MATSUKAWA *et al.*, 1997).

5.5 ESPECTROSCOPIA RAMAN

A espectroscopia Raman baseia-se na descoberta do Físico indiano C.V. Raman em 1928, de que o comprimento de onda de uma pequena fração da radiação espalhada por certas moléculas difere daquela do feixe incidente e, além disso, que os deslocamentos em comprimento de onda dependem das vibrações moleculares das moléculas responsáveis pelo espalhamento. O espectro Raman, originado pelo espalhamento inelástico de uma luz monocromática de alta intensidade, adequa-se à identificação de compostos orgânicos, permitindo a identificação concomitante de diferentes compostos orgânicos (HOLLER, 2009).

Todas as amostras algais e seus diferentes extratos foram submetidas à espectroscopia Raman. Picos somente foram observados para as amostras correspondentes aos extratos aquosos das algas. Os outros extratos (hexânico, clorofórmico e metanólico) exibiram intensa fluorescência não sendo possível gerar os espectros Raman por uma absorbância muito alta do laser. Como as algas possuem grande quantidade de pigmentos essa dificuldade de obtenção dos espectros por ação da fluorescência é relatada em alguns estudos como o de Oliveira et al. (1998).

Espectroscopias Raman em células de algas sugerem a necessidade de utilizar níveis baixos de energia do laser do sistema operacional, ou seja, abaixo de 1mW ao longo de um *spot size* 1-2 μm , podendo muitas vezes não ser eficiente para gerar um espectro (KUBO et al., 2000), conforme ocorreu com os extratos hexânicos, clorofórmicos e metanólicos das algas estudadas, onde a baixa potência (0,5 mW) do laser incidente não foi suficiente para gerar um espectro limpo, a potência foi ajustada de acordo com a fluorescência gerada.

Espectros obtidos de algas a baixo nível de laser incidente geram pronunciadas linhas inclinadas indicando grande fluorescência, como tentativa de melhorar o espalhamento do sinal pode-se adotar uma densidade de potência mais elevada porém a fluorescência mostra uma forte dependência do tempo (HUANG, 2009), o que prejudica a leitura do espectro gerado. Os espectros das amostras analisadas no presente estudo apresentaram uma relação sinal/ruído baixa, dificultando a identificação dos sinais de interesse.

Células de algas contêm principalmente cinco tipos de biomoléculas: proteínas, hidratos de carbono, lipídeos, ácidos nucleicos, pigmentos (ALBERTS et al., 1998). Cada tipo de biomoléculas possui uma assinatura característica de espectro de Raman. A partir desse espectro Raman picos característicos de biomoléculas podem ser usados para identificação de componentes orgânicos de algas (PARAB, 2012).

O espectro gerado para o extrato aquoso da *U. fasciata* (Figura 29) apresentou um pico na região com frequência de $983,3\text{ cm}^{-1}$, essa região apresenta trecho C-C e compostos n-alcanos (VIEN-LIEN et al., 1991), proteínas e lipídeos (NOTHINGER et al., 2004). Enquanto o espectro obtido para os extratos aquosos da *U. linza* (Figura 30), *P. gymnospora* (Figura 31) e *J. adhaerens* (Figura 32) apresentaram uma relação sinal/ruído prejudicada não sendo possível identificar picos limpos.

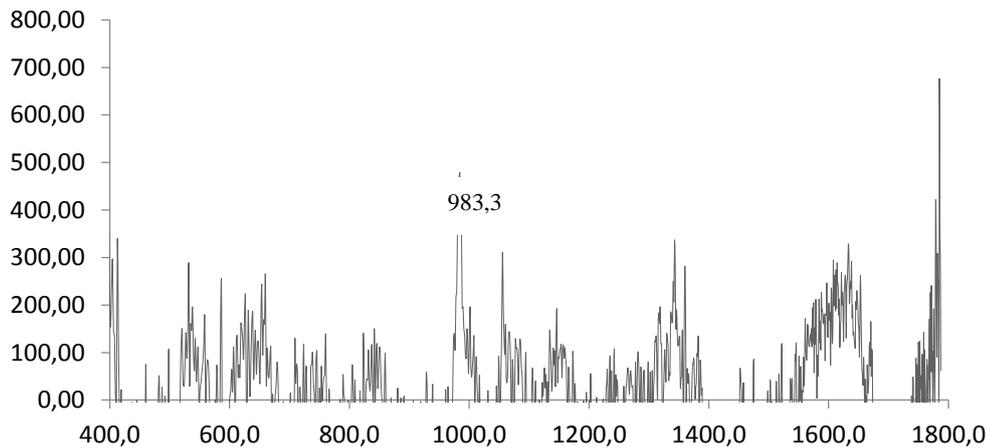


Figura 29. Espectro Raman do extrato aquoso da alga verde *Ulva fasciata*.

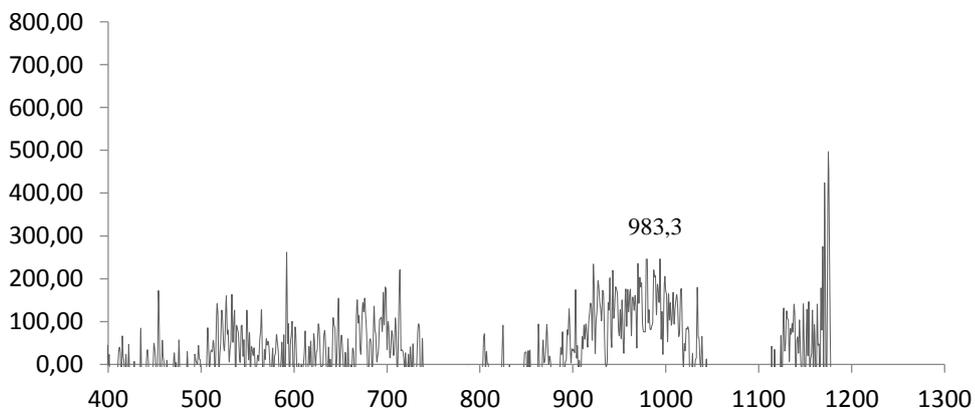


Figura 30. Espectro Raman do extrato aquoso da alga verde *Ulva linza*

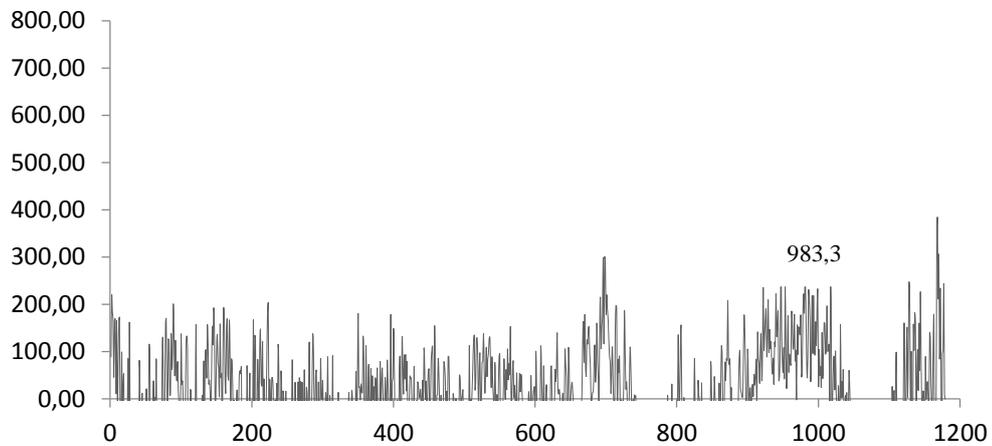


Figura 31. Espectro Raman do extrato aquoso da *Padina gymnospora*.

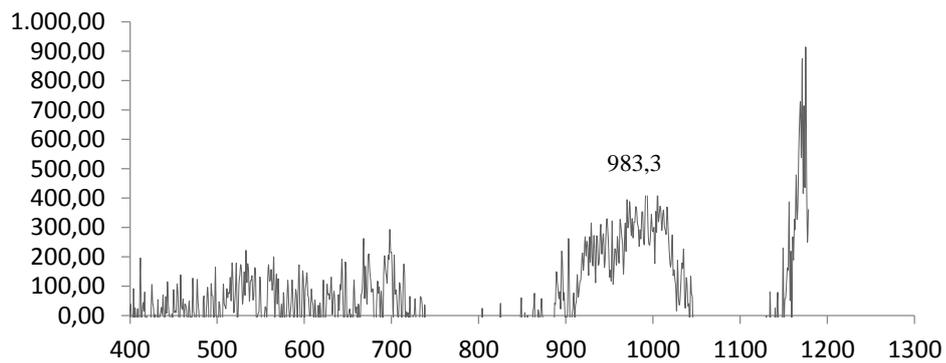


Figura 32. Espectro Raman do extrato aquoso da *Jania adhaerens*.

