



***Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana
em algas da costa de Peniche (Portugal): identificação de
compostos bioactivos com elevado potencial
biotecnológico.***

Susete Filipa Gonçalves Pinteus

[2011]



Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana em algas da costa de Peniche (Portugal): identificação de compostos bioactivos com elevado potencial biotecnológico.

Susete Filipa Gonçalves Pinteus

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos Recursos Marinhos

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Doutor Rui Pedrosa e co-orientação da Doutora Ana Rita Mendão.

[2011]

Título: Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana em algas da costa de Peniche (Portugal): identificação de compostos bioactivos com elevado potencial biotecnológico

Copyright © Susete Filipa Gonçalves Pinteus
Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche
Instituto Politécnico de Leiria
2011

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projecto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

À memória da minha Mãe,
ao meu Pai e Irmãos,
ao Paulo.

Resumo

Neste trabalho foi avaliado o potencial biotecnológico de dez algas da costa de Peniche relativamente à sua capacidade antioxidante e antimicrobiana. As algas analisadas foram *Asparagopsis armata*, *Plocamium cartilagineum*, *Ceramium ciliatum*, *Sphaerococcus coronopifolius*, *Codium adhaerens*, *Ulva compressa*, *Fucus spiralis*, *Saccorhiza polyschides*, *Stypocaulon scoparium* e *Halopteris filicina*. A identificação de compostos bioactivos das algas que revelaram o maior potencial biotecnológico também foi alvo de estudo.

Os compostos bioactivos foram extraídos das algas com recurso a solventes, nomeadamente metanol, *n*-hexano e diclorometano. Estes extractos foram utilizados em todos os ensaios experimentais.

A capacidade antioxidante foi determinada através da Quantificação Total de Polifenóis (QTP) pelo método de Folin-Ciocalteu e através da avaliação da capacidade de redução do radical 1, 1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). A capacidade antimicrobiana foi avaliada através do método de difusão em disco em *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. Por outro lado, a actividade antifúngica foi avaliada pelo acompanhamento da curva de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* na ausência e na presença dos extractos das algas. A identificação de compostos bioactivos foi realizada por espectrometria de massa com ionização por “electrospray” (ESI-MS).

A alga *Fucus spiralis*, na fracção metanólica, foi a alga que apresentou maior actividade antioxidante, com $90,01 \pm 0,003$ mg de equivalentes de ácido gálico/g extracto. As algas *Saccorhiza polyschides* e *Fucus spiralis* exibiram o efeito mais potente na capacidade de redução do DPPH, com IC₅₀ de 0,049 e 0,099 mg de extracto metanólico/ml, respectivamente.

Relativamente à capacidade antimicrobiana, não existiram resultados positivos contra *E. coli*. No entanto existiram vários resultados positivos contra *Bacillus subtilis*, tendo sido a alga *Asparagopsis armata* (fracção metanólica) a que apresentou o maior potencial com um halo de inibição de 10 mm para a menor concentração a que se obteve actividade (100 µg/disco).

Quanto à actividade antifúngica, alga *Sphaerococcus coronopifolius* produziu um efeito inibitório muito potente no crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, com IC₅₀ de 56,44; 78,9 e 40,2 µg/ml nas fracções metanólica, diclorometano e *n*-hexano, respectivamente.

Não foi possível identificar as principais moléculas responsáveis pela actividade antimicrobiana e antioxidante, no entanto foram identificados dois ácidos gordos de cadeia longa, na fracção do diclorometano da alga *Sphaerococcus coronopifolius*, o ácido heptadecanóico e o ácido oleico.

Pela realização deste trabalho podemos concluir que as algas castanhas *Fucus spiralis* e *Saccorhiza polyschides* foram as que apresentaram mais poder antioxidante. Por outro lado, as algas vermelhas *Sphaerococcus coronopifolius* e *Asparagopsis armata* destacaram-se pelo elevado potencial antimicrobiano. Das quatro algas referidas, as algas *Fucus spiralis* e *Sphaerococcus coronopifolius*, pela potência dos resultados obtidos na capacidade antioxidante e na capacidade antifúngica, respectivamente, são as algas que abrem maiores janelas para a identificação e obtenção de novas moléculas com potencial biotecnológico relevante.

Palavras chave: Actividade antioxidante; Actividade antimicrobiana; Compostos bioactivos; Algas.

Abstract

The biotechnological potential of ten algae from the Peniche coast was evaluated for their antimicrobial and antioxidant activity. The studied algae were *Asparagopsis armata*, *Plocamium cartilagineum*, *Ceramium ciliatum*, *Sphaerococcus coronopifolius*, *Codium adhaerens*, *Ulva compressa*, *Fucus spiralis*, *Saccorhiza polyschides*, *Stypocaulon scoparium* and *Halopteris filicina*.

The bioactive compounds were extracted from algae with methanol, *n*-hexane and dichloromethane and all tests were performed with these fractions.

The antioxidant activity was evaluated both, by quantification of the Total Polyphenol Contents by the Folin-Ciocalteu method and by 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity. The antimicrobial activity was evaluated against *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* by the disk diffusion method and the antifungal activity was evaluated by the *Saccharomyces cerevisiae* growth in the presence or absence of the algae extracts. The identification of the bioactive molecules was performed by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS).

Fucus spiralis presented the highest antioxidant activity in the methanolic fraction with a total polyphenolic concentration of $90,01 \pm 0,003$ acid galic equivalent/g extract. *Saccorhiza polyschides* and *Fucus spiralis* had the most potent scavenging activity of DPPH in the methanolic fraction with an IC_{50} of 0,049 and 0,099 mg of extract/ml, respectively.

Regarding to the antimicrobial activity, there were no positive results against *E. coli*. However we observed several positive results against *Bacillus subtilis* with *Asparagopsis armata* being the most active algae with an inhibitory halo of 10 mm in the lower concentration with activity (100 μ g/disk).

Concerning to the antifungal activity, in all studied fractions, *Sphaerococcus coronopifolius* produced the most potent inhibitory activity against *Saccharomyces cerevisiae* growth with an IC_{50} of 56,44; 78,9 and 40,2 μ g/ml in the methanolic, dichloromethane and *n*-hexane fractions, respectively.

With the ESI-MS analysis we couldn't identify the main molecules linked to the high antioxidant and antimicrobial activities. However, we identified two long chain fatty acids, the heptadecanoic acid and oleic acid, on the dichloromethane fraction of *Sphaerococcus coronopifolius*.

With this work we can conclude that the brown algae *Fucus spiralis* and *Saccorhiza polyschides* had the most potent antioxidant activity. By contrast, the red algae *Sphaerococcus coronopifolius* and *Asparagopsis armata* stand out for the high antimicrobial activity. However, *Fucus spiralis* and *Sphaerococcus coronopifolius* showed the highest antioxidant and antimicrobial activity, respectively. All this agree with the view

Abstract

that these algae are excellent sources of new bioactive molecules with significant biotechnological potential.

Key words: Antioxidant activity; Antimicrobial activity; Bioactive compounds; Algae.

Índice

	Página
Resumo	vii
Abstract	xi
1. Introdução	1
1.1 Biodiversidade marinha: as algas como fonte de compostos bioactivos	1
1.2 Desenvolvimento de novos antimicrobianos	3
1.3 Stress oxidativo e o papel dos antioxidantes	5
1.3.1 Os antioxidantes e a Indústria Alimentar	8
1.4 Identificação de moléculas bioactivas	11
2. Objectivos	15
2.1 Objectivo geral	15
2.2 Objectivos específicos	15
3. Material e Métodos	19
3.1. Recolha e preparação de amostras	19
3.2. Preparação dos extractos das amostras	19
3.3. Avaliação da capacidade antioxidante	19
3.3.1. Quantificação Total de Polifenóis	19
3.3.2. Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH	20
3.4. Avaliação da capacidade antimicrobiana	20
3.4.1. Preparação dos meios de cultura	20
3.4.2. Avaliação da capacidade antibacteriana	21
3.4.3. Avaliação da capacidade antifúngica	21
3.5 Identificação de moléculas bioactivas	22
3.6 Análise estatística	23
4. Resultados	27
4.1. Avaliação da capacidade antioxidante	27
4.1.1. Quantificação Total de Polifenóis (QTP)	27
4.1.2. Capacidade de redução do radical DPPH	28
4.2 Capacidade antimicrobiana	32
4.2.1 Capacidade antibacteriana	32
4.2.2 Capacidade antifúngica	33
4.3 Identificação de compostos bioactivos	38
5. Discussão e conclusão	43
6. Perspectivas futuras	55
7. Bibliografia	59

Introdução

1.1 Biodiversidade marinha: as algas como fonte de compostos bioactivos.

“A Terra é azul”, constatou Yuri Gagarin, o primeiro e privilegiado astronauta que a avistou do espaço. Existem diversas opiniões no universo científico que defendem que o planeta Terra dever-se-ia chamar "planeta água", pois é constituído por 77% de água (Yoshida, 2001). Como consequência da elevada quantidade de água presente no planeta Terra, a biodiversidade marinha é extremamente vasta, de tal forma que se acredita conhecer apenas 5% de todo o ecossistema marinho, sendo este uma fonte abundante de metabolitos secundários para pesquisa de novos compostos bioactivos (Li e Qin, 2005; Larsen *et al.*, 2005; Ding *et al.*, 2010). Estes metabolitos são, normalmente, produzidos como resposta a pressões ambientais, como defesa contra predadores, competição pelo espaço, captura de presas, entre outros (Haefner, 2003; Rhimou *et al.*, 2010).

A imensa biodiversidade de organismos marinhos e o seu potencial biotecnológico, tem ao longo do tempo ganho cada vez mais interesse e despertado a atenção de cientistas das diversas áreas da biotecnologia. Dada a sua abundância nos ecossistemas marinhos, as algas têm sido alvo de vários estudos nos quais têm revelado ser fonte dos mais variados metabolitos secundários, uma vez que estão sempre submetidas a rápidas variações de intensidade de luz bem como diferentes concentrações de oxigénio (O₂) e dióxido de carbono (CO₂) ao longo da coluna de água, obrigando o seu metabolismo a ter uma resposta eficiente a estas pressões (Takeshi *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2003; Plaza *et al.*, 2008; Potin *et al.*, 2002). Deste modo, estes organismos podem representar uma importante fonte de novos compostos bioactivos com capacidade antioxidante e/ou antimicrobiana, que poderão ser importantes para o desenvolvimento de novas moléculas com interesse quer para a indústria alimentar quer para a indústria farmacêutica, entre outras (Matsukawa *et al.*, 1997).

Existem mais de 5000 espécies de algas, desde algas microscópicas a algas gigantes que podem atingir os 60 metros de comprimento. A sua estrutura celular, o arranjo celular para formar corpos multicelulares e os seus pigmentos fotossintéticos variam significativamente de espécie para espécie (Sze, 1998).

Podem ser planctónicas, como a maioria das espécies unicelulares e viverem suspensas na coluna de água, ou até mesmo por baixo de gelo nas zonas polares. Podem também ser bentónicas, fixas ao sedimento ou viver dentro do próprio sedimento. São limitadas a áreas de pouca profundidade devido à dispersão da luz com a profundidade. A maior profundidade a que foi encontrada uma alga foi a 268 m, uma alga vermelha-púrpura onde a luz se torna verde-azulada e a sua intensidade é apenas 0,0005% da luz solar à superfície. A esta profundidade a zona vermelha do espectro solar

é filtrada através da coluna de água o que não permite obtenção de energia suficiente para a realização da fotossíntese. Estas algas conseguem sobreviver a estas profundidades porque possuem pigmentos acessórios que absorvem luz em regiões do espectro diferentes da absorvência captada pelas clorofilas *a* e *b* canalizando esta energia para a clorofila *a*. Por outro lado, as algas que vivem em zonas bastante iluminadas tipicamente possuem pigmentos que as protegem contra os danos causados por excessiva luminosidade.

É esta diversidade da composição e quantidade de pigmentos que confere às algas a grande variedade de cores que as caracterizam e as classifica por grupos Rhodophyta (algas vermelhas), Heterokontophyta (algas castanhas) e Chlorophyta (algas verdes). Adicionalmente, as algas produzem também uma vasta gama de moléculas que podem ser utilizadas pelo Homem na área Biomédica, Cosmética, Indústria alimentar e Farmacêutica, o que faz destes organismos marinhos um alvo de estudo muito interessante em termos biotecnológicos (Barsanti e Gualtieri, 2006).

Cada vez mais as indústrias, farmacêutica, cosmética e alimentar, focam os seus esforços na descoberta de novas substâncias naturais, que sejam mais eficientes e menos nocivas. Na indústria alimentar as algas representam um alimento natural que fornece um elevado valor nutritivo, baixo em calorias. Possuem muitos minerais, proteínas com todos os aminoácidos essenciais, vitaminas incluindo a vitamina B12 (ausente nos vegetais superiores), fibras e baixo conteúdo em gorduras (Pereira, 2007). Desde tempos ancestrais que as algas são utilizadas como fonte de compostos bioactivos de uma forma empírica, no entanto só mais recentemente, com o desenvolvimento de novas tecnologias se conseguiu perceber que substâncias benéficas estariam presentes (Scheper *et al.*, 2005). Já foram isolados, a partir de algas, agentes terapêuticos naturais que incluem classes de compostos como terpenóides, ácido ribonucleico, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, entre outros (Fusetani, 2000) com as mais diversas actividades biológicas, tais como antibacterianas, antioxidantes, antifúngicas, antimaláricas, antitumorais, anti-inflamatórias entre outras (Mayer *et al.*, 2009).

Neste contexto, Portugal com uma extensa costa de aproximadamente 830 km e com o alargamento da plataforma continental, revela-se um país com um enorme potencial em recursos biotecnológicos marinhos.

1.2 Importância de novos antimicrobianos.

Desde o início da Humanidade que os produtos naturais têm disponibilizado ao Homem os primeiros tratamentos de doenças. Foram descobertos fósseis do Neandertal com vestígios do uso de plantas medicinais. Nas culturas orientais existem tradições também muito ancestrais, cerca de 2000 aC, do uso de plantas no tratamento das mais diversas patologias e alguns dos primeiros registos descobertos sobre terapêuticas com plantas foram encontrados na Mesopotâmia e datam 2600 aC. Na realidade muitos destes agentes continuam a existir de uma forma ou de outra no tratamento de inflamações, gripes, constipações e contaminações por parasitas (Gad, 2005).

A organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial ainda recorre à medicina tradicional para os primeiros cuidados de saúde. O desenvolvimento de novas drogas ao longo dos anos tem tido base num pequeno número de moléculas e a grande maioria destas são de origem natural (Cragg e Newman, 2005). Os recursos naturais têm-nos revelado o caminho para novas abordagens terapêuticas, têm contribuído para a compreensão de inúmeras vias metabólicas e têm estado constantemente presentes como ferramentas na química biológica e molecular, bem como na compreensão da biologia celular (Scheper *et al.*, 2005).

Apesar dos muitos avanços terapêuticos, a constante evolução dos microrganismos tem sido um grande desafio para a medicina. O sucesso dos medicamentos antimicrobianos contra bactérias patogénicas encontra-se entre os maiores feitos da medicina moderna, no entanto, após mais de cinquenta anos de uso generalizado, muitos anti-microbianos já não são tão eficazes, em particular quando usados contra vírus, fungos ou parasitas. Mais de 50% das drogas disponíveis nos mercados são extraídas ou são sinteticamente obtidas, como por exemplo o taxol, a morfina, aspirina, penicilina, ciclosporina entre outros (Balandrin *et al.*, 1993). Como tal, a grande maioria dos antimicrobianos existentes hoje em dia, não são efectivamente compostos novos, mas sim alterações na molécula original, de modo a tentar ultrapassar a resistência dos microrganismos. A resistência aos medicamentos é um problema particularmente grave quando se trata de hospitais que albergam doentes em estado crítico, os quais são menos capazes de combater uma infecção sem a ajuda de antibióticos.

Quando exposto a um antimicrobiano, o microrganismo tenta defender-se de várias formas, sendo uma das mais comuns, a criação de mutações no seu genoma. Com uma capacidade de multiplicação incrível, estas mutações passam de geração em geração levando à criação de populações microbianas resistentes. Para além disto, as bactérias

têm a capacidade de transferir estas resistências para bactérias de espécies diferentes, através de diversos mecanismos (Hall *et al.*, 2001).

O aumento do aparecimento de microrganismos multi-resistentes com poucas opções de tratamento e muitas vezes ineficazes, como *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), *Enterococcus* resistentes a vancomicina (VRE) e *Bacillus* resistentes a β -lactamases de largo espectro, são alvo de grande preocupação pelos responsáveis de saúde pública. *Staphylococcus aureus* é talvez o patogénico que suscita mais preocupações pois possui virulência intrínseca e uma elevada capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais, o que lhe confere a possibilidade de provocar as mais diferentes infecções, como infecções urinárias, mastites, flebites, osteomielites, meningites, etc. (Al-Haj, *et al.*, 2010).

Apesar de fazer parte da nossa microflora natural, algumas estirpes de *S. aureus* têm a capacidade de produzir toxinas muito estáveis a altas temperaturas provocando uma série de doenças em humanos. Pode também multiplicar-se na comida mantida à temperatura ambiente e produzir enterotoxinas que são resistentes ao calor, a temperaturas de refrigeração e mesmo ao congelamento, causando gastroenterites ou inflamação no trato intestinal (Loir *et al.*, 2003).

Para além das doenças provocadas por bactérias, as doenças provocadas por fungos desde sempre que são problemáticas na sua terapêutica. A principal característica dos fungos que os torna potenciais patogénicos é possuírem dimorfismo, ou seja, existem na forma de micélios no ambiente mas convertem-se em fungo com o aumento da temperatura do hospedeiro humano (Klein e Tebbets, 2007).

Estas patologias podem incluir mais do que uma simples micose mas também reacções alérgicas complicadas, nomeadamente devido a toxinas que podem ser libertadas pelos fungos (Gad, 2005). As micoses são as doenças mais comuns, que podem ser cutâneas ou sistémicas. Nas sistémicas os esporos entram geralmente por inalação e conseqüentemente alcançam o sistema circulatório atingindo o sangue podendo causar infecções graves e até mesmo levar à morte. As micoses cutâneas são as mais comuns infecções fúngicas nos humanos e são causadas por fungos denominados dermatófitos que possuem a capacidade de utilizar a queratina da pele, do cabelo ou das unhas segregando uma enzima, a queratinase. O nome mais vulgar para este tipo de infecção é denominado por “pé de atleta” (Gad, 2005; Hogg, 2005).

