

CINTIA DALCUCHE LEAL MARTINS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS DE
MACROALGAS MARINHAS DA COSTA SUDESTE E SUL DO BRASIL

Monografia apresentada à disciplina Estágio Supervisionado como requisito parcial à conclusão do Curso de Oceanografia , Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Angelica Ribeiro Soares

PONTAL DO PARANÁ
2008

*À minha família e à memória
de minha avó Lili.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela saúde e proteção.

Agradeço carinhosamente aos meus pais, principais incentivadores do meu estudo e do meu trabalho, por sempre acreditarem em mim e apoiarem as minhas decisões. Nenhum agradecimento nunca estará à altura do meu amor por vocês.

À minha irmã, primas, tios, madrinha e avô por serem meu porto-seguro e estarem sempre presentes.

À Prof^a. Dr^a. Angelica Ribeiro Soares, pela orientação, paciência e conhecimentos transmitidos. Obrigada por acreditar em mim.

Ao meu amor Raphael, por sempre me entender e acreditar em mim. Obrigada pelo companheirismo e por demonstrar seu amor por mim diariamente, mesmo que à distância.

À minha alma gêmea feminina, minha querida companheira de apê Chay. Obrigada pela parceria durante todos esses anos, pela cumplicidade, pelo apoio e carinho. Torço muito por você!

À família GRR 2004, pela qual sempre terei muito carinho. Obrigada a cada um de vocês pelo companheirismo indispensável ao longo dos cinco anos de faculdade, pelos momentos de descontração e tantos outros impossíveis de serem citados aqui.

À coordenação do curso de Oceanografia (UFPR), aos funcionários e aos verdadeiros mestres que encontrei na Universidade, por terem conseguido transmitir sua dedicação pela ciência e seu amor pela profissão.

Ao prof. Dr. Everson Bianco e à Prof^a. Dr^a. Franciane Pellizzari, por gentilmente aceitarem fazer parte da minha banca.

À Prof^a. Dr^a. Sonia Soares Costa por ter me recebido no LPN-Bio (NPPN/UFRJ) e aos alunos Luiza, Gabriel, Bruno e Natalia pela amizade e ajuda imprescindível.

À Prof^a. Dr^a. Lísia M. Gestirari, pelas identificações das macroalgas.

Ao laboratório do GPNOA (UFRJ), em especial à Néia, aos alunos Lilian Natalia, Lorena, Gabriel, Fernanda e Bruno, pela descontração e colaboração e à técnica de laboratório Aline, pelo apoio e supervisão na utilização do espectrofotômetro.

“A pior coisa que pode acontecer na vida de uma pessoa não é quando seu projeto não dá certo, seu plano de ação não funciona ou quando a viagem termina no lugar errado. O pior é não começar. Esse é o maior naufrágio”.

(Amyr Klink – Mar sem fim, Cia. Das Letras)

RESUMO

Os radicais livres e outros derivados ativos do oxigênio são reconhecidos como subprodutos naturais do metabolismo aeróbico. No entanto, as espécies reativas do oxigênio participam diretamente de mecanismos relacionados a diversos estados patológicos como câncer, diabetes, aterosclerose, Alzheimer, Parkinson, entre outros. A aplicação tópica ou a administração oral de antioxidantes tem sido uma das maneiras de prevenção aos danos desencadeados pelo estresse oxidativo. As algas marinhas representam uma importante fonte de substâncias antioxidantes naturais, uma vez que têm sistemas de defesa antioxidante bem desenvolvidos. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antioxidante, através do método de seqüestro de radicais DPPH e do sistema β -caroteno/ácido linoléico; mensurar o conteúdo fenólico total, através do método Folin-Ciocalteu; e determinar o perfil químico por cromatografia em camada delgada dos extratos brutos obtidos a partir de 26 espécies de macroalgas marinhas coletadas em praias da costa sul e sudeste do Brasil. Os extratos que apresentaram resultados relevantes quanto à atividade antioxidante foram analisados por RMN, para a elucidação dos seus compostos majoritários. As espécies *Spyridia clavata*, *Dictyota* sp. e *Colpomenia sinuosa* apresentaram atividade superior a 65% em ambos os métodos utilizados para a avaliação da atividade antioxidante. *Cryptonemia seminervis* e *Amansia* sp. se destacaram por obter resultados acima de 72% nas três concentrações testadas pelo método DPPH. Por esse motivo, as duas espécies foram selecionadas para o fracionamento guiado por bioensaios. *Padina gymnospora*, *Sargassum vulgare* e *Osmundaria obtusiloba* apresentaram os maiores valores referentes ao conteúdo fenólico total (243,2; 252,65 e 569,33 mg EAG/ g extrato, respectivamente). A caracterização química dos extratos brutos revelou a presença de esteróis e substâncias da classe dos aminoácidos na maioria das espécies de Rhodophyta analisadas. Dentre as Ochrophyta, todas as espécies apresentaram fenóis e derivados aminados, e apenas uma delas não apresentou esteróis em sua composição. Em todas as espécies de Chlorophyta analisadas foi observada a presença de derivados aminados e fenóis, e em apenas duas espécies não foi constatada a presença de esteróis. As espécies *Plocamium brasiliense* (1), *Amansia* sp., *Osmundaria obtusiloba*, *Gracilaria cearensis*, *Spyridia clavata*, *Cryptonemia seminervis*, *Bostrychia tenella*, *Codium taylorii* e *Dictyota* sp. foram selecionadas para análise por RMN. Em *P. brasiliense* (1), os majoritários apresentaram um grande número de hidrogênios ligados a carbonos com heteroátomos e hidrogênios ligados a carbonos insaturados. A espécie *Dictyota* sp. apresentou substâncias terpenoídicas como metabólitos majoritários. As demais espécies analisadas apresentaram substâncias lipídicas, como por exemplo, ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos, triglicerídeos e esteróis como componentes majoritários. O fracionamento dos extratos das espécies *Cryptonemia seminervis* e *Amansia* sp. constatou que a fração orgânica de ambas as espécies era responsável pela atividade antioxidante observada nos extratos. Os resultados obtidos através deste trabalho indicam que as algas analisadas são uma fonte promissora de compostos biologicamente ativos com propriedades antioxidantes.

Palavras-chave: Macroalgas marinhas. Antioxidante. Radicais livres.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: localização das praias de coleta _____	25
FIGURA 2: reação de obtenção do DPPH (LIX) através da oxidação da difenilpicrilidrazina (LX) _____	28
FIGURA 3: microplaca com 96 cavidades _____	30
FIGURA 4: espectrofotômetro de UV _____	30
FIGURA 5: estrutura de esteroide _____	Erro! Indicador não definido.
FIGURA 6: estrutura de flavonóide _____	Erro! Indicador não definido.
FIGURA 7: estrutura de terpeno _____	Erro! Indicador não definido.
FIGURA 8: estrutura de aminoácido _____	Erro! Indicador não definido.
FIGURA 9: fluxograma das metodologias empregadas no presente trabalho _____	36
FIGURA 10: porcentagens de macroalgas coletadas referentes a cada divisão _____	39
FIGURA 11: gráfico representando o rendimento de cada espécie coletada _____	41
FIGURA 12: cromatoplaça (eluída em CH ₂ Cl ₂ e revelada com solução de DPPH) correspondente aos padrões quercetina (P1); ácido gálico (P2); Ginkgo biloba (P3); e às algas Plocamium brasiliense 1 (1); Plocamium brasiliense 2 (2); Plocamium brasiliense 3 (3) _____	42
FIGURA 13: cromatoplaça (eluída em CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 8:2 e revelada com solução de DPPH) correspondente aos padrões quercetina (P1); ácido gálico (P2); Ginkgo biloba (P3); e às algas Hypnea musciformis (4); Amansia sp. (5); Osmundaria obtusiloba (6); Gracilaria dominguensis (7); Gracilaria cervicornis (8); Gracilaria sp. (9); Gracilaria cearensis (10); Spyridia clavata (11); Acanthophora spicifera (12) _____	43
FIGURA 14: cromatoplaça (eluída em CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 8:2 e revelada com solução de DPPH) correspondente aos padrões quercetina (P1); ácido gálico (P2); Ginkgo biloba (P3) e às algas Cryptonemia seminervis 1 (13); Callophyllis microdonta (14); Cryptonemia sp. (15); Cryptonemia seminervis 2 (16); Chondria sp. (17); Pterocladia capillacea (18); Bostrychia tenella (19); Dichotomaria marginata (20); Liagora farinosa (21) _____	44
FIGURA 15: cromatoplaça (eluída em CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 8:2 e revelada com solução de DPPH) correspondente aos padrões quercetina (P1); ácido gálico (P2); Ginkgo biloba (P3); e às algas Dictyota sp. (22); Colpomenia sinuosa (23); Sargassum vulgare (24); Padina gymnospora (25) _____	44
FIGURA 16: cromatoplaça (eluída em CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 8:2 e revelada com solução de DPPH) correspondente aos padrões quercetina (P1); ácido gálico (P2); Ginkgo biloba (P3); e às algas Caulerpa mexicana (26); Codium taylorii (27); Codium decorticatum (28); Ulva fasciata (29) _____	45
FIGURA 17: gráfico representando a atividade antioxidante média das três concentrações analisadas para cada espécie de alga coletada _____	51
FIGURA 18: gráfico da atividade antioxidante frente ao sistema β-caroteno/ácido linoléico _____	53
FIGURA 19: gráfico correspondente ao conteúdo fenólico total das algas estudadas _____	57

FIGURA 20: cromatoplaca (eluída em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 8:2 e revelada com sulfato cérico) correspondente às algas *Gracilaria dominguensis* (1); *Gracilaria cervicornis* (2); *Gracilaria* sp. (3); *Gracilaria cearensis* (4); *Spyridia clavata* (5); *Acanthophora spicifera* (6) _____ 59

FIGURA 21: cromatoplaca (eluída em CHCl_3 e revelada com sulfato cérico) correspondente às algas *Plocamium brasiliense* 1 (7); *Plocamium brasiliense* 2 (8); *Plocamium brasiliense* 3 (9); *Hypnea musciformis* (10); *Amansia* sp. (11); *Osmundaria obtusiloba* (12) _____ 60

FIGURA 22: cromatoplaca (eluída em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 8:2 e revelada com sulfato cérico) correspondente às algas *Cryptonemia seminervis* 1 (13); *Callophyllis microdonta* (14); *Cryptonemia* sp. (15); *Cryptonemia seminervis* 2 (16); *Chondria* sp. (17); *Pterocliadiella capillacea* (18); *Bostrychia tenella* (19) _____ 61

FIGURA 23: cromatoplaca (eluída em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 8:2 e revelada com ácido tricloroacético) correspondente às algas *Plocamium brasiliense* 1 (1); *Plocamium brasiliense* 2 (2); *Plocamium brasiliense* 3 (3); *Hypnea musciformis* (4); *Amansia* sp. (5); *Osmundaria obtusiloba* (6); *Gracilaria dominguensis* (7); *Gracilaria cervicornis* (8); *Gracilaria* sp. (9); *Gracilaria cearensis* (10); *Spyridia clavata* (11); *Acanthophora spicifera* (12); *Cryptonemia seminervis* 1 (13); *Callophyllis microdonta* (14); *Cryptonemia* sp. (15); *Cryptonemia seminervis* 2 (16); *Chondria* sp. (17); *Pterocliadiella capillacea* (18); *Bostrychia tenella* (19); *Dichotomaria marginata* (20); *Liagora farinosa* (21) e ao padrão colesterol (P) _____ 61

FIGURA 24: cromatoplaca (eluída em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 8:2 e revelada com cloreto férrico) correspondente às algas *Plocamium brasiliense* 1 (1); *Plocamium brasiliense* 2 (2); *Plocamium brasiliense* 3 (3); *Hypnea musciformis* (4); *Amansia* sp. (5); *Osmundaria obtusiloba* (6); *Gracilaria dominguensis* (7); *Gracilaria*

cervicornis (8); *Gracilaria* sp. (9); *Gracilaria cearensis* (10); *Spyridia clavata* (11); *Acanthophora spicifera* (12); *Cryptonemia seminervis* 1 (13); *Callophyllis microdonta* (14); *Cryptonemia* sp. (15); *Cryptonemia seminervis* 2 (16); *Chondria* sp. (17); *Pterocliadiella capillacea* (18); *Bostrychia tenella* (19); *Dichotomaria marginata* (20); *Liagora farinosa* (21) e ao padrão *S. zonale* (P) _____ 62

FIGURA 25: cromatoplaca (eluída em BAW 8:1:1 e revelada com ninhidrina) correspondente às algas *Plocamium brasiliense* 1 (1); *Plocamium brasiliense* 2 (2); *Plocamium brasiliense* 3 (3); *Hypnea musciformis* (4); *Amansia* sp. (5); *Osmundaria obtusiloba* (6); *Gracilaria dominguensis* (7); *Gracilaria cervicornis* (8); *Gracilaria* sp. (9); *Gracilaria cearensis* (10); *Spyridia clavata* (11); *Acanthophora spicifera* (12); *Cryptonemia seminervis* 1 (13); *Callophyllis microdonta* (14); *Cryptonemia* sp. (15); *Cryptonemia seminervis* 2 (16); *Chondria* sp. (17); *Pterocliadiella capillacea* (18); *Bostrychia tenella* (19); *Dichotomaria marginata* (20); *Liagora farinosa* (21) _____ 63

FIGURA 26: cromatoplaca (eluída em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 8:2) correspondente às algas *Dictyota* sp. (20); *Colpomenia sinuosa* (21); *Sargassum vulgare* (22); *Padina gymnospora* (23) _____ 64

FIGURA 27: cromatoplaca (eluída em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 8:2 e revelada com ácido tricloro acético) correspondente às algas *Dictyota* sp. (22); *Colpomenia sinuosa* (23); *Sargassum vulgare* (24); *Padina gymnospora* (25) e ao padrão colesterol _____ 65

FIGURA 28: cromatoplaca (eluída em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 8:2 e revelada com cloreto férrico) correspondente às algas *Dictyota* sp. (22); *Colpomenia sinuosa* (23); *Sargassum vulgare* (24); *Padina gymnospora* (25) e ao padrão *S. zonale* (P) _____ 65

FIGURA 29: cromatoplaca (eluída em BAW 8:1:1 e revelada com ninhidrina) correspondente às algas *Dictyota* sp. (22); *Colpomenia sinuosa* (23); *Sargassum vulgare* (24); *Padina gymnospora* (25) _____ 66

FIGURA 30: cromatoplaca (eluída em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 8:2) correspondente às algas *Caulerpa mexicana* (25); *Codium taylorii* (26); *Codium decorticatum* (27); *Ulva fasciata* (28) _____ 66

FIGURA 31: cromatoplaca (eluída em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 8:2 e revelada com ácido tricloro acético) correspondente às algas *Caulerpa mexicana* (26); *Codium taylorii* (27); *Codium decorticatum* (28); *Ulva* sp. (29) e ao padrão colesterol _____ 67

FIGURA 32: cromatoplaca (eluída em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 8:2 e revelada com ácido tricloro acético) correspondente às algas *Caulerpa mexicana* (26); *Codium taylorii* (27); *Codium decorticatum* (28); *Ulva* sp. (29) e ao padrão *S. zonale* (P) _____ 67

FIGURA 33: cromatoplaca (eluída em BAW 8:1:1 e revelada com ninhidrina) correspondente às algas *Caulerpa mexicana* (26); *Codium taylorii* (27); *Codium decorticatum* (28); *Ulva* sp. (29) _____ 68

FIGURA 34: espectro de RMN (^{13}C) (200 MHz, CDCl_3) correspondente à alga *Codium taylorii* _____ 69

FIGURA 36: espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) correspondente à alga *Plocamium brasiliense* (1) _____ 71

FIGURA 38: cromatoplaca (eluída em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 8:2 e revelada com sulfato cérico) correspondente às frações orgânica (1) e aquosa (2) de *Amansia* sp. _____ 73

FIGURA 39: cromatoplaca (eluída em AcOEt e revelada com solução de DPPH) correspondente às frações orgânica (1); aquosa (2) de Amansia sp. e ao padrão quercetina (P) _____74

FIGURA 40: cromatoplaca (eluída em AcOEt e revelada com sulfato cérico) correspondente às frações orgânica (1); C1 (3); C2 (4); C3 (5); C4 (6); C5 (7); C6 (8) e aquosa (9) de C. seminervis _____76

FIGURA 41: cromatoplaca (eluída em AcOEt e revelada com solução de DPPH) correspondente às frações orgânica (1); C1 (3); C2 (4); C3 (5); C4 (6); C5 (7); C6 (8); aquosa (9) de C. seminervis e ao padrão quercetina (P) _____76

LISTA DE TABELAS

<i>TABELA 1: locais e datas de coleta</i>	26
<i>TABELA 2: período, locais de coleta e classificação taxonômica das espécies de macroalgas</i>	38
<i>TABELA 3: rendimento dos extratos brutos das macroalgas.</i>	40
<i>TABELA 4: atividade antioxidante (%) referente à análise pelo sistema de seqüestro de radicais DPPH</i>	46
<i>TABELA 5: atividade antioxidante (%) referente à análise frente ao sistema β-caroteno/ácido linoléico</i>	51
<i>TABELA 6: conteúdo fenólico total</i>	55
<i>TABELA 7: atividade antioxidante das frações de <i>Amansia</i> sp.</i>	75
<i>TABELA 8: atividade antioxidante das frações de <i>C. seminervis</i></i>	77

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 RADICAIS LIVRES	11
1.2 SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES	13
1.3 PRODUTOS NATURAIS	14
1.4 MACROALGAS MARINHAS	16
1.4.1 RHODOPHYTA	18
1.4.2 PHAEOPHYTA	19
1.4.3 CHLOROPHYTA	19
1.5 MACROALGAS MARINHAS E SEU POTENCIAL ANTIOXIDANTE	20
1.6 OBJETIVO GERAL	23
1.7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
2. METODOLOGIA	24
2.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LOCAIS DE COLETA	24
2.2 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO	26
2.3 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS (EBs)	27
2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	28
2.4.1 MÉTODO DO SEQÜESTRO DE RADICAIS DPPH•	28
2.4.1.1 ANÁLISE QUALITATIVA	29
2.4.1.2 ANÁLISE QUANTITATIVA	30
2.4.2 SISTEMA B-CAROTENO/ÁCIDO LINOLÉICO	31
2.5 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL	32
2.6 ANÁLISE DOS PERFIS QUÍMICOS DOS EXTRATOS BRUTOS	33
2.7 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS MAJORITÁRIAS DOS EXTRATOS BRUTOS SELECIONADOS	34
2.8 FRACIONAMENTO DE EXTRATOS BRUTOS ATIVOS	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1 RENDIMENTO	39
3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	42
3.2.1 MÉTODO DO SEQÜESTRO DE RADICAIS DPPH•	42
3.2.1.1 ANÁLISE QUALITATIVA	42
3.2.1.2 ANÁLISE QUANTITATIVA	46
3.2.2 SISTEMA B-CAROTENO/ÁCIDO LINOLÉICO	51
3.3 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL	55
3.4 ANÁLISE DOS PERFIS QUÍMICOS DOS EXTRATOS BRUTOS	58
3.5 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS MAJORITÁRIAS DOS EXTRATOS BRUTOS SELECIONADOS	68
3.6 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS ATIVOS E ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FRAÇÕES	72

4. CONCLUSÕES

79

REFERÊNCIAS

81

1. INTRODUÇÃO

A aplicação tópica ou a administração oral de antioxidantes tem sido uma das maneiras de prevenção aos danos desencadeados pelo estresse oxidativo. Neste contexto, muitos estudos têm se desenvolvido visando a busca de antioxidantes naturais, em substituição aos sintéticos, os quais demonstraram possuir efeitos tóxicos como, por exemplo, o BHT (butil-hidroxi-tolueno) e o BHA (butil-hidroxi-anisol), comumente utilizados em alimentos processados (WANG *et al.*, 2008).

Este trabalho tratará da busca por substâncias antioxidantes provenientes de macroalgas marinhas, as quais têm se mostrado organismos promissores como fonte de novas biomoléculas. Nesse sentido, é importante discorrer sobre a origem e os efeitos das espécies reativas do oxigênio, bem como sobre a importância dos antioxidantes.

1.1 RADICAIS LIVRES

O elemento químico oxigênio tem um significado fundamental para os organismos aeróbios, pois participa na obtenção de energia na forma de ATP e de reações bioquímicas e fisiológicas importantes para o corpo humano (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

Apesar de essencial, o oxigênio também gera efeitos tóxicos, os quais são conhecidos desde o século XIX. Entretanto, a identificação dos radicais livres e outros derivados ativos do oxigênio, causadores da sua toxicidade em organismos vivos, somente foi possível na década de 50, através de um trabalho pioneiro publicado por Denham Harman (HARMAN, 1956). Harman propôs a idéia de que o envelhecimento seria resultado de danos causados por radicais livres. Essa teoria foi baseada na observação de que a irradiação em seres vivos induzia a formação de radicais livres, os quais diminuía o tempo de vida desses seres e produziam mudanças semelhantes ao envelhecimento (HIRATA, 2004). Quando os radicais livres foram reconhecidos como subprodutos naturais do metabolismo aeróbico (cerca de 2-3% do oxigênio consumido pela célula é convertido em radicais livres), Harman propôs que o envelhecimento e as

doenças relacionadas a ele, poderiam ser causados pelos efeitos em longo prazo dos danos oxidativos, os quais, por sua vez, eram modificados por fatores genéticos e ambientais (WICKENS, 2001).

As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres (HALLIWELL, 1994). Essa configuração geralmente faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas (POMPELLA, 1997). Para atingir a estabilidade, os radicais livres reagem com as moléculas estáveis mais próximas no intuito de capturar elétrons. Esta molécula, por sua vez, perde seu elétron e se torna um radical livre (ZARDO, 2007). Uma vez que o processo é iniciado, ele pode desencadear uma reação em cadeia, o que gera peroxidação lipídica, resultando em desestabilização e desintegração das membranas das células ou oxidação de outros componentes celulares, como proteínas, lipídios e DNA (HALLIWELL, 1994). Nesse sentido, a presença de radicais livres no organismo pode gerar ou complicar diversas patologias como câncer, diabetes, aterosclerose, Alzheimer, Parkinson, entre outras (CHEW *et al.*, 2008).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são formados em quantidades moderadas a todo momento no organismo humano, como resultado do processo de respiração celular, que ocorre nas mitocôndrias das células, a fim de gerar ATP (MATSUMOTO, 2008). A produção de radicais livres é contrabalanceada por uma produção equivalente de mecanismos antioxidantes visando neutralizar seus efeitos danosos. Quando essa neutralização não é possível devido a um desequilíbrio causado pelo excesso de produção de radicais livres e pela conseqüente sobrecarga do mecanismo antioxidante, dizemos que há uma situação de estresse oxidativo (SIES, 1993). Se essa condição persistir por períodos prolongados e o sistema de reparo não puder compensar o aumento da formação de biomoléculas danificadas oxidativamente, diversos danos celulares podem ocorrer num organismo, seja ele humano ou não (SPITZ *et al.*, 2004).

A geração de radicais livres pode ter fontes endógenas e exógenas. A respiração aeróbica e as inflamações, por exemplo, são consideradas fontes endógenas de

geração de radicais livres, enquanto o ozônio, as radiações gama e ultravioleta, o tabaco e a dieta são exemplos de fontes exógenas (BIANCHI *et al.*, 1999).

Em sua maioria, os radicais livres derivam do oxigênio e são denominados genericamente de “Espécies Reativas do Oxigênio” (EROs) (MATSUMOTO, 2008). Dentre as EROs, o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($HO\bullet$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são formados em todas as células aeróbicas, enquanto a espécie mais reativa, o oxigênio singlete, é formada pela excitação do oxigênio fundamental, pela energia térmica ou fotoquímica, dissipada por substâncias “sensibilizadoras” quando irradiadas com luz em comprimento de onda específico (CHEW *et al.*, 2008; MATSUMOTO, 2008).