Recentemente, a técnica Raman tem sido aplicada a sistemas biológicos, tais como estudos da distribuição de biomoléculas em superfícies e células individuais de algas, como ainda é difícil obter os espectros por ação da fluorescência uma tentativa de melhorar espectroscopia Raman, é a utilização da técnica *Surface-enhanced Raman spectroscopy* (SERS), que consiste em uma técnica altamente seletiva que pode ser usada para obtenção de melhoramento do espalhamento do laser incidente, podendo ser utilizada em células de algas individuais para obtenção dos espectros. Em contraste com espectroscopia Raman normal, SERS utiliza a interação da luz com ouro coloidal ou partículas de prata que trabalham para melhorar a sensibilidade de medições de fluorescência (JOSEFSON, 2015).

Estudos publicados sugerem a utilização da espectroscopia Raman em algas para: determinação do grau de insaturação dos lipídeos presentes ao interior celular, acompanhar o processo de estresse em função da intensidade dos sinais em lipídeos como pigmentos, caracterização e quantificação tanto de lipídeos como de carotenoides, dentre outros compostos orgânicos (HUANG et al., 2009).

A técnica Raman provou ser uma ferramenta poderosa e versátil para caracterização e determinação da composição química de sistemas de materiais, tais como dispositivos semicondutores em nanoescala ou sistemas biológicos (RAMAN & KRISHNAN, 1928). Como ainda são poucos estudos brasileiros sobre o isolamento e a elucidação estrutural de compostos orgânicos de algas verdes, pardas e vermelhas bentônicas marinhas, sendo estudos desta natureza de fundamental importância para o descobrimento desses importantes compostos (TEIXEIRA et al., 2014).

Os espectros de Raman de biomoléculas individuais podem ser utilizados para determinar a estrutura molecular e as várias propriedades biológicas. Houve vários comentários de aplicações da espectroscopia Raman em bioanálise. Porém a bioanálise para compostos presentes em algas marinhas ainda precisa de mais dedicação (BAENA, 2004).

Dependendo da quantidade de pigmentos que a amostra algal contém, o espectro Raman pode ser prejudicado pela presença de ruídos. No estudo de Heraud et al. (2005) a maioria dos espectros obtidos apresentaram fundo pronunciado, o que é provavelmente ter sido causado por fluorescência dos pigmentos presentes em células de Chlorophyta da espécie *Dunaliella tertiolecta*. Uma vez que os fundos espectrais não contêm qualquer informação específica de componentes químicos, eles eram geralmente omitidos dos estudos prévios pela correção de linha de base utilizando diferentes procedimentos matemáticos.

Os espectros Raman já foram utilizados para identificar um tipo particular de espécies de algas em um grupo de diferentes tipos de algas ou em diferentes condições ambientais (WU et al., 1998). Esta técnica proporciona um método de alta resolução com alta precisão para a identificação e detecção de espécies de algas. Ele pode ser usado para detectar as espécies de algas a partir dos revestimentos de biomassa ou em proliferações de algas. Com equipamentos menores e portáteis, é possível detectar as espécies de algas em seu habitat natural (HERAUD et al., 2005).

A espectroscopia Raman está emergindo rapidamente como uma importante ferramenta de caracterização para sistemas biológicos. Com este ponto de vista, alguns trabalhos estão sendo realizados e grandes avanços estão sendo feitos em relação à espectroscopia Raman de algas, onde o foco é o melhoramento do espalhamento para obtenção de espectros limpos, ou então para a diminuição da fluorescência das amostras algais.

A identificação de algas utilizando espectroscopia de Raman baseia-se na identificação dos componentes de suas biomoléculas, onde o espectro Raman de uma célula de alga será a soma dos espectros de Raman das suas biomoléculas constituintes (HUANG et al., 2010). Os recentes desenvolvimentos na instrumentação e técnicas espectroscópicas tais como SERS continuarão a ajudar na identificação de algas.

5.5.1 TLC- RAMAN

Para melhorar a resolução dos picos dos espectros Raman das amostras foi empregado no presente estudo a técnica de *thin-layer chromatography* TLC-Raman, que consiste na obtenção do espectro com o espalhamento sobre as manchas geradas através da placa de CCD. O feixe de luz é localizado centralmente as manchas e os espectros são gerados (ZHU et al., 2014).

Para a padronização da metodologia em algas, utilizou-se no presente estudo a macroalga marinha *Ulva lactuca* (Chlorophyta) coletada na Ilha das Palmas, Santos-SP (24° 0'28.92"S 46°19'29.12"O), foi identificada pelo grupo de taxonomistas da Universidade Santa Cecília e passou pelo mesmo processo extrativo conforme descrito no item 4.4. Posteriormente foi realizada a CCD com os diferentes extratos, conforme o item 4.5. A leitura da placa foi realizada sob a luz UV com comprimento de onda 254nm e 365nm, e as bandas foram devidamente marcadas (figura 33).

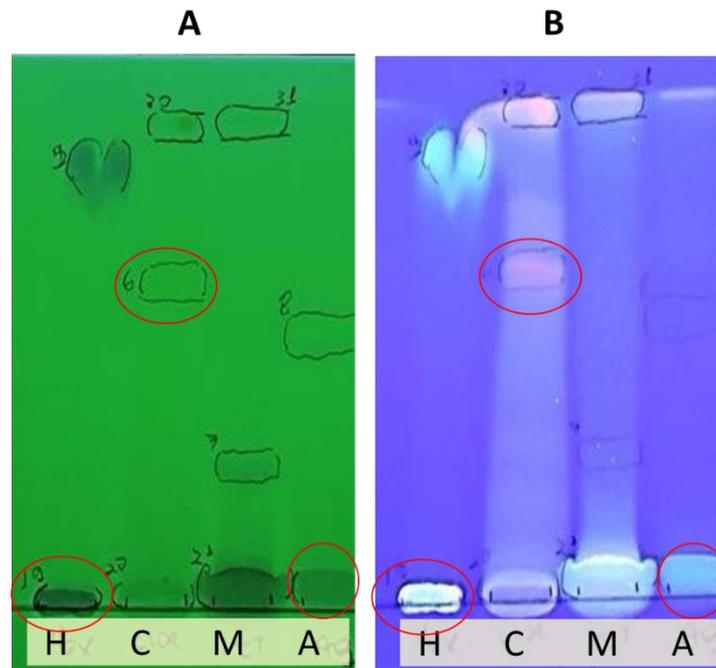


Figura 33. CCD da alga *U. lactuca* utilizada na técnica TLC-Raman. Painel A, placa sob luz UV 254 nm. Painel B, placa sob luz 365 nm. H, extrato hexânico; C, extrato clorofórmico; M, extrato metanólico; A, extrato aquoso. Em destaque as bandas cujos espectros Raman obtidos estão discutidos no texto.

Fonte: Arquivo pessoal

Materiais presentes na placa de CCD podem afetar os resultados (ISTVÁN et al., 2003). Quando se examina o espectro de Raman bandas nas placas de CCD, a fase estacionária em branco deve primeira ser determinada. Portanto primeiramente foi realizado o espectro da sílica que recobre a placa e posteriormente o espectro gerado pela mancha obtida sob a placa de TLC. Picos limpos foram gerados através da análise realizada na banda presente no extrato hexânico (Figura 34), correspondem a região com frequência de $783,6 \text{ cm}^{-1}$, correspondendo ao grupo isopropílico (LIEN-VIEN et al., 1991), e outro na região com frequência $1245,8 \text{ cm}^{-1}$, que indica amida III (SHETTY et al., 2006). Na espectroscopia de ATR-IR y-terpineno pode ser identificado por CH e CH₂ alterando entre as vibrações de 781 e 947 cm^{-1} (SCHULZ & BARANSKA, 2006), podendo, portanto, estar presente na *Ulva lactuca*, conforme mostra o pico gerado na região de $783,6 \text{ cm}^{-1}$.

