



Avaliação da sensibilidade ao H₂O₂ de diferentes linhas celulares humanas: estabelecimento de modelos celulares para avaliação da capacidade antioxidante de moléculas ou extratos

Nádia Sofia Caneira Fino

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia Aplicada

Dissertação de Mestrado realizado sob a orientação do Doutor Rui Filipe Pinto Pedrosa

2014

Título: Avaliação da sensibilidade ao H₂O₂ de diferentes linhas celulares humanas: estabelecimento de modelos celulares para avaliação da capacidade antioxidante de moléculas ou extratos.

Copyright © Nádia Sofia Caneira Fino
Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche
Instituto Politécnico de Leiria
2014

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 projeto/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 objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Aos meus pais e irmã,

aos meus avós,

ao João.

Agradecimentos

A dissertação de mestrado aqui apresentada é o culminar de um trabalho que só foi possível devido ao empenho, dedicação e esforço de diversas pessoas, que de alguma forma contribuíram para a sua concretização. Deste modo gostaria de agradecer:

Ao Doutor Rui Pedrosa, orientador desta tese de mestrado, que me acompanhou e apoiou ao longo deste trabalho contribuindo para a minha formação profissional e pessoal, permitindo-me adquirir diversas competências científicas.

À professora Susana Mendes, por todo o apoio e disponibilidade que demonstrou sempre que solicitada.

Aos técnicos de laboratório Pedro Ramalho, Cristina Salas e Vera Severiano que se encontraram sempre disponíveis quando necessário.

Aos meus colegas e amigos de mestrado, pelo convívio e companheirismo. Ao Luís Alves, pelo apoio e amizade.

Ao Celso Alves, ao André Horta, à Joana Silva, à Susete Pinteus e a todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, à minha irmã, aos meus avós, ao João e aos meus amigos, por todo o esforço e sacrifício que fizeram para que tudo isto fosse possível. Obrigado pelo apoio incondicional que me deram ao longo destes dois anos.

A todos, muito obrigado.

O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto europeu BAMMBO suportado pelo 7º programa quadro (FP7). Todos os ensaios realizados neste trabalho foram financiados por este projeto.



Até ao momento, o trabalho desenvolvido nesta dissertação resultou em uma publicação em revista internacional indexada (ISI) e uma comunicação em painel no International Meeting in Marine Resources:

Publicação Científica:

- Horta, A., Pinteus, S., Alves, C., **Fino, N.**, Silva, J., Fernandez, S., Rodrigues, A., Pedrosa, R. (2014). Antioxidant and Antimicrobial Potential of the *Bifurcaria bifurcata* Epiphytic Bacteria. *Marine Drugs*, 12 (3): 1676-1689.

Comunicação em congresso:

- **Fino, N.**, Horta, A., Pinteus, S., Silva, J., Alves, C., Pedrosa, R. (2014). Antioxidant activity of *Sphaerococcus coronopifolius* associated bacteria. *Frontiers Marine Science. Conference Abstract: IMMR | International Meeting on Marine Research 2014*. doi:10.3389/conf.FMARS.2014.02.00058.

Resumo

Os organismos marinhos são considerados uma fonte de novos compostos bioativos com enorme potencial biotecnológico. As bactérias associadas a macroalgas têm vindo a ser estudadas devido à produção de metabolitos secundários com atividades biológicas. Neste trabalho foram isoladas e identificadas 90 bactérias associadas às macroalgas *Asparagopsis armata*, *Bifurcaria bifurcata* e *Sphaerococcus coronopifolius* com diferentes características fenotípicas, sendo identificadas relativamente ao seu género através da sequenciação do gene 16S RNA. A extração de compostos bioativos foi realizada com os solventes metanol e diclorometano (1:1). A capacidade antioxidante dos extratos das bactérias associadas foi avaliada através do método fluorimétrico ORAC (*oxygen radical absorbent capacity*), da quantificação total de polifenóis (QTP) e da capacidade de redução do radical *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH). O efeito citotóxico do H₂O₂ foi testado nos modelos celulares SH-SY5Y, MCF-7 e HepG-2, representativos de células humanas neuronais, epiteliais da glândula mamária e hepáticas, respetivamente. Os extratos com maior capacidade antioxidante foram testados nos modelos celulares em condições de *stress* oxidativo induzido pelo H₂O₂. Os resultados foram revelados pelo método de 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT).