As micoses sistémicas são muito mais graves e incluem condições como a histoplasmose e a blastomicose. Estas são provocadas por um fungo denominado de *Histoplasma capsulatum* e está associado a contaminações por excrementos de morcego ou de pássaros. Quando a infecção é localizada apenas nos pulmões, normalmente com

a terapêutica adequada acaba por desaparecer com o tempo, no entanto se se dissemina para outros locais do organismo como o coração ou sistema nervoso, pode ser fatal.

O *Aspergillus fumigatus* é um exemplo de um patogénico oportunista que normalmente não exhibe patogenicidade, no entanto pode ser perigoso em indivíduos que apresentem o seu sistema imunitário debilitado. Outras micoses oportunistas incluem candidíase e *Pneumocystis pneumonia*. Estes são encontrados em elevadas percentagens em pessoas com o sistema imunitário comprometido como os portadores de sida. O organismo causador, *Pneumocystis carinii* era anteriormente considerado um protozoário, no entanto foi classificado como fungo em resultado da análise de sequências de DNA/RNA. Vive naturalmente em simbiose com uma série de mamíferos e possivelmente é transmitido aos humanos através do contacto com cães.

A ocorrência de micoses oportunistas tem aumentado substancialmente desde a introdução dos antibióticos, imunossuppressores e drogas citotóxicas. Estes compostos diminuem as defesas naturais dos indivíduos ou elimina microrganismos naturais da flora humana que são competidores dos patogénicos, permitindo aos fungos proliferarem (Hogg, 2005).

Desta forma, um dos principais objectivos de muitos investigadores nos últimos anos tem sido a procura de moléculas que possam ser potenciais fármacos antifúngicos eficazes especialmente nos casos em que os actuais não tenham a eficácia necessária.

1.3 Stress oxidativo e o papel dos antioxidantes.

Se por um lado, o oxigénio molecular é essencial para a vida aeróbia, funcionando como o último aceitador de electrões na cadeia respiratória, permitindo assim, a formação de energia na forma de ATP (Adenosina Trifosfato), a reoxidação do NADH (Dinucleótido de Nicotinamida-Adenina reduzido) e do FADH₂ (Dinucleótido de Flavina-Adenina reduzido), por outro lado, em situações de stress, há um desacoplamento do fluxo de electrões que pode conduzir à formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Pietta, 2000). Há diversos tipos de ROS, sendo todas elas moléculas com elevada reactividade. Os radicais derivados do oxigénio ou espécies reactivas de oxigénio representam a classe mais importante de radicais geradas nos sistemas vivos (Valko *et al.*, 2007). O radical hidroxilo (*OH), com uma semi-vida de 10⁻⁹ segundos e o radical alcóxido (RO*), com uma semi-vida de alguns segundos, são os mais reactivos e atacam moléculas muito próximas do seu local de formação. Juntamente com o anião superóxido, hidroperóxido lipídico e óxido nítrico, menos reactivos, formam a classe das ROS radicais. Os radicais livres podem ser definidos como átomos ou moléculas que têm em

comum o modo como os electrões, que constituem uma parte importante da sua estrutura, estão dispostos. Em circunstâncias normais, os electrões estão dispostos aos pares, o que lhes confere estabilidade. No entanto, um radical livre contém sempre um ou mais electrões soltos na sua estrutura. Para tentar igualar o número de electrões que contém, e deste modo adquirir estabilidade, o radical livre tem duas opções à escolha: tirar um electrão de uma molécula ou átomo vizinho ou dar um electrão a uma molécula/átomo vizinho. Em qualquer caso, um radical livre tentará sempre equilibrar o número de electrões presentes na sua estrutura, o que dará lugar a uma cadeia de reacções. Os radicais livres são portanto altamente instáveis e as reacções a que dão início danificam as moléculas e os átomos à sua volta (Basu *et al.*, 1999).

A classe das ROS não-radicaais é constituída pelo oxigénio singleto (O^2), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), e ácido hipocloroso (HOCl) (Pietta, 2000). As ROS podem ser geradas exogenamente ou produzidas intracelularmente, a partir de diversas fontes, como mitocôndrias, peroxissomas, lipoxigenases, NADH oxidase, citocromo P450, entre outros (Finkel e Holbrook, 2000; Valko *et al.*, 2004). Sendo produtos normais do metabolismo celular, por vezes as ROS são produzidas especificamente com determinadas funções biológicas, como a produção de energia, fagocitose, produção de compostos, regulação do crescimento celular e sinalização intercelular (Pietta, 2000). Se os efeitos benéficos ocorrem quando as ROS são produzidas em concentrações baixas ou moderadas, os efeitos nocivos ocorrem quando há uma sobreprodução destes ou um défice de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Ou seja, o stress oxidativo resulta de uma alteração do estado de equilíbrio entre reacções pro-oxidantes e antioxidantes nos organismos (Valko *et al.*, 2007; Basu *et al.*, 1999). Em concentrações elevadas as ROS podem ser extremamente prejudiciais, atacando outras moléculas e causando oxidações em lípidos das membranas celulares, enzimas, proteínas, hidratos de carbono e DNA (Pietta, 2000; Basu *et al.*, 1999). O dano oxidativo no Homem, é considerado uma das principais causas do envelhecimento, um precursor de diversas doenças degenerativas bem como de doenças cardiovasculares, cataratas, cancro, diabetes, entre outras (Dalle-Donne *et al.*, 2006; Markesbery, 1997; Tieu *et al.*, 2003). No entanto, o organismo tem vários mecanismos de defesa antioxidantes contra as ROS que incluem enzimas (catalase, superóxido dismutase, glutathione redutase, e glutathione peroxidase), moléculas endógenas que podem funcionar como antioxidantes (ácido úrico, glutathione, albumina, proteínas contendo grupos -SH e bilirrubina), algumas vitaminas (ácido L-ascórbico e α -tocoferol) e carotenóides (Fernandez-Panchon *et al.*, 2008; Basu *et al.*, 1999). Para além destes mecanismos endógenos, moléculas antioxidantes presentes nos alimentos

vegetais podem ajudar a diminuir o dano oxidativo, quer actuando directamente sobre ROS, quer estimulando sistemas defensivos endógenos (Scalbert *et al.*, 2005).

No entanto, o sistema de defesa do organismo humano muitas vezes não é suficiente para a protecção dos ataques dos radicais livres devido a vários factores externos como o stress, uma má alimentação, poluição, tabagismo, entre outros, que aumentam substancialmente a concentração de radicais livres no organismo. O verdadeiro perigo dos radicais livres é portanto a capacidade de alterar a conformidade de moléculas essenciais à vida de forma irreversível, como por exemplo proteínas, lípidos e ADN (Heo *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2007). Por estas razões é cada vez mais evidente que as vitaminas e antioxidantes podem desempenhar um papel protector da saúde humana, na medida em que estabilizam os radicais livres prevenindo a oxidação dessas moléculas (Scalbert *et al.*, 2005; Basu *et al.*, 1999).

Tal como já foi mencionado, as doenças neurodegenerativas estão intimamente relacionadas com o stress oxidativo. Na realidade, o cérebro é considerado um órgão muito vulnerável ao stress oxidativo devido a factores relacionados com: a) presença de muitas vias metabólicas associadas à glicose; b) presença de concentração elevada de ácidos gordos polinsaturados que podem ser potenciais substratos para a peroxidação lipídica; c) presença de metais de transição activadores de enzimas que podem catalisar a formação de ROS (Chauhan e Chauhan, 2006).

As doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson têm sido alvo de vários estudos, os quais indicam que estas podem estar intimamente ligadas ao stress oxidativo (Cassarino *et al.*, 1997; Benzi e Moretti, 1995).

Num estudo realizado em 1986 por Martins e colaboradores, detectaram um aumento de actividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e da 6-fosfoglutationa desidrogenase (6PGD) em portadores da doença de Alzheimer. O aumento na actividade destas enzimas poderá estar relacionado com um aumento da produção de NADPH pelo sistema de destoxificação dos peróxidos pela glutatona. Desta forma, um aumento na actividade destas enzimas indica um aumento na produção de radicais livres, em especial de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) no cérebro. Sendo que a actividade das enzimas G6PD e 6PGD está associada à diminuição da utilização da glicose na via glicolítica, é de especular que esta diminuição da utilização de glicose é em parte resultado de stress oxidativo que promove o aumento da actividade de G6PD e 6PGD e portanto um aumento da utilização da via metabólica da hexose-monofostato às custas da via glicolítica.

Outro indicador de stress oxidativo na doença de Alzheimer é a actividade da enzima glutamina sintetase, altamente sensível ao stress oxidativo. A sua actividade é reduzida

em doentes de Alzheimer (Smith *et al.*, 1991). Existem também evidências directas da ocorrência de uma elevada peroxidação lipídica em cérebros de doentes de Alzheimer, facto que está também relacionado com a produção de radicais livres. Os danos provocados pelos radicais livres não estão apenas restringidos à doença de Alzheimer. Também têm sido relacionados com outras doenças neurodegenerativas como esclerose amiotrófica lateral, síndrome de Down e Parkinson.

Na doença de Parkinson, muitos trabalhos científicos têm demonstrado que existe um aumento de radicais livres, principalmente no nível dos núcleos dos neurónios. Estes produzem a L-Dopa e são alvo de citotoxinas e neurotoxinas que aumentam a produção de superóxidos. Estudos indicam que a administração de antioxidantes poderá permitir controlar esta produção, sendo este um dos passos fulcrais para a cura da doença, pois a produção de superóxidos inibe a produção de L-Dopa. Porém, se a célula não estiver completamente alterada também poderá ser possível a recuperação da produção de L-Dopa através da aplicação de antioxidantes (Pedrosa e Soares-da-Silva, 2002).

Ainda não é possível diagnosticar precocemente a doença de Parkinson, no entanto sabe-se que está relacionada com um aumento de peroxidação dos lípidos cerebrais, apesar de este estar protegido com uma elevada concentração de enzimas antioxidantes (Chinta e Andersen, 2008).

1.3.1 Os antioxidantes e a Indústria Alimentar.

Hoje em dia a indústria alimentar procura cada vez mais alimentos funcionais. Esta nova classe de produtos tem tido sucesso nos mercados devido à crescente procura por alimentos saudáveis (Plaza *et al.*, 2009). Os alimentos funcionais possuem ingredientes que por si só podem conferir benefícios à saúde, para além dos aspectos nutricionais que todos os alimentos devem conter. Existe uma vasta gama de compostos que podem ser utilizados como ingredientes funcionais, tais como carotenóides ou outros pigmentos fotossintéticos, ácidos gordos poli-insaturados, polifenóis, entre outros. Neste sentido, a procura por compostos naturais com actividades funcionais, como por exemplo, antioxidantes, faz cada vez mais sentido. Para além disto, no contexto da indústria alimentar, a pesquisa de antioxidantes de origem natural poderá ter uma aplicação muito prática na preservação dos alimentos, aumentando o tempo de vida destes.

Os alimentos ricos em gorduras são normalmente alimentos com um tempo de prateleira pequeno, pois estão sujeitos a uma intensa actividade de enzimas que actuam nos lípidos provocando a sua deterioração (Heo *et al.*, 2004). Este facto é particularmente evidente em alimentos que possuam um elevado conteúdo em ácidos gordos

insaturados, como por exemplo o peixe gordo, que podem ser facilmente oxidados durante o tempo de prateleira ou mesmo durante a sua preparação, resultando no desagradável ranço e em diferentes grupos químicos promotores de carcinogénese como hidróxidos, endoperóxidos, aldeídos, radicais hidroperóxidos, entre outros (Basu *et al.*, 1999). Desta forma é crucial a estabilização destes grupos e a prevenção da sua formação com a adição de antioxidantes. Os antioxidantes têm a capacidade de retardar a oxidação lipídica através da ligação competitiva ao oxigénio, através da ligação aos radicais livres e estabilizando os hidroperóxidos. Podem “sequestrar” as formas activas do oxigénio envolvidas nas primeiras etapas do processo de oxidação quebrando todo o processo, formando uma ligação estável antioxidante-radical que não poderá entrar nos passos seguintes do processo de peroxidação lipídica, impedindo assim a formação de produtos indesejáveis e como tal a degradação das propriedades benéficas do pescado (Basu *et al.*, 1999)

Hoje em dia a indústria alimentar ainda recorre a antioxidantes sintéticos como o butil-hidroxianisol (BHA), o butiol-hidroxitolueno (BHT), a hidroquinona tert-butílica (TBHQ) entre outros. No entanto, apesar da sua elevada capacidade antioxidante, a sua utilização tem sido muito controversa nomeadamente por suspeita de efeitos cancerígenos, estando mesmo a TBHQ proibida por falta de dados toxicológicos conclusivos. O antioxidante ideal deverá ser seguro sob o ponto de vista alimentar, não alterar o sabor, o aroma ou a cor do alimento, ser eficiente a baixas concentrações e a temperaturas de fritura e cozedura, ser facilmente incorporável, de fácil obtenção e barato (Bernardo-Gil *et al.*, 2001).

Neste contexto a adição de antioxidantes resultantes de fontes naturais poderá contribuir significativamente para o aumento do tempo de vida dos alimentos (Xiaojun *et al.*, 1996; Mageid *et al.*, 2009; Plaza *et al.*, 2008; Ramkumar *et al.*, 2009). Na realidade, a descoberta de compostos bioactivos marinhos que, simultaneamente, possuam uma elevada capacidade antioxidante e antimicrobiana, poderão aumentar substancialmente o tempo de vida dos alimentos podendo ser a resposta para a actual falta de compostos naturais na indústria alimentar.

Actualmente, já foram isolados ácidos fenólicos com elevada capacidade antioxidante em algas comestíveis, como os ácidos protocatequínico, p-hidroxibenzóico, 2,3-dihidroxibezóico, vanílico, cafeico, p-coumárico, salicílico, entre outros, que poderão ter aplicabilidade na indústria alimentar (Onofrejová *et al.*, 2010).

Os polifenóis são antioxidantes com elevado potencial que estão amplamente presentes nas plantas e nas algas, (Onofrejová *et al.*, 2010; Stern *et al.*, 1996). Os compostos fenólicos são resultado da biossíntese da hidroxicinamoil coenzima A e

podem ser quimicamente definidos como substâncias que possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxílicos, incluindo os seus derivados funcionais. Representam um grande grupo de moléculas que possuem um grupo fenólico (hidroxibenzeno). Em alguns casos podem possuir um precursor fenólico como os derivados de metoxibenzene ou podem ser moléculas bastante simples como ácidos fenólicos e quinonas (com apenas um anel); chalcones e estilbenos (com dois anéis) ou até antocianinas, benzofuranos, cumarinas, flavonóides, isoflavonóides, neoflavonoides e xantonas (com três anéis). Existem ainda compostos mais complexos como as taninas (Polya, 2003; Manach *et al.*, 2004).

O anel fenólico (fenil-OH, ou para os aromáticos no geral, Aril-OH) é planar e rico em electrões. O anel benzeno planar é hidrofóbico mas o grupo OH confere-lhe polaridade e solubilidade em água, bem como a capacidade de formação de pontes de hidrogénio (estas propriedades permitem interações proteína-fenol que são muito fortes quanto maior o número de interações existente). O grupo fenólico pode ser desprotonado (formando fenolato (fenil-O⁻) e pode ser oxidado originando uma quinona (Aril=O) e o radical aril-O[•]. Estas propriedades conferem aos compostos fenólicos actividade antioxidante biologicamente muito importante.

Outra das características dos polifenóis mais complexos relaciona-se com o extensivo sistema de duplas ligações existentes que permite a absorção de luz na parte visível do espectro, ou seja possuem cor.

Todas estas propriedades dos compostos fenólicos conferem-lhes propriedades moleculares funcionais únicas (Manach *et al.*, 2004; Polya, 2003).

Os polifenóis têm sido descritos como possuindo elevada actividade antioxidante *in vitro*, por medição da sua capacidade para aprisionar radicais livres e reduzir outros compostos, conseguindo ser mais eficazes que as vitamina C e E (Scalbert *et al.*, 2005; Riceevans *et al.*, 1997). Devido à sua estrutura química, os grupos fenólicos dos polifenóis podem aceitar um electrão ou protão e formar radicais fenólicos relativamente estáveis, impedindo as reacções de oxidação em cadeia nos compartimentos celulares (Scalbert *et al.*, 2005). Assim, um consumo elevado de frutos e vegetais ou alimentos caracterizados como ricos em substâncias antioxidantes, poderá reduzir os danos causados pelas ROS no organismo (Fernandez-Panchon *et al.*, 2008).

Vários estudos em animais demonstraram que o consumo de polifenóis limita o desenvolvimento de lesões ateromatosas e pode inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), o que poderá prevenir doenças cardiovasculares (Scalbert *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 1999). Para além da actividade antioxidante, também já foram documentados efeitos anticarcinogénicos dos polifenóis em animais. Yang e

colaboradores (2001) demonstraram que quando administrados a ratos, os polifenóis são agentes protectores e reduzem o número e crescimento de tumores induzidos por agentes carcinogénicos ou por implantação de células cancerígenas. Também em ratos foram demonstrados efeitos hipoglicémicos de polifenóis quando administrados oralmente após o consumo de glicose (Geetha *et al.*, 1994).

O maior e mais importante grupo de fenóis é o dos flavonóides (Robards e Antolovich, 1997; Tringali, 2001). Estes compostos têm sido reconhecidos na actividade anti-hepatotóxica, anti-inflamatória, anti-alérgica, anti-osteoporótica, anticarcinogénica, nas doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Vários estudos clarificam a acção dos flavonóides como agentes antioxidantes e está assente que o mecanismo de acção tem por base a modulação de sinal de vias intracelulares importantes para a função celular. A sua baixa toxicidade e elevada acessibilidade tem demonstrado que o seu consumo poderá ser um dos caminhos mais favoráveis para prevenir e tratar danos causados pelo stress oxidativo (Gomes *et al.*, 2008; Tringali, 2001).

1.4 Identificação de moléculas bioactivas.

Muitas moléculas bioactivas já foram identificadas em organismos marinhos, e podem ser divididas em esteróides, terpenóides, isoprenóides, não-isoprenóides, quinonas, compostos bromados, heterocíclicos de azoto e de azoto sulfurado, entre outras. Como não se conhece efectivamente a mistura complexa dos compostos bioactivos não é possível estabelecer-se uma técnica específica para a separação dos constituintes da mistura. No entanto, uma separação extensiva pode ser conseguida através da extracção com diferentes solventes orgânicos, como por exemplo o metanol, diclorometano e o *n*-hexano, sendo cada uma destas fracções sujeita aos ensaios biológicos. Normalmente os compostos biológicos da fracção *n*-hexano são mais fáceis de isolar que os compostos solúveis em água. Os compostos normalmente isolados da fracção *n*-hexano poderão ser ésteres, éteres, hidrocarbonetos de terpenóides, esteróis, ácidos gordos, alcanos, cumarinas, entre outros; com o diclorometano conseguem-se extrair compostos com polaridade intermédia como por exemplo alguns alcalóides e flavonóides e com metanol extraem-se os compostos polares como glicosídeos, taninas, alguns alcalóides, entre outros (Sarker *et al.*, 2006).