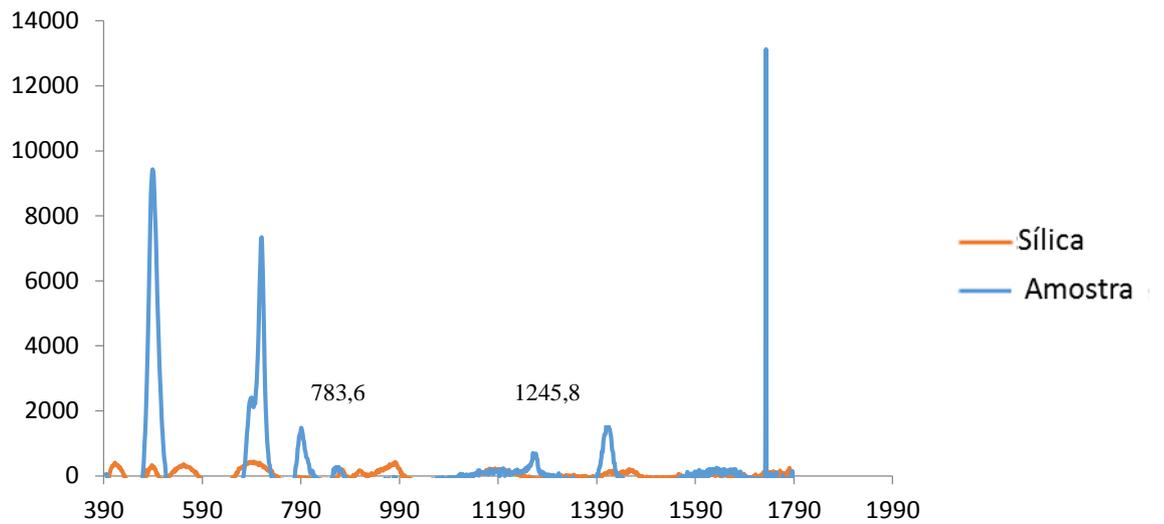


Figura 34. Espectro Raman da *Ulva lactuca*, extrato hexânico (amostra). Sílica, fase estacionária em branco.

No extrato aquoso observou-se um pico na região com frequência $687,5\text{cm}^{-1}$ e no extrato clorofórmico um pico na região $684,6\text{cm}^{-1}$, que indica compostos dialquil dissulfetos (figura 35) (LIEN-VIEN et al., 1991). Para o extrato clorofórmico ainda foi gerado um pico na região com frequência $535,1\text{cm}^{-1}$, apresentando composto de éster colesterol (figura 36) (KRAFFT et al., 2005).

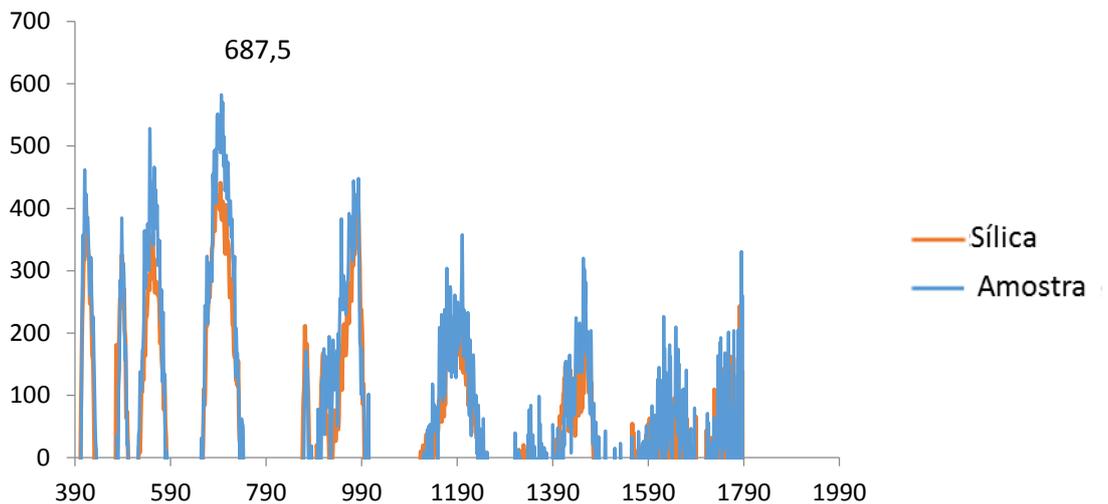


Figura 35. Espectro Raman da *Ulva lactuca*, extrato aquoso (amostra). Sílica, fase estacionária em branco.

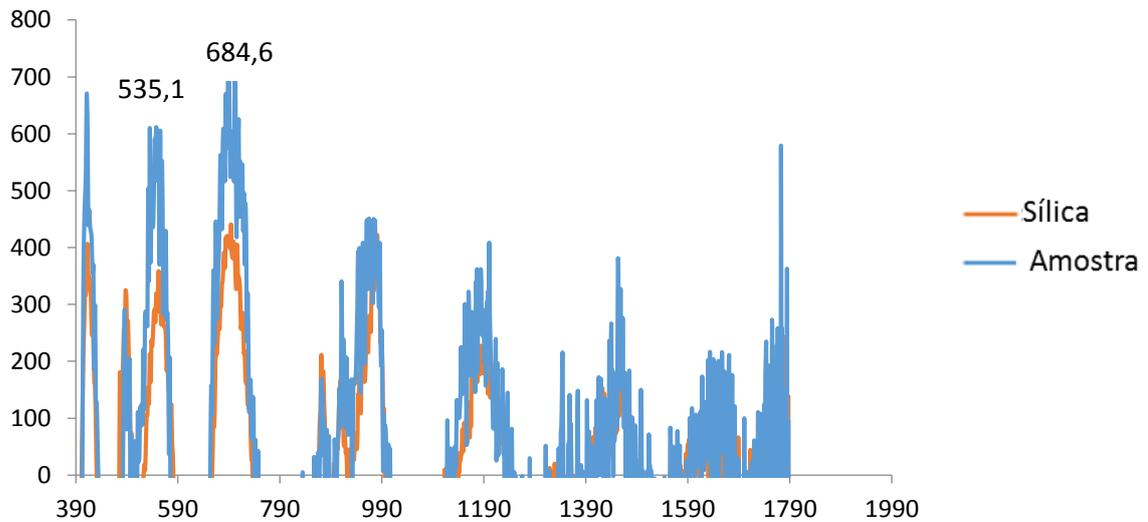


Figura 36. Espectro Raman da *Ulva lactuca*, extrato clorofórmico (amostra). Sílica, fase estacionária em branco.

Os resultados obtidos no estudo Earnshaw & Pollard (2006) indicam que compostos dialquil dissulfetos são promotores de ligações entre aminoácidos formando proteínas, que é um componente presente nas macroalgas, assim como os esteróis que são lipídeos que podem auxiliar na formação da membrana algal, já as aminas atuam na defesa contra predadores, podendo ser um indicio para a presença de compostos com atividade antioxidante (SOUTO, 2006).

Merlin et al. (1985) têm investigado antocianinas usando espectroscopia de Ressonância Raman (RR) e discutido uma forte influência de glicosilação no composto benzopyrylium, que faz parte da molécula de flavonóides (especificamente anéis A e C), e desde então forneceu algumas características espectrais referente a este fenômeno. A região espectral entre 500 e 900 cm^{-1} depende fortemente o padrão de glicosilação. Quando a posição do C5 é glicosilada as perturbações significativas geram características espectrais entre as regiões 640 e 750 cm^{-1} visíveis.

O foco na identificação de algas e seus compostos orgânicos usando espectroscopia Raman têm sido relatados na literatura (PARAB, 2012).

A técnica de identificação de algas utiliza os picos característicos em espectros de Raman para identificar biomoléculas únicas nas células algais que estão correlacionadas com as espécies de algas, em contrapartida a grande quantidade de

pigmento gera forte fluorescência sobre o espalhamento do IR, onde novos estudos são de extrema relevância para o aprimoramento dos resultados com algas.

O trabalho de Jurasekova et al. (2007) investigou os espectros Raman obtidos por um grupo de flavonoides (quercetina, kaempferol, luteolina e apigenina), onde os espectros indicaram que a principal diferença entre os flavonoides são os picos encontrados na região $1400-1000\text{cm}^{-1}$, e todos os espectros gerados no estudo apresentam pico na região de 1246cm^{-1} , assim como o pico gerado pela alga verde *U. lactuca*.

5.6 RELAÇÃO METABÓLITOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A busca por novas moléculas com potencial antioxidante tem se intensificado nas últimas décadas quando se descobriu uma relação direta entre o estresse oxidativo com a etiologia de diversas doenças como aterosclerose e alguns tipos de câncer. Dessa forma, os antioxidantes podem se tornar muito importantes na prevenção e/ou tratamento destas patologias.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram a presença de metabólitos secundários com potencial antioxidante (tabela 6) e resultados positivos para o ensaio atividade antioxidante (DPPH). Os dados gerados a partir deste estudo abrem perspectivas para a utilização dos extratos obtidos a partir das algas *U. fasciata*, *U. linza* e *P. gymnospora* em estudos que visam à descoberta de novos fármacos com potencial antioxidante.