O género de bactérias mais representativo identificado em associação com *Asparagopsis armata*, *Bifurcaria Bifurcata* e *Sphaerococcus coronopifolius* foi *Vibrio* sp. com 40%, 48,72% e 28,57%, respetivamente. Os géneros de bactérias menos representativos identificados em associação com *Asparagopsis armata* foram *Bacillus* sp., *Cobetia* sp. e *Erwinia* sp., com uma ocorrência de 3,33%. Por sua vez, *Citricoccus* sp., *Cellulophaga* sp., *Ruegeria* sp. e *Staphylococcus* sp. foram os géneros de bactérias menos representativos associados a *Bifurcaria Bifurcata* (2,56%). Os géneros menos representativos identificados em associação com *Sphaerococcus coronopifolius* foram *Bacillus* sp. e *Holomonas* sp. com uma ocorrência de 9,52%.

O extrato da bactéria associada que apresentou maior potencial antioxidante avaliado pelos métodos de ORAC (3603,66 ± 80,14 µmol eq. Trolox/g extrato), QTP (53,854 ± 3,02 mg eq. ácido gál./g extrato) e DPPH (20,21 (14,41-28,34) µg.mL⁻¹) foi a BB16 (*Shewanella* sp.), associada à alga *Bifurcaria bifurcata*.

O efeito induzido pelo H₂O₂ foi bastante distinto na redução da viabilidade celular, com IC₅₀ distintos, nas células SH-SY5Y (206,0 µM (150,4 – 282,2)), MCF-7 (450,2 µM (388,0 – 522,5)) e HepG-2 (1058,0 µM (847,3 – 1321,0)).

A elevada atividade antioxidante do extrato da bactéria associada à alga *Bifurcaria bifurcata* (0,1mg.mL⁻¹; BB16 – *Shewanella* sp.) permitiu a prevenção do efeito induzido pelo H₂O₂ na linha celular SH-SY5Y (IC₅₀ - 431,7 µM (360,1 – 517,6)).

Em conclusão, as bactérias associadas das macroalgas *Asparagopsis armata*, *Bifurcaria bifurcata* e *Sphaerococcus coronopifolius* podem ser uma excelente e interessante fonte de compostos marinhos naturais com um elevado potencial antioxidante.

Palavras-Chave: Bactérias associadas; Capacidade antioxidante; *Stress* oxidativo; Modelos celulares; Compostos bioativos; Atividades biológicas

Abstract

Marine organisms are considered a source of new bioactive compounds with enormous biotechnological potential. Macro-algae associated bacteria were recently linked to the production of secondary metabolites with biological activities. In this work we identified and isolated 90 associated bacteria, with different phenotypic features, from three macro-algae, *Asparagopsis armata*, *Bifurcaria bifurcata* and *Sphaerococcus coronopifolius*. The identification was performed in relation to their gender by 16S RNA gene sequencing. The bioactive compounds extraction was performed with methanol and dichloromethane solvents (1:1). The antioxidant capacity of the bacteria extracts was evaluated by fluorimetric method ORAC (Oxygen radical absorbent capacity), quantification of total phenolic content (TPC) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity. The cytotoxic effect of H₂O₂ was tested in SH-SY5Y, MCF-7 and HepG-2 cellular models. The extracts with higher antioxidant capacity were tested in cellular models in oxidative *stress* conditions induced by H₂O₂. The results were obtained by method 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT).

The more representative associated bacteria genus of *Asparagopsis armata*, *Bifurcaria Bifurcata* and *Sphaerococcus coronopifolius* was *Vibrio* sp. with 40%, 48.72% and 28.57%, respectively. The less representative associated bacteria genus of *Asparagopsis armata* were *Bacillus* sp., *Cobetia* sp. and *Erwinia* sp., with 3.33% of incidence. By contrast, *Citricoccus* sp., *Cellulophaga* sp., *Ruegeria* sp. and *Staphylococcus* sp. were the less representative genus associated with *Bifurcaria bifurcata* (2.56%). The less representative associated bacteria genus of *Sphaerococcus coronopifolius* were *Bacillus* sp. and *Holomonas* sp. with an incidence of 9.52%.

The extract of associated bacteria with the most antioxidant potential evaluated by ORAC (3603.66 ± 80.14 $\mu\text{mol Trolox eq./g extract}$), QTP (53.854 ± 3.02 mg galic acid eq./g extract) and DPPH (20.21 (14.41 - 28.34) $\mu\text{g.mL}^{-1}$) methods was the *Bifurcaria bifurcata* BB16 bacteria (*Shewanella* sp.).