1.2 SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES

Para prevenir ou reduzir os efeitos do estresse oxidativo, o organismo está equipado com diversos mecanismos de defesa antioxidante. O sistema antioxidante enzimático constitui a primeira defesa endógena a agir aos ataques das espécies reativas do oxigênio, impedindo sua formação ou seqüestrando-as de forma a impedir sua interação com alvos celulares. Esse sistema antioxidante é formado por diversas enzimas, como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) (MATSUMOTO, 2008). Os antioxidantes do sistema não enzimático necessitam, em sua maioria, ser adquiridos pela alimentação. As vitaminas C e E, os compostos fenólicos e os pigmentos carotenóides são os antioxidantes não enzimáticos mais eficientes na eliminação das EROs (MATSUMOTO, 2008).

Atualmente, a definição mais aceita para antioxidantes é que seriam substâncias as quais, mesmo presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, poderiam atrasar ou inibir as taxas de oxidação (SIES, 1993). Estes antioxidantes estão em permanente atividade no organismo, visto que a produção de energia no mesmo é uma das principais causas da formação de radicais livres. Bloqueando o processo de oxidação e neutralizando os radicais livres, as próprias substâncias antioxidantes tornam-se oxidadas, havendo uma necessidade constante de recarregar essas substâncias presentes em nosso organismo (ROCHA, 2004).

Dentre as substâncias antioxidantes produzidas pelos organismos, um dos grupos mais importantes são os compostos conhecidos como produtos naturais ou metabólitos secundários.

1.3 PRODUTOS NATURAIS

Para o entendimento do metabolismo secundário, é necessário compreender primeiramente o metabolismo primário, o qual é composto por substâncias envolvidas nas funções vitais básicas de todo ser vivo como, por exemplo, a clorofila *a* das algas e vegetais. Tais metabólitos estão envolvidos em processos que permitiram a sobrevivência dos organismos e o aumento de sua complexidade e diversidade ao longo da evolução (TEIXEIRA, 2002).

Os metabólitos secundários, por sua vez, são classicamente definidos como todos os compostos procedentes de um conjunto de processos que não apresentam distribuição universal, por não serem necessários a todas as espécies vegetais. Ainda que o metabolismo secundário nem sempre desempenhe uma função evidente na manutenção do ciclo de vida das plantas, seus produtos em geral apresentam expressiva relevância na interação das plantas com o meio ambiente, sobretudo nas interações mediadas entre plantas e fatores bióticos (TEIXEIRA, 2002). Os metabólitos secundários exercem ação protetora em função de estresses abióticos, como mudanças de temperatura, conteúdo da água, níveis de luz, exposição à radiação ultravioleta e deficiência nutricional (MATSUKAWA *et al.*, 1997). Os produtos naturais estão envolvidos, portanto, em processos de adaptação das espécies ao meio ambiente. Além disso, sabe-se que os processos mediados pelos metabólitos secundários são os que determinam o sucesso dos organismos e o aumento da biodiversidade nos sistemas, sendo de fundamental importância adaptativa (TEIXEIRA, 2002).

Em geral, os organismos das áreas tropicais exibem maior diversidade e concentração de metabólitos secundários em relação aos que vivem em regiões mais frias. Isso significa dizer que a maior riqueza e produção de metabólitos secundários segue a mesma tendência observada para a produção de outras estratégias de defesa.

A variabilidade geográfica na produção de metabólitos secundários pode ser resultante de diversos aspectos históricos ou mesmo atuais. Dentre eles, pode-se destacar a história prévia de herbivoria ou predação, fatores físicos como luz e nutrientes, interação com competidores e patógenos, diferença ou estrutura genética entre populações, etc. (PEREIRA, 2002).

Os produtos naturais têm sido fonte de alimento, fragrâncias, pigmentos, inseticidas, cosméticos, remédios, etc. Têm uma importância indiscutível, já que mais de 25% dos fármacos comercializados são drogas derivadas de produtos naturais de plantas e cerca de 12% oriundos de microorganismos (TEIXEIRA, 2002).

Os produtos naturais têm sido cada vez mais estudados e uma de suas fontes promissoras é o oceano. No ocidente, as pesquisas na área de produtos naturais marinhos começaram na década de cinquenta com o trabalho pioneiro de Bergman (BERGMAN *et al.*, 1951). Nos anos sessenta, o aumento da necessidade de outros fármacos para controlar novas doenças, bem como a resistência de microorganismos à terapêutica já existente, representava um estímulo à procura de novas fontes não convencionais de produtos naturais marinhos bioativos (KELECOM, 2002).

Alguns produtos naturais de origem marinha se destacam por estarem em desenvolvimento clínico como, por exemplo, o composto Bryostatina-1, isolado de um briozoário e em desenvolvimento clínico para tratamento do câncer (HAEFNER, 2003).

Dentre os organismos que representam fontes importantes de produtos naturais marinhos, as algas se destacam por possuir diversas atividades potenciais. Metabólitos secundários isolados desses organismos já mostraram ter, por exemplo, potencial antioxidante (CHEW *et al.*, 2008), antileishmania (FREILE-PELEGRIN *et al.*, 2008), contra a dengue (HIDARI *et al.*, 2008), antincrustante (BARBOSA *et al.*, 2007), neuroprotetora e anti-inflamatória (DA-QING *et al.*, 2006), citotóxica (TSUDA *et al.*, 2005), anti-herpes (GHOSH, *et al.*, 2004), entre outros.

Dentre os produtos naturais com atividade antioxidante de maior incidência e relevância estão os compostos fenólicos, substâncias com ampla distribuição no reino vegetal, sendo conhecidas atualmente mais de 8.000 estruturas. São definidos como metabólitos secundários que possuem um ou mais anéis aromáticos com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (MATSUMOTO, 2008).

Os polifenóis têm sido objeto de estudo de muitas pesquisas por estarem associados à prevenção de doenças crônico-degenerativas, como aterosclerose e câncer. A bioatividade dos fenólicos pode estar relacionada a uma provável atividade antioxidante, que é associada à própria natureza química deste grupo de compostos, os quais são considerados, em geral, bons agentes seqüestradores de EROs devido a sua estrutura (RICE-EVANS *et al.*, 1996).

1.4 MACROALGAS MARINHAS

As macroalgas ou algas macroscópicas são organismos que recebem essa denominação por apresentarem dimensões visíveis a olho nu. Algumas espécies podem apresentar uma relativa diferenciação de tecidos, como estruturas de fixação, por exemplo, mas nunca a formação de órgãos verdadeiros. Quando essa diferenciação ocorre, ela se situa num nível rudimentar quando comparada às plantas vasculares. Todas as macroalgas são eucarióticas e autótrofas. Elas possuem hábitos bentônicos, apesar de existirem espécies capazes de sobreviver flutuando na água, durante parte ou a totalidade de sua existência como, por exemplo, as espécies do gênero *Sargassum*, que flutuam nas proximidades do golfo do México, formando o mar dos Sargaços (LOURENÇO & MARQUES JÚNIOR, 2002).

A classificação das macroalgas dentro de um reino ainda é controversa. Alguns autores as classificam como pertencentes ao reino *Plantae* enquanto outros, porém, defendem sua classificação dentro dos Protistas.

As macroalgas possuem diferentes estratégias de reprodução, com alta habilidade de dispersão dos esporos e capacidade de regeneração, além dos aspectos de competição intra e interespecífica. Estas características, muitas vezes, favorecem a rápida colonização do substrato, seja orgânico ou inorgânico, tanto natural quanto artificial (CORREIA *et al.*, 2005).

A complexidade estrutural das macroalgas reflete a sua habilidade em sobreviver em zonas como, por exemplo, costões rochosos, onde estão sujeitas a amplas flutuações de umidade, temperatura, salinidade e luz, além da ação da arrebentação

das ondas e da ação abrasiva das partículas de areia em suspensão (RAVEN *et al.*, 1992).

A diversidade das macroalgas no ambiente marinho está relacionada diretamente com as condições ambientais, principalmente com a qualidade da água e o tipo de substrato disponível para a fixação dos esporos. Nas águas rasas, a penetração da luz solar ocasiona o maior crescimento da epiflora, proporcionando o desenvolvimento de um considerável número de espécies de macroalgas marinhas. Essa imensa diversidade de substratos vegetais favorece o surgimento das comunidades fitais, bastante ricas em organismos tipicamente adaptados para viverem associados a vegetais marinhos, incluindo inúmeros organismos errantes e outros sedentários (CORREIA *et al.*, 2005).

As macroalgas marinhas são amplamente encontradas ao longo do litoral brasileiro, sendo o trecho considerado de maior diversidade e abundância o nordeste do Brasil até o norte do estado do Rio de Janeiro, com áreas providas de substrato rochoso e águas mais transparentes (OLIVEIRA *et al.*, 2001) .

As algas marinhas bentônicas são organismos que possuem uma grande importância econômica na sociedade mundial e são utilizadas, por exemplo, como ração animal, na área industrial (como ficocolóides), como fertilizantes em fazendas próximas ao mar e na fabricação de compostos medicinais e cosméticos. De fato, preparações à base de algas são usadas há séculos pelas populações devido às suas propriedades medicinais. Algas pardas, como *Laminaria* sp., por exemplo, são efetivas na cura do bócio, devido ao alto teor de iodo. Algumas algas são usadas como vermífugos e outras para combater o escorbuto, como *Porphyra* sp. (LHULLIER, 2005). As algas marinhas também são amplamente utilizadas na alimentação humana. Por exemplo, a alga vermelha *Porphyra* sp. (nori) é utilizada no preparo de sushi, enquanto *Eucheuma* sp. (agar-agar) e *Laminaria japonica* (kombu) são utilizadas como alimento e na preparação de carnes, peixes e sopas em diversos países orientais (GUARATINI, 2008).

As macroalgas marinhas estão inseridas dentro de três divisões, de acordo com a sua pigmentação: Rhodophyta, Ochrophyta e Chlorophyta.

1.4.1 Rhodophyta

A divisão Rhodophyta é composta pelas algas vermelhas, quase que exclusivamente pluricelulares e marinhas (99%). São particularmente abundantes nas águas tropicais quentes, apesar de algumas espécies serem encontradas nas regiões mais frias do mundo (RAVEN *et al.*, 1992). A principal característica é a presença de um pigmento de natureza protéica em seus cloroplastos, a ficobilina, que mascara a cor da clorofila *a* e fornece às algas vermelhas sua cor característica (RAVEN *et al.*, 1992; VIDOTTI *et al.*, 2004). Esse pigmento é particularmente bem adaptado à absorção da luz verde e azul-esverdeada que penetra nas águas profundas, onde as algas vermelhas estão bem representadas (RAVEN *et al.*, 1992).

As Rhodophyta se caracterizam por apresentar principalmente talos em formas filamentosas e laminares, com grande variação de tamanho (CORREIA *et al.*, 2005). As paredes celulares da maioria das algas vermelhas incluem um componente interno rígido, que pode ser celulose ou outro polissacarídeo, e uma matriz mucilaginosa, geralmente um polímero de galactose sulfatada, tal como ágar ou carragenana. É esta matriz mucilaginosa que confere às algas vermelhas a flexibilidade e a textura escorregadia, características deste grupo (RAVEN *et al.*, 1992). A carragenana, inclusive, representa um componente importante de interesse econômico, uma vez que pode ser utilizada na fabricação de alimentos como iogurtes, sorvetes, achocolatados, embutidos (salsichas, presuntos), gelatinas e geléias. Ela também é utilizada como emulsificante e estabilizante e sua aplicação substitui o amido e a gordura na preparação de certos produtos alimentícios, com a vantagem de não ser energética, não ter cheiro, cor ou sabor. O ágar também representa um produto de importância econômica, uma vez que é utilizado na fabricação de gomas, cápsulas de vitaminas ou como meio de cultura para uso em laboratórios de microbiologia (VIDOTTI *et al.*, 2004).

As algas vermelhas constituem dentre as macroalgas o grupo com maior diversidade de espécies, incluindo aproximadamente 6000 táxons (WAALAND *et al.*, 2004). No litoral brasileiro, o número de espécies de algas vermelhas tende a ser maior do que o número de espécies de algas verdes e pardas somadas (LOURENÇO & MARQUES JÚNIOR, 2002).

1.4.2 Ochrophyta

Nesta divisão estão inseridas as algas pardas ou marrons, devido à coloração que apresentam, cujos cromóforos contêm clorofila *a* e *b*, β -caroteno e pelo menos seis xantofilas, sendo as fucoxantinas as mais características (JOLY, 1976). Os compostos majoritários que formam as algas pardas são os ácidos graxos e seus derivados (LHULLIER, 2005).

As Ochrophyta são organismos quase que exclusivamente marinhos (exceto por três gêneros bastante raros que vivem em água doce). Ocorrem em sua maioria nos mares de águas frias, embora certos gêneros sejam encontrados exclusivamente em águas tropicais (JOLY, 1976). Nos ambientes marinhos costumam colonizar a região infralitoral e áreas com maior profundidade, porém, necessitam de grande intensidade de luz solar para realizarem a fotossíntese (CORREIA *et al.*, 2005).

As algas pardas variam de tamanho, desde formas microscópicas até as maiores algas marinhas conhecidas, denominadas *kelps*, as quais podem atingir mais de 60 metros de comprimento (RAVEN *et al.*, 1992). Os *kelps* gigantes produzem um material intracelular mucilaginoso, denominado ácido algínico, cujas propriedades coloidais são aproveitadas, por exemplo, como estabilizante e emulsificante de alguns alimentos e tintas e na preparação de pomadas e suspensões (RAVEN *et al.*, 1992; VIDOTTI *et al.*, 2004).

1.4.3 Chlorophyta

Esta divisão inclui as algas verdes, caracterizadas pela presença de pigmentos verdes característicos nos seus cloroplastos: clorofila *a* e *b*, xantofilas e caroteno (JOLY, 1967). Os carotenóides produzidos são utilizados como proteção contra a luz intensa (RAVEN *et al.*, 1992). Constituem o grupo mais diversificado de todas as algas, tanto na morfologia quanto no histórico de vida, apresentando aspectos arredondados e laminares e talos com diversas aparências. São extremamente abundantes nos ambientes aquáticos, podendo habitar águas doces ou salgadas. Também são

encontradas em solos úmidos ou troncos (PAULERT, 2005) e ainda sobre a neve (RAVEN *et al.*, 1992).

Apenas 10% das algas verdes ocorrem em ambientes marinhos. Apesar disso, essas algas não são raras no mar e alguns gêneros como, por exemplo, *Ulva* e *Codium* são amplamente distribuídos em ambientes costeiros de todo o mundo (LOURENÇO & MARQUES JÚNIOR, 2002). Nos ambientes marinhos, colonizam principalmente a região entre-marés e áreas com pouca profundidade, uma vez que possuem pigmentos específicos os quais requerem luz em quantidades superiores em relação aos pigmentos presentes nas algas de outras divisões. Entretanto, podem ocorrer até profundidades maiores, pois a distribuição vertical dessas algas está diretamente relacionada com a incidência da luz solar e inversamente proporcional à turbidez da água (WAALAND *et al.*, 2004).

As algas verdes são conhecidas por sua capacidade de se desenvolver em ambientes com condições adversas, apresentando-se muitas vezes como espécies dominantes em ambientes sujeitos a variações extremas de salinidade. As Chlorophyta também podem ser encontradas em áreas sob impacto de poluição e, particularmente, em ambientes eutrofizados (LOURENÇO & MARQUES JÚNIOR, 2002).

As algas verdes são comumente utilizadas como alimento devido ao alto conteúdo de vitaminas, β -caroteno e minerais (FLEURENCE, 1999). *Ulva* sp. e *Enteromorpha* sp., por exemplo, são consumidas em países asiáticos e, na França, receberam autorização para consumo humano como vegetais (PAULERT, 2005).

1.5 MACROALGAS MARINHAS E SEU POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Mais de 70% da superfície do planeta é coberta pelos oceanos. Além disso, sabe-se que a vida na Terra teve sua origem no mar. Alguns cientistas afirmam que em alguns ecossistemas marinhos como, por exemplo, nos recifes de coral e nas planícies abissais, a diversidade biológica é maior se comparada às florestas tropicais (HAEFNER, 2003). A evolução e a sobrevivência destas espécies resultaram em

organismos que produzem substâncias únicas com funções ecológicas e fisiológicas diversas (PINTO *et al.*, 2002).

A imensa diversidade biológica encontrada no mar leva a crer que exista uma variedade igualmente grande de produtos naturais ainda desconhecidos produzidos por organismos marinhos, com atividades biológicas que podem ser úteis para a produção de fármacos com grande eficácia e específicos para o tratamento de diversas patologias humanas (HAEFNER, 2003).

Os organismos aeróbios, desde as cianobactérias até o homem, desenvolveram uma série de mecanismos fisiológicos e biomoleculares de defesa contra os efeitos das espécies reativas do oxigênio. Nas células de organismos fotossintetizantes, esses mecanismos estão mais fortemente desenvolvidos em comparação a outras células, uma vez que as membranas fotossintéticas (tilacóides) são alvo primário para os efeitos deletérios oxidativos, por conterem lipídios não saturados como elementos estruturais majoritários (ROCHA, 2007).

As algas marinhas estão sempre submetidas a condições ambientais extremas como, por exemplo, deficiência de nutrientes, alta salinidade, seca, temperaturas extremas, rápidas variações de intensidade luminosa, radiação UV e concentração de O₂ e CO₂ ao longo da coluna de água (LANGEBARTELS *et al.*, 2002). Isso afeta o metabolismo desses organismos fotossintetizantes, podendo resultar em estresse oxidativo com produção de radicais livres e peroxidação lipídica. As macroalgas podem responder a esse estresse com um aumento na produção de diferentes antioxidantes, como mecanismo de defesa, para proteger o cloroplasto das espécies reativas do oxigênio e, assim, poderem sobreviver (NISHIDA, 1996; MATSUKAWA *et al.*, 1997; SHARMA & DAVIS, 1997). A existência de sistemas de proteção antioxidantes em macroalgas pode ser confirmada, por exemplo, pela ausência de danos oxidativos nos seus componentes estruturais (NAHAS *et al.*, 2007). O fato de algumas algas secas poderem ser estocadas por um longo período sem o perigo de deterioração oxidativa, despertou o interesse dos pesquisadores em relação ao mecanismo antioxidante presente nesses organismos (FUJIMOTO & KANEDA, 1980).

Muitos produtos naturais isolados de algas e animais marinhos têm apresentado atividades promissoras para o uso como antioxidantes naturais em fármacos ou na

indústria alimentícia (ANGGADIREDDA *et al.*, 1997; TAKAMATSU *et al.*, 2003). Vários pesquisadores têm mostrado que nutrientes e produtos naturais que apresentam atividade antioxidante possuem, inclusive, grande potencial antitumoral (AHERNE & O'BRIEN, 2000; CALLISTE *et al.*, 2001; MENSAH *et al.*, 2001; CAI *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004).

O interesse inicial pelo estudo de substâncias com atividade antioxidante em algas surgiu no Japão, na busca de novos aditivos para alimentos, em substituição àqueles antioxidantes sintéticos, como o BHA e o BHT, os quais apresentaram efeitos carcinogênicos, alterações enzimáticas e lipídicas em animais (WANG *et al.*, 2008).

As algas vermelhas são as principais produtoras de metabólitos secundários biologicamente ativos, cuja principal característica é a síntese de substâncias halogenadas. Dentre os produtos naturais produzidos pelas algas vermelhas, destacam-se os bromofenóis encontrados em *Polysiphonia urceolata*, os quais possuem reconhecida atividade antioxidante (LI *et al.*, 2007).

As algas pardas constituem o grupo taxonômico mais conhecido em termos de química de produtos naturais, sendo caracterizado pela presença de polifenóis e hidrocarbonetos voláteis e por seus esteróis e carotenóides (TEIXEIRA, 2002). Dentre os metabólitos isolados de algas pardas, alguns também são conhecidos por possuir potencial antioxidante como, por exemplo, taondiol, isoepitaondiol, stypodiol, stypoldione, sargaquinone e sargaol (NAHAS *et al.*, 2007).

As algas verdes têm sido as menos estudadas dentre as macroalgas no que diz respeito a produtos naturais. Seu rápido crescimento, com grandes populações estabelecidas, tem sido apontado como o principal fator que estrategicamente conduziu a não produção de defesas químicas de grande número dos seus representantes (TEIXEIRA, 2002). Apesar disso, estudos já comprovaram a presença de produtos naturais com atividade antioxidante em algumas espécies como, por exemplo, *Ulva pertusa*, que atribui tal atividade a polissacarídeos presentes em sua composição (HUIMIN *et al.*, 2006).

1.6 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antioxidante de extratos brutos de macroalgas marinhas do litoral brasileiro.

1.7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a)** Avaliar o potencial antioxidante dos metabólitos presentes nos extratos brutos das macroalgas coletadas, através dos métodos de seqüestro de radicais DPPH e do sistema β -caroteno/ácido linoléico;
- b)** Avaliar o conteúdo fenólico total presente nos extratos brutos das macroalgas;
- c)** Determinar o perfil químico dos extratos brutos de diferentes espécies de macroalgas marinhas;
- d)** Identificar as substâncias majoritárias presentes nos extratos ativos;
- e)** Contribuir para o conhecimento sobre produtos naturais de macroalgas do litoral brasileiro, em relação a sua caracterização química e atividade biológica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CARACTERIZAÇÃO DOS LOCAIS DE COLETA

As macroalgas foram coletadas no litoral do Paraná (Praia do Limoeiro), no litoral do Rio de Janeiro (Praia Rasa, Praia do Forno e Praia dos Cavaleiros) e no litoral do Espírito Santo (Praia de Ubu), conforme Figura 1.

Segundo OLIVEIRA *et al.* (2001), os locais onde foram realizadas as coletas das macroalgas marinhas para o presente trabalho, podem ser enquadrados dentro de duas diferentes zonas de agregados ficoflorísticos:

- **Zona nordeste-oriental:** seus limites compreendem a costa oeste do Ceará e o norte do Rio de Janeiro. Essa região abriga a flora mais diversificada do país e é caracterizada por águas oligotróficas e abundância de substratos duros propícios ao crescimento de algas bentônicas.
- **Zona sudeste:** estendendo-se de Cabo Frio (RJ) até a Ilha Bela (SP). Porém, não há razões significativas para não estender esta área até o sul da Ilha de Santa Catarina. Esta região se caracteriza por sua grande disponibilidade de substrato rochoso, tanto na borda continental, recortada por inúmeras baías e enseadas, com praias pequenas separadas por esporões rochosos, como também nas numerosas ilhas e ilhotes que ocorrem na região. A flora é rica, embora menos diversificada que a da zona anterior. Nesta região a vegetação mais exuberante fica restrita à zona das marés e até uns poucos metros (5-10 metros) abaixo do nível 0.0. Dentro desta zona talvez fosse conveniente reconhecer mais um enclave, geograficamente muito limitado, representado pela ocorrência de áreas sujeitas regularmente ao afloramento de águas frias durante o verão na região de Cabo Frio.