Tabela 6. Metabólitos com atividade antioxidante detectados nas algas estudadas

METABÓLITO	<i>U. fasciata</i>	<i>U. linza</i>	<i>P. gymnospora</i>
FLAVONÓIDE	+	+	+
TERPENÓIDE	+	+	+
TANINOS	+	+	+

6. CONCLUSÕES

1. O método extrativo mostrou ser eficaz para a obtenção de compostos com atividade antioxidante, sendo a *P. gymnospora* a alga que apresentou melhor rendimento extrativo.

2. A partir dos resultados de CCD, pode-se observar um maior número de componentes químicos de polaridade intermediária, presentes nos extratos clorofórmicos e metanólicos das algas estudadas.

3. Os resultados obtidos no presente estudo desmontaram a presença de metabólitos secundários com potencial antioxidante com predominância de flavonóides do tipo chalconas em todas as algas estudadas, constituindo um importante dado para o auxílio do isolamento de novas substâncias com atividade farmacológica.

4. A alga *P. gymnospora* apresentou 02 compostos antioxidantes presentes nos extratos hexânico e metanólico. A alga *U. fasciata* apresentou 01 composto antioxidante no extrato aquoso e a *U. linza* 02 compostos antioxidantes nos extratos hexânico e metanólico.

5. As amostras exibiram intensa fluorescência nas análises por Espectroscopia Raman impedindo a obtenção de espectros com boa resolução, porém a técnica é importante para a caracterização dos compostos orgânicos, devendo ser mais explorada nos estudos com algas.

Este trabalho apresenta subsídios para incentivar a prospecção de novas moléculas que possam ser isoladas e caracterizadas a partir de macroalgas marinhas, com potencial terapêutico de grande utilidade na área da farmacologia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, C. B.; KANG, D. S.; SHIN, T. S. et al. **Free radical scavenging activity of enzymatic extracts from a Brown seaweed *Scytosiphon lomentaria* by electron spin resonance spectrometry.** Food Research Int 37: 253-258. 2004.
- ÁJILA, C.M.; NAIDU, K. A.; BHAT, S. G. et al. **Bioactive compounds and antioxidant potential of mango peel extract.** Food Chemistry. 105, 982-988. 2007.
- ALBERTS, B. **Essential cell biology.** Garland Publishing Inc. New York. 1998.
- ALENCAR, D.B. **Prospecção Química da macroalga marinha verde *Ulva fasciata* Delile.** Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2010. 68 p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, 2010.
- ALENCAR, D. B. **Extração, purificação e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Lobophora variegata*.** 30 f. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca)–Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.
- ALI, M. Y. S., RAVIKUMAR, S., BEULA, J. M. **Mosquito larvicidal activity of seaweeds extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*.** Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 3(3), 196-201. 2013.
- AMICO, V., ORIENTE, G., PIATTELLI, M. et al. **Caulerpenyne, an unusual sesquiterpenoid from the green alga *Caulerpa prolifera*.** Tetrahedron Letters, 19(38), 3593-3596. 1978.
- AWAD, N.E. **Biologically active steroid from the green alga *Ulva lactuca*.** Phytotherapy Research, Chchester, v. 14, n.08, p.641-643. 2000.
- BAENA, J. R.; LENDL, B. **Raman spectroscopy in chemical bioanalysis.** Curr Opin Chem Biol. 8:534-539. 2004.

- BHATTACHARYA, D.; MEDLIN, L. **Algal phylogeny and the origin of land plants.** Plant Physiology, v. 116, n. 1, p. 9-15, 1998.
- BEZERRA-NETO, J. T. B. **Extração, fracionamento, purificação e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha verde *Caulerpa sertularioides* (Caulerpales, Caulerpáceae).** 29 f. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca)–Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2005.
- BICUDO, C. E. M.; BICUDO, R. M. T. **Algas de águas continentais brasileiras: chave ilustrada para identificação de gêneros.** Fundação para o Desenvolvimento do Ensino de Ciências, São Paulo. 1970 p. 225
- BOEUF, G. **Marine biodiversity characteristics.** Comptes Rendus Biologies, v. 334, n.4 e 5, p. 435-440. 2011.
- BORGES, L. L. et al. **Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais.** Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer de Goiânia, v. 7, p. 12, 2011.
- BOYLE, T. P. **The effect of environmental contaminants on aquatic algae.** In: Shubert LE (ed) Algae as ecological indicators. Academic Press, New York, pp 237–256. 2004.
- BLUNDEN, G.& GORDON, S. M. **Betaines and their sulphonio analogues in marine algae.** Progress in phycological research, 4, 39-80. 1986.
- BLUNT, J. W. **Marine natural products.** Natural product reports, v.26 n.2 p. 170. 2009.
- BLUNT, J. W. **Marine natural products.** Natural product reports, v. 28, n. 2, p. 196, 2011.
- BRUNETON, J. **Farmacognosia, Fitoquímica. Plantas Medicinales.** Ed.I ACRIBIA S.A/ Zaragoza, Espanha, 2. ed, 1099 pp., 2001.
- BHATTACHARYA, D., MEDLIN, L. **Algal phylogeny and the origin of land plants.** Plant Physiology, 116(1), 9-15. 1998.

- CARVALHO, L. R.; ROQUE, N. F. **Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas**. Química Nova, v. 23 n. 6, p. 757-764, 2000.
- CHAKRABORTYy, K.; PAULRAJ, R. **Sesquiterpenoids with free-radical-scavenging properties from marine macroalga *Ulva fasciata* Delile**. FoodChemistry, Oxford, v.122, n.1, p.31-41. 2010.
- CHAPIN, R. E.; SLOANE, R. A.; HASEMAN, J. K.**The relationships among reproductive endpoints in Swiss mice, using the reproductive assessment by continuous breeding database**.Toxicological Sciences, v. 38, n. 2, p. 129-142, 1997.
- CHANDRASEKAR, P. H.; SOBEL, J. D. **Micafungin: a new echinocandin**.Clinical infectious diseases, v. 42, n. 8, p. 1171-1178, 2006.
- CAVALLI, R. O.; FERREIRA, J. F. **O futuro da pesca da aquicultura marinha do Brasil: a maricultura**. v. 62, São Paulo. p. 38-39. 2010.
- COFFEY, C. E.; CUMMINGS, J. L. **Textbook of Geriatric Neuropsychiatry**. 3ªedição. American Psychiatric Publishing, p. 17-70, 2011.
- COLLINS, C. H. **Principios básicos da Cromatografia**. Fundamentos da Cromatografia. São Paulo. Unicamp, cap.1, p.17-45. 2007.
- CORREIA, R. J. et al. **Reviewing the integration of patient data: how systems are evolving in practice to meet patient needs**. BMC medical informatics and decision making, v. 7, n. 1, p. 14, 2007.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. v. II. 1100p. 2002.
- DAVIES, K. J. **Oxidative stress: the paradox of aerobic life**. Biochem Soc Symp, v. 61, p. 1-31, 1995.
- DHARGALKAR, V. K.,& VERLECAR, X. N. **Southern Ocean seaweeds: A resource for exploration in food and drugs**. Aquaculture, 287(3), 229-242. 2009.

- DAVYT, D. **New sesquiterpene derivatives from the red alga *Laurencia scoparia*. Isolation, structure determination, and anthelmintic activity.** Journal of Natural Products, p. 1552- 1555, 2001.
- DECOSTERD, L. A., PARSONS, I. C., GUSTAFSON, K. R. et al. **HIV inhibitory natural products. 11. Structure, absolute stereochemistry, and synthesis of conocurvone, a potent, novel HIV-inhibitory naphthoquinone trimer from a *Conospermum sp.*** Journal of the American Chemical Society, 115(15), 6673-6679. 1993.
- DE LIMA, A. A. **Eletrochemical and antioxidant properties of anthocyanins and anthocyanidins.** Croatica Chemica Acta. 80, 29-34. 2007.
- DE SILVA, E. D; SCHEUER, P. J. **Manoalide, an antibiotic sesterterpenoid from the marine sponge *Luffariella variabilis* (Polejaeff).** Tetrahedron Letters, v. 21, n. 17, p. 1611-1614, 1980.
- DERNER, R B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados.** 158p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- DIKAKOV, S. **Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases.** Free Radic Biol Med. v. 51, n. 7, p. 1289-1301, 2011.
- DHILLON, A. S.; et al. **MAP kinase signalling pathways in cancer.** Oncogene v. 26, p. 3279–3290, 2007.
- DOS SANTOS, A.O., VEIGA-SANTOS, P., UEDA-NAKAMURA, T., et al. **Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*.** Mar. Drugs, v. 8, p. 2733-2743, 2010.
- DUVE, C. **The birth of complex cells.** Sci. Amer., v. 274, p. 50-57, 1996