The H₂O₂ induced cell death was associated to distinct IC₅₀ potency in SH-SY5Y (206.0 μM (150.4 – 282.2)), MCF-7 (450.2 μM (388.0 – 522.5)) and HepG-2 (1058.0 μM (847.3 – 1321.0)) cells.

The high antioxidant activity of the extract of associated bacteria BB16 (0.1mg.mL^{-1}) prevented the H₂O₂ induced effect on SH-SY5Y cell line (IC₅₀ - 431.7 μM (360.1 – 517.6)).

In conclusion, the macroalgae *Asparagopsis armata*, *Bifurcaria bifurcata* and *Sphaerococcus coronopifolius* associated bacteria can be an interesting and excellent source of marine natural compounds with high antioxidant potential.

Keywords: Associated bacteria; Antioxidant capacity; Oxidative *stress*; Cellular models; Bioactive compounds; Biological activities.

Índice

	Páginas
Resumo	xi
Abstract	xv
1. Introdução	1
1.1. Biodiversidade marinha e potencial biotecnológico	3
1.1.1. Macroalgas como fonte de novos compostos bioativos	5
1.1.2. Bactérias associadas a macroalgas como fonte de novos compostos bioativos	8
1.2. Condição de <i>stress</i> oxidativo em sistemas biológicos	10
1.2.1. Prevenção da condição de <i>stress</i> oxidativo por compostos bioativos marinhos	13
2. Objetivo	15
2.1. Objetivo Geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. Materiais e Métodos	19
3.1. Recolha e preparação de amostras	21
3.2. Processo de extração de DNA e identificação das bactérias associadas	21
3.3. Preparação da cultura bacteriana	22
3.4. Preparação dos extratos de bactérias	22
3.5. Avaliação da capacidade antioxidante	23
3.5.1. Método fluorimétrico ORAC	23
3.5.2. Quantificação Total de Polifenóis (QTP)	24
3.5.3. Capacidade de redução do radical DPPH	24
3.6. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de bactérias associadas em três modelos celulares em condições de <i>stress</i> oxidativo	25

3.6.1. Manutenção das culturas celulares	25
3.6.2. Indução da condição de <i>stress</i> oxidativo nos modelos celulares	26
3.6.3. Efeito dos extratos de bactérias associadas nos modelos celulares em condições de <i>stress</i> oxidativo	26
3.6.4. Método de 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)	27
3.7. Análise estatística	28
4. Resultados	29
4.1. Identificação de bactérias associadas às macroalgas em estudo	31
4.2. Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de bactérias associadas	33
4.2.1. ORAC (oxygen radical absorbance capacity)	33
4.2.2. Quantificação total de polifenóis (QTP) e capacidade de redução do radical DPPH	37
4.3. Análise de componentes principais (ACP)	42
4.4. Indução da condição de <i>stress</i> oxidativo nos modelos celulares	45
4.5. Avaliação da capacidade citotóxica dos extratos de bactérias associadas de macroalgas nos modelos celulares	47
4.6. Avaliação do efeito protetor dos extratos da bactéria associada BB16 em condições de <i>stress</i> oxidativo nos modelos celulares	50
4.6.1. Avaliação do potencial protetor do BHT e do extrato da bactéria associada BB16 na linha celular SH-SY5Y, em condições de <i>stress</i> oxidativo	50
4.6.2. Avaliação do potencial protetor do BHT e do extrato da bactéria associada BB16 na linha celular MCF-7, em condições de <i>stress</i> oxidativo	52
4.6.3. Avaliação do potencial protetor do BHT e do extrato de bactéria associada BB16 na linha celular HepG-2, em condições de <i>stress</i> oxidativo	53
5. Discussão e Conclusão	57
6. Perspetivas Futuras	71
7. Referências Bibliográficas	75

Introdução

1. Introdução

Ao longo dos séculos, os produtos naturais têm desempenhado um papel importante em todo o mundo no tratamento e prevenção de doenças humanas (Chin *et al.*, 2006). Historicamente, as empresas farmacêuticas utilizavam extratos vegetais para produzir formulações terapêuticas rudimentares, mas com o desenvolvimento de antibióticos em meados do século XX, as formulações farmacêuticas de compostos purificados tornaram-se mais comuns. Os produtos de origem natural têm sido uma das principais fontes de diversidade química de matérias-primas utilizados pela indústria farmacêutica, sendo obtidos a partir de plantas, animais e microrganismos. A sua descoberta e utilização como compostos ativos de fármacos tem sido de enorme importância, sendo que, desde 1994, aproximadamente metade dos fármacos que se encontram disponíveis no mercado são baseados em produtos naturais (Chin *et al.*, 2006; Baker *et al.*, 2007; Harvey, 2008).