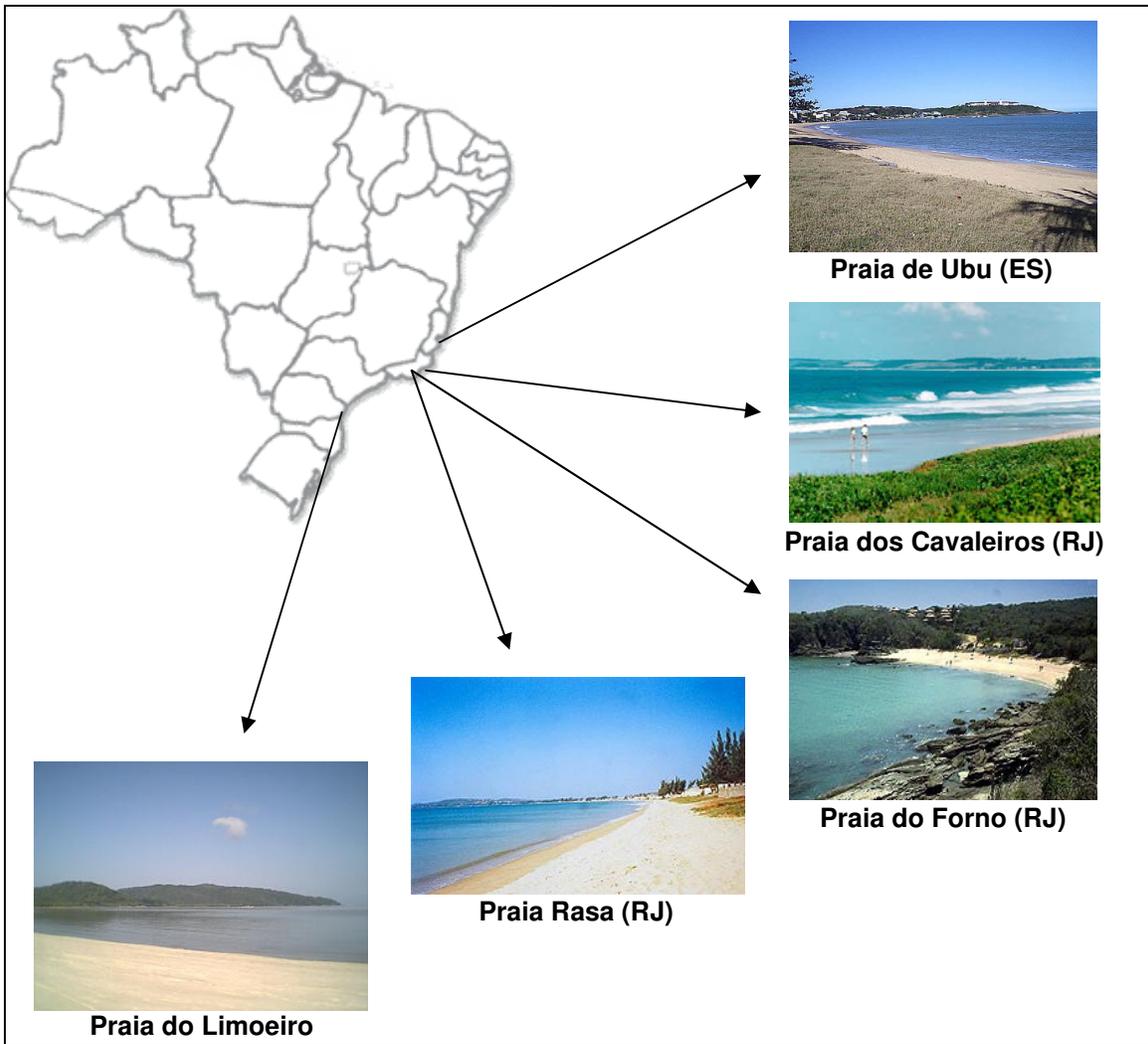


FIGURA 1: LOCALIZAÇÃO DAS PRAIAS DE COLETA

2.2 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

As macroalgas foram coletadas manualmente, entre a faixa de 30 cm e 1,5 m de profundidade, através de mergulho de apnéia. Conforme demonstrado na Tabela 1, as coletas foram realizadas nos dias 16 de novembro de 2006 na Praia dos Cavaleiros - cidade de Macaé, litoral norte do Rio de Janeiro; no dia 18 de novembro na Praia do Forno e nos dias 18 de novembro e 13 de dezembro de 2006 na Praia Rasa - ambas localizadas em Búzios, Rio de Janeiro; no dia 04 de janeiro de 2007 na Praia do Limoeiro - Ilha do Mel, Paraná e no dia 10 de janeiro de 2007 na Praia de Ubu - em Anchieta, Espírito Santo.

TABELA 1: LOCAIS E DATAS DE COLETA

		16 Nov 2006	18 Nov 2006	13 Dez 2006	04 Jan 2007	10 Jan 2007
Macaé (RJ)	Praia dos Cavaleiros					
Búzios (RJ)	Praia do Forno					
	Praia Rasa					
Ilha do Mel (PR)	Praia do Limoeiro					
Anchieta (ES)	Praia de Ubu					

Os locais de coleta foram escolhidos por apresentarem reconhecida diversidade e/ou abundância de macroalgas. Porém, a coleta do material ficológico não seguiu nenhum desenho amostral pré-determinado. Foram coletadas algas de substrato rochoso (Praias dos Cavaleiros, do Forno e de Ubu) e arenoso (Praias Rasa e do Limoeiro), em quantidade visivelmente suficiente para que cada espécie apresentasse uma biomassa mínima requerida para a preparação dos extratos.

Após a coleta, as macroalgas foram mantidas em água do mar e conservadas em caixas de isopor. O material foi transportado em seguida para o laboratório do GPNOA (Grupo de Produtos Naturais de Organismos Aquáticos), no Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Sócio-Ambiental de Macaé (NUPEM/UFRJ), onde as algas

foram triadas e separadas de sedimento, epífitas e fauna acompanhante, sendo, em seguida, colocadas sobre papel absorvente para drenar o excesso de água.

Para a identificação taxonômica, exemplares do material triado foram separados e analisados pela Prof^a. Dr^a. Lísia Mônica Gestinari (NUPEM/UFRJ). As exsiccatas de todas as espécies coletadas foram depositadas na Coleção do Herbário do Instituto de Biologia da UFRJ.

2.3 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS (EBs)

Todos os espécimes foram secos separadamente à sombra e em temperatura ambiente (para evitar fotólise e termodegradação dos metabólitos). As algas verdes pertencentes ao gênero *Codium* foram secas separadamente com o auxílio de um liofilizador. O material seco foi triturado com a ajuda de um liquidificador para uso doméstico, a fim de aumentar sua superfície de contato com os solventes e melhorar a eficiência das extrações. Em seguida, todo o material triturado foi pesado para posterior cálculo de seu rendimento, de acordo com a equação:

$$\text{Massa Inicial EB} \text{ --- } 100 \%$$
$$\text{Massa Final EB} \text{ --- } x \%$$

Para a obtenção dos extratos brutos, foi adicionada uma mistura dos solventes orgânicos diclorometano (CH_2Cl_2) e metanol (MeOH), na proporção 1:1, aos frascos contendo os materiais triturados. O uso desses solventes na preparação dos extratos seleciona dentre todas as substâncias presentes nas macroalgas aquelas com média polaridade ou apolares (lipofílicas), como, por exemplo, terpenóides e acetogeninas, já descritas na literatura como moléculas antioxidantes.

O volume dos solventes utilizados nas extrações de cada espécie não foi pré-determinado. Ele deveria ser o suficiente para encobrir todo o material triturado dentro do frasco. Após adicionada a mistura de solventes ao material, os frascos foram

conservados em geladeira por três dias a fim de evitar a evaporação dos solventes e a degradação dos produtos. Após esse período, o conteúdo de cada frasco foi filtrado, com o auxílio de algodão para reter as partículas residuais. Os procedimentos de extração das macroalgas e filtração foram repetidos quatro vezes para cada espécie, sempre utilizando o mesmo volume de solvente utilizado inicialmente. Após a última filtração, os solventes foram completamente evaporados em capela e o material seco (extrato bruto) foi pesado para o cálculo de rendimento.

2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

2.4.1 Método do seqüestro de radicais DPPH

O potencial antioxidante de todas as amostras foi determinado, inicialmente, de acordo com o método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), que é um radical livre estável na forma sólida, solúvel em solventes polares (etanol e metanol) e pode ser obtido através da oxidação da difenilpicrilidrazina, conforme apresentado na Figura 2:

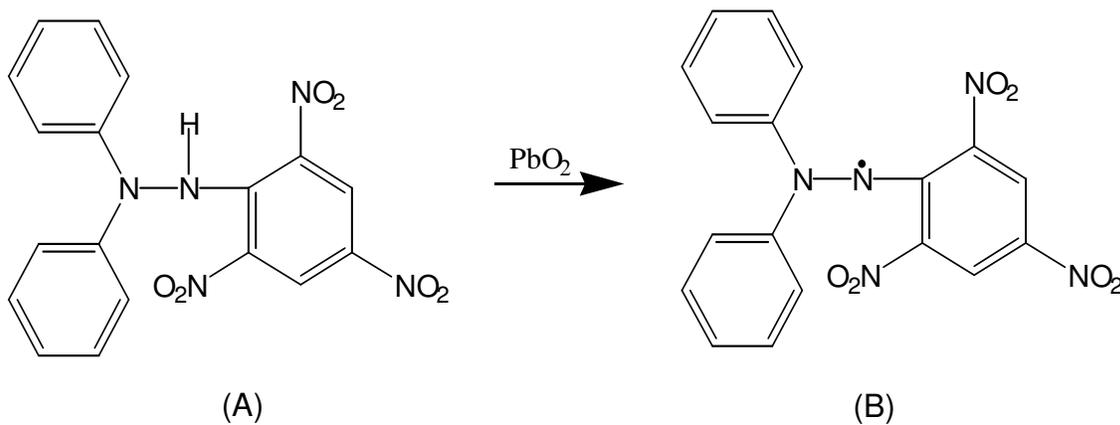


FIGURA 2: REAÇÃO DE OBTENÇÃO DO DPPH (B) ATRAVÉS DA OXIDAÇÃO DA DIFENILPICRILIDRAZINA (A)

O ensaio com o DPPH foi sumarizado e introduzido nos anos 50 por Marsden Blois (BLOIS, 1958) e vem sendo utilizado até hoje, por ser um método eficiente e prático para a avaliação da atividade antioxidante. O DPPH, quando em solução, apresenta coloração violeta com forte absorção em torno de 515 - 517 nm e apresenta

paramagnetismo, conferido pelo elétron desemparelhado. Assim, ao receber um elétron ou um radical hidrogênio, seu elétron passa a ser pareado, tornando-se uma molécula diamagnética. O princípio dessa metodologia é baseado na mudança de coloração da solução com DPPH, que de violeta se torna amarelada, devido ao seqüestro do radical pela substância antioxidante. A descoloração resultante está relacionada estequiometricamente com o número de elétrons aceito. Dessa forma, pode-se avaliar a capacidade redutora ou antiradical de substâncias, sintéticas ou naturais, com potencial para serem usadas como antioxidantes, através da interação com o DPPH, resultando na formação irreversível do produto hydrogenado (hidrazina), que é incolor. Em suma, a atividade antioxidante da amostra é determinada através da capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras em seqüestrar o radical estável DPPH.

Para a realização do ensaio utilizando o DPPH as amostras foram analisadas de forma qualitativa e quantitativa.

2.4.1.1 Análise Qualitativa

Para as análises qualitativas, os extratos foram analisados inicialmente por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando como agente revelador uma solução preparada com etanol e DPPH na concentração de 200 µg/mL. As cromatoplasmas referentes a essa análise foram organizadas em algas vermelhas, pardas e verdes. Como padrões positivos, foram utilizados a quercetina (Merck), o ácido gálico (Merck) e a preparação farmacêutica do extrato de *Gingko biloba* (Tanakan), os quais seguiram os mesmos procedimentos de aplicação, eluição e revelação da caracterização química dos extratos (item 2.6). Em seguida, as cromatoplasmas foram aquecidas em estufa a 60°C por aproximadamente cinco minutos. O princípio das cromatoplasmas reveladas com uma solução contendo DPPH é o mesmo seguido pela caracterização química, a qual utiliza outros reveladores. Na presença de substâncias com propriedades antioxidantes nos extratos aplicados nas cromatoplasmas, a coloração violeta desaparece, tornando-se visivelmente amarelada.

2.4.1.2 Análise Quantitativa

A análise quantitativa para a avaliação da atividade antioxidante foi realizada utilizando a reação com o DPPH na mesma concentração citada na análise qualitativa (200 µg/mL). Todos os extratos foram solubilizados em etanol e avaliados em três concentrações diferentes: 1,0; 0,1 e 0,01 mg/mL. Os padrões positivos utilizados foram a quercetina (Merck), o ácido gálico (Merck) e a preparação farmacêutica do extrato de *Gingko biloba* (Tanakan), também nas concentrações citadas acima. O branco utilizado foi preparado com etanol puro. Para cada diluição, os testes foram realizados em triplicata. As amostras foram alocadas em uma microplaca de poliestireno com 96 cavidades (Figura 3) e homogeneizadas em mesa agitadora durante 1 hora.

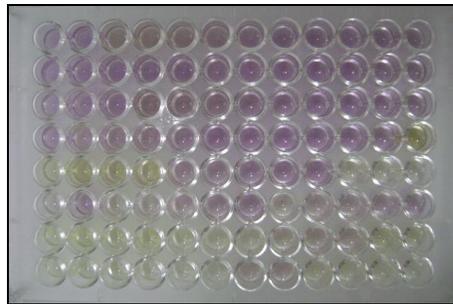


FIGURA 3: MICROPLACA COM 96 CAVIDADES

Para determinar as absorbâncias, foi utilizado um espectrofotômetro de ultravioleta com leitor de microplaca (Cary 50, Varian) (Figura 4) no comprimento de onda de 517 nm, no qual o radical difenilpicrilhidrazina apresenta o máximo de absorção.

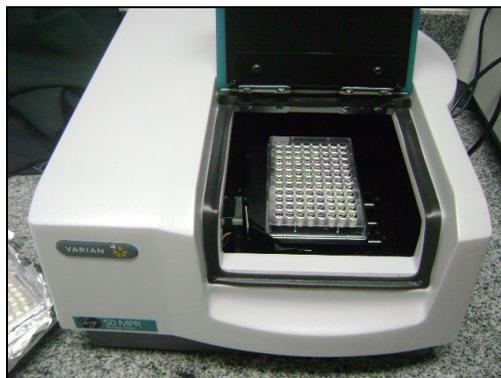


FIGURA 4: ESPECTROFOTÔMETRO DE UV

A expressão dos resultados foi dada através do cálculo da média das absorvâncias e o percentual de atividade antioxidante foi calculado segundo TAIT *et al.* (1996):

$$AA = (100 \times \Delta) / \text{controle}$$

Onde:

Δ = (controle – amostra),

controle = média das absorvâncias do DPPH,

amostra = média das absorvâncias das amostras de mesma espécie.

2.4.2 Sistema β -caroteno/Ácido Linoléico

O sistema de oxidação do β -caroteno/ácido linoléico foi originalmente descrito por MARCO (1968) e posteriormente modificado por MILLER (1971). Esse método avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. Ele está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico. Em outras palavras, esse sistema é capaz de determinar o potencial de uma amostra ou composto em proteger um substrato lipídico da oxidação.

Inicialmente foi preparada uma mistura reativa através da adição de 20 μ L de ácido linoléico, 200 mg de Tween 20, 25 μ L de solução de β -caroteno a 2,0 mg/mL em clorofórmio e 500 μ L de clorofórmio. Posteriormente, a mistura foi submetida à completa evaporação do clorofórmio. A esta mistura isenta de clorofórmio, adicionou-se 20 mL de água previamente saturada com oxigênio durante 30 minutos e agitou-se vigorosamente. Para determinar as absorvâncias, foram colocados em uma microplaca de 96 poços 250 μ L da mistura preparada e 10 μ L da amostra a 2,0 mg/mL em MeOH. Para o branco, foram utilizados 250 μ L da mistura e 10 μ L de MeOH. O padrão utilizado foi o BHT nas concentrações 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg/mL. As absorvâncias foram lidas através do espectrofotômetro de UV com leitor de microplaca (Cary 50, Varian) a 470 nm logo após a preparação das amostras (Abs_{inicial}) e após 17h de incubação a

45 °C (Abs_{final}). A incubação da microplaca a temperaturas elevadas acelera a reação de oxidação do sistema. Os resultados foram expressos como porcentagem, de acordo com a fórmula abaixo:

$$A_{am} = Abs_{inicial} - Abs_{final}$$

$$A_c = Abs_{inicial} - Abs_{final}$$

$$AA (\%) = 100 - [(A_{am} - A_c) \times 100]$$

Onde:

A_{am} = absorbância da amostra,
 A_c = absorbância do controle.

2.5 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL

O conteúdo fenólico total dos extratos brutos das macroalgas foi determinado de acordo com a análise colorimétrica de Folin-Ciocalteu (KARAGÖZLER, 2008). As amostras foram preparadas com 1,0 mg de extrato solubilizado em 1,0 mL de etanol. Uma alíquota de 30 μ L foi utilizada e a ela foram adicionados 4,6 mL de água destilada e em seguida 0,1 mL do reagente Folin- Ciocalteu. Após 3 minutos de repouso em local escuro, foram adicionados 0,3 mL de solução de carbonato de sódio a 2%. A curva padrão utilizada foi preparada com 7 diferentes concentrações de ácido gálico em etanol (10; 50; 100; 150; 200; 250; 300 μ g/mL). O branco utilizado foi preparado com etanol puro. O teste foi realizado em triplicata e, portanto, três alíquotas de cada amostra foram alocadas em uma microplaca de poliestireno com 96 cavidades e homogeneizadas, no escuro, em mesa agitadora durante 2 horas. Para a leitura das absorvâncias, foi utilizado um espectrofotômetro de ultravioleta com leitor de microplaca (Cary 50, Varian) no comprimento de onda de 760 nm. O conteúdo fenólico total dos extratos foi calculado a partir da equação de regressão da curva de calibração abaixo. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente por grama de extrato.

$$Abs_{760nm} = 0,0008 (\text{ácido gálico})_{mg} + 0,0001$$

2.6 ANÁLISE DOS PERFIS QUÍMICOS DOS EXTRATOS BRUTOS

A fim de caracterizar o perfil químico das diferentes espécies de macroalgas coletadas, todos os extratos brutos foram analisados pela técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se cromatoplasmas de sílica gel 60 F₂₅₄ em Alumínio, espessura 0,2 mm (Merck).

Para a análise por CCD, os extratos brutos foram alocados em três grupos: algas vermelhas, pardas e verdes. As placas foram eluídas em cubas com diferentes misturas de solventes: clorofórmio (CHCl₃)/acetato (AcOEt) 7:3; CHCl₃/AcOEt 8:2; CH₂Cl₂/AcOEt 8:2; CHCl₃ 100% e butanol:ácido acético:água (BAW) 8:1:1. A utilização de eluentes com diferentes polaridades visa encontrar o melhor sistema de eluição para as amostras visando a melhor separação dos diferentes constituintes nos extratos.

Após a eluição, as placas de CCD foram inicialmente analisadas através de inspeção sob lâmpadas de luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm. Em seguida, as placas foram borrifadas com diferentes reagentes reveladores e aquecidas sobre placa elétrica para ocorrer a reação cromogênica. O primeiro revelador utilizado foi uma solução preparada com 2% de sulfato cérico (CeSO₄) em ácido sulfúrico (H₂SO₄). Esse reagente é considerado um revelador universal, agindo pela oxidação do sulfato cérico e do ácido sulfúrico e revelando diferentes classes de substâncias como esteróides, terpenos e flavonóides (Figura 5). Posteriormente, foram utilizados três diferentes reveladores específicos: para identificar a presença de esteróides nos extratos, foi utilizada uma solução de 25% de ácido tricloroacético (TCA) como agente revelador; para a identificação de fenóis, foi utilizado o cloreto férrico e para a identificação de aminoácidos (Figura 5) e aminas, foi utilizada uma solução de ninhidrina em etanol a 2%.

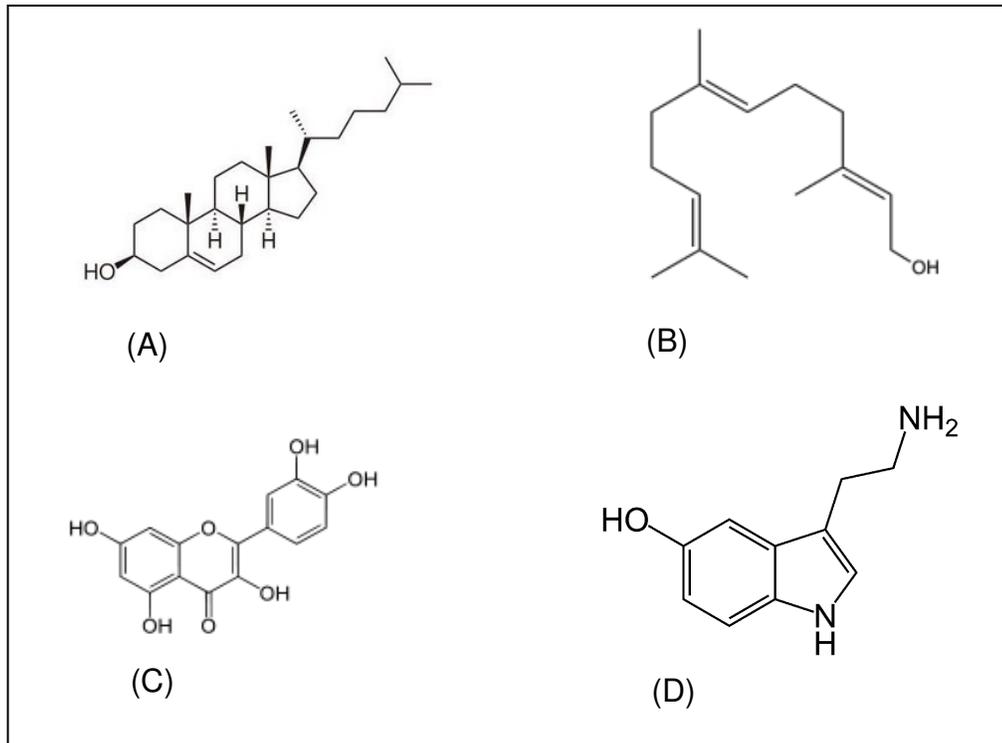


FIGURA 5: ESTRUTURAS QUÍMICAS DE ESTEROL (A), TERPENÓ (B), FLAVONÓIDE (C) E AMINOÁCIDO (D)

2.7 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS MAJORITÁRIAS DOS EXTRATOS BRUTOS SELECIONADOS

Os extratos brutos que obtiveram maior potencial antioxidante, de acordo com as análises qualitativas e quantitativas com o DPPH, foram selecionados para a análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^{13}C e ^1H . A análise por RMN permite identificar a classe química a qual a substância majoritária presente na amostra pertence.

2.8 FRACIONAMENTO DE EXTRATOS BRUTOS ATIVOS

Dentre os extratos com maior potencial antioxidante, duas espécies foram escolhidas para obtenção e identificação de produtos ativos. O fracionamento foi guiado por bioensaios. Os extratos das algas *Cryptonemia seminervis* e *Amansia* sp. foram

submetidos a uma partição líquido-líquido com diferentes solventes orgânicos. Quatro diferentes frações foram obtidas: fração em THF (solvente: Tetrahidrofurano), fração em acetato (solvente: acetato de etila), fração butanólica (solvente: butanol) e fração aquosa (solvente: água).

Após a evaporação dos solventes, todas as frações descritas acima foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando sulfato cérico como agente revelador, para a visualização dos seus perfis químicos. As frações que apresentaram perfil químico semelhante foram reunidas.

A partir da comparação entre os diferentes perfis químicos obtidos com a partição líquido-líquido, uma das frações se mostrou mais interessante quimicamente devido a sua alta concentração de substâncias. Tal fração foi, portanto, selecionada para se submeter à cromatografia em coluna preparativa (CC).

Inicialmente, a fração selecionada foi semipurificada através de sua filtração sobre sílica gel com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol). As frações resultantes da cromatografia em coluna foram recolhidas separadamente de acordo com as diferentes tonalidades de cor observadas na coluna. Em seguida, todas as frações obtidas na CC foram submetidas novamente à cromatografia em camada delgada (CCD) e aquelas que apresentaram perfis químicos semelhantes foram reunidas.