- DUFRESNE, C. J., & FARNWORTH, E. R. **A review of latest research findings on the health promotion properties of tea.** The Journal of nutritional biochemistry, 12(7), 404-421. 2001.
- DZEHA, T., Hall, M., & BURGESS, G. **Chemical and molecular approaches towards the biosynthesis of the modular cyclohexadepsipeptide anticancer agent homodolastatin 16.** In Febs Journal (Vol. 280, pp. 504-504), NJ USA: Willey-Blackwell. 2013.
- ERICKSON, K. L. **Constituents os *Laurencia*.** In Scheur, P. J. (ed) Marine Natural Products: chemical and biological perpectives, New York: Academic Press, p. 131-257. 1983.
- EVANS, P.; KARRAS, G. **Convergence revisited.** Journal of monetary economics, v. 37, n. 2, p. 249-265, 1996.
- FAULKNER, D. J. **Marine natural products.** Natural Product Reports, v. 13, p. 13-75, 1996.
- FAULKNER, D. J. **Marine natural products.** Natural Products Reports, v. 17, p. 7-55, 2000.
- FAULKNER, D. J. **Marine natural products.** Natural Products Reports, v. 19, p. 50-58, 2002.
- FELICIO, R.; ALBUQUERQUE, S.; YOUNG, M. C. M.; YOKOYA, N. S.; DEBONSI, H. M. **Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales).** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Vol. 52, p.763-769. 2010.
- FELIX, M.R. **Análise do perfil metabólico e de parâmetros fisiológicos e ultraestruturais de *Pterocliadiella capillacea* (Rhodophyta, gelidiales) sob condições de estresse por cádmio e gradientes de salinidade.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

- FENICAL, W.; NORRIS, J. N. **Chemotaxonomy in marine algae: Chemical separation of some *Laurencia* species (RHODOPHYTA) from the Gulf of California.** Journal of Phycology, v. 11, n 1, p. 104-108, 1975.
- FERREIRA, F.; et al. **Inhibition of the passive diffusion of cholic acid by *Ilex paraguariensis* St. Hil.Saponins.** Phytotherapy Research, v.11, n.1, p.79-81, 1997.
- FLEURY, B. G.; et al. **Os esteróides das algas pardas marinhas (Classe Phaeophyta).** Quím.Nova, v. 19, n.1, p. 19-37, 1996.
- FREARSON, J. A.; COLLIE, I. T. **HTS and hit finding in academia – from chemical genomics to drug discovery.** Drug Discovery Today, v.14, n.23-24, p.1150-8. 2009.
- FUCIKOVA, K.; LEWIS, L. A. **Putting incertae sedis taxa in their place: a proposal for ten new families and three new genera in Sphaeropleales (Chlorophyceae, Chlorophyta).** J. Phycol, v. 50, p. 14-25, 2011.
- FUJIMOTO, K.; KANEDA, T. **Screening test for antioxigenic compounds from marine algae and fraction from *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifida*.** Bull Japan Soc Sci Fisheries, v. 46, p. 1125-1130, 1980.
- FUJITA, R.M., WHEELER, P.A. & EDWARDS, R.L. **Assessment of macroalgal nitrogen limitation in a seasonal upwelling region.** Marine Ecology Progress Series 53:293-303. 1989.
- GAMBETA, R. M. **Perfil Fitoquímico de Diferentes Extratos de *Ilex paraguariensis* St. Hilaire.** Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. URI – Campus Erechim, departamento de ciências da saúde, curso de Farmácia. 2008.
- GUIMARÃES, L. L.; TOMA, W.; SILVEIRA, L. et al. **Técnica de Espectroscopia Raman Ressonante em Superfície (SERS) com colóide de Prata Aplicada à Acetaminofeno e Dipirona Visando controle de qualidade: estudo preliminar.** 3º Encontro de Pós-Graduação da Universidade Santa Cecília. 2014.

- GUIMARÃES, S.M.P.B. **A revised checklist of benthic marine Rhodophyta from the State of Espírito Santo, Brazil.** Boletim do Instituto de Botânica, v. 17, p. 143-194, 2006.
- GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. **Bioactive natural products from endophytes: a review.** Applied Biochemistry and Microbiology, 44: 136-142. 2008.
- GALGANI, I., et al. **Effect of caulerpenyne, a toxin extracted from *Caulerpa taxifolia* on mechanisms regulating intracellular pH in sea urchin eggs and sea bream hepatocytes.** J. Biochem. Toxicol. n. 11, p. 243-250. 1996.
- GARCIA, D. G. et al. **Inhibition of mammal Na, K-ATPase by diterpenes extracted from the Brazilian brown alga *Dictyota cervicornis*.** Phytother Res, v. 23, p. 943-947, 2009.
- GUPTA, S.; ABU-GHANNAM, N. **Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods.** Innovative Food Science and Emerging Technologies, v. 12, n. 4, p.600–609, 2011.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 10 Setembro 2015. 2015.
- GUVEN, K. C.; PERCOT, A.; SEZIK, E. **Alkaloids in marine algae.** Marine drugs, v. 8, n. 2, p. 269-284, 2010.
- GUVEN, K. C.; BORA, A.; SUNAM, G. **Hordenine from the alga *Phyllophora nervosa*.** Phytochemistry, v. 9, n. 8, p. 1893, 1970.
- GUVEN, K. C.; BORA, A.; SUNAM, G. **Alkaloid content of marine algae. I. Hordenine from *Phyllophora nervosa*.** Eczacılık Bul, v. 11, p. 177-184, 1969.
- HAINES, K.C. & WHEELER, P.A. **Ammonium and nitrate uptake by the marine macrophytes *Hyonea musciformis* (rhodophyta) and *Macrocystis pyrifera* (phaeophyta).** Journal of Phycology 14:319-324. 1978.

- HARMAN, D. **Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.** J. Gerontol, v. 11, p. 298-300. 1956
- HANSON, J.R. **Natural products: The secondary metabolites.** Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 154p. 2003.
- HARBONE, J. B. **Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis.** Springer Science & Business Media, 1998.
- HARPER, M.K.; BUGNI, T.S.; COPP, B.R. et al. **Introduction to the chemical ecology of marine natural products.** Pp. 3-69. In: McClintock, J. B. & Baker, B. J. (eds.). Marine chemical ecology. CRC Press. 610p. 2001.
- HARTMANN, E. **Outline for a theory on the nature and functions of dreaming.** Dreaming, v. 6, n. 2, p. 147, 1996.
- HARTMAN, E. **The functions of sleep.** Yale University Press, 1973.
- Hay, M. E.; FENICAL, W. **Marine plant-herbivore interactions. The ecology of chemical defense.** Oceanography v. 19, p 111-145, 1997.
- HENZE, M. **Über den Kupfergehalt der Cephalopoden-Leber.** Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem, v. 33, p. 417-425, 1904.
- HEO, S., CHA, S., LEE, K. et al. **Antioxidant activities of chlorophyta and phaeophyta from Jeju Island.** Algae-Inchon-,20(3), 251. 2005.
- HERAUD, P. et al. **Effects of processing of Raman spectra on in vivo classification of nutrient status of microalgal cells.** J Chemom 20:193-197. 2005.
- HOLDT, S. L.; Kraan, S. **Bioactive compounds in seaweed functional food applications and legislation.** Journal of Applied Phycology, v. 23, n. 3, p. 543-597, 2011.
- HOLLER, F.J., et al. **Princípios de análise instrumental** 6a.ed. Porto Alegre: Bookman. 2009.

- HOSAKAWA, M., BHASKAR, N., SASHIMA, T. et al. **Fucoxanthin as a bioactive and nutritionally beneficial marine carotenoid: A review.** *Carotenoid Science*, v. 10, n. 1, p. 15–28, 2006.
- HORTA, P.A. **Macroalgas do infralitoral do sul e sudeste do Brasil: taxonomia e biogeografia.** 301 p. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- HOTTA, H.; SAKAMOTO, H.; NAGANO, S. et al. **Unusually large numbers of electrons for the oxidation of polyphenolic antioxidants.** *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 2001.
- HUANG, R.; HAN, S. U. X. **Detection of tobacco-related biomarkers in urine samples by surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with thin-layer chromatography.** *Anal Bioanal Chem* 405: 6815–6822. 2013.
- HUANG, Z. et al. **Integrated Raman spectroscopy and trimodal wide-field imaging techniques for real-time in vivo tissue Raman measurements at endoscopy.** *Optics letters*, 34(6), 758-760. 2009.
- HUANG, Y. Y. et al. **Micro-Raman spectroscopy of algae: composition analysis and fluorescence background behavior.** *Biotechnol Bioeng* 105: 889-898. 2010.
- HUNG, D. T.; JAMISON, T. F.; SCHRIEBER, S. L.; **Understanding and controlling the cell cycle with natural products.** *Chemistry & Biology*, v. 3, n. 8, p. 623-639.1996.
- HUMPHREY, A.J. et al. **Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet.** Oxford: Blackwell Publishing, chapter 3, p.47-101. 2006.
- IKEKAWA, N.; TSUDA, K.; MORISAKI, N. **Saringosterol-A new sterol from brown algae.** *Chemistry & Industry*, n. 27, p. 1179-&, 1966.
- ISTVÀN, K.; KERESZTURY, G. A. **Normal Raman and surface enhanced Raman spectroscopic experiments with thin layer chromatography spots of**

essential aminoacids using different laser excitation sources. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 59:1709–1723. 2003.