Posteriormente, para a identificação de compostos bioactivos pode recorrer-se a diversas técnicas analíticas, sendo as mais comuns a cromatografia líquida (LC) e/ou gasosa (GC), ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infravermelho

(IV), espectroscopia de absorção molecular e espectrometria de massa (MS) (Sarker *et al.*, 2006; Bhakuni e Rawat, 2005).

Para a purificação dos compostos, mais uma vez não existe um protocolo “standard” e as metodologias são seleccionadas basicamente por “tentativa e erro”. Estas técnicas podem incluir diversos tipos de cromatografia, bem como métodos de preparação de amostra, como por exemplo a extracção em fase sólida (SPE). As técnicas são seleccionadas consoante a natureza dos compostos, sendo necessário verificar se existe perda de actividade à medida que se vai isolando o composto de interesse (Riguera, 1997; Ebada, *et al.*, 2008).

Objetivos

2.1 Objectivo Geral

Os organismos marinhos têm-se revelado importantes produtores de compostos secundários com as mais variadas actividades funcionais e portanto de elevado interesse biotecnológico. Neste contexto, as algas estão muito pouco exploradas em Portugal, sendo importante o seu estudo e caracterização a nível de produção de compostos activos. Desta forma, o objectivo deste trabalho consiste na avaliação do potencial biotecnológico de algas da costa de Peniche relativamente ao seu potencial antioxidante e antimicrobiano, bem como a identificação de moléculas que possam estar envolvidas nestas actividades. As algas estudadas foram: *Asparagopsis armata*, *Plocamium cartilagineum*, *Ceramium ciliatum*, *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta); *Codium adhaerens*, *Ulva compressa* (Chlorophyta); *Fucus spiralis*, *Saccorhiza polyschides*, *Stypocaulon scoparium* e *Halopteris filicina* (Heterokontophyta).

2.2 Objectivos Específicos

Neste trabalho pretende-se extrair compostos bioactivos de algas com recurso a solventes orgânicos, efectuando-se um primeiro fraccionamento pela polaridade dos solventes utilizados, metanol, diclorometano e *n*-hexano. Estes extractos serão utilizados posteriormente para:

1. Avaliar o seu potencial antioxidante, quer pela Quantificação Total de Polifenóis (QTP) pelo método de Folin-Ciocalteu, quer pela avaliação da capacidade de destoxificação do radical DPPH.
2. Avaliar a capacidade antimicrobiana:
 - a) Avaliação da capacidade antibacteriana através do método de difusão em disco contra bactérias gram positivas e gram negativas;
 - b) Avaliação da capacidade antifúngica contra *Saccharomyces cerevisiae* através do acompanhamento do seu crescimento na presença e na ausência dos extractos das algas.
3. Identificação dos compostos bioactivos das algas que apresentarem um maior potencial antimicrobiano e antioxidante, através de aplicação de técnicas de espectrometria de massa com fonte de ionização por “electrospray” (ESI-MS).

Material e Métodos

3.1. Recolha e preparação de amostras.

As algas foram recolhidas na praia da Papôa e Quebrado, Peniche, Portugal e identificadas com a colaboração de um profissional botânico, a Doutora Teresa Mouga da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, como: *Asparagopsis armata*, *Codium adhaerens*, *Ulva compressa*, *Fucus spiralis*, *Halopteris filicina*, *Plocamium cartilagineum*, *Saccorhiza polyschides*, *Sphaerococcus coronopifolius*, *Stypocaulon scoparium* e *Ceramium ciliatum*.

As diferentes amostras foram lavadas em laboratório com água do mar, de modo a remover organismos invertebrados, areias e detritos. Após a lavagem, as algas foram pesadas, embaladas e congeladas a -80 °C (Thermo, Electron Corporation).

3.2. Preparação dos extractos das amostras.

A preparação dos extractos das algas foi efectuada de acordo com o método adaptado do trabalho de Mayachiew e Devahastin (2008). As algas congeladas foram trituradas, obtendo-se um pó ao qual foi adicionado solventes de diferentes polaridades, nomeadamente metanol, diclorometano e *n*-hexano. O pó obtido a partir da trituração, foi colocado num gobelé contendo 400 ml de metanol (> 99%, Fisher Scientific, Reino Unido) durante 12 horas, com agitação constante sendo posteriormente filtrado e colocado numa ampola de decantação. Nesta foi adicionado 400 ml de *n*-hexano (95%, Lab-Scan analytical Sciences, Polónia) procedendo-se a uma extracção líquido-líquido; por sua vez à biomassa filtrada adicionou-se 400 ml de diclorometano (99,8%, Fisher Scientific, Reino Unido) ficando em agitação durante 12 horas, sendo de seguida filtrado.

Os extractos obtidos após a filtração foram concentrados através da utilização de um rotavapor Laborota 4000 (Heidolph) a 40 °C, obtendo-se no final a biomassa de cada uma das três fracções. Estas foram suspensas em DMSO (Dimetilsulfóxido) (99,9%, Sigma, Steinheim, Alemanha) e mantidas a -20 °C até posterior utilização.

3.3. Avaliação da capacidade antioxidante.

3.3.1. Quantificação Total de Polifenóis.

A Quantidade Total de Polifenóis (QTP) foi avaliada através do método de Folin-Ciocalteu, adaptado a partir do trabalho realizado por Yu e colaboradores (2002). Num microtubo adicionou-se 890 µl de água destilada, 10 µl de amostra e 50 µl de reagente de Folin-Ciocalteu (Fluka Biochemika, Sigma Aldrich, Suíça). Após 2 minutos adicionou-se

150 µl de carbonato de sódio, Na₂CO₃ a 20% (p/v) (Merck, Darmstadt, Alemanha). A reacção foi incubada à temperatura ambiente, no escuro durante 1 hora, após a qual se mediu a absorvância a um comprimento de onda de 755 nm num espectrofotómetro de absorção molecular (Helios α, Thermo Electron Corporation).

O ácido gálico (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha) foi usado como padrão para a curva de calibração. A QTP foi expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extracto. Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

3.3.2. Avaliação da capacidade de redução do radical DPPH.

A capacidade de redução do radical DPPH (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha) pelas amostras em estudo foi avaliada a partir da adaptação do método descrito por Duan e colaboradores (2006). Preparou-se previamente uma solução de DPPH 0,1 mM em metanol. Num microtubo juntou-se 10 µl de amostra a 990 µl da solução de DPPH e de seguida levou-se ao vórtex. Incubou-se 30 minutos no escuro à temperatura ambiente e mediu-se a absorvância a um comprimento de onda de 517nm. Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

A capacidade de redução do radical DPPH foi calculada através da aplicação da seguinte equação:

$$\% \text{ Redução} = [(Abs_{\text{amostra}} - Abs_{\text{branco}}) / Abs_{\text{controlo}}] \times 100$$

Onde:

Abs_{controlo} → absorvância da solução de DPPH +10 µl de DMSO;

Abs_{amostra} → absorvância da solução de DPPH + 10 µl de amostra;

Abs_{branco} → absorvância da amostra (990 µl de metanol + 10 µl amostra).

3.4. Avaliação da capacidade antimicrobiana.

3.4.1. Preparação dos meios de cultura.

Utilizaram-se três meios de cultura distintos: o meio LB líquido (Luria-Bertani *Broth*) (Merck, Whitehouse Station, EUA) para o crescimento de *Escherichia coli* e de *Bacillus subtilis*, o meio YPD (Yeast Peptone Dextrose) para crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* e o meio Mueller Hinton (Merck, Whitehouse Station, EUA) para a realização dos antibiogramas. Os meios LB e Mueller Hinton foram preparados conforme as instruções fornecidas pelo fornecedor.

3.4.2. Avaliação da capacidade antibacteriana.

De forma a avaliar a capacidade antibacteriana dos extractos das algas, foram utilizadas duas bactérias modelo Gram+ e Gram-, nomeadamente *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e *Escherichia coli* (ATCC 10536), respectivamente. As bactérias encontravam-se em *stock* a -80 °C (Thermo, Electron Corporation), a partir do qual se retiraram 100 µl, transferindo-os para 100 ml de meio LB e posterior incubação a 37 °C, 150 rpm (Heidolph Inkubator 1000). Ao fim de 24 horas retirou-se para tubos de ensaio com meio salino 0,85% cloreto de sódio (NaCl), a quantidade de cultura necessária para atingir 0,5 na escala de Mcfarland (equivalente a 5×10^5 unidades formadoras de colónias (ufc)/ml) (Treyprasert *et al.*, 2007), sendo a comparação feita com os padrões Mcfarland (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France).

Para a avaliação da capacidade antibacteriana dos extractos das algas recorreu-se ao método da realização de antibiogramas descrito por Vandepitte e colaboradores (2003). Para tal realizou-se um espalhamento com o auxílio de uma zaragatoa estéril numa placa com meio Muller-Hinton. Foram então colocados 10 µl de extracto de cada alga em discos estéreis de 6 mm, (30-300 µg/disco) e outros contendo 10 µl de DMSO (controlo negativo) sendo posteriormente transferidos com o auxílio de uma pinça estéril para a placa previamente semeada. Como controlo positivo utilizaram-se discos comerciais contendo antibiótico, nomeadamente o cloranfenicol (30µg/disco) (Oxoid, Cambridge, Reino Unido). Por fim as placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas, procedendo-se no dia seguinte à medição dos halos de inibição correspondentes a cada disco. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

3.4.3. Avaliação da capacidade antifúngica.

Antes de se efectuar os testes com os extractos das algas sobre a *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), foi necessário proceder à monitorização da sua curva de crescimento. A partir de um *stock* conservado a -80 °C (Thermo, Electron Corporation) retirou-se 5 µl de inóculo para um microtubo (2 ml) com 995 µl de meio YPD, perfazendo um volume final de 1 ml. As amostras foram incubadas a 28 °C com 400 rpm, durante 48 horas, sendo efectuadas leituras a diferentes horas do crescimento. Os resultados foram obtidos espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 600 nm (Guo *et al.*, 2008; Balasundaram *et al.*, 1999; Ausubel *et al.*, 2003). Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

A capacidade antifúngica dos extractos foi avaliada através da monitorização do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, na presença ou na ausência do extracto. A partir de um stock a -80 °C foram retirados 5 µl de *S. cerevisiae* para um microtubo de 2 ml contendo 975 µl de meio YPD e 20 µl de DMSO, perfazendo um volume final de 1 ml (situação controlo).

Todos os extractos foram testados a uma concentração de 1 mg/ml sendo adicionados 20 µl de extracto a 975 µl de meio YPD juntamente com os 5 µl do inóculo.

Como controlo positivo utilizou-se Anfotericina B (Sigma, St. Louis, MO, USA) (3 µg/ml - 100 µg/ml). Assim, num microtubo adicionou-se 5 µl de *S. cerevisiae*, 20 µl de Anfotericina B e 975 µl de meio YPD.

As amostras foram incubadas a 28 °C a 400 rpm, e as leituras foram efectuadas às 20 horas de crescimento. Os resultados foram obtidos espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 600 nm (Guo *et al.*, 2008; Balasundaram *et al.*, 1999; Ausubel *et al.*, 2003). Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

A capacidade antifúngica foi calculada pela redução do crescimento (% do controlo) através da seguinte equação:

$$\text{Redução do crescimento (\% Controlo)} = [(Abs_{\text{amostra}} - Abs_{\text{branco}}) / Abs_{\text{controlo}}] \times 100$$

Onde:

Abs_{controlo} → absorvância do crescimento de *S. cerevisiae*, em meio YPD;

Abs_{amostra} → absorvância do crescimento de *S. cerevisiae* na presença dos extractos;

Abs_{branco} → absorvância dos extractos no meio YPD.

3.5 Identificação de moléculas bioactivas

Para a identificação das moléculas bioactivas foram utilizados os extractos obtidos no ponto 3.2 tendo sido efectuada uma diluição de 1:100 do extracto do diclorometano com metanol (≥99,9%, Chromasolv, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha), com posterior adição de 0,1% de ácido fórmico, HCOOH (≥ 95%, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha). A análise foi efectuada por MS (Thermo Scientific (Bremen, Alemanha)) no modo de ionização positivo com um analisador Ion trap LCQ-Duo e com fonte de ionização *electrospray* (ESI). A aquisição de dados e o controlo do equipamento foi efectuado com recurso ao software: Xcalibur Versão 1.2, Thermo Scientific (Bremen, Alemanha).

Na tabela I apresentam-se as condições do espectrómetro de massa usadas para identificação dos compostos.

Tabela I – Condições experimentais da análise por ESI-MS.

Fonte	API (Ionização à pressão atmosférica)
Voltagem do <i>spray</i>	4,5 kV
Fluxo de gás nebulizador	N ₂ (L/min): 40
Fluxo de gás auxiliar	N ₂ (L/min): 20
Temperatura do capilar	220 °C
Fluxo de infusão	5µl/min
Gás de colisão	He
<i>m/z</i>	150-2000

3.6 Análise estatística.

Os dados obtidos foram avaliados através do teste de análise de variância com 1 factor (ANOVA-1 factor), seguido pelo teste de Dunnett (Zar, 2009). Os dados experimentais foram comparados com os do grupo controlo. As diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5% ($p < 0,05$) ou ao nível de 1% ($p < 0,01$).

Todas as análises foram realizadas no GraphPad InStat software.

Resultados

4.1. Avaliação da Capacidade Antioxidante.

4.1.1. Quantificação total de polifenóis (QTP).

A quantificação total de polifenóis das dez algas em estudo foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu, obtendo-se os resultados em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extracto (mg EAG/g).

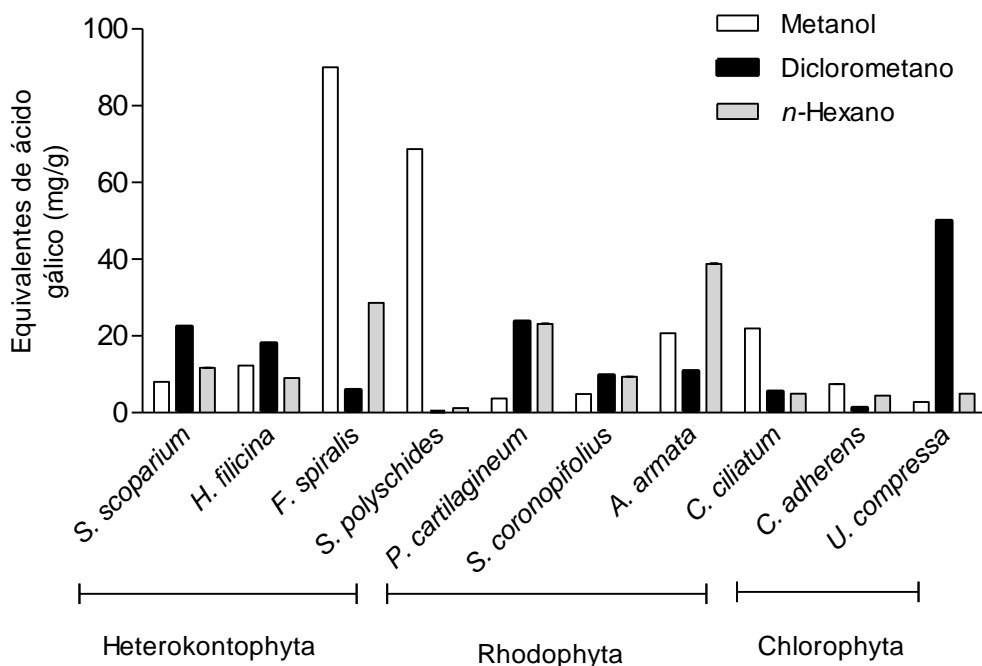


Figura 1 - Quantidade Total de Polifenóis (QTP) em mg EAG/g, nas diferentes fracções de cada alga em estudo. Os valores correspondem à média \pm Erro padrão da média (SEM) (n=3).

Tal como pode ser observado, a alga *Fucus spiralis*, na fracção metanólica, é a alga que apresenta um maior conteúdo em polifenóis, ($90,01 \pm 0,003$ mg EAG/g) seguida da *Saccorhiza polyschides* ($68,71 \pm 0,030$ mg EAG/g). Relativamente à fracção do diclorometano, a *Ulva compressa* foi a alga que apresentou o valor mais elevado, $46,39 \pm 0,006$ mg EAG/g, seguida da *Plocamium cartilagineum* e *Stypocaulon scoparium*, $23,75 \pm 0,018$ mg e $22,49 \pm 0,001$ mg EAG/g, respectivamente. Na fracção n-hexano as algas que apresentaram maior conteúdo em polifenóis foram a *Asparagopsis armata*, *Fucus spiralis* e a *Plocamium cartilagineum* com $38,82 \pm 0,017$ mg EAG/g, $28,65 \pm 0,02$ mg e $23,15 \pm 0,060$ mg EAG/g, respectivamente.

Se avaliarmos o conjunto das três fracções de forma a entender o conteúdo total de polifenóis por alga (figura 2), podemos verificar que a *Fucus spiralis* é a que apresenta uma maior quantidade de polifenóis ($\pm 41,54$ mg EAG/g de extracto total), seguida da

Asparagopsis armata ($\pm 23,45$ mg EAG/g de extracto total), *Saccorhiza polyschides* ($\pm 23,4$ mg EAG/g de extracto total), *Ulva compressa* ($\pm 19,26$ mg EAG/g de extracto total) e *Plocamium cartilagineum* ($\pm 16,87$ mg EAG/g de extracto total).