As frações resultantes do fracionamento das duas espécies selecionadas foram submetidas à análise qualitativa, por CCD, e quantitativa com o radical DPPH, para a avaliação da atividade antioxidante. A partir daí, foi possível inferir qual das frações era responsável pela atividade antioxidante verificada no extrato bruto.

A Figura 6 apresenta resumidamente todas as etapas seguidas neste projeto para avaliação do potencial antioxidante dos produtos naturais de macroalgas marinhas.

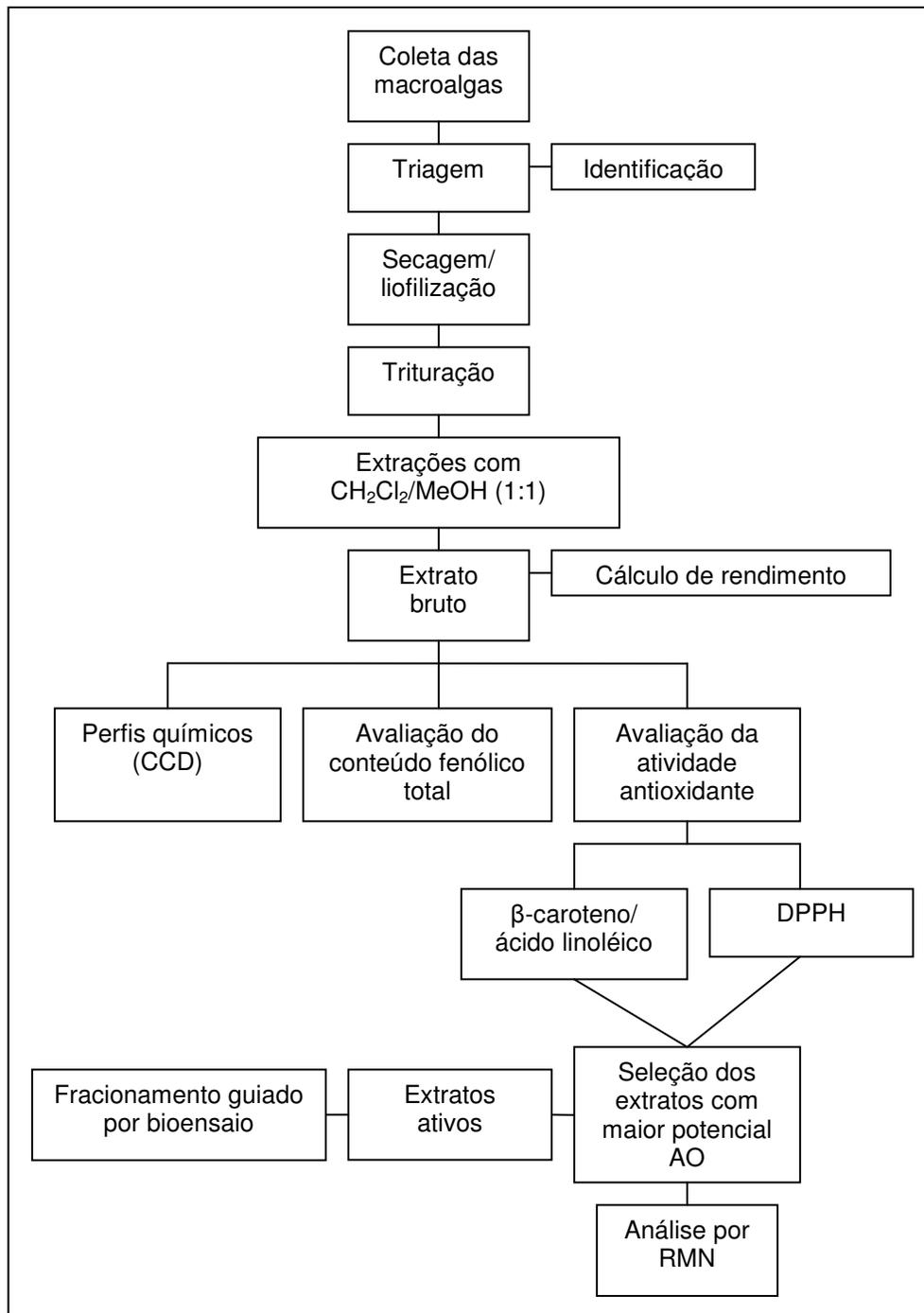


FIGURA 6: FLUXOGRAMA DAS METODOLOGIAS EMPREGADAS NO PRESENTE TRABALHO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estresse oxidativo pode ser apontado como um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento de inúmeras patologias em humanos, especialmente as cardiovasculares e o câncer (CHEW *et al.*, 2008). Atualmente, a terapia com substâncias antioxidantes, que atuam diminuindo ou inibindo a oxidação dos lipídios e outras moléculas, bloqueando o início ou a propagação de reações oxidativas em cadeia, vem se mostrando bastante eficiente (TIWARI, 2001). Dados na literatura correlacionam a atividade antioxidante de plantas com características antiinflamatórias das mesmas (SADIQUE *et al.*, 1987; RECIO *et al.*, 1995). Assim sendo, organismos contendo substâncias com atividade antioxidante, a exemplo das algas deste estudo, poderiam inclusive ser utilizadas na terapia de processos antiinflamatórios. Além disso, vários pesquisadores têm mostrado que nutrientes e produtos naturais que apresentam atividade antioxidante possuem também grande potencial antitumoral (CAI *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004; CALLISTE *et al.*, 2001; MENSAH *et al.*, 2001; AHERNE & O'BRIEN, 2000).

FUJIMOTO & KANEDA publicaram em 1980 os primeiros estudos avaliando a atividade antioxidante de produtos naturais produzidos por macroalgas marinhas (FUJIMOTO & KANEDA, 1980). Neste período, dezenas de metabólitos foram isolados e tiveram as suas atividades como antioxidantes descritas (NOMURA *et al.*, 1997; RUBERTO *et al.*, 2001; KANG *et al.*, 2004).

Com o objetivo de avaliar a atividade antioxidante dos produtos naturais produzidos por diversas espécies de macroalgas marinhas do litoral brasileiro, seus extratos brutos com polaridade intermediária foram testados através do método de seqüestro de radicais DPPH e do sistema β -caroteno/ácido linoléico. Para o presente estudo, foram coletadas 26 espécies de macroalgas marinhas bentônicas em cinco diferentes praias do litoral brasileiro, no período entre novembro de 2006 e janeiro de 2007 (Tabela 2).

TABELA 2: PERÍODO, LOCAIS DE COLETA E CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS ESPÉCIES DE MACROALGAS ESTUDADAS

Local de coleta	Data de coleta	Espécie coletada	Ordem	Divisão
Praia dos Cavaleiros (Macaé-RJ)	16/11/2006	<i>Caulerpa mexicana</i>	Bryopsidales	Chlorophyta
		<i>Colpomenia sinuosa</i>	Scytosiphonales	Ochrophyta
Praia do Forno (Búzios-RJ)	18/11/2006	<i>Plocamium brasiliense</i> (1)	Plocamiales	Rhodophyta
		<i>Hypnea musciformis</i>	Gigartinales	Rhodophyta
Praia Rasa (Búzios-RJ)	18/11/2006	<i>Gracilaria</i> sp.	Gracilariales	Rhodophyta
		<i>Plocamium brasiliense</i> (2)	Plocamiales	Rhodophyta
Praia Rasa (Búzios-RJ)	13/12/2006	<i>Plocamium brasiliense</i> (3)	Plocamiales	Rhodophyta
		<i>Amansia</i> sp.	Ceramiales	Rhodophyta
		<i>Osmundaria obtusiloba</i>	Ceramiales	Rhodophyta
		<i>Gracilaria dominguensis</i>	Gracilariales	Rhodophyta
		<i>Gracilaria cervicornis</i>	Gracilariales	Rhodophyta
		<i>Gracilaria cearensis</i>	Gracilariales	Rhodophyta
		<i>Spyridia clavata</i>	Ceramiales	Rhodophyta
		<i>Cryptonemia seminervis</i> (1)	Halymeniales	Rhodophyta
		<i>Callophyllis microdonta</i>	Gigartinales	Rhodophyta
		<i>Cryptonemia</i> sp.	Halymeniales	Rhodophyta
		<i>Cryptonemia seminervis</i> (2)	Halymeniales	Rhodophyta
		<i>Sargassum vulgare</i>	Fucales	Ochrophyta
		<i>Chondria</i> sp.	Ceramiales	Rhodophyta
		<i>Dictyota</i> sp.	Dictyotales	Ochrophyta
		<i>Codium taylorii</i>	Bryopsidales	Chlorophyta
<i>Codium decorticatum</i>	Bryopsidales	Chlorophyta		
Praia do Limoeiro (Ilha do Mel-PR)	04/01/2007	<i>Acanthophora spicifera</i>	Ceramiales	Rhodophyta
		<i>Pterocladiaella capillacea</i>	Gelidiales	Rhodophyta
		<i>Bostrychia tenella</i>	Ceramiales	Rhodophyta

Praia de Ubu (Anchieta-ES)	10/01/2007	<i>Dichotomaria marginata</i>	<i>Nemaliales</i>	Rhodophyta
		<i>Liagora farinosa</i>	<i>Nemaliales</i>	Rhodophyta
		<i>Padina gymnospora</i>	Dictyotales	Ochrophyta
		<i>Ulva fasciata</i>	Ulvales	Chlorophyta

Dentre as espécies coletadas, 18 foram classificadas como Rhodophyta, 4 como Ochrophyta e 4 como Chlorophyta. As espécies pertencentes à divisão Rhodophyta, portanto, representaram 70% do material coletado. Enquanto isso, as algas pardas, assim como as verdes, representaram cada uma apenas 15% do total de espécies coletadas (Figura 10).

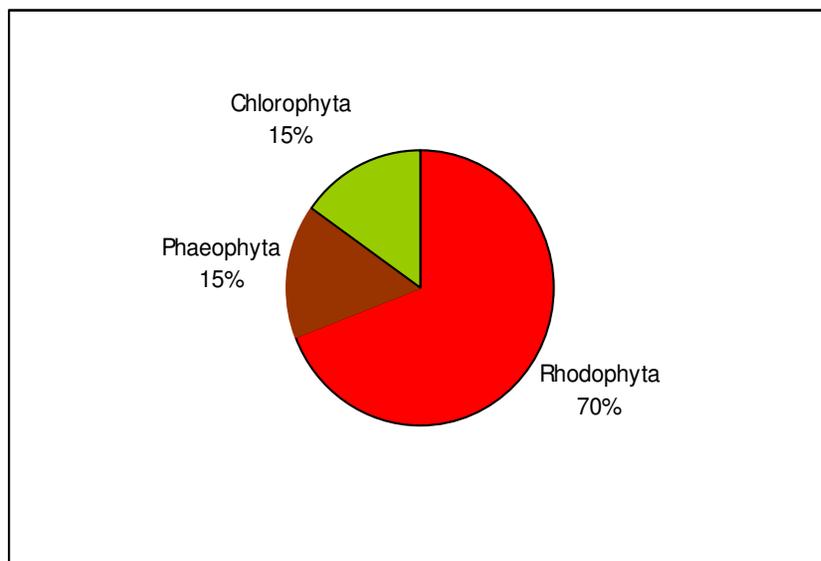


FIGURA 7: PORCENTAGENS DE MACROALGAS COLETADAS REFERENTES A CADA DIVISÃO

3.1 RENDIMENTO

Após as coletas, as algas foram triadas e secas à temperatura ambiente. O rendimento dos extratos brutos de cada espécie de macroalga foi expresso em porcentagem, de acordo com a fórmula já citada na metodologia. As espécies foram

agrupadas em algas vermelhas, pardas e verdes na Tabela 3 abaixo, de acordo com a sua pigmentação, com o objetivo de facilitar a visualização dos resultados.

TABELA 3: RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS DAS MACROALGAS

	Espécie	Rendimento
Algas Vermelhas	<i>Plocamium brasiliense</i> (1)	8, 52%
	<i>Plocamium brasiliense</i> (2)	14,74%
	<i>Plocamium brasiliense</i> (3)	*
	<i>Hypnea musciformis</i>	8,41%
	<i>Amansia sp.</i>	11,97%
	<i>Osmundaria obtusiloba</i>	10,96%
	<i>Gracilaria dominguensis</i>	9,12%
	<i>Gracilaria cervicornis</i>	7,48%
	<i>Gracilaria sp.</i>	6,41%
	<i>Gracilaria cearensis</i>	18,31%
	<i>Spyridia clavata</i>	7,35%
	<i>Acantophora spicifera</i>	7,21%
	<i>Cryptonemia seminervis</i> (1)	9,66%
	<i>Callophylis microdonta</i>	9,91%
	<i>Cryptonemia sp.</i>	8,54%
	<i>Cryptonemia seminervis</i> (2)	8,92%
	<i>Chondria sp.</i>	6,63%
	<i>Pterocladia capillacea</i>	7,93%
	<i>Bostrychia tenella</i>	4,29%
	<i>Dichotomaria marginata</i>	9,07%
<i>Liagora farinosa</i>	5,41%	
Algas Pardas	<i>Dictyota sp.</i>	9,00%
	<i>Colpomenia sinuosa</i>	7,29%
	<i>Sargassum vulgare</i>	8,72%
	<i>Padina gymnospora</i>	5,12%
Algas Verdes	<i>Caulerpa mexicana</i>	10,04%
	<i>Codium taylorii</i>	20,00%
	<i>Codium decortatum</i>	18,03%
	<i>Ulva fasciata</i>	5,81%

* Valor não calculado

O gráfico abaixo (Figura 11) representa o rendimento de cada espécie coletada, simplificando a apresentação dos resultados visualizados na tabela acima.

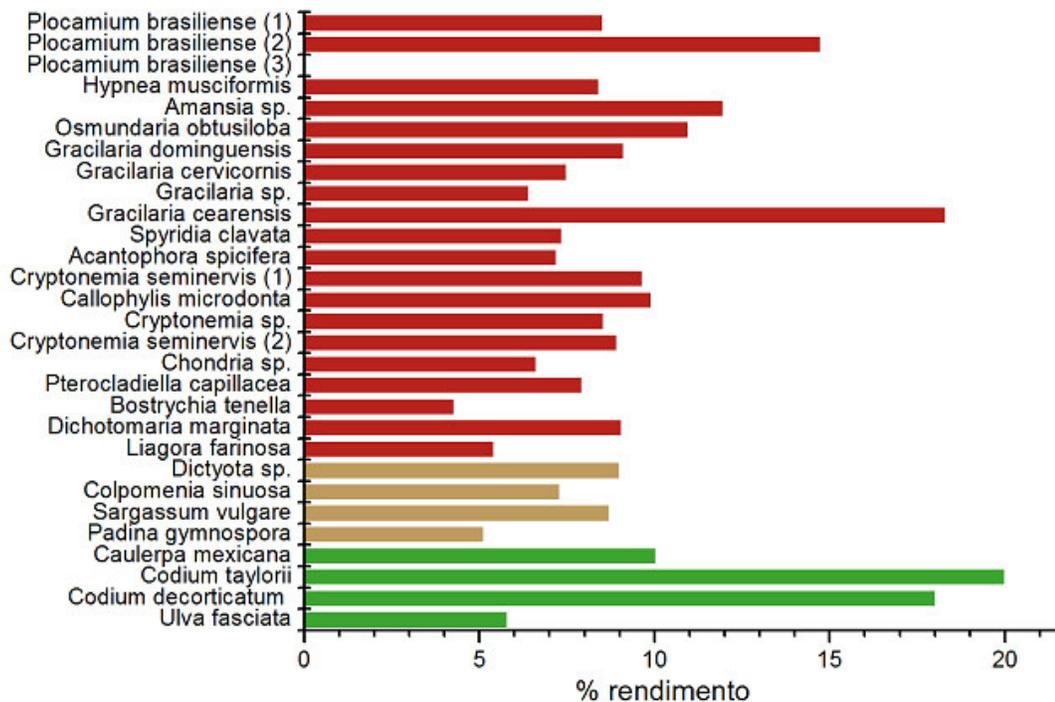


FIGURA 8: GRÁFICO REPRESENTANDO O RENDIMENTO DE CADA ESPÉCIE COLETADA

O resultado obtido através do cálculo de rendimento de cada espécie é essencial para entender a relação entre a biomassa coletada e a biomassa resultante após as extrações (extrato bruto).

Conforme a Tabela 3, as espécies que obtiveram maiores rendimentos foram as algas verdes *Codium taylorii*, com 20% e *Codium decorticatum*, com 18,03% e a alga vermelha *Gracilaria cearensis*, com 18,31%. O menor rendimento calculado foi atribuído à alga vermelha *Bostrychia tenella*, com 4,29%. Em média, as algas verdes apresentaram maiores rendimentos, em relação às algas vermelhas e pardas. Algumas algas pertencentes ao mesmo gênero mostraram significativa diferença de rendimento, como foi o caso de *Gracilaria* sp., que apresentou variação entre 6,41% e 18,31% e *Plocamium* sp., com rendimento entre 8,52% e 14,74%. Isso pode ter ocorrido devido a presença de água em alguns extratos ou ainda a erros durante a pesagem dos mesmos.

3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.2.1 Método do seqüestro de radicais DPPH

Para a avaliação da atividade antioxidante dos extratos brutos através do método do DPPH, foram realizados testes quantitativos e qualitativos. Os resultados quantitativos foram expressos em porcentagem. Tanto os resultados quantitativos quanto as cromatoplacas resultantes dos testes qualitativos também foram agrupados em algas vermelhas, pardas e verdes para melhor visualização e comparação dos resultados.

3.2.1.1 Análise Qualitativa

Os resultados da análise qualitativa da potencial atividade antioxidante consistem em cromatoplacas reveladas com DPPH. As áreas circuladas representam as áreas que foram descoloradas após a revelação, ou seja, correspondem à localização dos constituintes que atuaram como antioxidantes.

- **Algas vermelhas**

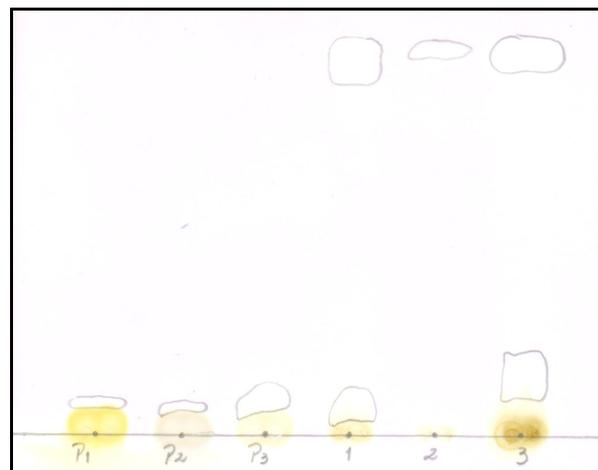


FIGURA 9: cromatoplaca (eluída em CH_2Cl_2 e revelada com solução de DPPH) correspondente aos padrões quercetina (P1); ácido gálico (P2); *Ginkgo biloba* (P3); e às algas *Plocamium brasiliense* 1 (1); *Plocamium brasiliense* 2 (2); *Plocamium brasiliense* 3 (3)

Na análise qualitativa realizada com o DPPH, os três padrões utilizados mostraram possuir constituintes de alta polaridade como os responsáveis por sua atividade antioxidante. O mesmo foi observado nos extratos de *P. brasiliense* (1) e *P. brasiliense* (3), onde podem ser observadas manchas descoloradas na parte inferior da cromatoplaca. A análise ainda revela a presença de substâncias apolares com atividade antioxidante, localizadas na parte superior da placa, nos três extratos de *P. brasiliense* analisados, conforme observado na Figura 12 acima. Apesar dos extratos de *Plocamium* analisados corresponderem à mesma espécie, é possível observar diferenças em suas constituições. Pode-se inferir, portanto, que a composição química de extratos correspondentes à mesma espécie pode variar de acordo com o local e data de coleta.

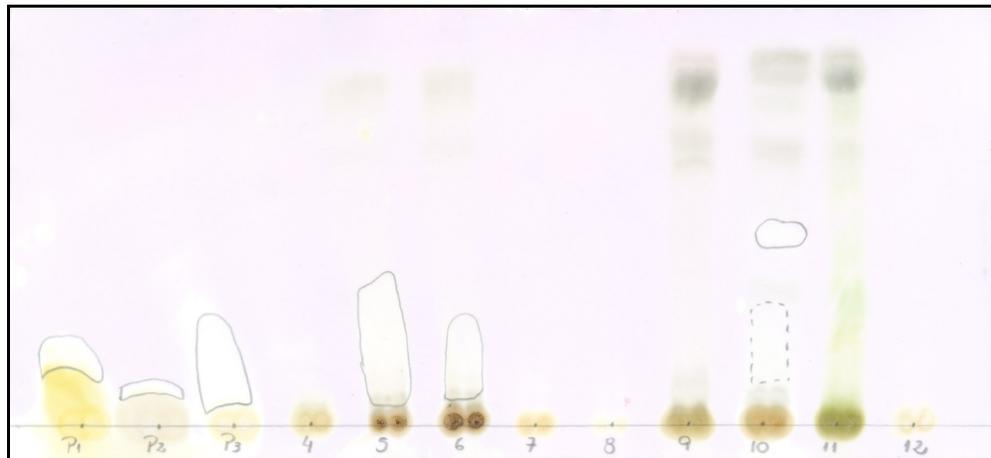


FIGURA 10: cromatoplaca (eluída em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 8:2 e revelada com solução de DPPH) correspondente aos padrões quercetina (P1); ácido gálico (P2); *Ginkgo biloba* (P3); e às algas *Hypnea musciformis* (4); *Amansia* sp. (5); *Osmundaria obtusiloba* (6); *Gracilaria dominguisensis* (7); *Gracilaria cervicornis* (8); *Gracilaria* sp. (9); *Gracilaria cearensis* (10); *Spyridia clavata* (11); *Acanthophora spicifera* (12)

Na cromatoplaca acima (Figura 13), os extratos que obtiveram resultado positivo quanto à atividade seqüestradora de radicais foram *Amansia* sp., *O. obtusiloba* e *G. cearensis*, todas atribuindo sua atividade antioxidante a constituintes de média polaridade. As demais espécies não apresentaram resultados positivos frente à análise qualitativa com o DPPH. Destaca-se aqui o extrato de *Amansia* sp., que apresentou uma grande banda com potencial antioxidante.

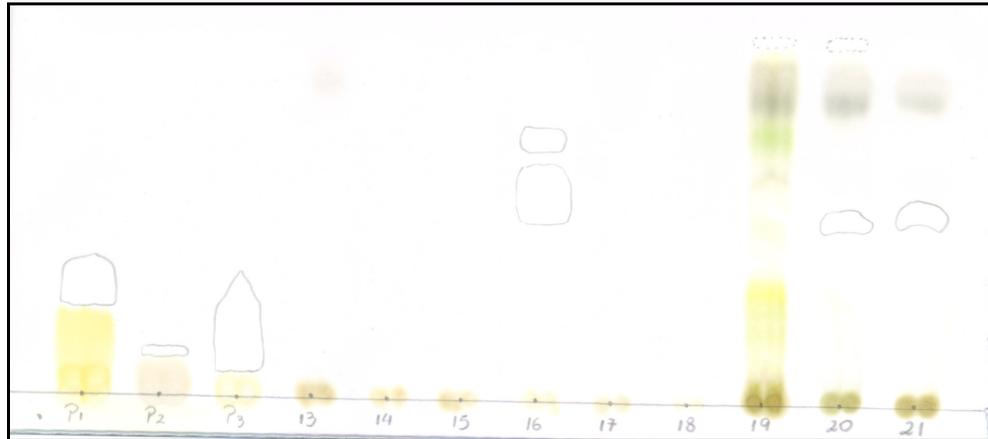


FIGURA 11: cromatoplaça (eluída em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 8:2 e revelada com solução de DPPH) correspondente aos padrões quercetina (P1); ácido gálico (P2); *Ginkgo biloba* (P3) e às algas *Cryptonemia seminervis* 1 (13); *Callophyllis microdonta* (14); *Cryptonemia* sp. (15); *Cryptonemia seminervis* 2 (16); *Chondria* sp. (17); *Pterocliadiella capillacea* (18); *Bostrychia tenella* (19); *Dichotomaria marginata* (20); *Liagora farinosa* (21)

Dentre as espécies de algas vermelhas analisadas pela CCD acima (Figura 14), *C. seminervis* (2), *B. tenella*, *D. marginata* e *L. farinosa* foram as únicas a apresentar atividade positiva frente à revelação com o DPPH. É possível inferir que tais espécies atribuem sua atividade antioxidante a constituintes de baixa polaridade, segundo a localização das bandas descoloradas.