Muitos produtos naturais e derivados de produtos naturais modificados sinteticamente, como compostos sintéticos ou semi-sintéticos, têm sido desenvolvidos com êxito para utilização clínica no tratamento de doenças humanas em quase todas as áreas terapêuticas, como por exemplo, doenças tumorais, doenças neurodegenerativas e diabetes (Baker *et al.*, 2007; Harvey, 2008). Apesar do contínuo crescimento do mercado farmacêutico, a procura de novos produtos com aplicabilidade farmacêutica continua a ser estimulada. A principal causa dessa motivação deve-se, por exemplo, à crescente resistência aos fármacos atualmente utilizados em doenças infecciosas ou em processos de quimioterapia (Baker *et al.*, 2007).

De facto, os recursos terrestres têm sido muito explorados na pesquisa de novas moléculas com potencial farmacêutico, contudo nas últimas décadas os investigadores iniciaram também a exploração no ambiente marinho, que é atualmente considerado uma fonte de novos metabolitos bioativos com elevado potencial biotecnológico (Yan, 2004; Jirge & Chaudhari, 2010).

1.1. Biodiversidade marinha e potencial biotecnológico

Os oceanos representam aproximadamente 70% da superfície terrestre (Haefner, 2003; Zhang *et al.*, 2005) distribuindo-se por uma área de, aproximadamente, 360 milhões km² (Hu *et al.*, 2011). De entre 36 filos conhecidos, 34 destes encontram-se em ambientes

marinhos com mais de 300 mil espécies conhecidas de fauna e flora (Yan, 2004). Esta grande biodiversidade ecológica está associada a um elevado potencial biotecnológico, nomeadamente como fonte de produtos naturais estruturalmente únicos que se encontram acumulados principalmente nos organismos vivos (Jha & Zi-rong, 2004; Costa-Lotufo *et al.*, 2009).

Os oceanos incluem 95% da biosfera da terra (Davidson, 1995) e abrigam uma enorme diversidade de organismos com morfologias e adaptações distintas, que variam de acordo com o tipo de habitat em que se desenvolvem e consoante a competitividade que existe entre todas as formas de vida presentes. Deste modo, os organismos marinhos apresentam uma elevada capacidade de produzir compostos com enorme atividade biológica, tanto para afastar os seus predadores como para mecanismos de adaptação. A produção de metabolitos secundários é uma consequência dos mecanismos de adaptação a pressões ecológicas e físicas que ocorrem no seu habitat, tendo estas moléculas demonstrado possuir um elevado potencial biotecnológico (Bhakuni & Rawat, 2005; Bhatnagar & Kim, 2010).

A pesquisa de novos compostos com potencial biomédico é intemporal e indispensável uma vez que o tratamento de diversas patologias está muito aquém das necessidades. Esta realidade pode ser constatada pelo número crescente de compostos de origem marinha identificados, em que entre 1965 e 2006 foram isoladas cerca de 18 500 substâncias de organismos marinhos. No entanto, apesar da elevada quantidade de compostos isolados, estima-se que se tenha apenas estudado aproximadamente 3% dos organismos marinhos (Costa-Lotufo *et al.*, 2009; Montaser & Luesch, 2011).

Alguns dos compostos bioativos isolados e identificados a partir de organismos marinhos, são atualmente comercializados e utilizados tanto na indústria farmacêutica como na indústria cosmética. Por exemplo, o composto Cytarabine (Cytosar-U[®]) possui na sua composição nucleótidos isolados da esponja *Cryptotethya crypta*, o composto Eribulin mesylate (Halaven[®]) isolado da esponja *Halichondria okada* e o composto Ziconotide (Prial[®]) isolado do molusco *Conus magus* estão há muito tempo aprovados pela FDA (Food and Drugs Administration), e são exemplos de sucesso no âmbito da utilização farmacêutica (Gerwick & Moore, 2012; Martins *et al.*, 2014).

Devido à sua enorme biodiversidade, os oceanos revelam ser uma fonte promissora de novos compostos bioativos, os quais apresentam uma elevada potencialidade de

aplicabilidade nas mais diversas indústrias, tais como a cosmética, farmacêutica e a alimentar (Minh *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 2013).