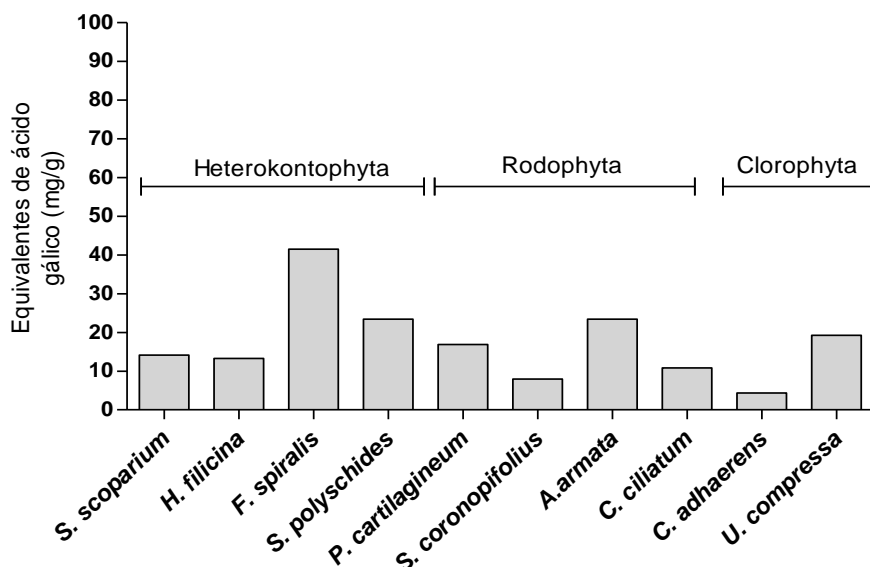


Figura 2 – Equivalentes de ácido gálico totais (fracção do metanol, diclorometano e *n*-hexano) por extracto de alga.

4.1.2. Capacidade de redução do radical DPPH.

O DPPH é um radical livre relativamente estável, podendo ser reduzido por moléculas antioxidantes. Este ensaio baseia-se na capacidade de moléculas antioxidantes funcionarem como doadores de hidrogénios ou redutores de radicais livres (Chew *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008).

A capacidade de redução do radical DPPH demonstrada pelos extractos das algas em estudo encontra-se representada na figura 3. Na fracção metanólica (situação A) verifica-se claramente que as algas castanhas (Heterokontophyta) são as que possuem maior capacidade de redução do DPPH com excepção da alga *Stypocaulon scoparium*. Relativamente à fracção do diclorometano (situação B) praticamente todas as algas apresentaram uma elevada capacidade de redução do radical DPPH com excepção do *Codium adherens* e da *Halopteris filicina*. Relativamente à fracção do *n*-hexano (situação C) verifica-se que exceptuando a *Ulva compressa*, o *Codium adherens* e a *Sphaerococcus coronopifolius*, todas as algas revelaram uma elevada capacidade de redução do radical DPPH.

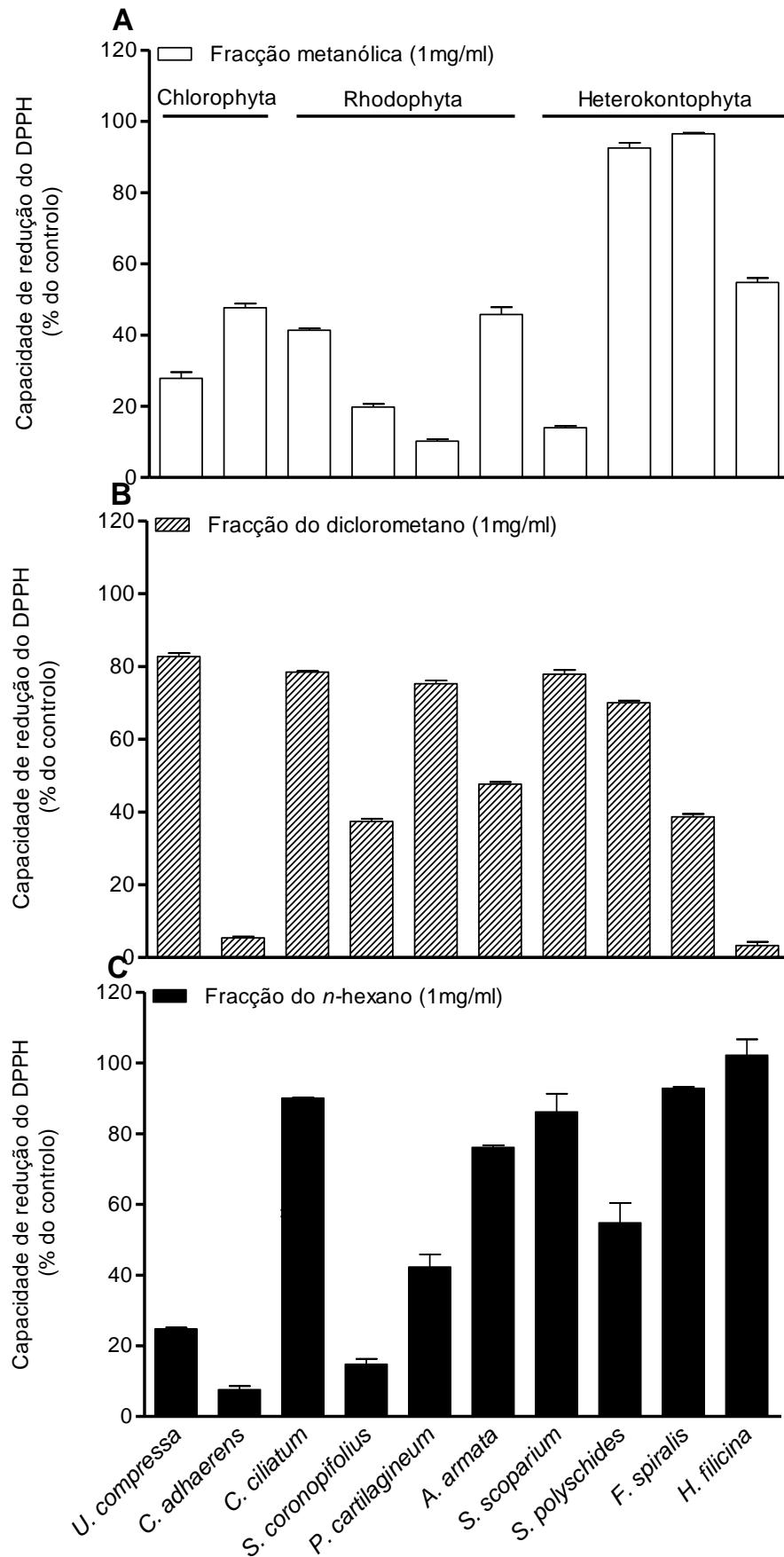


Figura 3 – Capacidade de redução do radical DPPH de todas as algas em estudo a 1mg/ml. Situação A) fracção metanólica; B) fracção do diclorometano; C) fracção do *n*-hexano.

De modo a perceber se a redução do DPPH ocorre de um modo dependente da concentração, e principalmente para conseguir comparar a potência de efeitos demonstrados pelos vários extractos das algas estudadas, decidiu-se realizar um ensaio de dependência da concentração para as algas que apresentaram uma capacidade de redução igual ou superior a 60%, para a concentração máxima testada (1 mg/ml; figura 3). Todas as algas demonstraram reduzir o radical DPPH de um modo dependente da concentração (figura 4). Com estas experiências foi possível calcular a concentração de extracto capaz de reduzir 50% o radical DPPH (IC_{50}). Pela análise da tabela II verifica-se que na fracção metanólica, as algas *Saccorhiza polyschides* e *Fucus spiralis* são as mais potentes na capacidade de redução do DPPH, com IC_{50} de 0,049 e 0,099 mg de extracto/ml respectivamente. A alga *Fucus spiralis* apresentou igualmente uma elevada actividade antioxidante na fracção *n*-hexano (0,119 mg de extracto/ml). Nesta fracção a alga *Halopteris filicina* revelou-se como a segunda mais potente (0,391 mg de extracto/ml). Na fracção do diclorometano, as algas com maior potencial antioxidante foram a *Ulva compressa* e a *Stypocaulon scoparium* (0,453 e 0,468 mg de extracto/ml, respectivamente).

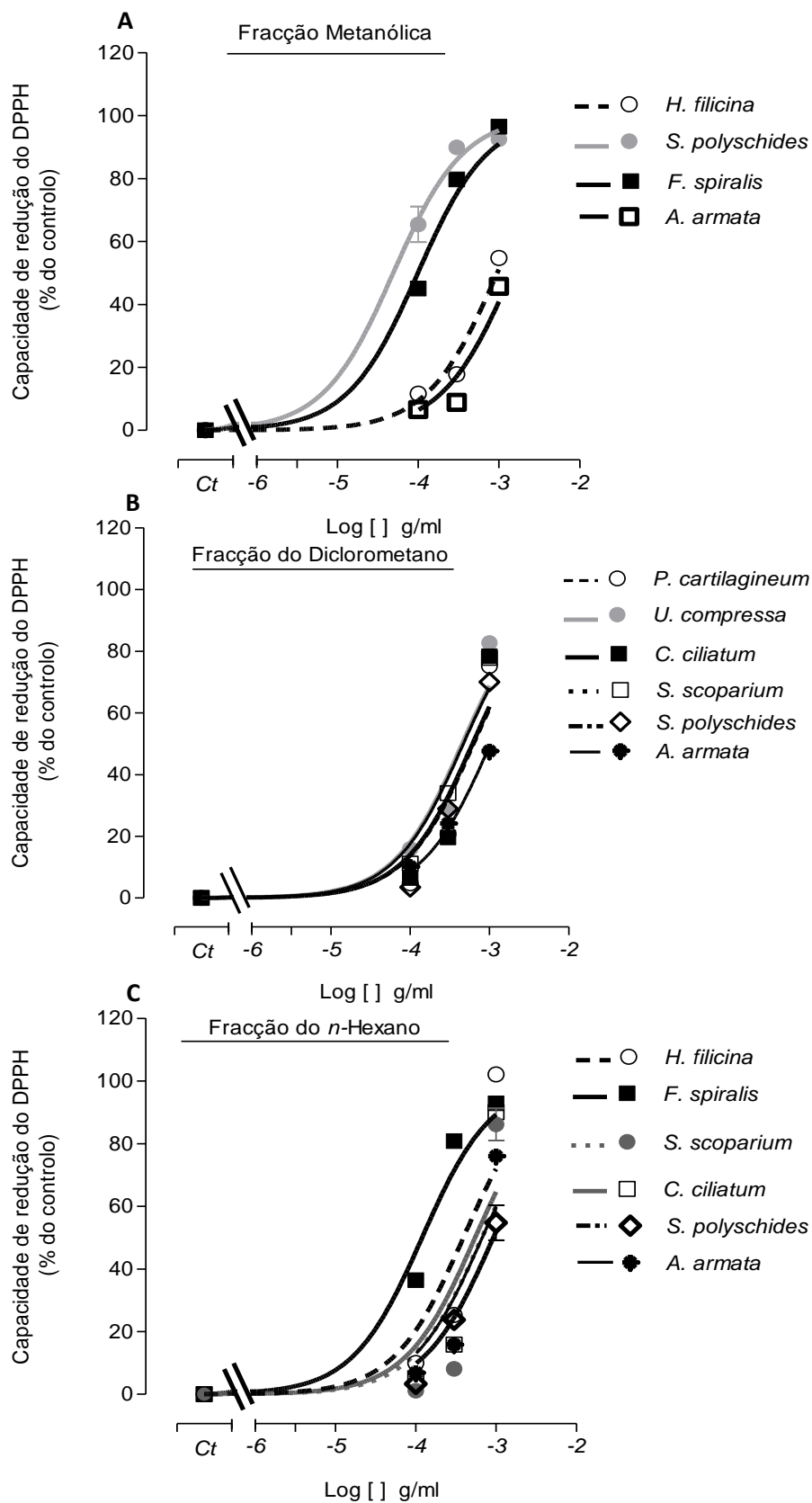


Figura 4 – Capacidade de redução do DPPH – dependência da concentração (100 – 1000 μ g/ml) das fracções metanólica (A); diclorometano (B) e *n*-hexano (C) para as algas que obtiveram uma capacidade de redução do radical DPPH \geq 60%, na concentração de 1 mg/ml.

Resultados

Tabela II – Determinação do IC₅₀ para capacidade de redução do DPPH dos diferentes extractos.

Algas / Fracção	Metanol IC ₅₀ (mg/ml)	Diclorometano IC ₅₀ (mg/ml)	n-Hexano IC ₅₀ (mg/ml)
<i>Ulva compressa</i>		0,453 (0,309-0,665)	
<i>Ceramium ciliatum</i>		0,611 (0,375-0,998)	0,548 (0,264-1,135)
<i>Plocamium cartilagineum</i>		0,643 (0,412-1,004)	
<i>Asparagopsis armata</i>	1,446 (1,086-1,926)	1,033 (0,804-1,328)	0,671 (0,387-1,164)
<i>Stypocaulon scoparium</i>		0,468 (0,356-0,616)	0,666 (0,291-1,524)
<i>Fucus spiralis</i>	0,099 (0,080-0,122)		0,119 (0,088-0,162)
<i>Saccorhiza polyschides</i>	0,049 (0,037-0,066)	0,625 (0,449-0,867)	0,925 (0,475-1,801)
<i>Halopteris filicina</i>	0,958 (0,799-1,147)		0,391 (0,178-0,860)

*BHT (controlo) IC₅₀= 0,0406 mg/ml (0,026-0,064)

4.2 Capacidade antimicrobiana.

4.2.1 Capacidade antibacteriana.

Tal como foi referido anteriormente, é extremamente importante encontrar novas moléculas que possam ser utilizadas ou que sirvam de modelo para o desenvolvimento de novas moléculas com capacidade antimicrobiana. Deste modo, e para cumprir os objectivos do presente trabalho, analisámos a capacidade antibacteriana contra *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* de todos os extractos, de todas as fracções das algas estudadas (tabela III).

Tabela III – Capacidade antibacteriana dos extractos das algas contra *Bacillus subtilis* (ATCC 6733).

Alga	Metanol (µg/disco)			Diclorometano (µg/disco)			n-Hexano (µg/disco)		
	30	100	300	30	100	300	30	100	300
<i>Sphaerococcus coronopifolius</i>	-	7 ± 0,33	7 ± 0	-	-	7 ± 0,33	-	8 ± 0	9 ± 0,33
<i>Asparagopsis armata</i>	-	10 ± 0,57	11 ± 0,57	-	-	12 ± 0,57	-	-	8 ± 0,33
<i>Plocamium cartilagineum</i>	-	-	11 ± 1,15	-	-	7 ± 0,57	-	7 ± 0,5	9 ± 0,33
<i>Ulva compressa</i>	-	-	-	-	-	-	-	7 ± 0	7 ± 0,33
<i>Ceramium ciliatum</i>	-	-	-	-	-	7 ± 0,33	-	-	-

*zona de inibição incluindo o diâmetro do disco (6mm); os valores correspondem a médias de triplicados ± SEM; - sem actividade. Cloranfenicol 30 µg/disco foi utilizado como controlo positivo (30mm ± 0,57) e DMSO como controlo negativo (0 mm ± 0).

Todas as Rhodophyta apresentaram capacidade antibacteriana contra *B. subtilis*, sendo a *Asparagopsis armata* a que revelou maior actividade à concentração de 100 µg/disco (10 mm) na fracção metanólica. Por outro lado, a *Ulva compressa* foi a única

Chlorophyta (fracção do *n*-hexano) que revelou actividade antibacteriana à concentração de 100 e 300 µg/disco (7 mm). A alga *Ceramium ciliatum* também revelou actividade na fracção *n*-hexano, mas apenas à concentração de 300 µg/disco.

Não se obtiveram resultados positivos contra *E. coli*.

4.2.2 Capacidade antifúngica.

Para avaliar a capacidade antifúngica foi utilizado como modelo celular de estudo a *Saccharomyces cerevisiae*. Inicialmente seguiu-se o crescimento da *S. cerevisiae* ao longo do tempo (0-42 horas) pela leitura da densidade óptica (DO) a 600 nm (figura 5). Pela análise do crescimento celular, foi possível verificar que a fase de crescimento exponencial ocorre entre as 15 e as 26 horas. Deste modo, seleccionámos as 20 horas de crescimento para avaliar a actividade dos extractos.

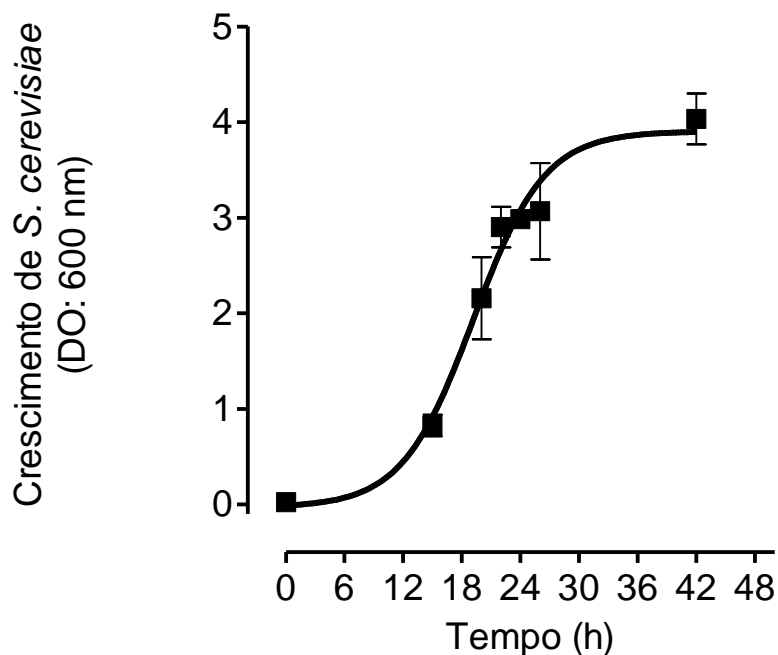


Figura 5 – Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* a 28°C em meio YPD. O crescimento foi avaliado às 0, 15, 20, 22, 24, 26 e 42 horas após a incubação. Os símbolos representam a média de 3 leituras independentes; as linhas verticais indicam o SEM.

Tal como se pode verificar pela análise da figura 6, na fracção metanólica (situação A), para a concentração máxima testada (1 mg/ml) quase todas as algas revelaram capacidade de inibir o crescimento de *S. cerevisiae*, nomeadamente *Ceramium ciliatum*,

Fucus spiralis, *Stypocaulon scoparium*, *Saccorhiza polyschides*, *Asparagopsis armata*, *Halopteris filicina*, e *Sphaerococcus coronopifolius*, no entanto, esta última destacou-se substancialmente das restantes com uma inibição de cerca de 86%. Para os extractos diclorometano e *n*-hexano (figuras 6B e 6C), exceptuando as algas *Saccorhiza polyschides*, *Fucus spiralis* e *Stypocaulon scoparium*, todas as algas apresentaram capacidade de inibição, sendo de destacar as algas *Sphaerococcus coronopifolius*, *Asparagopsis armata*, *Plocamium cartilagineum* e *Ulva compressa* que apresentaram a capacidade de inibição mais elevada, 95, 96, 74 e 70%, respectivamente.