- **Algas pardas**

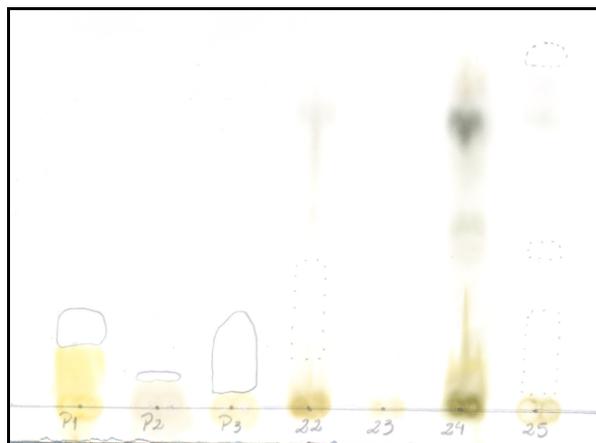


FIGURA 12: cromatoplaça (eluída em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 8:2 e revelada com solução de DPPH) correspondente aos padrões quercetina (P1); ácido gálico (P2); *Ginkgo biloba* (P3); e às algas *Dictyota* sp. (22); *Colpomenia sinuosa* (23); *Sargassum vulgare* (24); *Padina gymnospora* (25)

De maneira geral, as algas pardas praticamente não apresentaram atividade positiva, conforme demonstrado na CCD acima (Figura 15). Isso pode ter ocorrido devido à baixa concentração do extrato aplicado na origem da cromatoplaca ou mesmo à ausência de constituintes com propriedades antioxidantes em concentração detectável. Apenas os extratos das espécies *Dictyota* sp. e *P. gymnospora* apresentaram uma fraca descoloração (linhas pontilhadas) resultante da revelação com o DPPH. É possível relacionar a banda descorada em *Dictyota* sp. a algum constituinte de média polaridade, enquanto que as descolorações observadas em *P. gymnospora* podem ser relacionadas a constituintes de baixa, média e alta polaridade.

- **Algas verdes**

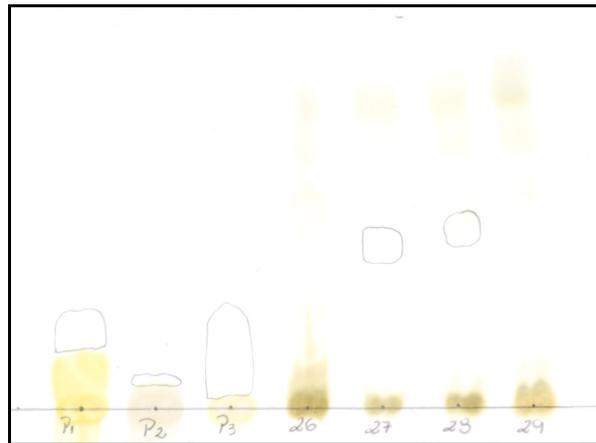


FIGURA 13: cromatoplaca (eluída em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 8:2 e revelada com solução de DPPH) correspondente aos padrões quercetina (P1); ácido gálico (P2); *Ginkgo biloba* (P3); e às algas *Caulerpa mexicana* (26); *Codium taylorii* (27); *Codium decortdatum* (28); *Ulva fasciata* (29)

As espécies *C. taylorii* e *C. decortdatum* foram as únicas dentre as algas verdes a apresentar atividade positiva na análise qualitativa observada acima (Figura 16). Os constituintes correspondentes à atividade antioxidante de ambas as espécies correspondem às descolorações localizadas na parte central da placa e, portanto, pode-se inferir que são substituintes de média a baixa polaridade.

De maneira geral, as algas vermelhas apresentaram melhores resultados nos testes para avaliação qualitativa da atividade antioxidante em relação às espécies verdes e pardas. Esse resultado contradiz diversos *screenings* já realizados com diversas espécies de macroalgas marinhas em busca de substâncias antioxidantes, os quais encontraram maior atividade antioxidante em extratos de algas pardas (FUJIMOTO & KANEDA, 1980; LE TUTOUR *et al.*, 1990; MATSUKAWA *et al.*, 1997).

De acordo com dados da literatura, a polaridade dos extratos de macroalgas marinhas pode estar correlacionada à sua atividade antioxidante. Em alguns trabalhos, a atividade seqüestradora de radicais de extratos de determinadas espécies de algas é atribuída a compostos menos polares (GUARATINI, 2008; NAHAS *et al.*, 2007). Porém, outros trabalhos verificaram que a atividade antioxidante de extratos e frações de macroalgas pode ser atribuída a compostos com maior polaridade, como por exemplo polissacarídeos (TEPE *et al.*, 2007; MATSUKAWA *et al.*, 1997). No presente trabalho, a atividade antioxidante dos extratos analisados pôde ser atribuída a compostos de diferentes polaridades, variando conforme a espécie.

3.2.1.2 Análise Quantitativa

A análise quantitativa da atividade antioxidante referente às macroalgas coletadas foi realizada com o radical DPPH e testou três diferentes concentrações para cada amostra. Os resultados foram expressos em porcentagem e estão apresentados na Tabela 4.

TABELA 4: atividade antioxidante (%) referente à análise pelo sistema de seqüestro de radicais DPPH

	Amostra	Concentração (mg/mL)	Atividade Antioxidante (%)
Padrões	Quercetina	1	81,51
		0,1	88,81
		0,01	89,78
	Ácido Gálico	1	93,51
		0,1	91,41
		0,01	90,43

	<i>Ginkgo biloba</i>	1	68,38
		0,1	84,43
0,01		86,70	
Algas Vermelhas	<i>Plocamium brasiliense (1)</i>	1	78,59
		0,1	64,49
		0,01	60,92
	<i>Plocamium brasiliense (2)</i>	1	55,24
		0,1	51,35
		0,01	45,51
	<i>Plocamium brasiliense (3)</i>	1	38,87
		0,1	46,97
		0,01	32,70
	<i>Hypnea musciformis</i>	1	54,59
		0,1	76,65
		0,01	76,81
	<i>Amansia sp.</i>	1	72,76
		0,1	76,32
		0,01	75,68
	<i>Osmundaria obtusiloba</i>	1	30,59
		0,1	64,32
		0,01	55,89
	<i>Gracilaria dominguensis</i>	1	40,32
		0,1	46,49
		0,01	40,16
	<i>Gracilaria cervicornis</i>	1	45,19
		0,1	46,32
		0,01	35,46
	<i>Gracilaria sp.</i>	1	11,46
		0,1	43,89
		0,01	29,95
	<i>Gracilaria cearensis</i>	1	73,08
		0,1	65,62
		0,01	46,16
<i>Spyridia clavata</i>	1	-	
	0,1	77,30	
	0,01	78,92	

Algas Vermelhas	<i>Acanthophora spicifera</i>	1	50,86
		0,1	33,84
		0,01	43,73
	<i>Cryptonemia seminervis (1)</i>	1	80,05
		0,1	76,65
		0,01	79,73
	<i>Callophyllis microdonta</i>	1	76,81
		0,1	51,68
		0,01	50,54
	<i>Cryptonemia sp.</i>	1	48,76
		0,1	50,22
		0,01	47,95
	<i>Cryptonemia seminervis (2)</i>	1	52,00
		0,1	57,35
		0,01	79,41
	<i>Chondria sp.</i>	1	39,35
		0,1	47,14
		0,01	52,00
	<i>Pterocladia capillacea</i>	1	57,51
		0,1	57,03
		0,01	51,35
	<i>Bostrychia tenella</i>	1	56,38
		0,1	64,65
		0,01	60,27
	<i>Dichotomaria marginata</i>	1	30,59
		0,1	33,68
		0,01	25,24
<i>Liagora farinosa</i>	1	17,95	
	0,1	31,41	
	0,01	40,49	
Algas Pardas	<i>Dictyota sp.</i>	1	77,78
		0,1	48,92
		0,01	44,38
	<i>Colpomenia sinuosa</i>	1	72,11
		0,1	47,78
		0,01	43,89

	<i>Sargassum vulgare</i>	1	37,73
		0,1	41,95
		0,01	46,49
	<i>Padina gymnospora</i>	1	28,32
		0,1	46,32
		0,01	34,32
Algas Verdes	<i>Caulerpa mexicana</i>	1	34,65
		0,1	38,70
		0,01	36,11
	<i>Codium taylorii</i>	1	45,03
		0,1	71,95
		0,01	36,59
	<i>Codium decorticatum</i>	1	-0,54
		0,1	34,81
		0,01	43,57
	<i>Ulva fasciata</i>	1	58,00
		0,1	34,97
		0,01	33,51

Todos os resultados superiores a 60% foram considerados com potencial antioxidante.

Dentre todos os extratos analisados, apenas 13 foram considerados relevantes em pelo menos uma das concentrações utilizadas. Merecem destaque as espécies *Plocamium brasiliense* (1), *Amansia* sp. e *Cryptonemia seminervis* (1) por terem apresentado significativo potencial antioxidante nas três concentrações testadas.

Nenhuma das espécies analisada obteve resultado superior aos padrões quercetina e ácido gálico, nas três concentrações testadas e *Ginkgo biloba*, nas concentrações 0,1 e 0,01 mg/mL. Sabe-se, porém, que os padrões utilizados são substâncias puras e, por isso, podem realmente apresentar atividade antioxidante superior em relação a um extrato bruto, que é constituído por diversos compostos. Apesar da atividade antioxidante dos extratos ser menor em comparação aos padrões, alguns deles demonstraram resultados muito satisfatórios, com valores superiores a 76% de inibição do radical DPPH em pelo menos uma das concentrações testadas,

como *Cryptonemia seminervis* (1), *Cryptonemia seminervis* (2), *Spyridia clavata*, *Plocamium brasiliense* (1), *Dictyota* sp., *Hypnea musciformis*, *Callophylis microdonta* e *Amansia* sp. Todas essas espécies apresentam alto potencial para a continuidade de pesquisas que abordam a atividade antioxidante, mas apenas duas delas foram escolhidas para o fracionamento visando o isolamento e identificação dos metabólitos secundários: *C. seminervis* e *Amansia* sp.

Os extratos brutos que apresentaram baixos resultados percentuais quanto à atividade antioxidante analisada através do método do DPPH possuem, provavelmente, baixa concentração de substâncias capazes de doar elétrons para o radical DPPH, o que pode ser resultado da degradação na obtenção dos extratos ou mesmo da ausência de moléculas com esta atividade.

Todas as espécies que apresentaram resultados relevantes na análise quantitativa, com exceção de *Spyridia clavata* e *Colpomenia sinuosa*, haviam também apresentado atividade positiva na análise qualitativa da atividade antioxidante. Em contrapartida, muitas espécies que apresentaram atividade positiva na análise qualitativa, não apresentaram porcentagem relevante na análise quantitativa. Isso pode ser atribuído às concentrações utilizadas na análise quantitativa, as quais podem não ter detectado a atividade antioxidante dos extratos por estarem abaixo do mínimo requerido para esse tipo de análise.

O gráfico abaixo (Figura 17) simplifica a apresentação dos resultados, através da exibição da porcentagem média da atividade antioxidante de cada espécie, calculada a partir dos valores correspondentes às três concentrações avaliadas para cada amostra.

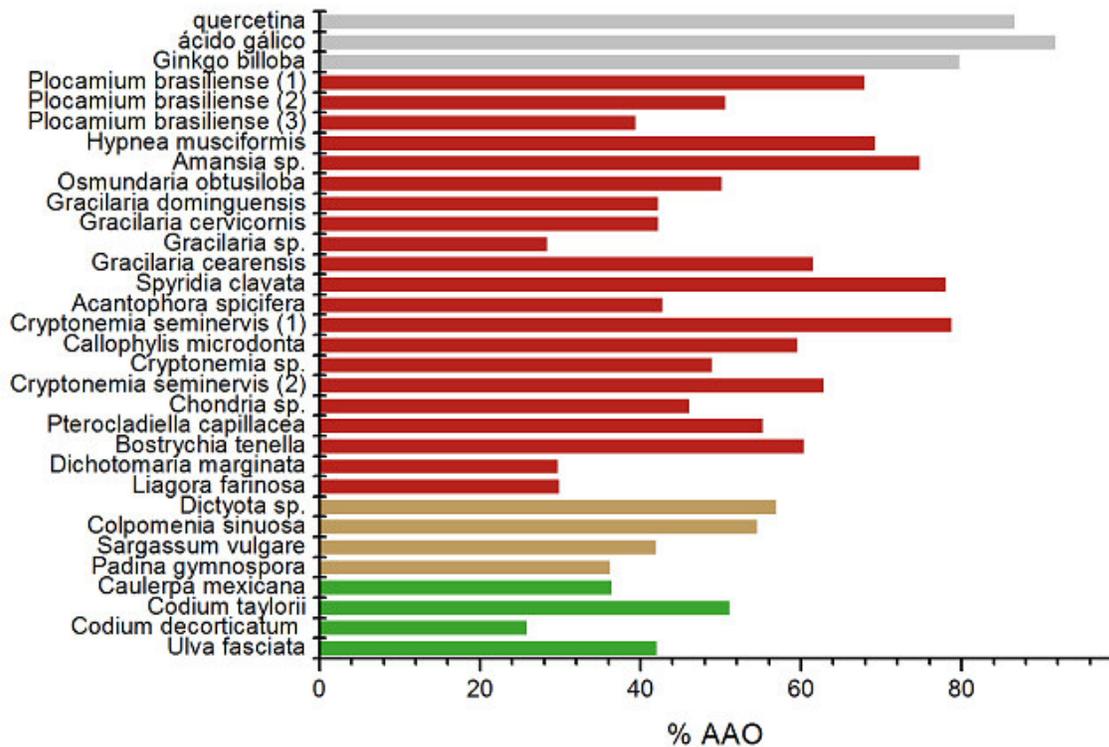


FIGURA 14: gráfico representando a atividade antioxidante média das três concentrações analisadas para cada espécie de alga coletada

3.2.2 Sistema β -caroteno/Ácido Linoléico

O sistema β -caroteno/ácido linoléico também foi empregado nesse trabalho com o intuito de avaliar a atividade antioxidante dos extratos brutos das macroalgas coletadas. Antes de calculados os resultados, foi realizada uma curva de calibração com as absorbâncias observadas nas cinco diferentes concentrações do padrão BHT (1,0; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg/mL). Os resultados estão expressos em porcentagem de atividade antioxidante na Tabela 5 abaixo.

TABELA 5: atividade antioxidante (%) referente à análise frente ao sistema β -caroteno/ácido linoléico

	Amostra	Atividade Antioxidante (%)
Padrão	BHT [1mg/mL]	86,83
	BHT [2mg/mL]	88,02

	BHT [4mg/mL]	90,08
	BHT [6mg/mL]	86,07
	BHT [8mg/mL]	75,44
Algas vermelhas	<i>Plocamium brasiliense</i> (1)	-5,40
	<i>Plocamium brasiliense</i> (2)	-2,10
	<i>Plocamium brasiliense</i> (3)	-4,76
	<i>Hypnea musciformis</i>	-5,60
	<i>Amansia</i> sp.	33,21
	<i>Osmundaria obtusiloba</i>	43,49
	<i>Gracilaria dominguensis</i>	-4,09
	<i>Gracilaria cervicornis</i>	5,91
	<i>Gracilaria</i> sp.	36,51
	<i>Gracilaria cearensis</i>	36,98
	<i>Spyridia clavata</i>	65,63
	<i>Acanthophora spicifera</i>	-3,97
	<i>Cryptonemia seminervis</i> (1)	-6,79
	<i>Callophyllis microdonta</i>	-0,91
	<i>Cryptonemia</i> sp.	2,10
	<i>Cryptonemia seminervis</i> (2)	4,76
	<i>Chondria</i> sp.	37,58
	<i>Pterocladia capillacea</i>	42,66
	<i>Bostrychia tenella</i>	41,94
	<i>Dichotomaria marginata</i>	65,75
<i>Liagora farinosa</i>	65,91	
Algas pardas	<i>Dictyota</i> sp.	75,67
	<i>Colpomenia sinuosa</i>	74,68
	<i>Sargassum vulgare</i>	1,43
	<i>Padina gymnospora</i>	1,07
Algas verdes	<i>Caulerpa mexicana</i>	-3,49
	<i>Codium taylorii</i>	3,81
	<i>Codium decorticatum</i> (1)	-1,15
	<i>Ulva fasciata</i>	46,71

Para a análise da atividade antioxidante frente ao sistema β -caroteno/ácido linoléico, também foram considerados ativos e destacados em negrito todos os

resultados superiores a 60%. O gráfico abaixo (Figura 18) simplifica a visualização dos resultados obtidos.

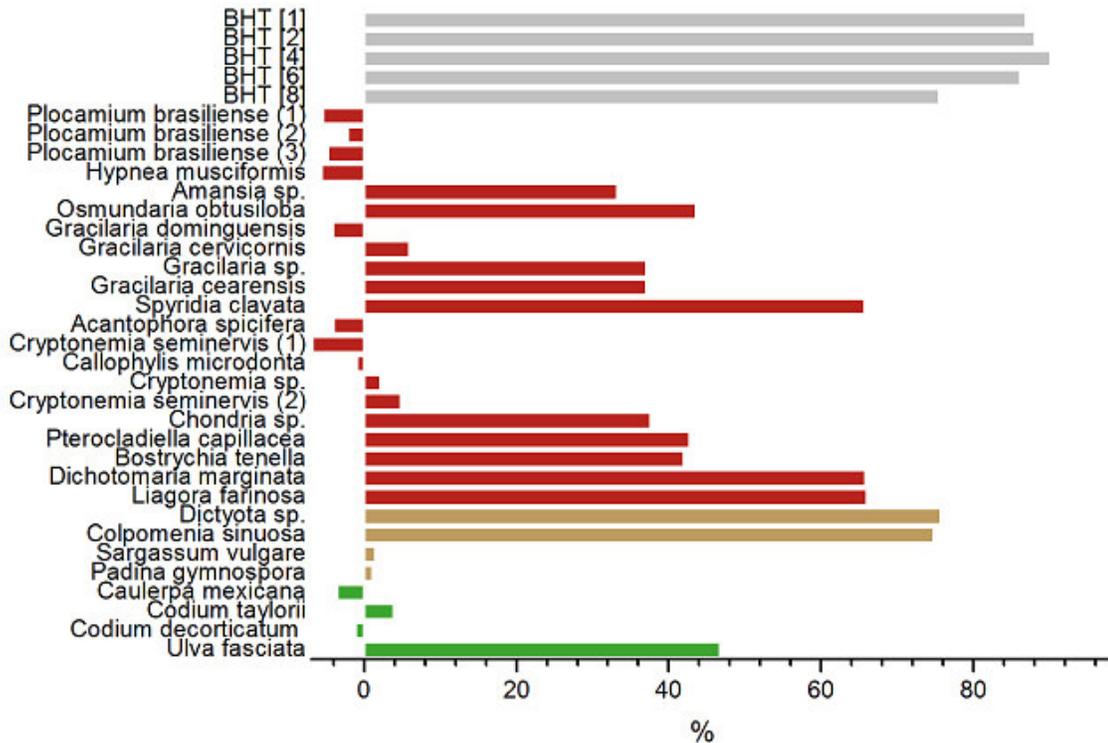


FIGURA 15: gráfico da atividade antioxidante frente ao sistema β -caroteno/ácido linoléico

Dentre todos os extratos analisados, apenas aqueles correspondentes a cinco espécies apresentaram resultados relevantes frente ao sistema β -caroteno/ácido linoléico, sendo três pertencentes às Rhodophyta (*Spyridia clavata*, *Dichotomaria marginata*, *Liagora farinosa*) e duas pertencentes às Ochrophyta (*Dictyota* sp. e *Colpomenia sinuosa*). Dentre essas, as espécies *Spyridia clavata*, *Dictyota* sp. e *Colpomenia sinuosa* também apresentaram grande potencial antioxidante frente ao método DPPH.

De acordo com dados publicados pela literatura, diversos metabólitos já foram isolados de espécies do gênero *Dictyota* como, por exemplo, 14-hidroxiacetoxicrenulida e 13-hidroxiacetoxicrenulida, isolados de *Dictyota* sp.; diterpenos dolabelanos, isopacidictiol A e dictiotatriol, isolados de *D. dichotoma*; acutilol A, isolado de *D. acutiloba* (FAULKNER, 1998); e sulfonoglicolípido, isolado de *D. ciliolata* (FAULKNER, 1999).

As espécies *D. dichotoma* e *D. mertensii*, ambas coletadas no Rio de Janeiro (KELECOM *et al.*, 1991), têm o conhecido diterpeno guaiano prenilado, pachidictiol A e também produzem o dictiol guaiano prenilado H. Para a espécie *D. cerviconis*, coletada na Baía de Ribeira (RJ) (FLEURY, 1994), foram descritos 14 diterpenos, 10 com esqueleto dolastano e 4 com esqueleto secodolastano.

Em um estudo realizado por LHULLIER (2005), a atividade antioxidante de *Dictyota cervicornis* e *Colpomenia sinuosa*, coletadas no litoral de Santa Catarina, foi avaliada utilizando o sistema DPPH. Ambas as espécies apresentaram baixo potencial antioxidante.

Em um estudo realizado por MATSUKAWA *et al.* (1997), para avaliar a atividade antioxidante de extratos de diversas espécies coletadas na costa do Japão, o extrato etanólico de *Colpomenia bullosa* apresentou uma fraca atividade antioxidante através do sistema DPPH.

Para o gênero *Spyridia*, não foram encontrados resultados relatando a atividade antioxidante de seus extratos brutos ou frações.

De acordo com DUARTE-ALMEIDA *et al.* (2006), apesar do método que utiliza o radical DPPH para a avaliação da atividade antioxidante ser um dos mais utilizados por pesquisadores de diversos países, o perfil das amostras apresentado por ele pode ser diferente do perfil obtido por outras metodologias como, por exemplo, a do sistema β -caroteno/ácido linoléico. Isso pode ocorrer uma vez que os mecanismos antioxidantes avaliados nos dois métodos são diferentes e, portanto, avaliam a atividade do extrato de formas distintas. Enquanto o método DPPH se baseia na transferência de íons H^+ de um composto antioxidante para um oxidante (radical livre DPPH), o sistema β -caroteno/ácido linoléico avalia a capacidade do substrato de inibir a peroxidação do β -caroteno.

De fato, algumas espécies que haviam apresentado grande potencial antioxidante frente ao método DPPH, não mostraram resultados relevantes frente ao sistema β -caroteno/ácido linoléico, como verificado em *Cryptonemia seminervis* (1), *Cryptonemia seminervis* (2), *Plocamium brasiliense* (1), *Hypnea musciformis*, *Callophylis microdonta* e *Amansia sp.*

Diversos autores (DUVAL *et al.*, 2000; AGUILERA *et al.*, 2002; VEGA *et al.*, 2002; HAN & HAN, 2005; XU *et al.*, 2008) têm relatado variações na produção de compostos antioxidantes em organismos fotossintetizantes, dependendo da quantidade de radiação UV-A e UV-B incidente sobre eles. Desta forma, a atividade antioxidante constatada para as algas avaliadas no presente trabalho podem não corresponder a outras investigações realizadas em outras épocas do ano.