ITOGAWA et al. **Simulation apparatus and method for NC machining.** U.S. Patent n. 7,979,254, 12 jul. 2001.

KAJIWARA, T. et al. **Dictyopterenes from three Japanese brown algae.** *Phytochemistry*, v. 30, n. 6, p. 1805-1807, 1991.

KELECOM, A. **Marine natural products in Brazil, Par 1, isolation and structure determination,** *Ciência e Cultura, Journal of Brazilian Association for the Advancement of Science*, v. 49, n5/6, p. 321-330, 1997.

KELECOM, A.; TEIXEIRA, V. L. **Diterpenes of marine brown algae of the Family Dictyotaceae: their possible role as defence compound and their use in chemotaxonomy.** *Sci Tot. Environ*, v. 58, n. 1-2, p. 109-115, 1986.

KNEIFEL, H. et al. **Analysis of amines in algae by highperformance liquid chromatography.** *Journal of Phycology*, v. 13, p. 36-36. Suplemento. 1977.

KIM, K. W.; THOMAS, R. L. **Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weight.** *Food Chemistry*. 2006.

KINGSTON, D.G.I. **Modern Natural Products Drug Discovery and its Relevance to Biodiversity Conservation.** *Journal of Natural Products*, v. 74, n. 3, p. 496-511. 2011.

KNIGHTS, B. A. **Sterols in *Ascophyllum nodosum*.** *Phytochemistry*, 9(4), 903-905. 1970.

KOIVIKKO, R.; et al. **High-performance liquid chromatographic analysis of phlorotannins from the brown alga *Fucus vesiculosus*.** *Phytochemistry Analysis*, v. 18, n. 4, p. 326-332, 2007.

KOTZE, M.; ELOFF, J. N.; HOUGHTON, P. J. **Extraction of antibacterial compounds from *Combretum microphyllum* (Combretaceae).** *South African Journal of Botany*, v. 68, n. 1, p. 62-67, 2002.

- KRAFFT, C., NEUDERT, L., SIMAT, T. et al. **Near infrared Raman spectra of human brain lipids**. *Spectrochimica Acta, Part A*, 61: 1529– 1535. 2005.
- KUBO, Y., IKEDA, T., YANG, S. Y. et al. **Orientation of carotenoid molecules in the eyespot of alga: in situ polarized resonance Raman spectroscopy**. *Applied Spectroscopy*, 54(8), 1114-1119. 2000.
- KUTCHAN, T. M. **Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism**. *Plant Physiology* v. 125, p. 58–60, 2001.
- LAHAYE, M.; ROBIC, A. **Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds**. *Biomacromolecules*, v. 8, n. 6, p. 1765-1774, 2007.
- LEE, R. E. **Phycology**. Cambridge University Press. 2008.
- LEJA, M.; MARECZEK, A.; WYZGOLIK, G. et al. **Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species**. *Food Chemistry*. 100, 237-240. 2007.
- LEWIS, L. A.; MCCOURT, R. M. **Green algae and the origin of land plants**. *Am J Bot* v. 91, p. 1535-1556. 2004.
- LI, D.; QU, L.; ZHAI, W. et al. **Facile on-site detection of substituted aromatic pollutants in water using thin layer chromatography combined with surface-enhanced Raman spectroscopy**. *Environ Sci Technol* 45:4046–4052. 2011
- LIMA, P. C. W. C. **Efeito dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Spatoglossum shroederi* sobre o aumento da resistência do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* submetido a situações de estresse**. 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2007.
- LIN-VIEN, D.; Colthup, N.B.; Fateley, W.B.; and Grasselli, J.B. **The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules**, Academic Press: Boston, 1991.

- LOPES, J. L. C. Cromatografia em camada delgada. Fundamentos da Cromatografia. São Paulo, cap.3, p.67-86. 2007.
- LUCOTTI, A.; TOMMASIN, M.; CASELLA, M. et al. **TLC-surface enhanced Raman scattering of apomorphine in human plasma.** Vib Spectrosc 62:286–291. 2012.
- MACEDO, N. R. P. V. **Caulerpin as a potential antiviral drug against herpes simplex virus type 1.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 22, n. 4, p. 861-867, 2012.
- MACHADO, F. L. S. **Antileishmanial sesquiterpenes from the brazilian red alga Laurencia dendroidea.** Planta Med. v. 77, p. 733-735, 2011.
- MANN, J. **Metabolites derived from mevalonate: isoprenoids.** In. **Secondary metabolites.** 2 ed. Oxford: Oxford Science Publications, charpter 3, p.94-172. 2005.
- MARTIN L. J. **Biology of mitochondria in neurodegenerative diseases.**Prog Mol Biol Transl Sci. v. 107, p. 355-415, 2012.
- MASCHEK, J. A.; BAKER, B. J. **The chemistry of algal secondary metabolism.** In Algal chemical ecology (pp. 1-24). Springer Berlin Heidelberg. 2008.
- MASOKO, P.; PICARD, J.; ELOFF, J. N. **The antifungal activity of twenty-four southern African Combretum species (Combretaceae).** South African Journal of Botany, v. 73, n. 2, p. 173-183, 2007.
- MATSUKAWA, R.; et al. **Acomparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds.**J. Appl. Phycol., v.9, p.29-35, 1997.
- MAURICIO, A. **As algas na nossa alimentação.** Ciências da natureza. P. 1-10, 2011.
- MCCLINTOCK, J. B.; BAKER, B. J. **Marine Chemical Ecology.** CRC Press: New York, 2001.

- MELO, M. R. S. **Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea***. Carbohydrate Polymers, v. 49, n. 4, p. 491-498, 2002.
- MENÉNDEZ, M.; HERRERA, J. & COMÍN, F.A. **Effect of nitrogen and phosphorus supply on growth, chlorophyll content and tissue composition of the macroalga *Chaetomorpha linum* (O. F. Müll.) Kütz in a Mediterranean coastal lagoon**. Scientia Marina 4:355-364. 2002.
- MERCIER, L. et al. **The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant defense**. New Phytologist, v. 149, p. 43-51, 2001.
- MILARDOVIC, S. et al. **Use of DPPH·| DPPH Redox Couple for Biamperometric Determination of Antioxidant Activity**. Electroanalysis, v. 17, n. 20, p. 1847-1853, 2005.
- MOURE, A. et al. **Natural antioxidants from residual sources**. Food Chemistry, v. 72, n. 2, p. 145-171, 2001.
- MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, U. **Raman Spectroscopy of Biological Tissues**. Applied Spectroscopy Reviews, 42: 5, 493 — 541. 2007.
- MOZZACHIODI, R. et al. **Caulerpenyne, a toxin from the seaweed *Caulerpa taxifolia*, depresses afterhyperpolarization in invertebrate neurons**. Neuroscience, v. 107, n. 3, p. 519-526, 2001.
- NAGAI, T.; YUKIMOTO, T. **Preparation and functional properties of beverages made from sea algae**. Food chemistry, 81(3), 327-332. 2003.
- NALDI, M. & WHEELER, P.A. **N .measurements of ammonium and nitrate uptake by *Ulva fenestrata* (chlorophyta) and *Gracilaria pacifica* (rhodophyta): comparison of net nutrient disappearance, release of ammonium and nitrate, and 15 n accumulation in algal tissue**. Journal of Phycology 38:135–144. 2002.
- NAPOLI, D. S. **Architects of adjustment: The history of the psychological profession in the United State**. Kennikat Press. 1981.

- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. **The influence of natural products upon drug discovery**. Nat. Prod. Rep. v. 17, p. 215, 2001.
- O'DOHERTY, J. V., et al. **The effects of lactose inclusion and seaweed extract derived from *Laminaria* spp. on performance, digestibility of diet components and microbial populations in newly weaned pigs**. Animal Feed Science and Technology, v. 157, n. 3–4, p. 173–180, 2010.
- OLIVEIRA, A. C. **Fontes vegetais naturais antioxidantes**. Química Nova, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.
- OLIVEIRA, J. C.; **Seminário Comett – Cosmectotecnica dos Produtos Marinhos**, Lisboa, Portugal, 1992.
- PADILHA, R. J. A.; BEZERRA, R. S.; LIMA, C. S.A. **Perfil químico e atividade antimicrobiana de *Caulerpa racemosa* (Forsk.)**. Dissertação de Mestrado. J. Agard. 2014.
- PAUL, U. **Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: a review**. Aquaculture, v. 54, n. 3, p. 205-240, 1986.
- PALERMO, J. A. **Productos Naturales de Origen Marina**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 6ed. Porto Alegre: ed. UFSC. P 1001-1012. 2010.
- PARAB, N. D. T.; TOMAR, V. **Raman Spectroscopy of Algae: A Review**. J Nanomedic Nanotechnol 3:131. doi:10.4172/2157-7439.1000131. 2012.
- PARADAS, W. C. et al. **Traffic of secondary metabolites to cell surface in the red alga *Laurencia dendroidea* depends on a two-step transport by the cytoskeleton**. 2013.
- PAVÃO, M. I. **Crescimento de *Ulva rígida* C. Agardh em condições de stress de macronutrientes**. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia e Biodiversidade vegetal. Departamento de Biologia. Universidade dos Açores. 2014.

- PEDRINI, A. **Algas Marinhas Bentônicas da Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, Brasil; Uma síntese dos conhecimentos taxonômicos.** XV encontro Brasileiro de Ficologia. 2011.
- PELLETIER, J.; SONENBERG, N. **Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA.** Nature, v. 334, n. 6180, p. 320-325, 1988.
- PETTIT, G. R.; et al. **Synthesis of phakellistatin 11: A Micronesia (Chuuk) marine sponge cyclooctapeptide.** J. NAT. PROD. V. 64, p. 883, 2001.
- PEREIRA, R. C.; et al. **Florotaninos e fenóis de algas pardas (Phaeophyta).** Ínsula, v. 19, p. 349-371, 1989.
- PEREIRA, R. C.; TEIXEIRA, V. L. **Sesquiterpenos das algas marinhas *Laurencialemouroux* (Cerámiales, Rhodophyta).** Química Nova, v. 22, n. 3, p. 369-374, 1999.
- PEREIRA, R.; SOUSA-PINTO, I. & YARISH, C. **Field and culture studies of the life history of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta) from Portugal.** Phycologia 43:756-767. 2004.
- PEREIRA, R.; YARISH, C.; SOUSA-PINTO, I. **The influence of stocking density, light and temperature on the growth, production and nutrient removal capacity of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta).** Aquaculture 252:66-78. Rosenberg, G. & Ramus, J., 1982. Ecological Growth Strategies in the Seaweeds *Gracilariafoliifera* (Rhodophyceae) and *Ulva* Sp. (Chlorophyceae): Soluble Nitrogen and Reserve Carbohydrates. Marine Biology 66:251-259. 2006.
- PEREIRA, R.C.; DA GAMA B.A.P. **Macroalgal chemical defenses and their roles in structuring tropical marine communities.** P. 25-56. In: C.D. Amsler. Ed. Algal Chemical Ecology. Springer, Berlin, BE. 2008.
- PEREIRA, R., KRAEMER, G., YARISH, C. & SOUSA-PINTO, I. **Nitrogen uptake by gametophytes of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta) under controlled-culture conditions.** Journal of Phycology 43:107-118. 2008.

- PÉREZ-LORENZO, R. et al. **Autoantibodies to autologous skin in guttate and plaque forms of psoriasis and cross-reaction of skin antigens with streptococcal antigens.** International journal of dermatology, v. 37, n. 7, p. 524-531, 1998.
- PESSUTO. M. B., et al. **Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss.** Quimica Nova, v. 32, n. 2, p. 412-416, 2009.
- PINTO, A.C.; et al. **Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas.** Química Nova, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.
- PITOMBO, L. F.; TEIXEIRA, V. L.; KELECOM, A. **Feromonios sexuais de algas pardas - uma visao quimiosistemática.** Insula, v. 19, p. 229-247. 1989.
- PIRES, K. M. S.; ALENCAR, D. B.; SOUZA, M. B. et al. **Teores de alfa-caroteno e beta-caroteno em macroalgas marinhas desidratadas.** Revista Ciência Agronômica, Fortaleza, v.39, n.2, p.257-262. 2008.
- PLAZA, M.; CIFFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. **In the search of new functional food ingredients from algae.**Trends in Food Science & Technology, v. 19, n. 1, p. 31-39, 2008.
- POZZI, F.; SHIBAYAMA, N.; LEONA, M. et al. **TLC–SERS study of Syrian rue (*Peganum harmala*) and its main alkaloid constituents.** J Raman Spectrosc 44:102–107. 2013.
- RAMAN, C. V.; KRISHNAN, K. S. **A new type of secondary radiation.**Nature. 121(3048), 501-502. 1928.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 5a. ed. Coord. Trad. J. E. Kraus. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1996.
- RAYMUNDO, M. S.; HORTA, P.; FETT, R. **Atividade antioxidante in vitro de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil),** Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas. 2004.

- RENAUD, P. E.; HAY, M. E.; SCHMITT, T. M. **Interactions of plant stress and herbivory: intraspecific variation in the susceptibility of a palatable versus an unpalatable seaweed to sea urchin grazing.** *Oecologia*, v. 82, p. 217-226.1990.
- REUTER, S. et al. **“Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?”.** *Free Radic Biol Med*, v. 49, n. 11. 2010.
- RISHA, P.; MSUYA, Z.; CLARK, M. et al. **The use of MiniLabsto improve the testing capacity of regulatory authorities in resource limited settings: Tanzanian experience.** *Health policy* 87:217–222. 2008.
- ROBERTS, C. M. **Marine Biodiversity Hotspots and Conservation Priorities for Tropical Reefs.***Science*, v. 295, n. 5558, p.1280-1284.2002.
- ROCHA, F. D. **Potential cytotoxic activity of some Brazilian seaweeds on human melanoma cells.** *Phytother Res.* v. 21, p. 170-175, 2007.
- RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, V. M.; DE ALENCAR, D. B. et al. **Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*.** *Revista Ciência Agronômica*, 40(2), 224-231. (2009).
- RODRIGUES, J. A. G. **Atividade anticoagulante de galactanas sulfatadas de algas marinhas vermelhas do gênero *Halymenia* e seu efeito imunoestimulante no camarão marinho *Litopenaeus vannamei*.** 77 f. Diss. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. **Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food.** *Food Chemistry*. 92, 235-254. 2005.
- SAKER-SAMPAIO, S. **Evaluation of *Palmaria palmata* and *Laminaria digitata* as potential human food products.** Tese de Doutorado. University of Portsmouth. 1997.

- SAFAYHI, H.; SAILER, E. R. **Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes**. *Planta medica*, v. 63, n. 6, p. 487-493, 1997.
- SANCHEZ, M. et al. **Physiological response and photoacclimation capacity of *Caulerpa prolifera* (Forsskål) JV Lamouroux and *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson meadows in the Mar Menor lagoon (SE Spain)**. *Marine environmental research*, v. 79, p. 37-47, 2012.
- SALAMANCA, E. J. P. **Extracción, separación y elucidación estructural de dos metabolitos secundarios del alga marina *Bostrychia calliptera***. *Scientia et Technica*, v. 1, n. 33, p. 97-102, 2007.
- SHAH, J. J.; ORLOWSKI, R. Z. **Proteasome inhibitors in the treatment of multiple myeloma**. *Leukemia*, v. 23, n. 11, p. 1964-1979.2009.
- SANTOS, E. S. et al. **Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade do café (*Coffea arabica*)**. *Quimica Nova*. 30, 604-610, 2007.
- SANTOS, M. G. M. et al. **A screening for antiviral effect of extracts from Brazilian marine algae against acyclovir resistant Herpes simplex virus type 1**. *Botanica Marina*. v. 42, p. 227-230, 1999.
- SASHIDHARA, K. V.; WHITE, K. N.; CREWS, P. **A selective account of effective paradigms and significant outcomes in the discovery of inspirational marine natural products**. *J. Nat. Prod.* v. 72, p. 588–603. 2009.
- SEO, A. Y.; JOSEPH, A. M.; DUTTA, D. et al. **New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more**. *J Cell Sci.* v. 123, n. 15, p. 2533-42, 2010.
- SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. **Triagem fitoquímica de plantas de cerrado, da área de proteção ambiental municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão**. *Scientia Plena*, vol. 6 n°2. 2010.
- SILVA, B. S.; FERRERES, F.; MALVA, J. O. et al. **Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts**. *Food Chemistry*. 90, 157-167. 2005.
- SILVA, F.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. **Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante**. *Química Nova*. 22, 1999.
- SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2010.

- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Farmacognosia. Da planta ao medicamento. Óleos essenciais.**JCP Porto Alegre/Florianópolis. Ed. UFRGS/UFSC, 2004.
- SIMÕES, C. M. O., Vieira, P. C., Fernandes, J. B., Schenkel, E. P., Gosmann, G., De Mello, J. C. P.; Petrovick, P. R. **Farmacognosia: da planta ao Medicamento. Farmacognosia: da planta ao Medicamento.** 1999.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. **Saponinas.**In:Simões, C. M. O.;Schenkel, E. P.; Gosman, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. **Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento.** 6. Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1104p. 2007
- SCHNITZLER, I.; BOLAND, W.; HAY, M. E. J. **Organic sulfur compounds from *Dictyopteris* spp deter feedig by an herbivorous amphipod *Ampithoe longimana* but not an herbivorous sea urchin *Arbacia punctulata*** Chem. Ecol. v. 24, p. 1715-1732. 1998.
- SMITH, E.; DENT, G. **The Raman Experiment–Raman Instrumentation, Sample Presentation, Data Handling and Practical Aspects of Interpretation.** Modern Raman Spectroscopy-A Practical Approach, p. 23-70, 2005.
- SOARES, L. P.; FUJII, M. T. **Novas ocorrências de macroalgas marinhas bentônicas no estado de Pernambuco, Brasil.** Rodriguésia, Rio de Janeiro, n.3, p.557-570, 2012.
- SOUZA, B. W. **Antioxidant potential of two red seaweeds from the Brazilian coasts.** Agric. Food Chem., v. 59, p. 5589-5594, 2010.
- SOUZA, B. W. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais.** Quimica Nova. 30, 351-355. 2007.
- SOSA, V. **Oxidative stress and cancer: an overview.** Ageing Res Rev, v. 12, n. 1, p376-390, 2013.
- STADNIK, M. J.; PAULERT, R.. **Uso de macroalgas marinhas na agricultura.**Congresso Brasileiro de Ficologia, Itajaí SC. XI Congresso Brasileiro de Ficologia/Simpósio Latino-americano sobre algas nocivas. Rio de Janeiro RJ. Museu Nacional do Rio de Janeiro. Vol. 30. 2008.
- STEIN, E. M. **Search for cytotoxic agents in multiple *Laurencia* complex seaweed species (Ceramiales, Rhodophyta) harvested from the Atlantic Ocean with emphasis on the Brazilian State of Espírito Santo.** Rev. Bras. Farmacogn. v. 21, p. 239-243, 2011.
- STEIN, E. M. **Screening for antifungal activities of extracts of the Brazilian seaweed genus *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta).** Rev Bras Farmacogn v. 21, p. 290-295, 2011.

- STENGEL, D. B. **Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants.** Annual review of plant biology, v. 62, p. 567-590, 2011.
- SUDATTI, D. B.; FUJII, M. T.; RODRIGUES, S. V. et al. **Effects of abiotic factors on growth and chemical defenses in cultivated clones of *Laurencia dendroidea* J. Agardh (Ceramiales, Rhodophyta).** Mar. Biol. v. 158, p. 1439-1446, 2011.
- TEIXEIRA, V. L.; TOMASSINIS, T.; KELECOM, A. **Produtos naturais de organismos marinhos: uma revisão sobre os diterpenos da alga parda *Dictyota* spp.** Quim Nova, v. 8, p. 302-313, 1985.
- TEIXEIRA, V. L.; KELECOM, A. **Geographic distribution of the diterpenes from the marine brown alga *Dictyota* Lamouroux (Dictyotales, Phaeophyta).** Nerítica, v. 2, p. 179-200, 1987.
- TEIXEIRA, V. L.; KELECOM, A. **The use of diterpenes as chemosystematic markers in marine brown algae of the genus *Dictyota* Lamouroux (Dictyotales, Phaeophyta)** Sci. Tot. Environ., v. 75, p. 271-283. 1988
- TEIXEIRA, V. L.; KELECOM, A.; OTTLIEB, O. R. **O uso de carotenóides como marcadores taxonômicos e filogenéticos de Algas 1. Principais características das classes.** Quím. Nova, v. 13, p. 293-297. 1990.
- TEIXEIRA, V. L. **Produtos naturais marinhos.** In: Biologia Marinha. (R.C. Pereira & A. Soares-Gomes, org.). Engenho Novo: Interciência, p. 249-279. 2002.
- TEIXEIRA, V. L. **Em Biologia Marinha;** Pereira, R. C.; Soares-Gomes, A., Eds.; Interciência: Rio de Janeiro, 2009.
- TEIXEIRA, J.; FEIO, M.; FIGUEIRA, M.L. **O papel do stress oxidativo no envelhecimento e na demência.** Rev. Serv. Psiquiatria do hospital Prf. Dr. Fernando Fonseca, v. 12, n. 1, p. 43-57, 2014.
- THOMSON, J. J. **A defense of abortion.** Philosophy & Public Affairs, 47-66. 1971.
- TOMA, W.; GUIMARÃES, L. L.; BRITO, A. R. M. S.; SANTOS, A. R.; CORTEZ, F. S.; PUSCEDDU, F. H.; CESAR, A.; JUNIOR, L. S.; PACHECO, M. T. T.; PEREIRA, C. D. S. **Safflower oil: an integrated assessment of phytochemistry, antiulcerogenic activity, and rodent and environmental toxicity.** Revista brasileira de Farmacognosia. 2014.
- TORRES, V. M. T. **Extração, purificação e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Champia feldmannii*.** 28 f. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2005.
- TRAINOR, F.R. **Survival of algae in soil after high temperature treatment** Phycologia, v. 22, p. 201-202, 1983.

- VALLIM, M. A.; DE PAULA, J. C.; PEREIRA, R. C. et al. **The diterpenes from Dictyotacean marine brown algae in the Tropical Atlantic American region.** *Biochem. Syst. Ecol.* v. 33, p. 1-33, 2005.
- VAN DEN HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to physiology.** Cambridge: Academic Press, 1997.
- VEIGA-SANTOS, P. **In vitro anti-trypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*.** *Parasitology*, v. 17, n. 11, p. 1661-1670, 2010.
- VELLOSA, J. C. R.; BARBOSA, V. F.; OLIVEIRA, O. M. M. F. **Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres.** *Revista eletrônica de farmácia*. v.4, n. 2, p. 119-130, 2007.
- VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. **Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica.** *Química Nova*, v. 27, n.1, p.139-145, 2004.
- VOGEL, H. **Antioxidant properties and TLC characterization of four Chilean haplopappus-species known as bailahue'n.** *Journal of Ethnopharmacology*. 2004.
- ZHANG, H. J. **Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum*.** *Carbohydrate Polymers*, v. 71, n. 03, p. 428-434, 2008.
- ZHU, Q.; CAO, Y.; CAO, Y.; CHAY, Y.; LU, F. **Rapid on site TLC-SERS detection of four antidiabetes drugs used as adulterants in botanical dietary supplements.** *Anal Bioanal Chem*. 2014.
- ZEMKE-WHITE, W. L.; OHNO, M. **World seaweed utilization: An end-of-century summary.** *Journal of Applied Phycology*, v. 11, p. 369–376, 1999.
- ZINADAH, O. A. et al. **Evaluation of the anti-genotoxicity and growth performance impacts of green algae on *Mugil cephalus*.** *Life Science Journal*, v. 10, n. 3, p. 1543-1554, 2013.
- ZUBIA, M. **Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts.** *Food Chem.*, v.116, n. 3, p. 693–701, 2009.
- WAGNER, H.; WISENAUER, M.; **Fitoterapia: Fitofármacos, farmacologia e aplicações clínicas**, 2ed. São Paulo: Ed. Pharmabooks, 2006. p.14-17.
- WESOFF, Eric. **Growing Algae: Open Pond vs. Closed Bioreactors.** 2009. Disponível em: Acesso em: 20 nov. 2015.
- WRIGHT, E. M. **Biodiversity: New Leads for the Pharmaceutical and Agrochemical Industries;** Wrigley, S. K.; Hayes, M. A.; Thomas, R.; Chrystal,

E. J. T.; Nicholson, N., eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2000, p. 113-139.

WU, Q. **Differentiation of algae clones on the basis of resonance Raman spectra excited by visible light.** *Anal Chem.* 70:1782-1787. 1998.

WYNNE, M. J. **A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: second revision.** J. Cramer in der Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung, 2005.

YAN, X.; NAGATA, T.; FAN, X. **Antioxidative activities in some common seaweeds.** *Plant Foods for Human Nutrition*, 52(3), 253-262.1998.

YOON, H. S. **A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes.** *Mol Biol Evol* v. 21, p. 809-818, 2004.