Na fracção do diclorometano (situação B), as dez algas revelaram actividade antifúngica, sendo de destacar mais uma vez as algas *Sphaerococcus coronopifolius*, *Asparagopsis armata*, *Plocamium cartilagineum* e *Ulva compressa* com 86, 96, 76 e 86%, capacidade de inibição, respectivamente.

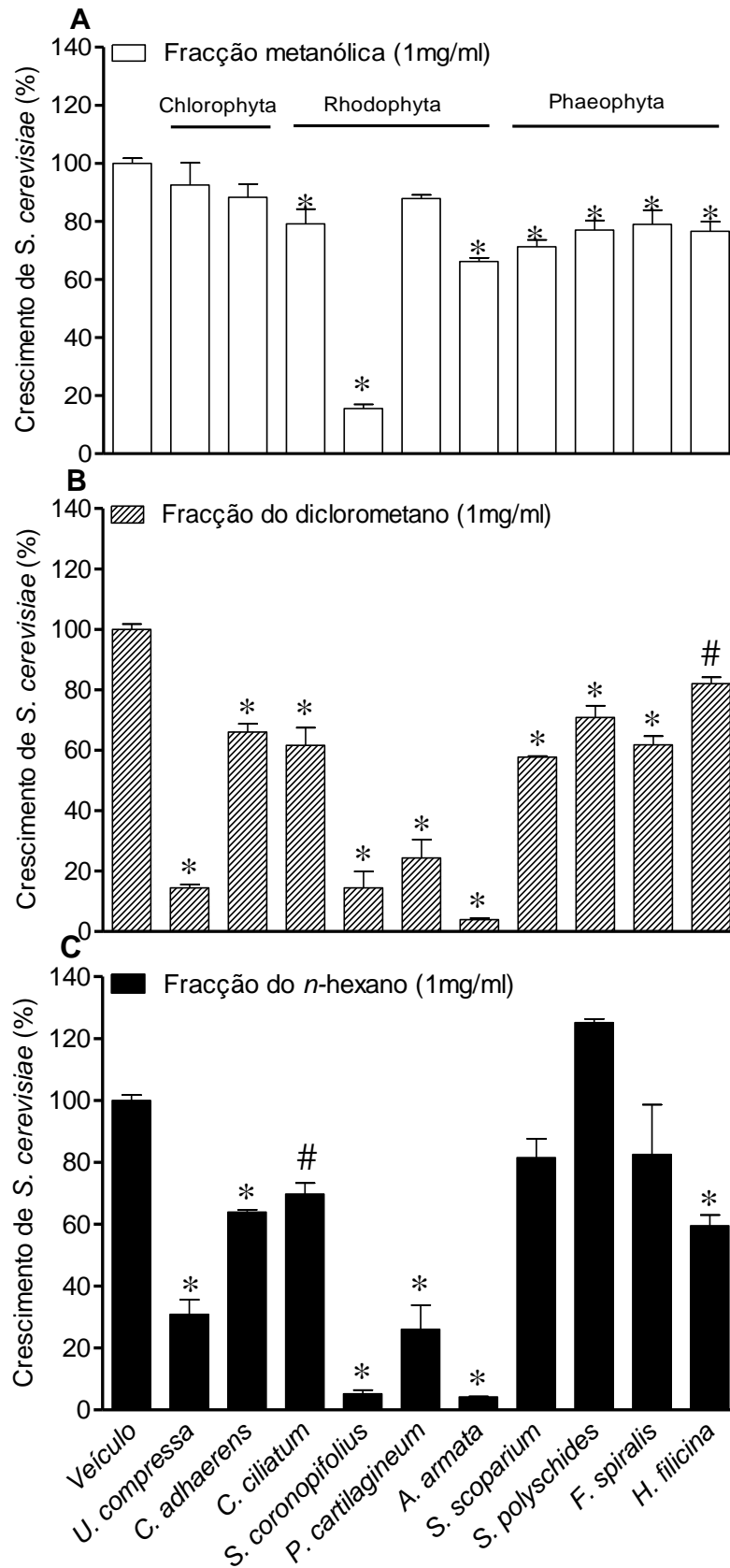


Figura 6 – Efeito dos extractos (1 mg/ml) da fracção metanólica (A), do diclorometano (B) e do *n*-hexano (C) de todas as algas em estudo, no crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* a 28°C após 20 horas de incubação. Cada coluna representa a média de 3 a 6 experiências independentes. As linhas verticais indicam o SEM. * $p < 0.01$ e # $p < 0.05$ representam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo.

De modo a avaliar a potência dos efeitos verificados pelas fracções que demonstraram inibição $\geq 60\%$, para a concentração máxima testada (1 mg/ml) no crescimento da *S. cerevisiae*, decidimos avaliar a dependência da concentração dos efeitos obtidos. Os resultados referentes às fracções metanólica, diclorometano e *n*-hexano, encontram-se expressos nas figuras 7, 8 e 9, respectivamente.

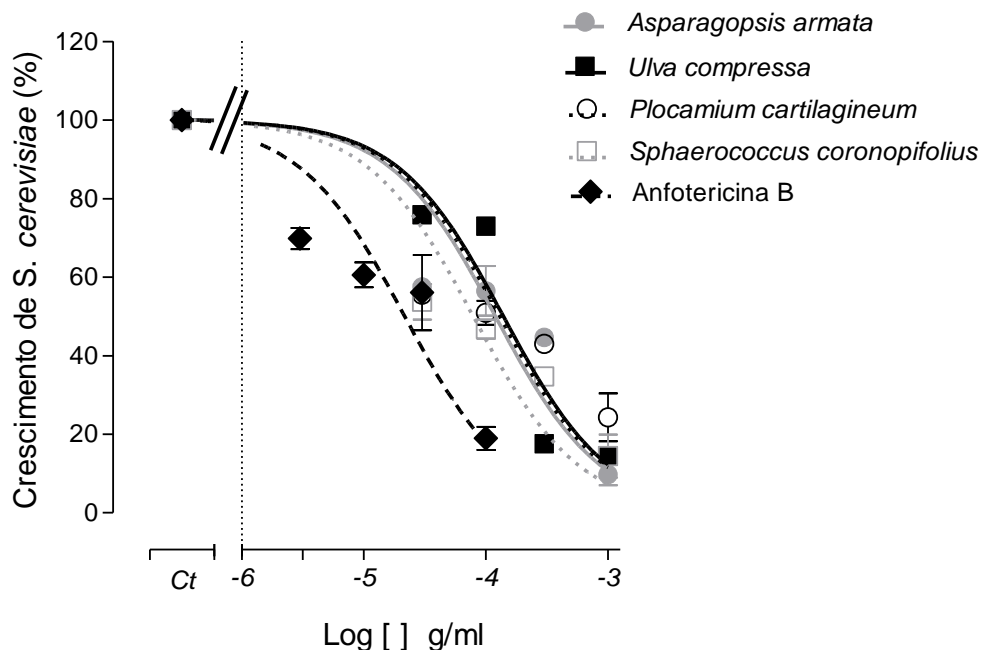


Figura 7 – Crescimento de *S. cerevisiae* a 28°C (20 horas) na presença dos extractos da fracção do diclorometano das algas *Asparagopsis armata*, *Sphaerococcus coronopifolius*, *Ulva compressa*, *Plocamium cartilagineum*, (30-1000 $\mu\text{g/ml}$) e Anfotericina B (3-100 $\mu\text{g/ml}$). Os símbolos representam a média de 3 a 6 experiências independentes; as linhas verticais indicam o SEM.

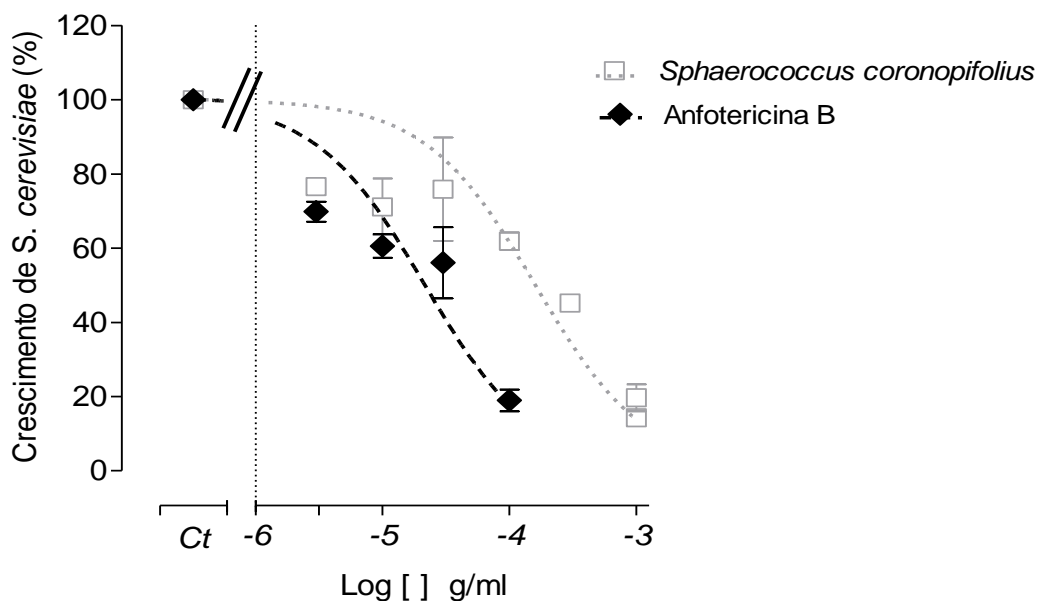


Figura 8 – Crescimento de *S. cerevisiae* a 28°C (20 horas) na presença do extracto da fracção fracção metanólica de *Sphaerococcus coronopifolius* (30-1000 $\mu\text{g/ml}$) e Anfotericina B (3-100 $\mu\text{g/ml}$). Os símbolos representam a média de 3 a 6 experiências independentes; as linhas verticais indicam o SEM.

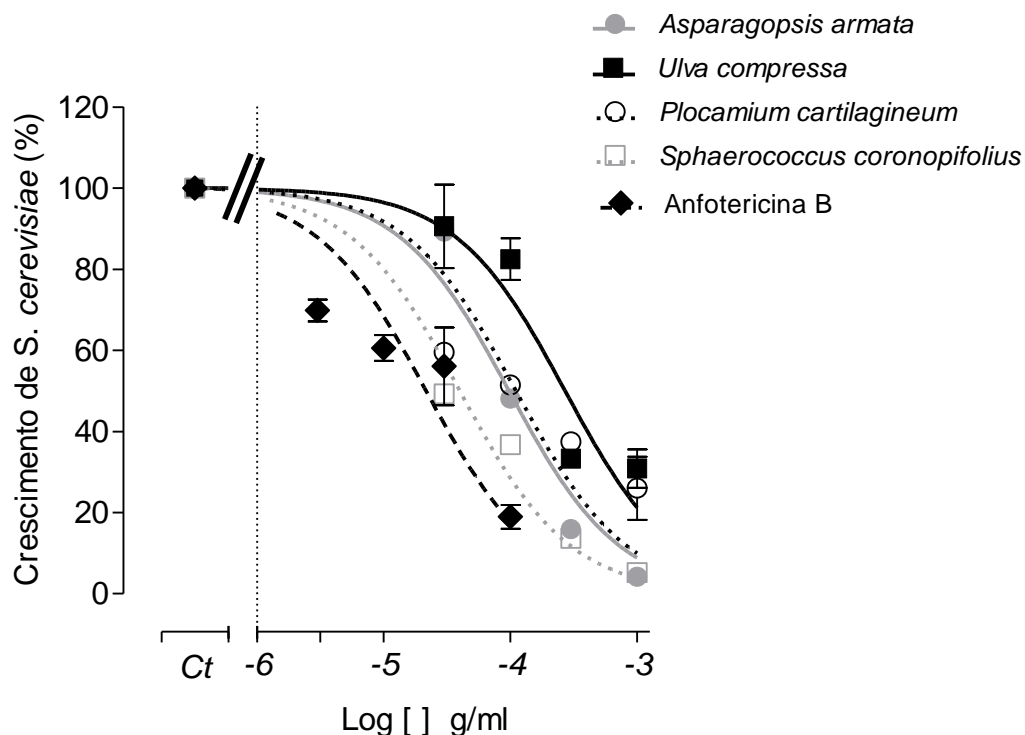


Figura 9 – Crescimento de *S. cerevisiae* 28°C (20 horas) na presença do extracto da fracção do *n*-hexano, das algas *Asparagopsis armata*, *Sphaerococcus coronopifolius*, *Ulva compressa* e *Plocamium cartilagineum*, (30-1000 µg/ml) e Anfotericina B (3-100 µg/ml). Os símbolos representam a média de 3 a 6 experiências independentes; as linhas verticais indicam o SEM.

Na tabela IV encontram-se os valores de IC_{50} , onde se verifica que a alga *Sphaerococcus coronopifolius* tem o menor IC_{50} , para todas as fracções estudadas.

Tabela IV – Determinação do IC_{50} para a actividade antifúngica dos extractos da fracção do diclorometano, *n*-hexano e do metanol das algas *Asparagopsis armata*, *Ulva compressa*, *Plocamium cartilagineum* e *Sphaerococcus coronopifolius* às 20 horas de incubação de *S. cerevisiae* a 28°C.

Algas	Metanol IC_{50} (µg/ml)	Diclorometano IC_{50} (µg/ml)	<i>n</i> -Hexano IC_{50} (µg/ml)
<i>Asparagopsis armata</i>	-	119,8 (79,7-180,1)	97,6 (75,5-126,3)
<i>Ulva compressa</i>	-	139,3 (102,4-189,4)	270,5 (179,7-407,2)
<i>Plocamium cartilagineum</i>	-	130,3 (76,7-221,1)	111,1 (70,3-175,4)
<i>Sphaerococcus coronopifolius</i>	56,44 (35,6-89,4)	78,9 (51,3 -121,5)	40,2 (32,4-49,9)

*Anfotericina B (controlo positivo) IC_{50} = 21,6 µg/ml (13,89-33,71). Os valores são médias de triplicados com um intervalo de confiança de 95%.

4.3 Identificação de compostos bioactivos.

As algas que apresentaram maior capacidade antimicrobiana e antioxidante foram sujeitas a análises por ESI-MS para a identificação de compostos que pudessem estar associados as estas propriedades. Assim sendo, a *Fucus spiralis* e *Sphaerococcus coronopifolius* foram seleccionadas como as algas com maior capacidade antioxidante e antimicrobiana, respectivamente.

Através da análise dos espectros de massa obtidos (figuras 10 e 11) é possível indicar a provável presença de dois ácidos gordos de cadeia longa, o ácido heptadecanóico e o ácido oleico, na fracção do diclorometano da alga *Sphaerococcus coronopifolius*. Esta identificação foi efectuada com base no mecanismo de fragmentação das moléculas, nomeadamente pelo facto de se fragmentarem muito e pela diferença de massas ser quase sempre 14 Da, indicativo de uma longa cadeia carbonada. Pela massa do ião molecular $[M+H]^+$ foi possível identificar qual o ácido gordo.

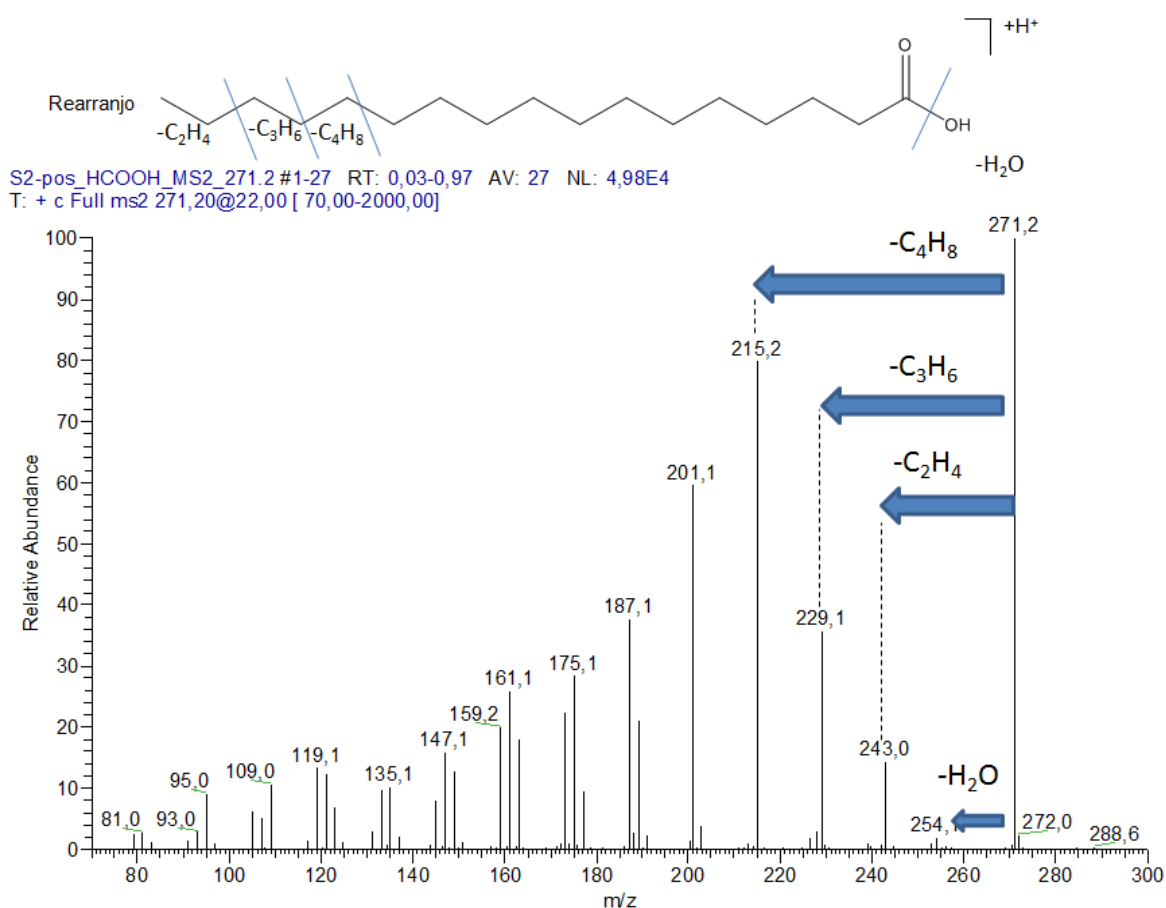


Figura 10 – Espectro de massa do ácido heptadecanóico (ou ácido margárico) (C17:0), com esquema representativo da sua fragmentação obtido na fracção do diclorometano da alga *Sphaerococcus coronopifolius*.