3.3 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO FENÓLICO TOTAL

Os compostos fenólicos possuem atividade antioxidante, a qual é associada à própria natureza química deste grupo de compostos, os quais são considerados, em geral, bons agentes seqüestradores de EROs devido a sua estrutura (RICE-EVANS *et al.*, 1996).

Os extratos das macroalgas coletadas foram, portanto, avaliados quanto ao seu conteúdo fenólico total, uma vez que esse dado pode contribuir para o conhecimento em relação à composição química dos extratos e a cerca da relação existente entre a atividade antioxidante e os compostos fenólicos das espécies coletadas.

Antes de calculados os resultados, foi realizada uma curva de calibração com as absorbâncias observadas nas sete diferentes concentrações do padrão ácido gálico (10; 50; 100; 150; 200; 250; 300 µg/mL). Os resultados dessa análise foram expressos em concentração (mg) equivalente de ácido gálico (EAG) em cada grama de extrato e estão apresentados na Tabela 6 abaixo.

TABELA 6: conteúdo fenólico total

	Amostra	mg EAG/ g extrato
Padrão	Ácido gálico [300 µg/mL]	285,64
	Ácido gálico [250 µg/mL]	250,59
	Ácido gálico [200 µg/mL]	217,26
	Ácido gálico [150 µg/mL]	145,44
	Ácido gálico [100 µg/mL]	89,25
	Ácido gálico [50 µg/mL]	20,35

	Ácido gálico [10 µg/mL]	38,22
Algas vermelhas	<i>Plocamium brasiliense</i> (1)	-7,31
	<i>Plocamium brasiliense</i> (2)	87,88
	<i>Plocamium brasiliense</i> (3)	118,29
	<i>Hypnea musciformis</i>	50,93
	<i>Amansia</i> sp.	128,60
	<i>Osmundaria obtusiloba</i>	569,33
	<i>Gracilaria dominguensis</i>	49,90
	<i>Gracilaria cervicornis</i>	20,18
	<i>Gracilaria</i> sp.	62,10
	<i>Gracilaria cearensis</i>	107,64
	<i>Spyridia clavata</i>	-120,20
	<i>Acanthophora spicifera</i>	22,41
	<i>Cryptonemia seminervis</i> (1)	116,06
	<i>Callophyllis microdonta</i>	99,04
	<i>Cryptonemia</i> sp.	186,85
	<i>Cryptonemia seminervis</i> (2)	88,56
	<i>Chondria</i> sp.	94,06
	<i>Pterocladia capillacea</i>	18,80
	<i>Bostrychia tenella</i>	15,71
	<i>Dichotomaria marginata</i>	89,25
<i>Liagora farinosa</i>	62,45	
Algas pardas	<i>Dictyota</i> sp.	102,14
	<i>Colpomenia sinuosa</i>	85,30
	<i>Sargassum vulgare</i>	252,65
	<i>Padina gymnospora</i>	243,20
Algas verdes	<i>Caulerpa mexicana</i>	97,67
	<i>Codium taylorii</i>	79,28
	<i>Codium decortatum</i>	98,36
	<i>Ulva fasciata</i>	72,58

O gráfico abaixo (Figura 19) permite uma melhor visualização dos resultados referentes ao conteúdo fenólico total dos extratos analisados.

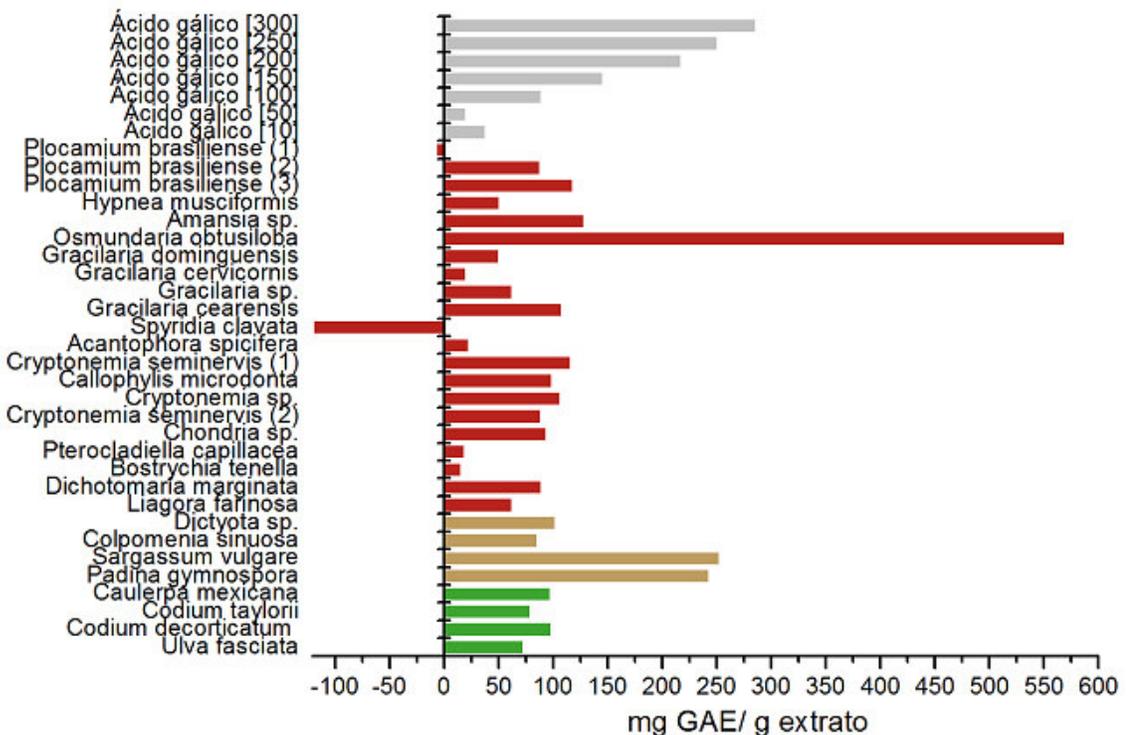


FIGURA 16: gráfico correspondente ao conteúdo fenólico total das algas estudadas

Dentre os extratos analisados, 18 merecem destaque quanto ao seu conteúdo fenólico total. Dentre esses extratos, 9 correspondem a algas Rhodophyta (*P. brasiliense* 3, *Amansia* sp., *O. obtusiloba*, *G. cearensis*, *C. seminervis* 1, *C. microdonta*, *Cryptonemia* sp., *Chondria* sp. e *D. marginata*), 3 a algas Ochrophyta (*Dictyota* sp., *S. vulgare* e *P. gymnospora*) e 2 a algas Chlorophyta (*C. mexicana* e *C. decorticatum*). Dentre as espécies citadas acima, destacam-se os resultados referentes à alga vermelha *O. obtusiloba* (569,33 mg GAE/ g extrato) e às algas pardas *P. gymnospora* (243,2 mg GAE/ g extrato) e *S. vulgare* (252,65 mg GAE/ g extrato). Pôde-se observar que, de maneira geral, as algas pardas apresentaram resultados mais relevantes em relação às algas vermelhas e verdes. Segundo TARGETT & ARNOLD (1998), as algas pardas são, de fato, dentre as divisões de macroalgas, aquelas que apresentam maiores concentrações de polifenóis como, por exemplo, florotaninos, que funcionam como antioxidantes devido à presença de grupos fenólicos múltiplos.

A maioria das espécies que apresentaram maior conteúdo fenólico também se destacaram frente à avaliação quantitativa da atividade antioxidante realizada com o DPPH, como foi o caso de *Amansia* sp., *Osmundaria obtusiloba*, *Gracilaria cearensis*,

Cryptonemia seminervis (1) e *Dictyota* sp. Essa última espécie foi, inclusive, a única a apresentar resultados relevantes tanto em relação ao seu conteúdo fenólico, quanto à avaliação da sua atividade antioxidante em ambos os métodos utilizados (DPPH e β -caroteno/ácido linoléico). O gênero *Dictyota* é amplamente conhecido por possuir metabólitos com atividade antioxidante, como já mencionado anteriormente.

Apesar da possível correlação existente entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante de plantas, algumas espécies de alga analisadas apresentaram altos valores correspondentes ao conteúdo fenólico total, mas não foram consideradas relevantes quanto à atividade antioxidante em nenhum dos sistemas utilizados neste trabalho, como foi o caso de *Plocamium brasiliense* (3), *Cryptonemia* sp., *Sargassum vulgare* e *Padina gymnospora*.

3.4 ANÁLISE DOS PERFIS QUÍMICOS DOS EXTRATOS BRUTOS

Todos os extratos brutos obtidos foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Esta análise teve como principal objetivo determinar o perfil químico dos extratos. A CCD tem como princípio a separação de misturas de moléculas através da migração diferencial dos mesmos entre duas fases: uma líquida móvel e outra sólida estacionária. À medida que o solvente avança pela placa, a amostra é compartilhada entre a fase móvel (eluente) e a fase estacionária. Num sistema onde a fase estacionária é polar (sílica) e a fase móvel apolar ou de média polaridade, o processo ocorre com a separação dos diversos componentes da mistura. As substâncias menos polares avançam mais rapidamente que as substâncias mais polares, sendo possível a identificação da polaridade das substâncias. Esta diferença na velocidade resultará em uma separação dos componentes da amostra. Quando estiverem presentes várias substâncias, cada uma se comportará segundo suas propriedades de solubilidade e adsorção, dependendo dos grupos funcionais presentes na sua estrutura (COLLINS *et al.*, 2006).

A partir das cores desenvolvidas e do fator de retenção (rf) das bandas formadas pela eluição das cromatoplas, é possível inferir a quais classes químicas pertencem

as substâncias presentes nos extratos. O r_f de uma cromatoplaça pode ser calculado pela razão entre a distância percorrida pela banda e a distância percorrida pelo eluente.

Neste trabalho, os cromatogramas foram inicialmente inspecionados sob lâmpadas de luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 nm e 365 nm. As manchas observadas em maior comprimento de onda foram destacadas com linhas cheias e aquelas observadas em menor comprimento de onda foram destacadas com linhas pontilhadas.

Os resultados das cromatoplaças são apresentados a seguir.

- **Algas Vermelhas**

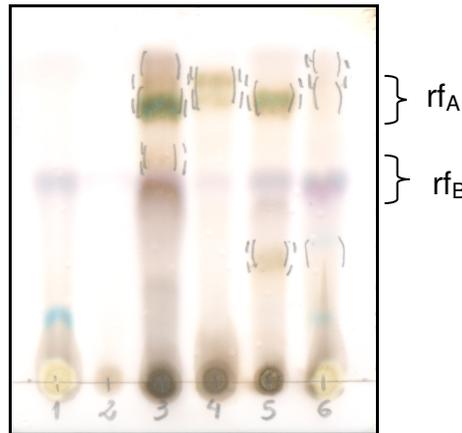


FIGURA 17: cromatoplaça (eluída em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 8:2 e revelada com sulfato cérico) correspondente às algas *Gracilaria dominguensis* (1); *Gracilaria cervicornis* (2); *Gracilaria* sp. (3); *Gracilaria cearensis* (4); *Spyridia clavata* (5); *Acanthophora spicifera* (6)

Em todos os extratos analisados na Figura 20 acima, com exceção de *G. cervicornis*, são observadas bandas arroxeadas (r_{fB}), provavelmente referente a esteróis. As manchas esverdeadas (r_{fA}) observadas em *Gracilaria* sp., *G. cearensis* e *S. clavata* podem corresponder a pigmentos fotosintetizantes, possivelmente clorofila presente nos extratos. O extrato correspondente à alga *G. cervicornis* não apresentou nenhuma mancha visível na luz UV ou a olho nu, o que indica a presença de poucos constituintes no extrato ou a presença de constituintes químicos polares, que não seriam resolvidos num sistema de média polaridade como o utilizado para a eluição da placa.

Nos extratos de *Gracilaria* sp., *G. cearensis* e *S. clavata* pode ser observada a retenção de muitos constituintes na origem da cromatoplaca, o que pode indicar a presença de constituintes polares, os quais não foram carreados pelos eluentes utilizados.

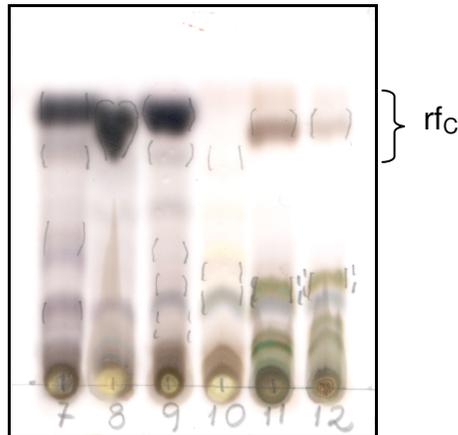


FIGURA 18: cromatoplaca (eluída em CHCl_3 e revelada com sulfato cérico) correspondente às algas *Plocamium brasiliense* 1 (7); *Plocamium brasiliense* 2 (8); *Plocamium brasiliense* 3 (9); *Hypnea musciformis* (10); *Amansia* sp. (11); *Osmundaria obtusiloba* (12)

Os extratos analisados pela cromatoplaca acima (Figura 21) possuem uma riqueza notável de compostos químicos, os quais são evidenciados pelas bandas com diferentes tonalidades e fatores de retenção. Todos os extratos, mas principalmente aqueles correspondentes às espécies *H. musciformis*, *Amansia* sp. e *O. obtusiloba*, possuem uma maioria de constituintes polares.

Apesar de terem sido coletadas em locais e datas distintas, as algas da espécie *Plocamium brasiliense* possuem perfil químico muito semelhante. Na cromatoplaca acima, destacam-se três manchas escuras (rf_c), metabólitos majoritários nos extratos de *P. brasiliense*, as quais podem estar relacionadas a terpenos descritos para o gênero (FLEURY, 1994).

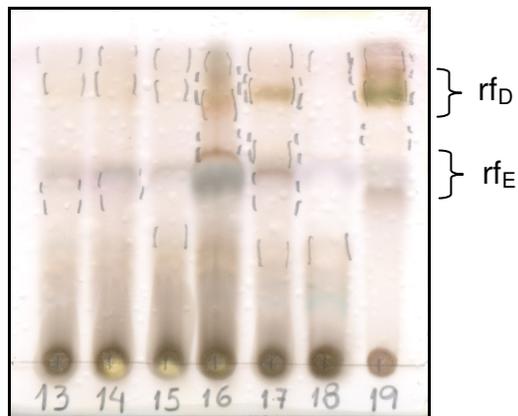


FIGURA 19: cromatoplaca (eluída em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 8:2 e revelada com sulfato cérico) correspondente às algas *Cryptonemia seminervis* 1 (13); *Callophyllis microdonta* (14); *Cryptonemia* sp. (15); *Cryptonemia seminervis* 2 (16); *Chondria* sp. (17); *Pterocladia capillacea* (18); *Bostrychia tenella* (19)

A presença de bandas arroxeadas (rf_E) revela a possível presença de esteróis em todos os extratos analisados acima (Figura 22). As bandas esverdeadas (rf_D) que aparecem nos extratos de *C. seminervis* (2), *Chondria* sp. e *B. tenella* também podem estar relacionadas à clorofila.

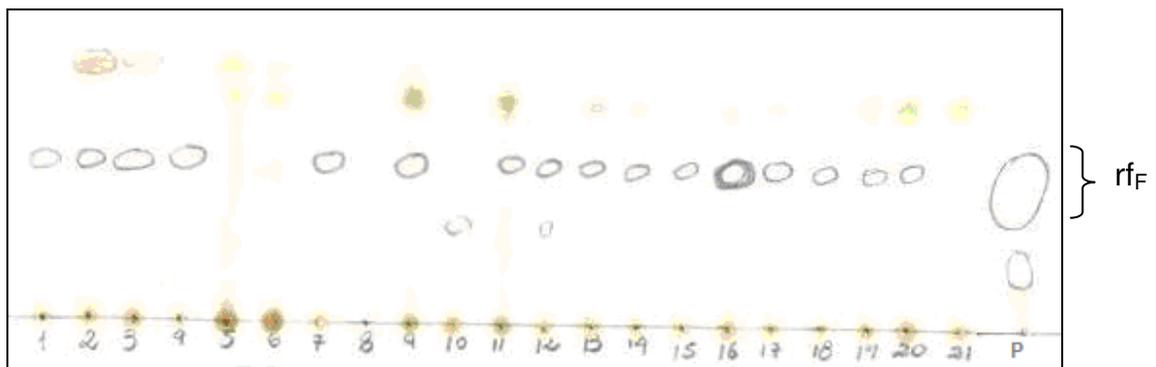


FIGURA 20: cromatoplaca (eluída em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 8:2 e revelada com ácido tricloroacético) correspondente às algas *Plocamium brasiliense* 1 (1); *Plocamium brasiliense* 2 (2); *Plocamium brasiliense* 3 (3); *Hypnea musciformis* (4); *Amansia* sp. (5); *Osmundaria obtusiloba* (6); *Gracilaria dominguensis* (7); *Gracilaria cervicornis* (8); *Gracilaria* sp. (9); *Gracilaria cearensis* (10); *Spyridia clavata* (11); *Acanthophora spicifera* (12); *Cryptonemia seminervis* 1 (13); *Callophyllis microdonta* (14); *Cryptonemia* sp. (15); *Cryptonemia seminervis* 2 (16); *Chondria* sp. (17); *Pterocladia capillacea* (18); *Bostrychia tenella* (19); *Dichotomaria marginata* (20); *Liagora farinosa* (21) e ao padrão colesterol (P)

A cromatoplaca acima (Figura 23) foi revelada com ácido tricloroacético para a detecção de esteróis nos extratos analisados. Inicialmente, ela foi inspecionada em

câmara de luz UV, o que permitiu a visualização de bandas fluorescentes, as quais estão circuladas. A partir da comparação entre o r_f das bandas fluorescentes dos extratos e do padrão utilizado, pode-se sugerir que r_{f_1} corresponde ao fator de retenção específico dos esteróis. Sendo assim, é possível inferir que nos extratos correspondentes às espécies *P. brasiliense* (1), (2) e (3), *H. musciformis*, *G. dominguensis*, *Gracilaria* sp., *G. cearensis*, *S. clavata*, *A. spicifera*, *C. seminervis* (1), *C. microdonta*, *Cryptonemia* sp., *C. seminervis* (2), *Chondria* sp., *P. capillacea*, *B. tenella* e *D. marginata* foram detectados constituintes correspondentes a esteróis.

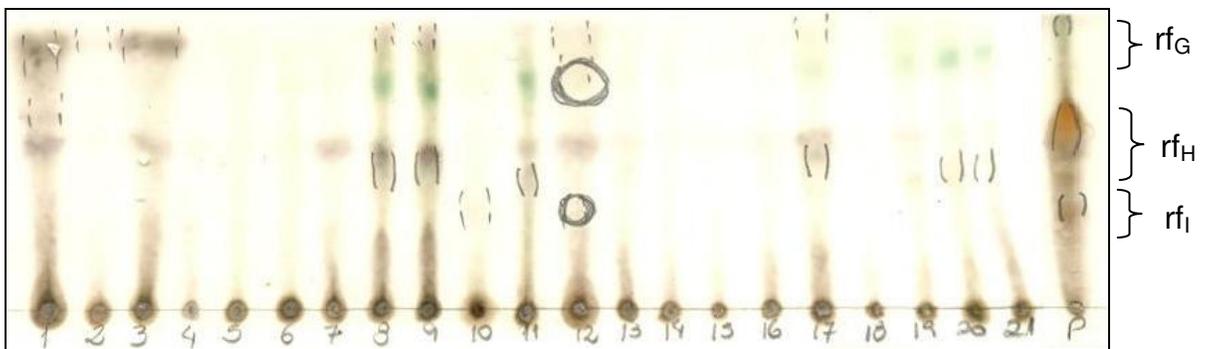


FIGURA 21: cromatoplate (eluída em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 8:2 e revelada com cloreto férrico) correspondente às algas *Plocamium brasiliense* 1 (1); *Plocamium brasiliense* 2 (2); *Plocamium brasiliense* 3 (3); *Hypnea musciformis* (4); *Amansia* sp. (5); *Osmundaria obtusiloba* (6); *Gracilaria dominguensis* (7); *Gracilaria cervicornis* (8); *Gracilaria* sp. (9); *Gracilaria cearensis* (10); *Spyridia clavata* (11); *Acanthophora spicifera* (12); *Cryptonemia seminervis* 1 (13); *Callophyllis microdonta* (14); *Cryptonemia* sp. (15); *Cryptonemia seminervis* 2 (16); *Chondria* sp. (17); *Pterocladia capillacea* (18); *Bostrychia tenella* (19); *Dichotomaria marginata* (20); *Liagora farinosa* (21) e ao padrão *S. zonale* (P)

A cromatoplate acima (Figura 24) foi revelada com cloreto férrico, para a identificação de derivados fenólicos nos extratos. Após a revelação da cromatoplate, essa foi inspecionada sob lâmpada de luz UV e as bandas fluorescentes foram circuladas. As bandas r_{f_G} , r_{f_H} e r_{f_I} correspondem, com base no padrão, às substâncias da classe dos fenóis. Com base nisso, é possível inferir que os extratos correspondentes às espécies *P. brasiliense* (1), (2) e (3), *G. cervicornis*, *Gracilaria* sp., *G. cearensis*, *S. clavata*, *A. spicifera*, *Chondria* sp., *D. marginata* e *L. farinosa* possuem, portanto, derivados fenólicos em sua composição.

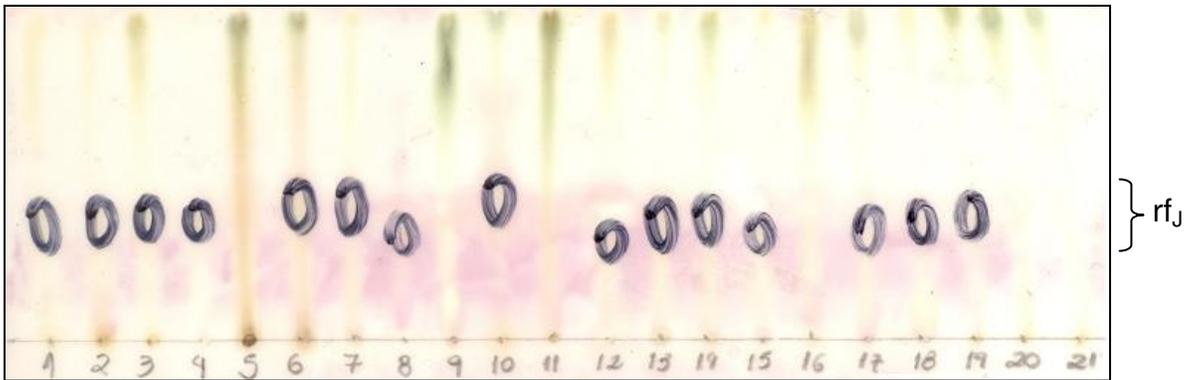


FIGURA 22: cromatoplaça (eluída em BAW 8:1:1 e revelada com ninhidrina) correspondente às algas *Plocamium brasiliense* 1 (1); *Plocamium brasiliense* 2 (2); *Plocamium brasiliense* 3 (3); *Hypnea musciformis* (4); *Amansia* sp. (5); *Osmundaria obtusiloba* (6); *Gracilaria dominguensis* (7); *Gracilaria cervicornis* (8); *Gracilaria* sp. (9); *Gracilaria cearensis* (10); *Spyridia clavata* (11); *Acanthophora spicifera* (12); *Cryptonemia seminervis* 1 (13); *Callophyllis microdonta* (14); *Cryptonemia* sp. (15); *Cryptonemia seminervis* 2 (16); *Chondria* sp. (17); *Pterocladia capillacea* (18); *Bostrychia tenella* (19); *Dichotomaria marginata* (20); *Liagora farinosa* (21)

A cromatoplaça correspondente à Figura 25 acima, utilizou a ninhidrina como revelador, com o objetivo de identificar a possível presença de substâncias da classe dos aminoácidos e seus derivados. Como essas substâncias são conhecidas por serem polares, foi utilizado um eluente também polar para que as substâncias de interesse pudessem ser melhor visualizadas no centro da cromatoplaça. De acordo com a literatura, as cromatoplaças reveladas com ninhidrina, aminoácidos ou derivados surgem como colorações róseas (bandas circuladas, correspondentes ao rf_j) na cromatoplaça após sua revelação. A partir disso, é possível inferir que os extratos correspondentes às espécies *P. brasiliense* (1), (2) e (3), *H. musciformis*, *O. obtusiloba*, *G. dominguensis*, *G. cervicornis*, *G. cearensis*, *A. spicifera*, *C. seminervis* (1), *C. microdonta*, *Cryptonemia* sp., *Chondria* sp., *P. capillacea* e *B. tenella* possuem tal classe de substâncias em sua composição.