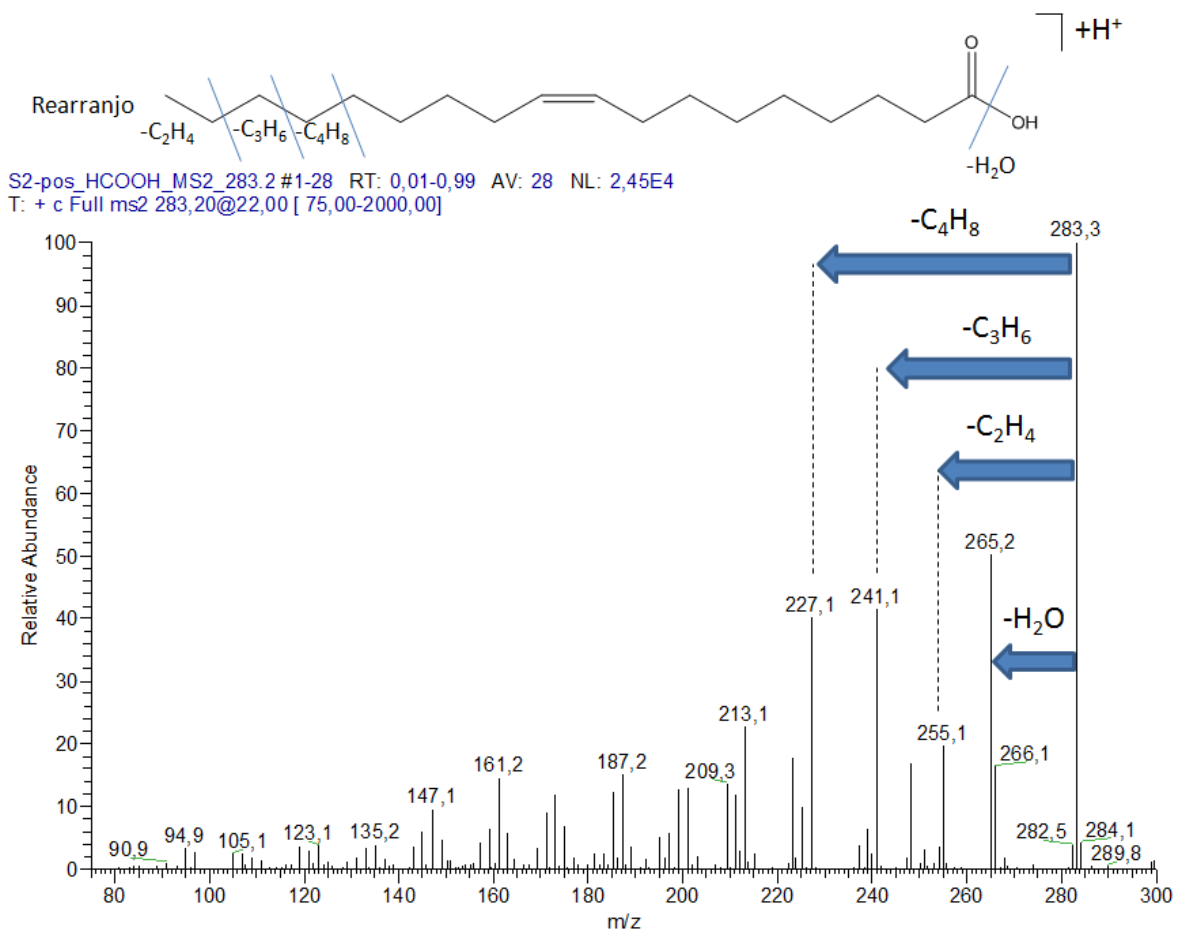


Figura 11 – Espectro de massa do ácido oleico, com esquema representativo da sua fragmentação, obtido na fracção do diclorometano da alga *Sphaerococcus coronopifolius*.

Discussão e Conclusão

Todas as algas estudadas neste trabalho foram colhidas na região intertidal. Esta, também designada por “entre-marés”, fica exposta ao ar e sol durante a maré-baixa, ficando submersa com a subida da maré. Em consequência da alternância de submersão e exposição ao ar, os organismos marinhos são obrigados a suportar condições extremas de salinidade, secura, sobre-hidratação, radiação ultravioleta (UV), hidrodinamismo, entre outras. Como defesa a estas condições extremas, nomeadamente à radiação UV, as algas produzem um elevado leque de compostos capazes de absorver a luz UV, incluindo polifenóis, (Takeshi *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2003; Plaza *et al.*, 2008). De facto, a exposição solar é um dos maiores potenciadores da produção de antioxidantes. Os elementos constituintes do aparelho fotossintético são especialmente vulneráveis ao fotodinamismo devido à presença de ácidos gordos poli-insaturados que fazem estruturalmente parte da membrana dos tilacóides. Assim sendo, é sugerido que as algas possuam um eficiente mecanismo de defesa antioxidante que inclui a produção dos mais diversos compostos antioxidantes (Matsukwa *et al.*, 1997).

Neste trabalho, as algas *Fucus spiralis*, *Saccorhiza polyschides*, *Ulva compressa* e *Asparagopsis armata*, que são representativas das três classes de algas, foram as que apresentaram um maior conteúdo em polifenóis.

Diversos trabalhos têm revelado que todas as classes de algas produzem compostos com actividade antioxidante (Devi *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Valentão *et al.*, 2010; Yuan e Walsh, 2006). Por tudo isto e tendo em consideração o ambiente em que estes organismos vivem, não é de surpreender que todas as classes possuam actividade antioxidante e que todas as algas estudadas apresentassem esta capacidade.

Os resultados obtidos para *Fucus spiralis* e *Saccorhiza polyschides* na fracção metanólica evidenciam-se claramente dos restantes. Nos trabalhos de Díaz-Rubio e colaboradores (2008), Chkhikvishvili e Ramazanov (1999) e de Cerantola e colaboradores, (2006) as algas do género *Fucus* encontram-se descritas como sendo constituídas maioritariamente por polissacáridos não digestíveis e polifenóis, o que apoia os resultados obtidos na espécie *Fucus spiralis*, que apresentou uma elevada QTP.

As algas castanhas (Heterokontophyta) têm sido alvo de diferentes estudos nos quais têm apresentado resultados muito promissores no que diz respeito à capacidade antioxidante, sendo as que normalmente apresentam o maior potencial antioxidante, comparativamente com as outras classes de algas, facto que também é suportado pelos resultados obtidos neste trabalho (Matasukwa *et al.*, 1997; Chkhikvishvili e Ramazanov, 1999; Kang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2009; Zaragoza *et al.*, 2008).

Os polifenóis amplamente mais bem conhecidos nas algas castanhas são as florotaninas, que fazem parte do maior grupo de polifenóis detectados em algas, as taninas (Pavia e Toth, 2000; Koivikko *et al.*, 2005; Shibata *et al.*, 2004). Sabe-se que a produção destes compostos está relacionada com a defesa contra fungos e bactérias, protecção contra herbívoros sendo constituintes da parede celular com funções de regeneração celular (nomeadamente na *Fucus spiralis*), protecção U.V (Schoenwaelder e Wiencke, 2000; Swanson e Druehl, 2002; Nagayama *et al.*, 2002; Matsukawa *et al.*, 1997) e são consideradas substâncias osmorreguladoras (Koivikko *et al.*, 2005; Amsler e Fairhead, 2006). Para além destas características, demonstram possuir uma forte capacidade antioxidante e como tal, têm sido alvo de diversos estudos para o tratamento profilático de doenças como por exemplo as doenças cardiovasculares, disfunção eréctil e cancro. (Kang *et al.*, 2003; Matsukawa *et al.*, 1997). Para além das florotaninas, já foram identificados em algas castanhas compostos fenólicos como fucóis, fluretóis, fucofluretóis, fucoxantina, entre outros (Chkivkihilili *et al.*, 1999; Sadati *et al.*, 2011).

No presente estudo, a fracção polar (metanólica) é a que apresenta um maior conteúdo em polifenóis, o que poderá estar relacionado com a presença de florotaninas pois estas possuem características polares (Amsler e Fairhead, 2006). No trabalho realizado por Matsukawa e colaboradores (1997) os compostos com elevado potencial antioxidante também apresentaram características polares. No entanto, uma característica importante dos polifenóis é o facto de possuírem características “bi-polares” na natureza (Chew *et al.*, 2008), o que justifica por um lado o facto da alga *Fucus spiralis* apresentar uma elevada QTP, quer na fracção metanólica (polar), quer na fracção *n*-hexano (apolar) e poderá explicar também a elevada actividade antioxidante de *Ulva compressa* na fracção do diclorometano e da *Asparagopsis armata* na fracção do *n*-hexano. Isto demonstra a elevada diversidade que existe dentro deste grupo de moléculas. Os polifenóis constituem um amplo grupo de substâncias que podem diferir muito nas suas estruturas químicas (Martínez-Valverde *et al.*, 2000; Cheynier, 2005; Basu *et al.*, 1999) tendo sido identificados em algas diversos tipos de polifenóis como os flavonóides, cumarinas tocofenóis, entre outros (Plaza *et al.*, 2008; Onofrejová *et al.*, 2010).

Tendo em conta que grande parte das algas castanhas é comestível, (Gupta e Abu-Ghannam, 2011) a possibilidade de aplicação directa na dieta humana poderá trazer vantagens indiscutíveis para a saúde humana, bem como na preservação dos alimentos. *Saccorhiza polyschides*, por exemplo, pertence ao grupo de algas castanhas denominadas laminárias, e faz parte dos hábitos alimentares orientais desde há muito. A composição nutricional deste grupo tem sido alvo de vários estudos e portanto conhece-

se relativamente bem a sua composição nutricional característica. São compostas por diversos compostos fenólicos, ácidos gordos poli-insaturados das famílias ω -3 e ω -6, fosfolípidos, aminoácidos, proteínas, vitaminas e minerais, etc. (Kushnerova *et al.*, 2010; Rupérez, 2002). Para além destas propriedades, a sua composição em lípidos é muito baixa, permitindo a sua aplicação nas dietas mais exigentes.

Hoje em dia são muito utilizados antioxidantes sintéticos como o BHT ou BHA na preservação de alimentos, no entanto já foi provado que a utilização destes na alimentação humana está associada a diversas patologias relacionadas com a alteração de lípidos e enzimas, bem como efeitos carcinogénicos (Rocha *et al.*, 2007; Matsukawa *et al.*, 1997). A aplicabilidade dos polifenóis é inumerável e o facto de não possuírem toxicidade torna-os adequados para a aplicação directa na indústria alimentar (Rocha *et al.*, 2007; Matsukawa *et al.*, 1997). Em adição, muitas algas possuem também um elevado conteúdo em fibras dietéticas, macro e micro nutrientes como Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu e esteróides com actividades anti-inflamatórias, antibacterianas, antifúngicas, antitumorais, bem como a capacidade de reduzir o colesterol (Plaza *et al.*, 2008; Rupérez, 2002; Gupta e Abu-Ghannam, 2011; Mageid *et al.*, 2009).

Neste contexto, os nossos resultados demonstram que as algas *Fucus spiralis* e *Saccorhiza polyschides*, por possuírem uma elevada capacidade antioxidante e por serem comestíveis, tornam-se particularmente atraentes para a indústria alimentar.

Apesar de algumas algas como o *Codium adhaerens* e a *Sphaerococcus coronopifolius* não apresentarem uma concentração de polifenóis significativa, poderá indicar que estas possuem outro tipo de defesas, como proteínas, alcalóides, clorofilas e derivados, aminoácidos, outros pigmentos fotossintéticos, ou outros mecanismos antioxidantes, que não são detectadas nesta análise, visto que todas as algas possuem um sistema de defesa antioxidante, tal como já foi referido anteriormente (Celikler *et al.*, 2009; Matsukawa *et al.*, 1997). Muitas das moléculas produzidas pelas algas são respostas ecológicas e os polifenóis são um bom exemplo deste tipo de moléculas, no entanto o seu conteúdo pode variar consideravelmente consoante as características do ecossistema circundante e do ambiente. Por exemplo, a composição em florotaninas, varia consideravelmente com os factores ambientais como a temperatura e salinidade, ataques de predadores e distribuição geográfica (Jormalainem e Honkanem, 2004; Pavia e Toth, 2000). Existem outros estudos que indicam que a composição em compostos antioxidantes poderá variar também com diferenças genéticas na população e com o ciclo de vida de cada espécie (Hou e Yan, 1998; Hemmi *et al.*, 2004 e 2005; Marinho-Soriano *et al.*, 2006; Culioli *et al.*, 2002; Cronin e Hay, 1996; Murakami *et al.*, 2011; Gorham e Lewey, 1984).

A capacidade antioxidante das dez algas em estudo foi também avaliada consoante a sua capacidade de reduzir o radical DPPH.

O radical DPPH é um radical relativamente estável, o que permite a sua utilização em ensaios *in vitro* e serve como modelo do que sucede com os radicais livres no organismo humano. Na sua forma de radical possui uma cor violeta, e à medida que vai sendo reduzido passa para uma cor amarelada, sendo possível acompanhar esta viragem espectrofotometricamente (Chew *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008; Duan *et al.*, 2006).

Tanto a fracção do diclorometano como a do *n*-hexano não revelaram nenhum padrão em relação à classe das algas, no entanto para a fracção metanólica esse padrão parece evidente, ou seja, as algas castanhas são as que parecem revelar maior capacidade antioxidante na fracção polar. Este resultado faz especial sentido e reforça os resultados obtidos no ensaio da quantificação total de polifenóis, bem como as características das moléculas antioxidantes previamente mencionadas nas algas castanhas como as florotaninas, que possuem características polares (Amsler e Fairhead, 2006). A correlação entre o conteúdo total de polifenóis e a capacidade antioxidante está bem estabelecida (Celikler *et al.*, 2009). De facto, as algas que apresentaram um elevado conteúdo total de polifenóis possuem também uma elevada capacidade de redução do radical DPPH, o que faz especial sentido tendo em conta as características antioxidantes dos polifenóis que podem actuar como dadores de H⁺, estabilizando assim o radical DPPH (Matsukawa *et al.*, 1997).

No entanto, quase todas as algas nas fracções do diclorometano e do *n*-hexano apresentaram uma elevada capacidade antioxidante, apesar do seu conteúdo em polifenóis não ser elevado. Este resultado suporta a ideia que todas as algas possuem um sistema antioxidante muito eficiente e este não tem de passar necessariamente pela produção de polifenóis, mas sim de outras substâncias antioxidantes como por exemplo pigmentos fotossintéticos, proteínas, alcalóides, tal como já foi referido anteriormente (Celikler *et al.*, 2009; Matsukawa *et al.*, 1997).

As algas que apresentaram uma capacidade de redução do DPPH igual ou superior a 60% foram sujeitas a ensaios de dependência de concentração e para estas foi calculado o IC₅₀. Verificou-se mais uma vez que as algas que apresentam uma maior capacidade antioxidante, nomeadamente no que diz respeito à capacidade de redução do radical DPPH, fazem parte das Heterokontophyta, sendo as algas *Saccorhiza polyschides* (IC₅₀=0,049 mg/ml - fracção metanólica) e *Fucus spiralis* (IC₅₀=0,099 mg/ml - fracção metanólica; IC₅₀=0,119 mg/ml – fracção *n*-hexano) as que apresentam um maior potencial. É de salientar que a *Saccorhiza polyschides* possui um IC₅₀ muito semelhante

ao antioxidante sintético BHT que é amplamente utilizado na indústria alimentar. Este resultado, bem como os das restantes algas castanhas, é extremamente relevante se tivermos em conta que o BHT é uma substância química pura, enquanto nesta análise, as algas foram sujeitas apenas a uma separação dos seus constituintes por polaridades, o que implica que cada fracção possua um elevado número de compostos, sendo que muitos poderão não ter qualquer interesse no âmbito da capacidade antioxidante. Desta forma, tudo indica que se os compostos antioxidantes forem isolados, a concentração necessária para ter actividade antioxidante relevante será muito menor. Desta forma todos os resultados apresentados nesta tabela merecem ser valorizados e sujeitos a mais estudos, nomeadamente a separação dos compostos activos.

A capacidade antibacteriana foi avaliada através do método de difusão em disco, que é o teste amplamente utilizado para a análise de sensibilidade bacteriana, sendo o mais simples, económico e reprodutível. Para além destas vantagens é um teste standard reconhecido e aceite pela *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) (Salvador *et al.*, 2007; Greenwood, *et al.*, 2007).

Para todas as algas estudadas surgiram alguns resultados promissores no que diz respeito à actividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, especialmente os obtidos com as algas *Sphaerococcus coronopifolius* e *Asparagopsis armata*, no entanto não houve nenhum extracto que tivesse a capacidade de inibir o crescimento de *E. coli*.

Este resultado é bastante comum, ou seja, geralmente a actividade contra gram positivas é mais frequente que para gram negativas (Ballantine *et al.*, 1987; González del Val *et al.*, 2001) As bactérias gram negativas, como a *E. coli* possuem uma membrana celular externa e um espaço periplasmático que é inexistente nas bactérias gram positivas como o *Bacillus subtilis* (Cowan, 1999). Para além da membrana externa das bactérias gram negativas, que por si só já é uma barreira eficiente, o espaço periplasmático contém uma série de enzimas capazes de degradar um vasto leque de moléculas, consistindo assim uma forte defesa contra muitos antibióticos ou outras moléculas estranhas (Sofidiya *et al.*, 2009; Lambert, 2002).

Das dez algas estudadas, todas as vermelhas e uma verde (*Ulva compressa*) revelaram possuir capacidade antibacteriana contra *B. subtilis*. As espécies que apresentaram maior actividade foram a *Asparagopsis armata* na fracção metanólica e a alga *Sphaerococcus coronopifolius* na fracção do *n*-hexano, ambas pertencentes à classe das algas vermelhas (Rhodophyta). As algas vermelhas têm sido alvo de vários estudos nos quais apresentaram actividade antimicrobiana, o que vai de acordo com os resultados obtidos neste trabalho. (Mahasneh *et al.*, 1995; Padmakumar e Ayyakkannu, 1997). Num trabalho desenvolvido por Vairappan e colaboradores (2004) foram isolados

diferentes compostos halogenados em algas vermelhas e todos eles com capacidade antibacteriana contra microrganismos gram positivos. Ainda em algas vermelhas, Ohta e Tagaki (1977) isolaram compostos polares com elevada capacidade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*.

Também as algas verdes (Chlorophyta) têm sido fonte de compostos com capacidade antibacteriana, apoiando os resultados obtidos para *Ulva compressa*, nomeadamente diterpenos e sesquiterpenos, que possuem características apolares, o que poderá justificar de alguma forma esta alga só ter apresentado actividade antibacteriana na fracção apolar (Gamal, 2010).

Se analisarmos os resultados tendo em conta as fracções, verificamos que em todas ocorreu actividade antibacteriana, no entanto, a fracção metanólica da alga *Asparagopsis armata* foi a fracção que obteve um halo maior com a menor concentração testada. Ter actividade a baixas concentrações é um dos pressupostos principais quando falamos num composto antimicrobiano, pois baixas concentrações implicam uma menor toxicidade e maior facilidade em ser removido do organismo (Greenwood, *et al.*, 2007). No trabalho realizado por Shanmughapriya e colaboradores (2008), também a fracção metanólica revelou ser mais eficiente para extrair compostos com actividade antimicrobiana, para além disso, *Asparagopsis armata* já revelou possuir actividade antimicrobiana em estudos anteriores (Genovese *et al.*, 2009), o que reforça os resultados obtidos.

A fracção do *n*-hexano foi a que apresentou mais algas com actividade à menor concentração testada, nomeadamente *Plocamium cartilagineum*, *Ulva compressa* e *Sphaerococcus coronopifolius*. Existem alguns trabalhos em que foram isolados os compostos com actividade antimicrobiana sendo que muitos possuem características apolares (Shanmughapriya *et al.*, 2008 e Ballantine *et al.*, 1987).

O facto de ter ocorrido actividade antibacteriana em todas as polaridades confirma mais uma vez a grande complexidade de moléculas presentes. A fracção polar é normalmente constituída por sais alcalóides, aminoácidos, poli-hidroxi-esteróis e saponinas (fracção metanólica); a fracção do diclorometano é constituída habitualmente por compostos de polaridade intermédia como os péptidos, e a fracção do *n*-hexano é constituída maioritariamente por compostos de baixa polaridade ou apolares como os hidrocarbonetos, ácidos gordos, terpenos, etc. (Riguera, 1997). Outros trabalhos realizados com diferentes espécies de algas, revelaram também actividade antimicrobiana nas três fracções em estudo, o que está de acordo com os nossos resultados (Gonzalez del Val *et al.*, 2001; Taskin *et al.*, 2007; Bansemir *et al.*, 2006; Lima-Filho *et al.*, 2002). De facto, a variabilidade de metabolitos que ocorrem nas algas com

possibilidade de serem utilizados na síntese de compostos com actividade antimicrobiana é imensa.

Apesar da utilização do controlo positivo servir essencialmente para validar o método, a comparação dos resultados é inevitável. O tamanho dos halos obtidos em todas as algas em estudo, são substancialmente inferiores ao halo obtido com o controlo positivo (cloranfenicol). Este resultado não é surpreendente visto que o cloranfenicol é uma substância activa purificada com uma elevada toxicidade (Greenwood, *et al.*, 2007) enquanto os extractos das algas são basicamente uma mistura complexa de compostos, sendo que a porção activa desta mistura provavelmente será extremamente baixa.

A actividade antifúngica dos extractos das algas foi avaliada num organismo modelo, a *Saccharomyces cerevisiae*. Para determinar o efeito dos extractos das algas perante o crescimento de *S. cerevisiae*, o seu crescimento foi analisado em vários tempos, comparando com o veículo. Após este procedimento, a análise da actividade antifúngica foi avaliada às 20 horas de crescimento que corresponde a um ponto na fase exponencial.

Das algas estudadas, a *Sphaerococcus coronopifolius* apresentou a maior actividade antifúngica em todas as fracções em estudo, com IC₅₀ de 56,44; 78,9 e 40,2 µg/ml nas fracções metanol, diclorometano e *n*-hexano, respectivamente. A alga *Asparagopsis armata* na fracção *n*-hexano também revelou um elevado potencial (IC₅₀ de 97,6 µg/ml).

Estas algas já foram alvo de diferentes estudos em que foram isolados vários compostos halogenados que se supõe funcionarem como defesas químicas contra herbívoros marinhos, com actividade antibacteriana, insecticida, antifúngica e antiviral (Smyrniotopoulos *et al.*, 2010; Rhimou *et al.*, 2010; Genovese *et al.*, 2009).

De facto, todas as algas vermelhas analisadas neste trabalho, possuem compostos com elevada capacidade antifúngica, especialmente nas fracções do diclorometano e do *n*-hexano. Tal como já foi referido anteriormente, as algas vermelhas têm-se revelado promissoras no que diz respeito à capacidade antimicrobiana.

À semelhança dos compostos antioxidantes, também os compostos antimicrobianos fazem parte dos sistemas de defesa das algas, nomeadamente contra herbívoros, fungos e bactérias, no entanto há que ter em conta que a sazonalidade e o método de extracção vão influenciar directamente os resultados (Shanmughapriya *et al.*, 2008; Gozález del Val *et al.*, 2001; Stirk *et al.*, 2007). Existem inúmeros trabalhos que revelam que tanto as algas castanhas como as verdes também possuem capacidade de produzir compostos com elevada capacidade antimicrobiana (Shanmughapriya *et al.*, 2008, Gozález del Val *et al.*, 2001). Na realidade, já foram isolados e identificados compostos como isopredóides, aminoácidos, terpenóides, florotaninas, compostos fenólicos, esteróides, ácidos gordos,

entre outros, em todas as classes de algas (Watson e Cruz-Rivera, 2003). Isto faz especial sentido ao analisar os resultados obtidos na fracção do diclorometano, em que se pode verificar que todas as algas possuem capacidade de inibir o crescimento de *S. cerevisiae*, revelando assim a presença de compostos com características antifúngicas.

As vias metabólicas pelas quais as algas produzem metabolitos secundários com capacidades bioactivas têm sido amplamente estudadas, no entanto ainda não se conhece por completo todos os mecanismos que despoletam a sua produção. No entanto existem evidências que a presença de determinadas substâncias no ambiente circundante das algas poderá provocar uma resposta da produção de metabolitos secundários. Existem estudos com algas castanhas e vermelhas que mostraram que estas produzem compostos com actividade antimicrobiana, quando expostas a compostos resultantes da degradação das suas paredes celulares. Quando a parede celular é degradada, dá-se a libertação de substâncias como oligossacáridos de alginatos ou de agar. Quando expostas a estas substâncias, as algas “assumem” que ocorreu uma agressão física e que estão debilitadas, susceptíveis a infecções por bactérias e fungos. Desta forma, respondem com um mecanismo de defesa, através da produção de compostos com actividade antimicrobiana contra possíveis patogénicos (Pottin, 2002).

Este será certamente só um exemplo de muitos dos mecanismos que favorecem a produção de compostos com actividade antimicrobiana e revela-se muito interessante pois poderá permitir que seja aplicado, por exemplo, em aquaculturas de algas. Tudo indica que expondo as algas aos produtos resultantes da degradação das paredes celulares, estas aumentarão a produção dos metabolitos secundários com actividade antimicrobiana.

Estes resultados indicam também que este tipo de estudos são muito importantes para uma melhor compreensão dos mecanismos que estão envolvidos na produção de compostos bioactivos e poderão ser uma alternativa viável para o desenvolvimento de novos compostos passíveis de serem utilizados na indústria farmacêutica com características naturais.

Após a análise por ESI-MS das três fracções da alga *Fucus spiralis*, não se conseguiu identificar nenhum composto. A pesquisa bibliográfica indica que muitos compostos com capacidade antioxidante poderão ser compostos fenólicos, como por exemplo as florotaninas, que fazem especial sentido para a alga *Fucus spiralis*. No entanto, as florotaninas são moléculas muito instáveis e reactivas, que formam complexos muito fortes com outras moléculas (Stern *et al.*, 1996). Esta propriedade torna estas moléculas muito difíceis de serem identificadas por espectrometria de massa sem acoplamento de outras técnicas, como por exemplo a cromatografia.

Relativamente à alga *Sphaerococcus coronopifolius* sugere-se a presença de dois ácidos gordos de cadeia longa no seu extracto de diclorometano, o ácido oleico e o ácido heptadecanóico (ou margárico). No entanto esta identificação terá de ser posteriormente confirmada por outras técnicas. Contudo, a presença destes ácidos gordos em algas já foi constatada em vários trabalhos (Polat e Ozogul, 2008; Nasir *et al.*, 2011). Relativamente à possível capacidade antimicrobiana destes ácidos, existem várias evidências que tanto o ácido oleico como o ácido heptadecanóico possuem características antibacterianas e antifúngicas, (Siddiqui *et al.*, 1993; Stengel *et al.*, 2011; De Felício *et al.*, 2010; Carballeira, 2007; Huang *et al.*, 2011) e tal como sucede neste estudo, a actividade antibacteriana é mais evidente em *Bacillus subtilis* (Agoramoorthy *et al.*, 2007). Adicionalmente, existem estudos que demonstram que os ácidos gordos de cadeia longa não possuem capacidade antibacteriana contra bactérias gram negativas devido à constituição da parede celular destas, (Agoramoorthy *et al.*, 2007) o que de alguma forma também suporta os resultados obtidos neste trabalho. No entanto, a elevada potência da actividade antifúngica demonstrada pela alga *Sphaerococcus coronopifolius*, sugere que estes ácidos gordos poderão não ser os principais responsáveis por esta bioactividade, sendo essencial a realização de mais estudos na identificação de compostos bioactivos.

Para a indústria Farmacêutica o valor de um organismo, quer seja terrestre quer seja marinho está no facto deste poder providenciar moléculas bioactivas que possam ser sintetizadas em laboratório ou que possam ser utilizadas como “moldes” para a síntese de novas moléculas com elevada especificidade e eficácia no tratamento de doenças (Gad, 2005; Fusetani, 2000). Neste contexto, verifica-se que as algas da costa de Peniche poderão ser uma fonte de novos compostos bioactivos com elevada capacidade antioxidante e antimicrobiana, com especial destaque para as algas *Fucus spiralis* e *Saccorhiza polyschides* que possuem uma elevada capacidade antioxidante e para *Sphaerococcus coronopifolius* e *Asparagopsis armata*, que possuem uma elevada capacidade antimicrobiana.

Perspectivas Futuras

Os resultados obtidos neste trabalho experimental revelam que as algas da costa de Peniche são excelentes fontes de compostos bioactivos, no entanto estes são apenas as primeiras pistas para o início de um longo trabalho de investigação. O facto de não se conhecer as moléculas presentes nas diferentes espécies de algas, torna este trabalho um desafio, obrigando a aplicação das mais diversificadas técnicas analíticas à medida que se vão obtendo resultados. Por outro lado, a actividade biológica de extractos de organismos marinhos pode ser testada de diferentes modos. Por exemplo, será um desafio realizar trabalho científico associado às interações que existem entre o organismo que produz o composto e a via metabólica que lhe é inerente.

Os organismos marinhos vivem normalmente em simbiose, sendo que o caminho de transferência de compostos nesta simbiose é muito relevante e levanta questões sobre a verdadeira origem dos metabolitos produzidos nesta associação. Desta forma, revela-se também muito pertinente o estudo futuro das associações de simbiose nos ecossistemas (Bhakuni e Rawat, 2005; Schweder *et al.*, 2005).

Relativamente à capacidade antioxidante um próximo passo poderá passar por testar a capacidade antioxidante em modelos *in vitro*, como por exemplo em células animais, para determinar se existe uma protecção efectiva contra a peroxidação lipídica.

Poderá ser interessante o estudo da capacidade antimicrobiana com mais estirpes bacterianas e fungos, nomeadamente em patogénicos humanos, bem como a determinação da concentração mínima inibitória dos extractos das algas.

Existem estudos em que tentaram desenvolver metodologias gerais para isolamento e purificação de compostos, no entanto, devido às características únicas de cada molécula, é muito complicado estabelecer-se um protocolo geral (Shimizu, 1985). Contudo, começam a surgir as primeiras pistas que relacionam as bioactividades com as características das moléculas (Blunt *et al.*, 2009).

A análise por MS é muito útil para a identificação de biomoléculas, no entanto, quando estas se encontram acopladas a outras moléculas, esta análise terá pouco sucesso. Desta forma, um passo seguinte neste estudo poderá ser a aplicação de outras técnicas que permitam uma maior separação dos compostos, como por exemplo técnicas de separação de amostra, ou o acoplamento de técnicas cromatográficas à espectrometria de massa. Como complemento à MS, a RMN (Ressonância Magnética Nuclear) também poderá ser útil para a identificação de moléculas.

Tal como referido anteriormente, apesar da presumível presença destes dois ácidos gordos nas algas, estamos certos que as actividades bioactivas aqui exploradas

poderão estar associadas à presença de outros tipos de moléculas, à semelhança de moléculas já identificadas em outros trabalhos de investigação (Blunt *et al.*, 2006-2010), desta forma e tendo em conta os resultados obtidos, é extremamente pertinente a continuidade deste trabalho de investigação, especialmente no que diz respeito à identificação das moléculas bioactivas. Para nós, este será provavelmente, o maior desafio futuro, mas também uma janela de oportunidade para desenvolver trabalho científico relevante e de elevada qualidade.

Bibliografia

- Agoramoorthy, G., Chandrasekaran, M., Venkatesalu, V., Hsu, M.J. 2007. Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the Blind-Your-Eye mangrove from India. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38:739-742.
- Al-Haj, N.A., Mashan, N.I., Shamsudin, M.N., Mohamad, H., Vairappan, C.S., Sekawi, Z. 2010. Antibacterial activity of marine source extracts against multidrug resistance organisms. *Journal of Pharmacology and Toxicology*. 5(2):95-102.
- Amsler, C. D., Fairhead, V.A. 2006. Defensive and Sensory Chemical Ecology of Brown Algae. *Advances in Botanical Research*. 43:1-91.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. 2003. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York. USA.
- Balandrin, M. F., Kinghorn, A. D., Farnsworth, N- R. 1993. Plant-derived natural products in drug discovery and development – An Overview. *American Chemical Society*.1: 2-12.
- Balasundaram, D., Tabor, C.W. and Tabor, H. 1999. Sensitivity of spermidine-deficient *Saccharomyces cerevisiae* to paromomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43: 1314–1316.
- Ballantine, D.L., Gerwick, W.H., Velez, S.M., Alexander, E., Guevara, P. 1987. Antibiotic activity of lipid-soluble extracts from Caribbean marine algae. *Hydrobiologia*. 151/152:463-469.
- Bansemir, A., Blume, M., Schröder, S., Lindequist, u. 2006. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*. 252:79-84.
- Barsanti, L. Gualtieri, P. 2006. *Algae – Anatomy, Biotechnology and Biotechnology*. CRC Press, Taylor & Francis Group. New York. USA.
- Basu, T. K., Temple, N. J., Garg, M. L. 1999. *Antioxidants in Human Health and Disease*. CABI Publishing, New York. USA.
- Benzi, G., Moretti, A. 1995. Are Reactive Oxygen Species Involved in Alzheimer's Disease? *Pergamon*. 16(4): 661-674.
- Bernardo-Gil, M. G., Ribeiro, M. A., Esquivel, M.M. 2001. Produção de Extractos para a Indústria Alimentar: Uso de Fluidos Supercríticos. *Boletim de Biotecnologia*. 73, 14-21.
- Bhakuni, D. S., Rawat, D.S., 2005. *Bioactive Marine Natural Products*. Springer, New York, USA.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Hu, W.P., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. 2009. Marine natural products. *Nat Prod Rep*. 26:170–244.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Hu, W.P., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. 2008. Marine natural products. *Nat Prod Rep*. 25:35–94.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Hu, W.P., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. 2007. Marine natural products. *Nat Prod Rep*. 24:31–86.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. 2010. Marine natural products. *Nat Prod Rep*. 26:165–237.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H.G., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. 2006. Marine natural products. *Nat Prod Rep*. 23:26–78.
- Carballeira, N.M. 2007. New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents. *Progress in Lipid Research*. 47:50–61.

Cassarino, D.S., Fall, C.P., Swerdlow, R.H., Smith, T.S., Halvorsen, E.M., Miller, S.W., Parks, J.P., Parker Jr, W.D., Bennet Jr, J.P. 1997. Elevated reactive oxygen species and antioxidant enzyme activities in animal and cellular models of Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1362: 77–86.

Celikler, S., Vatan, O., Yildiz, G., Bilaloglu, R. 2009. Evaluation of anti-oxidative, genotoxic and antigenotoxic potency of *Codium tomentosum* Stackhouse ethanolic extract in human lymphocytes in vitro. *Food and Chemical Toxicology*. 47:796-801

Cerantola, S., Breton, F., Ar Gall, E., Deslandes, E. 2006. Co-occurrence and antioxidant activities of fucol and fucophlorethol classes of polymeric phenols in *Fucus spiralis*. *Botanica Marina*. 49, 347–351.

Chauhan V, Chauhan A, 2006. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Pathophysiology*, 13: 195-208.

Chew, Y.L., Lim, Y.Y., Omar, M., Khoo, K.S. 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT – Food Science and Technology*. 41:1067–1072.

Cheyrier, V. 2005 Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Society for Clinical Nutrition*. 81:223-229.

Chinta, S.J., Andersen, J.K. 2008. Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1780: 1362-1367.

Chkhikvishvili, I.D., Ramazanov, Z. M. 1999. Phenolic substances of brown algae and their antioxidant activity. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 36: 289-291.

Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12:564–582.

Cragg, G.M., Newman, D.J. 2005. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure Appl. Chem*. 77:7-24.

Cronin, G., Hay, M.E. 1996. Chemical defenses, protein content, and susceptibility to herbivory of diploid vs. haploid stages of the isomorphic brown alga *Dictyota ciliolata* (Phaeophyta). *Botanica Marina*. 39: 395-399.

Culioli, G., Ortalo-Magné, A., Richou, M., Valls, R., Piovetti, L. 2002. Seasonal variations in the chemical composition of *Bifurcaria bifurcata* (Cystoseiraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 30:61-64.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A. 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*. 52:601-623.

De Felício, R., De Albuquerque, S., Young, M.C.M., Yokoya, N.S., Deboni, H.M. 2010. Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 52: 763–769.

Devi, K. P., Suganthy, N., Ksesika, P., Pandian, S., K. 2008. Bioprotective properties of seaweeds: In vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity against food borne bacteria in relation to polyphenolic content. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 8:38.

Díaz-Rubio, M.E., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. 2008 Dietary fiber and antioxidant capacity in *Fucus vesiculosus* products. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 1-12.