- Algas Pardas



FIGURA 23: cromatoplaca (eluída em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 8:2) correspondente às algas *Dictyota* sp. (20); *Colpomenia sinuosa* (21); *Sargassum vulgare* (22); *Padina gymnospora* (23)

A cromatoplaca referente aos extratos de algas pardas (Figura 26) indica média polaridade de seus constituintes. Os extratos analisados foram caracterizados por conterem uma grande quantidade de substâncias, com destaque para as espécies *Dictyota* sp. e *S. vulgare*. As manchas esverdeadas observadas em *S. vulgare*, *P. gymnospora* e *D. marginata* (rf_K) podem estar relacionadas à clorofila. As manchas arroxeadas observadas nos extratos das mesmas espécies (rf_L) podem indicar a presença de esteróis. O extrato de *C. sinuosa* aparenta possuir poucos constituintes, embora isso também possa ocorrer devido à baixa concentração de extrato aplicado na sua origem.

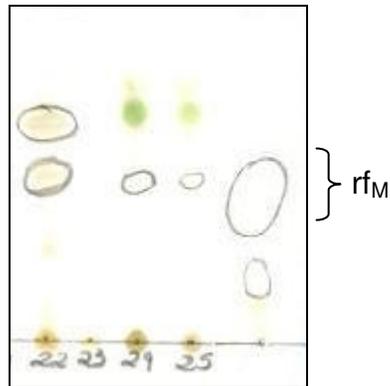


FIGURA 24: cromatoplaca (eluída em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 8:2 e revelada com ácido tricloro acético) correspondente às algas *Dictyota* sp. (22); *Colpomenia sinuosa* (23); *Sargassum vulgare* (24); *Padina gymnospora* (25) e ao padrão colesterol

A cromatoplaca acima (Figura 27), revelada com TCA, indicou a possível presença de esteróis nos extratos de *Dictyota* sp., *S. vulgare* e *P. gymnospora*, representados pelas bandas circuladas, correspondentes ao rf_M .

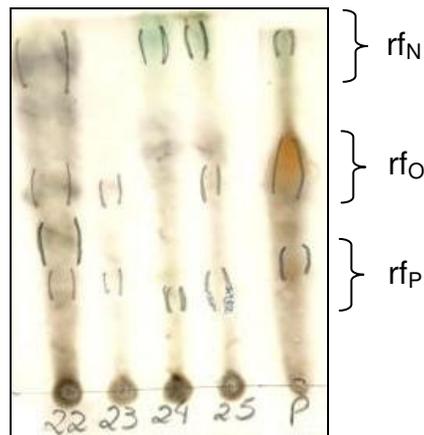


FIGURA 25: cromatoplaca (eluída em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 8:2 e revelada com cloreto férrico) correspondente às algas *Dictyota* sp. (22); *Colpomenia sinuosa* (23); *Sargassum vulgare* (24); *Padina gymnospora* (25) e ao padrão *S. zonale* (P)

De acordo com a cromatoplaca acima (Figura 28), revelada com cloreto férrico, pode-se inferir que todos os extratos de Ochrophyta analisados possuem substâncias fenólicas em sua composição, representadas pelas bandas rf_N , rf_O e rf_P .

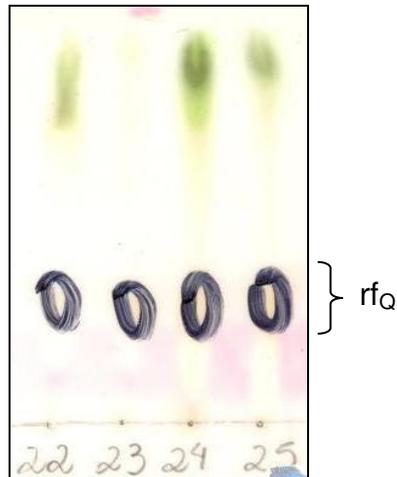


FIGURA 26: cromatoplaca (eluída em BAW 8:1:1 e revelada com ninhidrina) correspondente às algas *Dictyota* sp. (22); *Colpomenia sinuosa* (23); *Sargassum vulgare* (24); *Padina gymnospora* (25)

A cromatoplaca acima (Figura 29) indica a presença de aminoácidos ou derivados, correspondentes ao rf_0 , em todos os extratos analisados.

- **Algas Verdes**

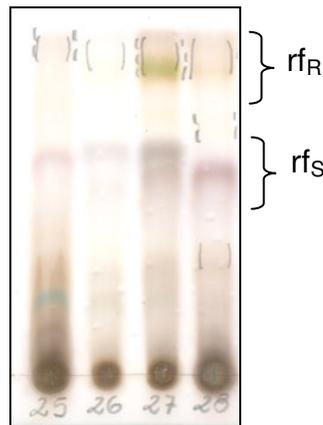


FIGURA 27: cromatoplaca (eluída em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 8:2) correspondente às algas *Caulerpa mexicana* (25); *Codium taylorii* (26); *Codium decorticatum* (27); *Ulva fasciata* (28)

A CCD correspondente aos extratos das algas verdes (Figura 30) indica média polaridade de seus constituintes. É possível observar grande quantidade de material retido na origem da cromatoplaca, o que infere a presença de constituintes polares nos extratos. Os extratos de todas as espécies apresentaram perfil químico semelhante,

com destaque às bandas arroxeadas (rf_S) observadas em todos eles, as quais podem indicar a presença de esteróis. As manchas esverdeadas (rf_R) observadas nos extratos de *C. decortiatum* e *Ulva fasciata* aparentam estar relacionadas à clorofila.

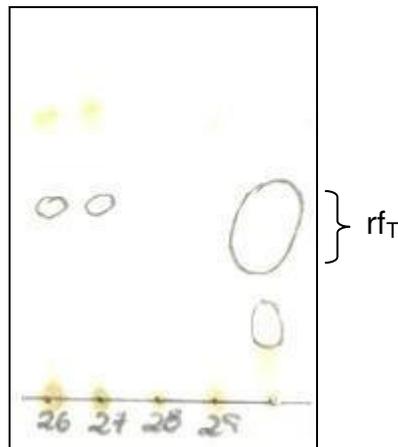


FIGURA 28: cromatoplate (eluída em $CHCl_3/AcOEt$ 8:2 e revelada com ácido tricloro acético) correspondente às algas *Caulerpa mexicana* (26); *Codium taylorii* (27); *Codium decortiatum* (28); *Ulva* sp. (29) e ao padrão colesterol

De acordo com a cromatoplate acima (Figura 31) revelada com TCA, a presença de esteróis, destacada com círculos e correspondente ao rf_T , pode ser observada nos extratos de *C. mexicana* e *C. taylorii*.

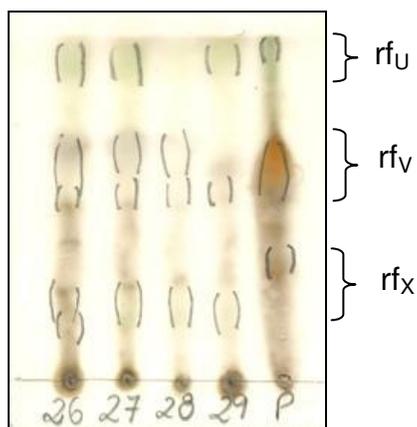


FIGURA 29: cromatoplate (eluída em $CHCl_3/AcOEt$ 8:2 e revelada com ácido tricloro acético) correspondente às algas *Caulerpa mexicana* (26); *Codium taylorii* (27); *Codium decortiatum* (28); *Ulva* sp. (29) e ao padrão *S. zonale* (P)

A cromatoplaca acima (Figura 32) indica a presença de fenólicos em todos os extratos de Chlorophyta analisados, com base nos fatores de retenção do padrão rf_U , rf_V e rf_X .

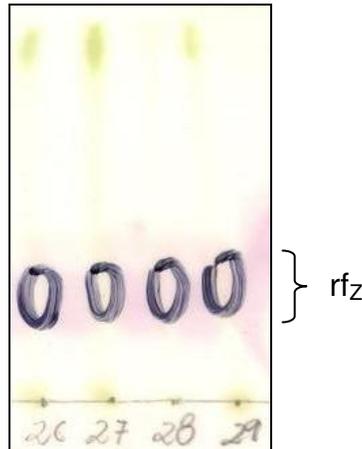


FIGURA 30: cromatoplaca (eluída em BAW 8:1:1 e revelada com ninhidrina) correspondente às algas *Caulerpa mexicana* (26); *Codium taylorii* (27); *Codium decortcatum* (28); *Ulva sp.* (29)

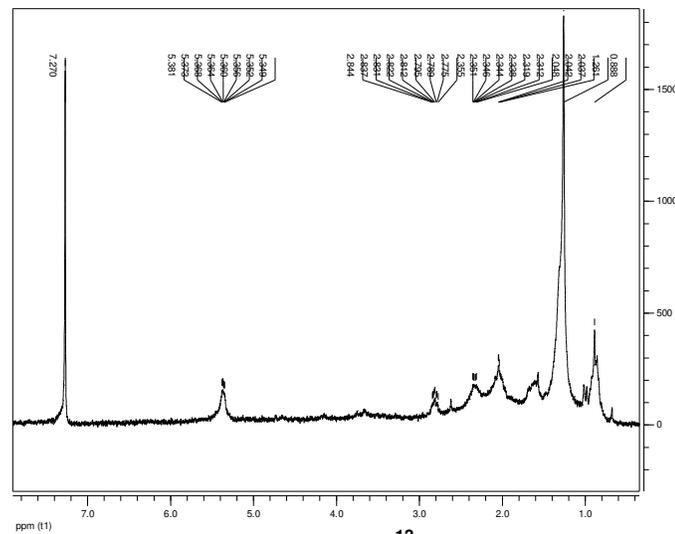
A cromatoplaca acima (Figura 33), revelada com ninhidrina, indica a presença de aminoácidos ou seus derivados, representados por rf_Z , em todos os extratos de algas verdes analisados.

3.5 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS MAJORITÁRIAS DOS EXTRATOS BRUTOS SELECIONADOS

De acordo com os resultados provenientes das análises qualitativa e quantitativa da atividade antioxidante, os extratos que apresentaram melhor desempenho frente ao seqüestro do radical foram as algas vermelhas *Plocamium brasiliense* (1), *Amansia sp.*, *Osmundaria obtusiloba*, *Gracilaria cearensis*, *Spyridia clavata*, *Cryptonemia seminervis* e *Bostrychia tenella*; a alga parda *Dictyota sp.*; e a alga verde *Codium taylorii*. Os extratos correspondentes a tais espécies foram, portanto, submetidos à análise por RMN de 1H e ^{13}C ($CDCl_3$). Os espectros obtidos seguem abaixo, juntamente com suas análises.

O uso da técnica de RMN é de grande importância para a elucidação estrutural de substâncias químicas, especialmente substâncias orgânicas. O uso desta técnica para análise de extratos fornece importantes informações sobre as estruturas de seus componentes majoritários. Os sinais dos metabólitos minoritários não são observados na maioria das vezes, devido principalmente à sensibilidade do equipamento. Os sinais das substâncias minoritárias são mascarados pela sobreposição dos sinais majoritários.

As Figuras 34 e 35 mostram os espectros da alga verde *C. taylorii* e os espectros das algas vermelhas *Amansia* sp., *Osmundaria obtusiloba*, *Gracilaria cearensis*, *Spyridia clavata*, *Cryptonemia seminervis* e *Bostrychia tenella*. É possível observar a grande similaridade entre os sinais presentes em todos estes espectros. De acordo com a interpretação dos dados e comparação dos mesmos com os dados da literatura, é possível sugerir a presença de substâncias lipídicas, como por exemplo, ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos, triglicerídeos e esteróis como componentes majoritários.



Em relação ao espectro da alga *P. brasiliense* (Figura 36), é possível observar que este se apresenta consideravelmente diferente em relação aos anteriores, sugerindo a presença de metabólitos majoritários pertencentes a outras classes químicas. De acordo com os deslocamentos químicos observados, os majoritários apresentam um grande número de hidrogênios ligados a carbonos com heteroátomos e hidrogênios ligados a carbonos insaturados.

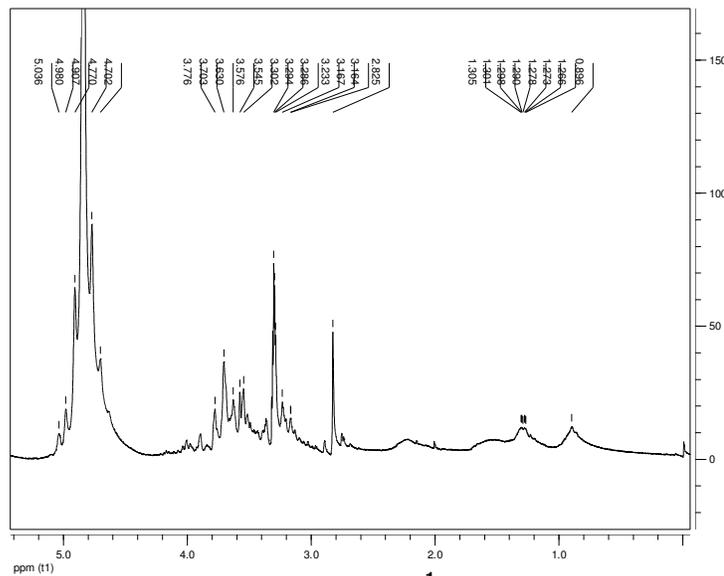


FIGURA 33: espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) correspondente à alga *Plocamium brasiliense* (1)

Já em relação à alga *Dictyota* sp., observam-se sinais correspondentes a substâncias terpenoídicas como metabólitos majoritários nos espectros de RMN de hidrogênio e carbono abaixo (Figura 37). Terpenóides são produtos naturais amplamente descritos como característicos do gênero *Dictyota* (FLEURY, 1994)

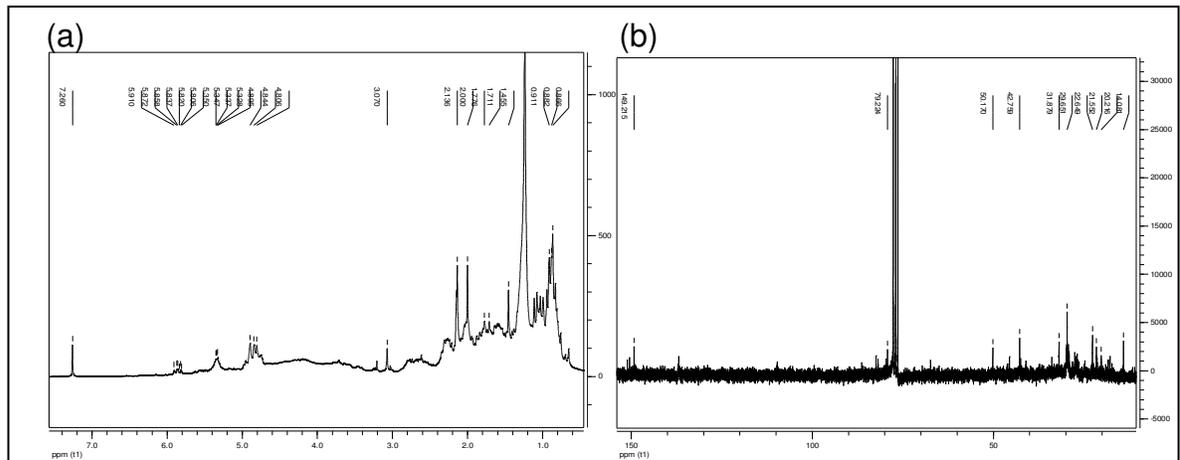


FIGURA 34: espectros de RMN de ¹H (a) e de ¹³C (b) (200 MHz, CDCl₃) correspondentes à alga *Dictyota* sp.

3.6 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS ATIVOS E ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FRAÇÕES

Com o objetivo de tentar identificar os metabólitos secundários responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos ativos, foram selecionadas duas espécies, dentre todas as macroalgas coletadas e analisadas no presente trabalho, para serem submetidas a um fracionamento guiado por bioensaios.

A primeira espécie selecionada foi *Amansia* sp., por ter apresentado bons resultados quantitativos e qualitativos na análise de seqüestro de radicais DPPH e concentração relevante de fenólicos totais. A segunda espécie eleita foi *Cryptonemia seminervis* por também ter apresentado um dos maiores potenciais antioxidantes na análise com o DPPH e possuir um alto conteúdo de fenólicos totais.

Inicialmente, alíquotas dos extratos das duas espécies selecionadas (1,19g do extrato de *Amansia* sp. e 1,49g do extrato de *C. seminervis*) foram submetidas separadamente a uma partição líquido-líquido, a partir da qual foram obtidas diferentes frações de acordo com a solubilidade das moléculas: fração THF, fração acetato de etila, fração butanol e fração aquosa. Todas as frações obtidas foram investigadas por CCD.

- *Amansia* sp.

A partir da CCD referente às frações obtidas do extrato de *Amansia* sp., constatou-se que as frações THF, acetato de etila e butanol eram muito semelhantes entre si e se diferenciavam apenas da fração aquosa. As primeiras três frações, portanto, foram reunidas e renomeadas como fração orgânica (Figura 38).

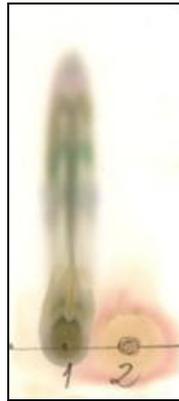


FIGURA 35: cromatoplaça (eluída em $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 8:2 e revelada com sulfato cérico) correspondente às frações orgânica (1) e aquosa (2) de *Amansia* sp.

A cromatoplaça acima (Figura 38) revela uma gama de constituintes na fração orgânica de *Amansia* sp, inferida pela diversidade de bandas aparentes, as quais aparentam possuir diferentes polaridades. Em contrapartida, a fração aquosa permaneceu retida na origem da cromatoplaça, uma vez que seus constituintes possuem alta polaridade e o eluente utilizado não foi capaz de carregá-los ao longo da placa.

As frações de *Amansia* sp. foram submetidas à avaliação qualitativa (Figura 39) e quantitativa (Tabela 7) da atividade antioxidante através do método de seqüestro de radicais DPPH com o objetivo de tentar localizar a fração responsável pela atividade seqüestradora de radicais observada em seu extrato.

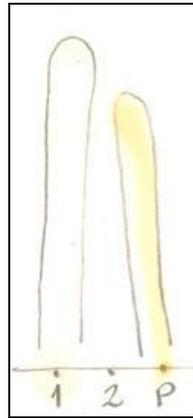


FIGURA 36: cromatoplaça (eluída em AcOEt e revelada com solução de DPPH) correspondente às frações orgânica (1); aquosa (2) de *Amansia* sp. e ao padrão quercetina (P)

Como já mencionado anteriormente, as áreas circuladas na cromatoplaça representam as áreas que foram descoradas após a revelação com DPPH, ou seja, correspondem à localização dos constituintes que atuaram como antioxidantes. De acordo com a cromatoplaça acima (Figura 39), é possível identificar claramente a presença de substâncias antioxidantes na fração orgânica, enquanto que a fração aquosa não apresentou nenhum descoramento após sua revelação. Porém, a ausência de descoramento decorrente da revelação com DPPH, pode ser atribuída à quantidade insuficiente de material aplicado na cromatoplaça. O fracionamento de um extrato bruto é essencial para o isolamento da substância de interesse. Neste caso, sugere-se que a fração orgânica seja responsável pela propriedade antioxidante do extrato de *Amansia* sp. e a partir dela podem ser feitos novos fracionamentos até a obtenção da substância purificada.

Para a avaliação quantitativa da atividade antioxidante das frações de *Amansia* sp., as amostras foram analisadas em três diferentes concentrações (0,3; 0,2; 0,1 mg/mL) e comparadas ao padrão BHT (Tabela 7).

TABELA 7: atividade antioxidante das frações de *Amansia* sp.

Amostra	Concentração (mg/mL)	Atividade Antioxidante (%)
Padrão BHT	0,3	35,97
	0,2	34,88
	0,1	34,96
F. orgânica	0,3	62,16
	0,2	59,24
	0,1	67,06
F. aquosa	0,3	47,74
	0,2	46,19
	0,1	43,45

De acordo com a Tabela 7 acima, apenas a fração orgânica de *Amansia* sp. obteve resultado superior a 60% de atividade antioxidante, observado em duas das concentrações analisadas para tal fração. Isso corrobora a análise qualitativa mostrada na Figura 39, a qual revelou atividade positiva para a fração orgânica da espécie em questão.

- *Cryptonemia seminervis*

A partir das cromatografias (CCD) realizadas com as frações de *C. seminervis*, a fração THF foi selecionada para ser submetida à cromatografia em coluna (CC), sob gel de sílica, por apresentar maior número de constituintes. Após a separação de uma alíquota da fração THF para a realização da cromatografia em coluna, as frações acetato de etila e butanol foram reunidas ao restante da fração THF, por apresentarem constituintes muito semelhantes entre si, originando a fração orgânica (Figura 40).

A partir da CC realizada com a fração THF de *Cryptonemia seminervis*, foram identificadas e separadas 24 diferentes frações. Todas elas foram submetidas novamente à cromatografia em camada delgada com o objetivo de identificar e reunir aquelas que apresentassem perfil químico semelhante. Foram então identificados 6 diferentes perfis químicos (C1, C2, C3, C4, C5 e C6) (Figura 40).

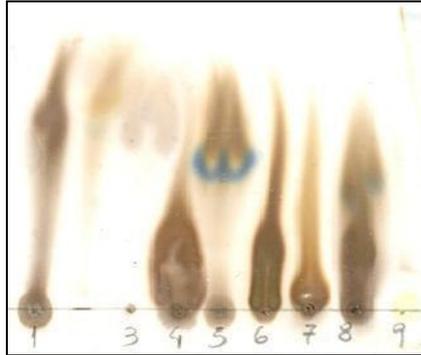


FIGURA 37: cromatoplate (eluída em AcOEt e revelada com sulfato cérico) correspondente às frações orgânica (1); C1 (3); C2 (4); C3 (5); C4 (6); C5 (7); C6 (8) e aquosa (9) de *C. seminervis*

A cromatoplate acima (Figura 40), realizada com as diferentes frações obtidas de *C. seminervis*, aparenta possuir uma concentração muito grande de material nos pontos de origem. Provavelmente devido a essa grande quantidade de material na origem da placa, a mesma não apresentou eluição suficiente para a separação dos constituintes. Sendo assim, não é possível inferir a polaridade dos mesmos, tampouco suas classes químicas.