- Ding, B., Yin, Y., Zhang, F., Li, Zhiyong. 2010 Recovery and phylogenetic diversity of culturable fungi associated with marine sponges *Clathrina luteoculcitella* and *Holoxea sp.* in the South China Sea. *Marine Biotechnology*. DOI 10.1007/s10126-010-9333-8.
- Duan, X.-J., Zhang, W.-W., Li, X.-M., Wang, B.-G. 2006. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chemistry*. 95: 37–43.
- Ebada, S.S., Edrada, R.A., Lin, W., Proksch, P. 2008 Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. *Nature Protocols*. 3 (12): 1820-1831.
- Fernandez-Panchon, M.S., Villano, D., Troncoso, A.M., Garcia-Parrilla, M.C. 2008. Antioxidant activity of phenolic compounds: From in vitro results to in vivo evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48:649-671.
- Finkel, T., Holbrook, N.J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 408:239-247.
- Fusetani, N. 2000. *Drugs From The Sea*. Karger. Tokyo. Japan
- Gad, S. C. 2005. *Drug Discovery Handbook*. Wiley-Interscience. New Jersey. USA.
- Gamal, A.A.E. 2010. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 18:1-25.
- Geetha, B., Mathew, B., Augusti, K. 1994. Hypoglycemic effects of leucodelphinidin derivative isolated from *Ficus bengalensis* (Linn). *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*. 38:220-222.
- Genovese, G., Tedone, L., Hamann, M. T., Morabito, M. 2009. The Mediterranean red alga *Asparagopsis*: A Source of Compounds against Leishmania. *Mar Drugs*. 7: 361-366.
- Gomes A, Fernandes E, Lima J, Mira L, Corvo M, 2008. Molecular mechanisms of anti-inflammatory activity mediated by flavonoids. *Corrent Medicinal Chemistry*. 15:1586-1605.
- González Del Val, A., Platas, G., Basilio, A., Cabello, A., Gorrochategui, J., Suay, I., Vicente, F., Portillo, E., Del Rio, M. J., Reina, G.G., Peláez, F. 2001. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Int. Microbiol*. 4:35-40.
- Gorham, J., Lewey, S. A. 1984. Seasonal changes in the chemical composition of *Sargassum muticum*. *Marine Biology*. 80:103-107.
- Greenwood, D., Finch, R., Davey, P., Wilcox, M., 2007. *Antimicrobial Chemotherapy*. 5th Edition. Oxford University Press. USA.
- Guo, N., Yu, L., Meng, R., Fan, J., Wang, D., Sun, G. and Deng, X. 2008. Global gene expression profile of *Saccharomyces cerevisiae* induced by dictamnine. *Yeast*. 25: 631-641.
- Gupta, S., Abu-Ghannam, N. 2011. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science & Technology*. 22:315-326.
- Haefner, B. 2003 Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today*. 8 (12): 536-544.
- Hall, M.A.L.-V., Box, A.T.A., Blok, H.E.M., Paauw, A., Fluit, A.C., Verhoef, J. 2001. Evidence of extensive interspecies transfer of integron-mediated antimicrobial resistance genes among multidrug-resistant enterobacteriaceae in a clinical setting. *The Journal of Infectious Diseases*. 186:49-56.

- Hemmi, A., Honkanen, T., Jormalainen, V. 2004 Inducible resistance to herbivory in *Fucus vesiculosus*—duration, spreading and variation with nutrient availability. *Marine Ecology Progress Series*. 273:109-120.
- Hemmi, A., Mäkinen, A., Jormalainen, V., Honkanen, T. 2005. Responses of growth and phlorotannins in *Fucus vesiculosus* to nutrient enrichment and herbivory. *Aquatic Ecology*. 39: 201-211.
- Heo, S.-J., Park, E.-J., Lee, W.-K., Jeon, Y.-J. 2004. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technology*. 1613-1623.
- Hogg, S. 2005. The Fungi. *Essential Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd. England.
- Hou, X. e Yan, X. 1998. Study on the concentration and seasonal variation of inorganic elements in 35 species of marine algae. *The Science of the Total Environment*. 222: 141-156.
- Huang, C.-M., Chen, C.-H., Pornpattananangkul, D., Zhang, L., Chan, M., Hsieh, M.-F., Zhang, L. 2011. Eradication of drug resistant *Staphylococcus aureus* by liposomal oleic acids. *Biomaterials*. 32:214-221.
- Jormalainen, V. e Honkanen, T. 2004. Variation in natural selection for growth and phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *J. Evol. Biol.* 17:807-820.
- Kang, K., Park, Y., Hwang, H.J., Kim, S.H., Lee, J.G., Shin, H.-C. 2003. Antioxidant properties of brown algae polyphenolics and their perspectives as chemopreventive against vascular risk factors. *Arch Pharm Res*. 6: 286-293
- Klein, B. S., Tebbets, B. 2007. Dimorphism and virulence in fungi. *Current Opinion in Microbiology*. 10: 314-319.
- Koivikko, R., Loponen, J., Honkanen, T., Jormalainen, V. 2005. Contents of soluble, cell-wall-bound and exuded phlorotannins in the brown alga *Fucus Vesiculosus*, with implications on their ecological functions. *Journal of Chemical Ecology*. 31:195-212.
- Kumar, S.K., Ganesan, K. and Rao., P.V.S. 2008. Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty – An edible seaweed. *Food Chemistry*. 107: 289–295.
- Kushnerova, T.V., Fomenko, S.E., Kushnerova, N.F., Sprygin, V.G., Lesnikova, L.N., Khotimchenko, Y.S., Kondratieva, E.V. 2010. Antioxidant and membrane-protective properties of an extract from the brown Alga *Laminaria japonica*. *Russian Journal of Marine Biology*. 36(5):390-395.
- Lambert, P.A. 2002. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 92: 46–54.
- Larsen, T. O., Smedsgaard, J., Nielson, K., F., Hansen, M., E., Frisvad, J. C. 2005 Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Natural Products Reports*. 22: 672-695.
- Li, X., Qin, L. 2005. Metagenomics-based drug discovery and marine microbial diversity. *Trends in Biotechnology*. 23(11):539-543.
- Lima-Filho, J.V.M., Carvalho, A.F.F.U., Freitas, S.M., Melo, V.M.M. 2002. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern Brazilian coast. *Braz. J. Microbiol.* 33: 311-313.
- Loir, Y.L., Baron, F., Gautier, M. 2003 *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*. 2(1):63-76.

- Mageid, M.M.A.E., Salama, N.A., Saleh, M.A.M., Taleb, H.M.A. 2009. Antioxidant and antimicrobial characteristics of red and brown algae extracts. *4th Conference on Recent Technologies in Agriculture*. 818-828.
- Mahasneh, I., Jamal, M., Kashashneh, M., Zibdeh, M., 1995. Antibiotic activity of marine algae against multiantibiotic resistant bacteria. *Microbios*. 83: 23–26.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79:727-747.
- Marinho-Soriano, E., Fonseca, P.C., Carneiro, M.A.A., Moreira, W.S.C. 2006. Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresource Technology*. 97:2402-2406.
- Markesbery, W.R. 1997. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 23:134-147.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M.J., Ros, G. 2000 Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*. 50: 5-18.
- Martins, R. N., Harper, C.G., Stokes, G.B., Masters, C.L. 1986. Increased Cerebral Glucose-6-Phosphatase Dehydrogenase Activity in Alzheimer's Disease may Reflect Oxidative Stress. *Journal of Neurochemistry*. 46 (4): 1042-1045.
- Matsukawa, R., Dubinsky, Z., Kishimoto, E., Masaki, K., Masuda, Y., Takeuchi, T., Chihara, M., Yamamoto, Y., Niki, E. and Karube, I. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*. 9, 29-35.
- Mayachiew, P., and Devahastin, S. 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *LWT- Food Science and Technology*. 41: 1153 – 1159.
- Mayer, A.M.S., Rodríguez, A.D., Berlinck, R.G.S. and Hamann, M.T. 2009. Marine pharmacology in 2005-6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antibuberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1790: 283-308.
- Murakami, K., Yamaguchi, Y., Noda, K., Fujii, T., Shinohara, N., Ushirokawa, T., Sugawa-Katayama, Y., Katayama, M. 2011. Seasonal variation in the chemical composition of a marine brown alga, *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24:231-236.
- Nagayama, K., Iwamura, Y., Shibata, T., Hirayama, I., Nakamura, T. 2002. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 50: 889-893.
- Nasir, M., Saeidnia, S., Mashinchian-Moradi, A., Gohari, A.R. 2011. Sterols from the red algae *Gracilaria salicornia* and *Hypnea flagelliformis*, from Persian Gulf. *Pharmacogn Mag*. 7(26):97-100.
- Ohta, K., Takagi, M., 1977. Antimicrobial compounds of the marine red alga *Marginisporum aberrans*. *Phytochemistry*. 16: 1085–1086.
- Onofrejšová, L., Vasícková, J., Klejšus, B., Stratil, P., Misurcová, L., Krácmár, S., Kopecký, J., Vacek, J. 2010. Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid phase separation techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 51: 464-470.
- Padmakumar, K., Ayyakkannu, K., 1997. Seasonal variation of antibacterial and antifungal activities of the extracts of marine algae from southern coast of India. *Bot. Mar*. 40: 507–515.

- Pavia, H. e Toth, G. B. 2000 Influence of light and nitrogen on the phlorotannin content of the brown seaweeds *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. *Hydrobiologia*. 440: 299-305.
- Pedrosa, R., Soares-da-Silva, P. 2002. Oxidative and non-oxidative mechanisms of neuronal cell death and apoptosis by L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and dopamine. *British Journal of Pharmacology*. 137:1305-1313.
- Pereira, L. 2007. As Algas Marinhas e Respectivas Utilidades. Departamento de Botânica – Universidade de Coimbra.
- Pietta, P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. 63:1035-1042.
- Plaza, M. Santoyo, S., Jaime, L., Reina, G. G.-B. 2009. Screening for bioactive compounds from algae. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 7183.
- Plaza, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. 2008. In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology*. 19: 31-39.
- Polat, S., Ozogul, Y. 2008. Biochemical composition of some red and brown macro algae from the Northeastern Mediterranean Sea. *Int J. Food Sci. Nutr.* 59 (7-8): 566-572.
- Polya, G. 2003. *Biochemical Targets Of Plant Bioactive Compounds. A pharmacological reference guide to sites of action and biological effects*. CRC Press. Florida. USA.
- Potin, P., Bouarab, K., Salaün, J.P., Pohnert, G., Kloareg, B. 2002. Biotic interactions of marine algae. *Current Opinion in Plant Biology*. 5:1-10.
- Ramkumar, K. M., Majula, C., Sankar, L., Suriyanarayanan, S., Rajaguru, P. 2009. Potential in vitro antioxidant and protective effects of *Gymnema montanum* H. on alloxan-induced oxidative damage in pancreatic β -cells, HIT-T15. *Food and Chemical Toxicology*. 47:2246-2256.
- Rhimou, B., Hassane, R., José, M., Nathalie, B., 2010. The antibacterial potential of the seaweeds (Rhodophyceae) of the Strait of Gibraltar and the Mediterranean Coast of Morocco. *African journal of Biotechnology*. 9(38): 6365-6372.
- RiceEvans, C.A., Miller, J., Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*. 2:152-159.
- Riguera, R. 1997 Isolating bioactive compounds from marine organisms. *Journal of Marine Biotechnology*. 5: 187-193.
- Robards, K., Antolovich, M. 1997. Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids – A Review. *Analyst*. 122:11-34.
- Rocha, F. D., Pereira, R. C. Kaplan, M.A.C., Teixeira, V. L. 2007. Produtos Naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. *Brazilian Journal of Pharmacology*. 17(4):631-639.
- Rupérez, P. 2002. Mineral Content of edible marine seaweeds. *Food Chemistry*. 79:23-26.
- Sadati, N., Khanavi, M., Mahrokh, A., Nabavi, S.M.B., Sohrabipour, J., Hadjiakhoondi, A. 2011. Comparison of antioxidant activity and Total Phenolic Contents of some Persian Gulf Marine algae. *Journal of Medicinal Plants*. 10(37): 73-79.
- Salvador, N., Garreta, A.G., Lavelli, L., Ribera, M.A. 2007. Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. *Scientia Marina*. 71(1): 101-113.
- Sarker, S.D., Latif, Z., Gray, A.I. 2006. *Natural Product Isolation. Methods in Biotechnology*. 2nd Edition. Humana Press. New Jersey.

- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45:287-306.
- Scheper, T., Gal, Y.L., Ulber, R. 2005. *Marine Biotechnology I – Advances in Biochemical engineering/Biotechnology*. V.96. Springer. Berlin. Germany.
- Schoenwaelder, M.E.A., Wiencke, C. 2000. Phenolic compounds in the embryo development of several northern hemisphere fucoids. *Plant Biology*. 2: 24-33.
- Shanmughapriya, S., Manilal, A., Sujith, S., Selvin, J., Kiran, S. G., Natarajaseenivasan, K. 2008. Antimicrobial activity of seaweeds extracts against multiresistant pathogens. *Annals of Microbiology*. 58 (3): 535-541.
- Shibata, T., Kawaguchi, S., Hama, Y., Inagaki, M., Yamaguchi, K., Nakamura, T. 2004. Local and chemical distribution of phlorotannins in brown algae. *Journal of Applied Phycology*. 16: 291-296.
- Shimizu, Y. 1985. Bioactive Marine Natural Products, With Emphasis on Handling Of Water-Soluble Compounds. *Journal of Natural Products*. 48 (2): 223-235.
- Siddiqui, S., Naqvi, B. S., Usmanhiani, K., Shameel, M. 1993. Antibacterial activity and fatty acid composition of the Extract from *hypnea musciformis* (Gigartinales, Rhodophyta). *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science*. 6(1): 45-51.
- Smith, C.D., Carney, J.M., Starke-Reed, P.E., Oliver, C.N., Stadtman, E.R., Floyd, R.A., Markesbery, W.R. 1991. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 10540-10543.
- Smyrniotopoulos, V., Vagias, C., Rahman, M.M., Gibbons, S., Roussis, V. 2010. Ioniols I and II, Tetracyclic Diterpenes with Antibacterial Activity, from *Sphaerococcus coronopifolius*. *Chemistry & Biodiversity*. 7: 666-675.
- Sofidiya, M.O., Odukoya, O.A., Afolayan, A.J., Familoni, O.B. 2009. *Natural Product Research*. 23(2):168-177.
- Stengel, D.B., Connan, S., Popper, Z.A. 2011. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology advances*. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.016.
- Stern, J.L., Hagerman, A.E., Steinberg, P.D., Mason, P.K. 1996. Phlorotannin-Protein interactions. *Journal of Chemical Ecology*. 22 (10):1878-1899.
- Stirk, W.A., Reinecke, D.L., Staden, J.V. 2007 Seasonal variation in antifungal, antibacterial and acetylcholinesterase activity in seven South Africa seaweeds. *J. Appl. Phycol*. 19: 271-276.
- Swanson, A. K., Druehl, L., D. 2002. Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins. *Aquatic Botany* 241-253.
- Sze, P., 1998. *A Biology of the Algae*. McGraw-Hill Companies. 3rd Edition. Boston. United States of America.
- Takeshi, S., Yumiko, Y. S., Joko, S. 2005. Mineral components and anti-oxidant activities of tropical seaweeds. *Journal of Ocean University of China*. 4: 205–208.
- Taskin E, Ozturk M, Taskin E, Kurt, O. 2007. Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). *Afr. J. Biotechnol*. 6: 2746-2751.
- Tieu, K., Ischiropoulos, H., Przedborski, S. 2003. Nitric oxide and reactive oxygen species in Parkinson's disease. *J. Neurochem*. 85:329-335.

- Treyprasert, W., Schmidt, S., Rand, K. H., Suvanakoot, U. and Derendorf, H. 2007. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of in vitro activity of azithromycin against four different bacterial strains. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 29: 263–270.
- Tringali, C. 2001. *Bioactive Compounds from Natural Sources – Isolation, Characterisation and biological properties*. Taylor & Francis. London and New York.
- Vairappan, C.S., Kawamoto, T., Miwa, H., Suzuki, M., 2004. Potent antibacterial activity of halogenated compounds against antibiotic-resistant bacteria. *Planta Med*. 70: 1087–1090.
- Valentão, P., Trindade, P., Gomes, D., Guedes de Pinho, P., Mouga, T., Andrade, P. B., 2010. *Codium tomentosum* and *Plocamium cartilagineum*: Chemistry and antioxidant potential. *Food Chemistry*. 119: 1359-1368.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 266:37-56.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39:44-84.
- Vandepitte, J., Verhaegen, J., Engbaek, K., Rohner, P., Piot, P. and Heuck, C.C. 2003 Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. World Health Organization, Geneva.
- Wang, B-G., Zhang, W.-W., Duan, X.-J., Li, X.-M. 2008. In vitro antioxidative activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga, *Rhodomela confervoides* (Rhodomelaceae). *Food Chemistry*. 113: 1101-1105.
- Wang, T., Jónsdóttir, R., Ólafsdóttir, G. 2009. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*. 116: 240-248.
- Watson, S.B., Cruz-rivera E. 2003. Algal chemical ecology: an introduction to the special issue. *Phycologia*, 42: 319-323.
- Xiaojun, Y., Xiancui, L., Chengxu, Z., Xiao, F. 1996. Prevention of fish oil rancidity by phlorannins from sargassum *kjellmannianum*. *Journal of applied phycology*. 8: 201-203
- Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.T., Newmark, H.L. 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*. 21:381-406.
- Yoshida, N. 2001. Hydrogen and oxygen Isotopes in Hydrology. International hydrological Programme. Hydrospheric Atmospheric Research Center, Educational Scientific and Cultural Organization. Nagoya University. United Nations.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J. and Qian, M. 2002. Free Radical Scavenging Properties of Wheat Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 1619-1624.
- Yuan, Y.V., Walsh, N.A. 2006. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food and Chemical Toxicology*. 44:1144-1150.
- Zar, J. H. 2009. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall; 5th Edition.
- Zaragozá, M.C., López, D., Sáiz, M. P., Poquet, M., Pérez, J., Puig-Parellala, P., Màrmol, F., Simonetti, P., Gardana, C., Lerat, Y., Burtin, P., Inisan, C., Rousseau, I., Besnard, M., Mitjavila, M. T. 2008 Toxicity and antioxidant activity in vitro and in vivo of two *Fucus vesiculosus* extracts. *J. Agric. Food Chem*. 56: 7773-7780.

Zhu, Q.Y., Huang, Y., Tsang D., Chen, Z.Y. 1999. Regeneration of alpha-tocopherol in human low-density lipoprotein by green tea catechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 2020-2025.