As frações de *Cryptonemia seminervis* também foram submetidas à avaliação qualitativa (Figura 41) e quantitativa (Tabela 8) da atividade antioxidante através do método de seqüestro de radicais DPPH.

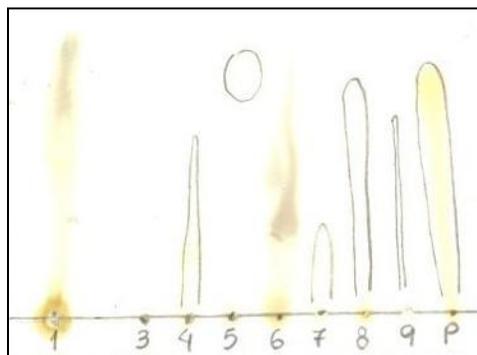


FIGURA 38: cromatoplate (eluída em AcOEt e revelada com solução de DPPH) correspondente às frações orgânica (1); C1 (3); C2 (4); C3 (5); C4 (6); C5 (7); C6 (8); aquosa (9) de *C. seminervis* e ao padrão quercetina (P)

De acordo com a Figura 41 acima, as frações C2, C3, C5, C6, provenientes da cromatografia em coluna (CC) e a fração aquosa de *C. seminervis* apresentaram atividade antioxidante positiva frente ao DPPH.

Para a avaliação quantitativa da atividade antioxidante das frações de *Cryptonemia seminervis*, as amostras foram analisadas nas três concentrações já descritas para *Amansia* sp. e comparadas ao padrão BHT (Tabela 8).

TABELA 8: atividade antioxidante das frações de *C. seminervis*

Amostra	Concentração (mg/mL)	Atividade Antioxidante (%)
Padrão BHT	0,3	35,97
	0,2	34,88
	0,1	34,96
F. orgânica	0,3	45,70
	0,2	45,06
	0,1	43,97
C1	0,3	40,64
	0,2	41,18
	0,1	39,96
C2	0,3	42,46
	0,2	43,13
	0,1	42,29
C3	0,3	44,29
	0,2	45,53
	0,1	43,57
C4	0,3	42,72
	0,2	43,83
	0,1	44,11
C5	0,3	45,48
	0,2	43,89
	0,1	36,46
C6	0,3	40,05
	0,2	44,13
	0,1	39,26

F. aquosa	0,3	43,36
	0,2	42,59
	0,1	45,83

Todas as frações de *C. seminervis* analisadas acima obtiveram resultados inferiores ao estipulado como relevante para as análises quantitativas realizadas com o DPPH no presente estudo.

As baixas porcentagens de atividade antioxidante calculadas para todas as frações de *C. seminervis* (Tabela 8) e para a fração aquosa de *Amansia* sp. (Tabela 7) podem ser atribuídas à baixa concentração das frações analisadas, inferior em relação àquelas utilizadas na análise da atividade antioxidante dos extratos brutos. Outra possível causa das baixas porcentagens seria a diminuição da atividade antioxidante decorrente da partição do extrato bruto. Em outras palavras, poderia estar ocorrendo um sinergismo entre as substâncias presentes no extrato bruto, o que proporcionaria a ele grande potencial antioxidante, sem que isso reflita em suas frações. De acordo com CECHINEL FILHO *et al.* (2007), quando o extrato é particionado, o efeito dos compostos pode ter características diferentes das apresentadas pelo extrato total, uma vez que não haverá mais sinergia entre as substâncias.

Segundo CANO *et al.* (1998), a avaliação de componentes isolados pode não refletir apuradamente sua ação combinada, uma vez que pode haver uma cooperação entre as substâncias antioxidantes durante o estresse oxidativo. Daí o interesse na atividade antioxidante total das amostras, considerando-se essa atividade como uma característica total do extrato, apesar da composição individual contribuir para isso.

De acordo com CECHINEL FILHO *et al.* (2007), outro aspecto que deve ser levado em consideração é a instabilidade dos compostos ativos, que podem se degradar durante o processo de isolamento e se transformar em compostos inativos, o que também explicaria os baixos valores encontrados na análise quantitativa da atividade antioxidante das frações analisadas.

4. CONCLUSÕES

- Foram coletadas um total de 27 espécies de macroalgas marinhas bentônicas em seis diferentes praias do litoral sul e sudeste do Brasil. Os resultados de triagem buscando moléculas bioativas indicam que as macroalgas coletadas produzem metabólitos com grande potencial antioxidante, verificado através do método do seqüestro do radical DPPH e do sistema β -caroteno/ácido linoléico;
- As espécies *Spyridia clavata*, *Dictyota* sp. e *Colpomenia sinuosa* apresentaram resultados relevantes quanto à atividade antioxidante avaliada pelos dois métodos utilizados, obtendo porcentagens acima de 65% de atividade;
- Foram encontradas diferenças entre os resultados apresentados pelo método DPPH e pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico. Isso pode ocorrer uma vez que os mecanismos antioxidantes avaliados nos dois métodos são diferentes e, portanto, avaliam a atividade do extrato de formas distintas. Enquanto o método DPPH se baseia na transferência de íons H^+ de um composto antioxidante para um oxidante (radical livre DPPH), o sistema β -caroteno/ácido linoléico avalia a capacidade do substrato de inibir a peroxidação do β -caroteno;
- As espécies *Padina gymnospora*, *Sargassum vulgare* e *Osmundaria obtusiloba* apresentaram os maiores valores referentes ao conteúdo fenólico total (243,2; 252,65 e 569,33 mg GAE/ g extrato, respectivamente). De maneira geral, as algas pardas apresentaram resultados mais relevantes em relação às algas vermelhas e verdes. Isso pode ser atribuído ao fato de que as primeiras apresentam maiores concentrações de polifenóis como, por exemplo, florotaninos, que funcionam como antioxidantes devido à presença de grupos fenólicos múltiplos;
- A caracterização química dos extratos brutos revelou a presença de esteróis e substâncias da classe dos aminoácidos na maioria das espécies de Rhodophyta analisadas. Dentre as Ochrophyta, todas as espécies apresentaram fenóis e derivados aminados, e apenas uma delas não apresentou esteróis em sua composição. Em todas as espécies de Chlorophyta analisadas foi observada a presença de derivados

aminados e fenóis, e em apenas duas espécies não foi constatada a presença de esteróis;

- Na análise dos extratos brutos por RMN, *Plocamium brasiliense* (1) apresentou um grande número de hidrogênios ligados a carbonos com heteroátomos e hidrogênios ligados a carbonos insaturados. A espécie *Dictyota* sp. apresentou substâncias terpenoídicas como metabólitos majoritários. As demais espécies analisadas (*Amansia* sp., *Osmundaria obtusiloba*, *Gracilaria cearensis*, *Spyridia clavata*, *Cryptonemia seminervis*, *Bostrychia tenella* e *C. taylorii*) apresentaram substâncias lipídicas, como por exemplo, ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos, triglicerídeos e esteróis como componentes majoritários.
- O fracionamento guiado por bioensaios realizado com os extratos brutos de *Cryptonemia seminervis* e *Amansia* sp. constatou que a fração orgânica de ambas as espécies era responsável pela atividade antioxidante observada nos extratos.

REFERÊNCIAS

- AGUILERA, J.; DUMMERMUTH, A.; KARSTEN, U.; SCHRIEK, R.; WIENCKE, C. Enzymatic defences against photooxidative stress induced by ultraviolet radiation in Arctic marine macroalgae. **Polar Biology**, v. 25, p. 432-441, 2002.
- AHERNE, S.A. & O'BRIEN, N.M. Lack of effect of flavonoids myricetin, quercetin, and rutin, on repair of H₂O₂ - induced DNA single-strand breaks in Caco-2, Hep G2, and V79 cells. **Nutrition and Cancer**, v. 38 (1), p. 106-115, 2000
- ANGGADIREDJA, J.; ANDYANI, R. & HAYATI, M. Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* (Phaeophyta) and *Laurencia obtusa* (Rhodophyta) from Seribu Islands. **Journal of Applied Phycology**, v. 9 (5), p. 477-479, 1997.
- BARBOSA, J.P.; PEREIRA, R.C.; ABRANTES, J.L.; SANTOS, C.C.C.; REBELLO, M.A.; FRUGULHETTI, I.C.P.P.; TEIXEIRA, V.L. In vitro antiviral diterpenes from the brazilian brown alga *Dictyota pfaffi*. **Planta Medica**, v. 70, p. 856-860, 2004.
- BARBOSA, J.P.; FLEURY, B.G.; GAMA, B.A.P. da; TEIXEIRA, V.L.; PEREIRA, R.C. Natural products as antifoulants in the Brazilian brown alga *Dictyota pfaffi* (Phaeophyta, Dictyotales). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, P. 549-553, 2007.
- BERGMAN, W.; FEENEY, R.J. Nucleosides of sponges. **Journal of Organic Chemistry**, v. 16, p. 981-987, 1951.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr**, Campinas, v. 12 (2), p. 123-130, 1999.
- BLOIS, S.M. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181 (4617), p. 1199-1200, 1958.
- CAI, YIZHONG; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Science**, v. 74, p. 2157-2184, 2004.
- CALLISTE, C-A.; TROUILLAS, P.; ALLAIS, D-P.; SIMON, A.; DUROUX, J-L. Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 3321-3327, 2001.
- CANO, A. *et al.* An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. **Phytochemical Analysis**, v. 9, p. 196-202, 1998.
- CARTÉ, B.K. Biomedical potential of marine natural products. **BioScience**, v. 46 (4), p. 271-286, 1996.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Ed. da UNIVALI, 2007. v. 01.

CHAVES, D.S.A. **Estudo químico e farmacológico da *Petroselinum crispum* (salsa):** avaliação da atividade anti-coagulante e anti-agregante plaquetária *in vitro*. Monografia (Graduação em Farmácia) - Universidade Severino Sombra, Vassouras, 2004.

CHEW, Y.L.; LIM, Y.Y.; OMAR, M.; KHOO, K.S. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. **LWT**, v. 41, p. 1067–1072, 2008.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. 1 ed. Campinas: Unicamp, 2006.

CORREIA, M.D.; SOVIERZOSKI, H.H. Ecossistemas Marinhos: recifes, praias e manguezais. In: **Conversando sobre ciências em Alagoas**. 1. ed. Maceió: Ed. UFAL, 2005. v. 1, p. 0-55.

DA-QING, J.; CHOL SEUNG, L.; JIN-YOUNG, S.; HAN GIL, C.; ILHO, H.; JUNG-SOO, H. *Ulva conglobata*, a marine algae, has neuroprotective and anti-inflammatory effects in murine hippocampal and microglial cells. **Neuroscience Letters**, v. 402, p.154–158, 2006.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, M.F. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH¹. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26 (2), p. 446-452, 2006.

DUVAL, B.; SHETTY, K.; THOMAS, W.H. Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. **Journal of Applied Phycology**, v. 11, p. 559–566, 2000.

FAULKNER, D.J. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v. 15, p. 113-157, 1998.

FAULKNER, D.J. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v 16, p. 155-198, 1999.

FAULKNER, D.J. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v 18, p. 1-49, 2001.

FLEURENCE, J. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potencial uses. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 25-28, 1999.

FLEURY, B.G. Comparative study of monohydroxylated sterols from seven species of marine brown algae from the Dictyotales and Fucales. **Phytochemistry**, v. 37, p. 1647-1649, 1994.

FREILE-PELEGRIN, Y.; ROBLEDO, D.; CHAN-BACAB, M.J.; ORTEGA-MORALES, B.O. Antileishmanial properties of tropical marine algae extracts. **Fitoterapia**, v. 79, p. 374–377, 2008.

FUJIMOTO, K. & KANEDA, T. Screening test for antioxidigenic compounds from marine algae and fraction from *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifida*. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**. v. 46 (9), p. 1125-1130, 1980.

FUJIMOTO, K.; KANEDA, T. Antioxidant activity of *Sargassum polycystum* (Phaeophyta) and *Laurencia obtusa* (Rhodophyta) from Seribu Islands. **Hydrobiologia**, v. 116/117, p. 111-113, 1984.

GHOSH, P.; ADHIKARI, U.; GHOSAL, P.K.; PUJOL, C.A.; CARLUCCI, M.J.; DAMONTE, E.B.; RAY, B. In vitro anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 3151–3157, 2004.

GRANATO, A.C.; OLIVEIRA, J.H.H.L.; SELEGUIM, M.H.R.; BERLINCK, R.G.S.; MACEDO, M.L.; FERREIRA, A.G.; ROCHA, R.M.; HADJU, E.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.O.; MORAES, M.O. & CAVALCANTI, B.C. Produtos Naturais da Ascídia *Botrylloides giganteum*, das esponjas *Verongula gigantean*, *Ircinia felix*, *Cliona delitrix* e do nudibrânquio *Tambja eliora*, da costa do Brasil. **Química Nova**, v. 28 (2), p. 192-198, 2005.

GUARATINI, T. **Antioxidantes de macroalgas marinhas: caracterização química e atividade *in vitro***. 152f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

HAEFNER, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug Disc. Today**, v. 8 (12), p. 536-544, 2003.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, New York, v. 52 (8), p. 253-265, 1994.

HALSTEAD, B.W. Poisonous and venomous marine animals of the world. **Government Printing Office**, Washington, v. 1, p. 4-5, 1965.

HAN, Y.S. & HAN, T. UV-B induction of UV-B protection in *Ulva pertusa* (chlorophyta). **Journal of Phycology**. v. 41, p. 523–530, 2005.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**, v. 11, p. 298-300, 1956.

HAYASE, F.; KATO, H. Antioxidative components of sweet potatoes. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v. 30, p. 37-46, 1984

HIDARI, K.I.P.J.; TAKAHASHI, N.; ARIHARA, M.; NAGAOKA, M.; MORITA, K.; SUZUKI, T. Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 376, p.91–95, 2008.

HIRATA, L. L. **Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride, Cesalpiniaceae, em serum**. 114f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

HUIMIN, Q.; QUANBIN, Z.; TINGTING, Z.; RUGUI, H.; KUN, Z.; ZHIEN, L. In vitro antioxidant activity of acetylated and benzoylated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 2441–2445, 2006.

JOLY, A.B. **Gêneros de algas marinhas da costa Atlântica Latino-Americana**. 1. ed. São Paulo: Ed. da USP, 1967.

JOLY, A.B. **Botânica. Introdução à taxonomia vegetal**. 3. ed. São Paulo: Ed. da USP, 1976.

KANG, H.S.; CHUNG, J.Y.; KIM, J.Y.; SON, B.W.; JUNG, H.A. & CHOI, J.S. Inhibitory phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on total reactive oxygen species (ROS) generation. **Arch. Pharmacol Res.**, v. 27 (2), p. 194-198, 2004.

KELECOM, A.; TEIXEIRA, V.L.; PITOMBO, L.F. Quimiotaxonomia de Dictyotales (Phaeophyta). 6. Da sinonímia entre as algas pardas *Dictyota dentata* e *Dictyota mertensii*. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v. 40, p. 67-70, 1991.

KELECOM, A. Secondary metabolites from marine microorganisms. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 74 (1), p. 151-170, 2002.

KUDA, T.; TSUNEKAWA, M.; GOTO, H.; ARAKI Y. Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, p. 625-633, 2005.

LANGEBARTELS, C.; WOHLGEMUTH, H.; KSCHIESCHAN, S.; GRÜN, S.; SANDERMANN, H. Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 40, p. 567-575, 2002.

LE TUTOUR, B.; BENSLIMANE, F.; GOULEAU, M.P.; GOUYGOU, J.P.; SALDAN, B.; QUEMENEUR, F. Antioxidative activities of algae extracts, synergistic effect with vitamin E. **Phytochemistry**, v. 29, p. 3759-3765, 1990.

LEDFOURD, H.K. & NIYOGI, K.K. Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. **Plant, Cell and Environment**, v. 28, p. 1037-1045, 2005.

LEE, J-Y.; HWANG, W-I.; LIM, S-T. Antioxidant and anticancer activities of organic extracts from *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 409-415, 2004.

LHULLIER, C. **Triagem de macroalgas bênticas do litoral de santa catarina biomonitorada pelo ensaio de letalidade para larvas de artemia salina e investigação fitoquímica de *Pterocladia capillacea***. 103f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

LI, K.; LI, X.; JI, N.; WANG, B. Natural bromophenols from the marine red alga *Polysiphonia urceolata* (Rhodomelaceae): Structural elucidation and DPPH radical-scavenging activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 6627-6631, 2007.

LOURENÇO, S.O. & MARQUES JÚNIOR, A.N. Produção primária marinha. In: PEREIRA, R.C.; SOARES-GOMES, A. **Biologia Marinha**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2002. p. 195-227.

MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Society**, v. 45, p. 594-598, 1968.

MATANJUN, P.; MOHAMED, S.; MUSTAPHA, N.M.; MUHAMMAD, K.; MING, C.W. Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, p. 367–373, 2008.

MATSUKAWA, R.; DUBINSKY, Z.; KISHIMOTO, E.; MASAKI, K.; MASUDA, Y.; TAKEUCHI, T.; CHIHAARA, M.; YAMAMOTO, Y.; NIKI, E.; KARUBE, I. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 29-35, 1997.

MATSUMOTO, R.L.T. **Atividade antioxidante do chá mate (*Ilex paraguariensis*)**. 103f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MENSAH, A.Y.; SAMPSON, J.; HOUGHTON, P.J.; HYLANDS, P.J.; WESTBROOK, J.; DUNN, M.; HUGHES, M.A.; CHERRY, G.W. Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 219-226, 2001.

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. **J. Am. Oil Society**, v. 48, p. 91, 1971.

NAHAS, R.; ABATIS, D.; ANAGNOSTOPOULOU, M.A.; KEFALAS, P.; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V. Radical-scavenging activity of Aegean Sea marine algae. **Food Chemistry**, v. 102, p. 577-581, 2007.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources os new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NISHIDA, T. A method for screenig potential antioxidant activity. **Journal of Biotechnology**, v. 51, p. 149-155, 1996.

NOMURA, T.; KIKUCHI, M & KAWAKAMI, Y. Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-difenil-2-pidrilidrazila (DPPH). **Biochem. Mol. Biol. Internat.**, v. 42 (2), p. 361-370, 1997

OLIVEIRA, E. C. de; HORTA, P. A.; AMANCIO, E.; SANT'ANNA, C. L. Algas e angiospermas marinhas bêmicas do litoral brasileiro. In: MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. (Org.). **Macrodiagnóstico da Zona Costeira do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério do Meio Ambiente, 2001, v., p. -.

PAULERT, R. **Atividade antimicrobiana e controle da antracnose do feijoeiro comum (*phaseolus vulgaris l.*) utilizando polissacarídeo e extratos da macroalga marinha *Ulva fasciata***. 107f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Centro de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

PEDERSEN, M. Actividad antioxidante y acidos fenólicos del alga marina. **Phytochemistry**, v. 17, p. 291, 1978.

PEREIRA, R.C. Ecologia química marinha. In: PEREIRA, R.C.; SOARES-GOMES, A. **Biologia Marinha**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2002. p. 281-310.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perpectivas. **Química Nova**, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v. 67 (5), p. 289-297, 1997.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

RAYMUNDO, M.S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v. 40 (4), p. 495-503, 2004.

RECIO, M. C.; GINER, R. M.; MÁÑEZ, S. Screening of tropical medicinal plants for antiinflammatory activity. **Phytoth. Res.**, v. 9, p. 571-574, 1995.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20 (7), p. 933-956, 1996.

ROCHA, F. D. **Atividade antioxidante de produtos naturais de algas marinhas bentônicas e espécies de bromeliaceae.** Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) - Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

ROCHA, F.D.; PEREIRA, R.C.; KAPLAN, M.A.C.; TEIXEIRA, V.L. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17 (4), p. 631-639, 2007.

RUBERTO, G.; BARATTA, M.T.; BIONDI, D.M. & AMICO, V. Antioxidant activity of extracts of the marine algal genus *Cystoseira* in a micellar model system. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, p. 403-407, 2001.

SADIQUE, J.; CHANDRA, T.; THENMOZHI, T. Biochemicals modes of action of *Cassia occidentalis* and *Cardiospermum halicatum* in inflamantion. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 19, p. 213-219, 1987.

SHARMA, Y.K. & DAVIS, K.R. The effects of ozone on antioxidant responses in plants. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 23 (3), p. 480-488, 1997.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 215 (2), p. 213-219, 1993.

SOARES, A.R.; ABRANTES, J.L.; SOUZA, T.M.L.; FONTES, C.F.L.; PEREIRA, R.C.; FRUGULHETTI, I.C.P.P.; TEIXEIRA, V.L. *In vitro* antiviral effect of meroditerpenes isolated from the Brazilian *Styopodium zonale* (Dictyotales). **Planta Medica**, v. 73 (11), p. 1221-1224, 2007.

SPITZ, D.R.; AZZAM, E.I.; LI, J.J.; GIUS, D. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: A unifying comcept in stress response biology. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 23, p. 311-322, 2004.

TAIT, A.; GANZERLI, S.; DI BELLA, M. Synthesis and free radical scavenging activity of 4-(2H-1,2,4-Benzothiadiazine-1,1-dioxide-3-yl)-2,6-bis(1,1-dimethylethyl)phenols. **Tetrahedron**, v. 52, p. 1287-1296, 1996.

TAKAMATSU, S.; HODGES, T.W.; RAJBHANDARI, I.; GERWICK, W.H.; HAMANN, M.T.; NAGLE, D.G. Marine Natural Products as Novel Antioxidant Prototypes. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 605-608, 2003.

TARGETT, N. M. & ARNOLD, T. M. Predicting the effects of brown algal phlorotannins on marine herbivores in tropical and temperate oceans. **Journal of Phycology**, v. 34(2), p. 195–205, 1998.

TEIXEIRA, V.L. Produtos Naturais Marinhos. In: PEREIRA, R.C.; SOARES-GOMES, A. **Biologia Marinha**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2002. p. 249-279.

TEPE, B.; DAFERERA, D.; TEPE, A.; POLISSIOU, M.; SPKMEN, A. Antioxidant activity of the essential oil and various extracts of *Nepeta flavida* Hub.-Mor. from Turkey. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1358-1364, 2007.

TIWARI, A.K. Imbalance in antioxidant defense and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. **Current Science**, v. 81, p. 1179-1187, 2001.

TSUDA, M.; KARIYA, Y.; IWAMOTO, R.; FUKUSHI, E.; KAWABATA J.; KOBAYASHI, J. Amphidinolides B4 and B5, potent cytotoxic 26-membered macrolides from dinoflagellate *Amphidinium* species, **Marine Drugs**, v. 3, p. 1–8, 2005.

VEGA, M.P.; PIZARRO, R.A. Oxidative stress and defence mechanisms of the freshwater *Daphnia longispina* exposed to UV radiation. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol**, v. 54, p. 121–125, 2000.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27 (1), p. 139-145, 2004.

WAALAND, J. R.; STILLER, J. W.; CHENEY, D. P. Macroalgal candidates for genomics. **Journal of Phycology**, v. 40, p. 26-33, 2004.

WANG, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, Z.; LI, Z. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 127–132, 2008.

WICKENS, A.P. Ageing and the free radical theory. **Respiration Physiology**, v. 128, p. 379-391, 2001.

XU, C.; NATARAJAN, S.; SULLIVAN, J.H. Impact of solar ultraviolet-B radiation on the antioxidant defense system in soybean lines differing in flavonoid contents. **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, p. 39–48, 2008.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from Reactive Oxygen Species. **Physiol. Rev.** v. 74, p. 139-162, 1994.

YUAN, Y.V.; WALSH N.A. Antioxidant and proliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 1144-1150, 2006.

ZARDO, D.M. **Avaliação do teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em maçãs e seus produtos.** 73f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de pós graduação em ciência e tecnologia de alimentos - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2007.