1.1.1. Macroalgas como fonte de novos compostos bioativos

Nas últimas décadas os investigadores começaram a olhar para os oceanos como uma fonte inesgotável de novos compostos com enorme potencial biotecnológico devido essencialmente aos seus sofisticados sistemas fisiológicos e bioquímicos (Davidson, 1995; Bhatnagar & Kim, 2010).

Ao contrário dos organismos terrestres, os organismos marinhos vivem em habitats complexos expostos a condições ambientais marinhas extremas, tais como alta pressão, elevada concentração de sal, baixa concentração de nutrientes, temperatura baixa constante (exceto em zonas localizadas perto de vulcões submarinos em que a temperatura é elevada e em regiões polares que a temperatura é extremamente baixa), luz solar limitada e baixo teor de oxigénio (Hu *et al.*, 2011). Para se adaptarem a estas condições, os organismos marinhos desenvolveram características únicas que os diferenciam de organismos terrestres em vários aspetos, tais como o metabolismo, o comportamento e a estratégia de adaptação. Estas características são úteis para determinar as diferenças entre os organismos terrestres e marinhos no que diz respeito aos mecanismos do metabolismo secundário e reações enzimáticas. Estas diferenças são responsáveis pela diversidade do metabolismo secundário dos organismos marinhos (Hu *et al.*, 2011; Lordan *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, a indústria farmacêutica tem desenvolvido diversos estudos com o intuito de identificar e caracterizar compostos bioativos provenientes de organismos marinhos, como corais, algas, esponjas e moluscos (Smit, 2004), sendo que o sucesso destes trabalhos tem sido incrivelmente satisfatório, descobrindo metabolitos secundários biologicamente ativos com estruturas químicas únicas (Davidson, 1995; Jha & Zi-rong, 2004; Hu *et al.*, 2011), o que reforça a hipótese da sua função protetora em resposta a pressões ecológicas e físicas do meio marinho, evidenciando o potencial biotecnológico destas moléculas (Costa-Lotufo *et al.*, 2009).

De entre os organismos marinhos, as macroalgas têm sido bastante estudadas como fonte de novos compostos bioativos (Gupta & Abu-Ghannam, 2011; Hu *et al.*, 2011). Os metabolitos presentes nas macroalgas estão descritos como benéficos para a saúde humana, tendo propriedades anti-inflamatória, anticoagulante, antioxidante, antimicrobiana,

antiviral e antitumoral (Athukorala *et al.*, 2007; Kong *et al.*, 2009; Gupta & Abu-Ghannam, 2011; Pangestuti & Kim, 2011; Kelman *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2013).

As macroalgas podem ser distribuídas e classificadas em três diferentes grupos, as algas verdes (Filo Chlorophyta), as algas castanhas (Filo Heterokontophyta) e as algas vermelhas (Filo Rhodophyta) com base na sua composição química (Gupta & Abu-Ghannam, 2011; Lordan *et al.*, 2011; Thomas & Kim, 2013).

A grande variedade de pigmentos fotossintéticos presentes nas algas conferem-lhes as cores características de cada grupo, sendo que no caso das algas verdes a cor deve-se à presença de clorofila *a* e *b* nas mesmas proporções que as plantas superiores, beta-caroteno e diversas xantofilas que lhes são características. A dominância da fucoxantina é responsável pela cor das algas castanhas, mascarando outros pigmentos como a clorofila *a* e *c* e outras xantofilas, enquanto a cor das algas vermelhas deve-se à presença de ficoeritrina e ficocianina, que mascaram pigmentos como a clorofila *a* e o beta-caroteno (Gupta & Abu-Ghannam, 2011). A presença de diferentes fotopigmentos nas algas está relacionada com o habitat marinho, pois a intensidade e disponibilidade de luz é muito variada e as algas estão distribuídas por diferentes zonas deste ambiente (Bocanegra *et al.*, 2009).

Estes organismos marinhos fotossintéticos desenvolvem-se na zona intertidal e na zona subtidal, contudo já foram identificadas macroalgas em profundidades bastante acentuadas em que a disponibilidade de luz é apenas de 0,1% (Dhargalkar & Pereira, 2005). As algas, pelo facto de se encontrarem na zona entre marés e serem organismos sésseis estão expostas a herbívoros, organismos incrustantes e agentes patogénicos (Stirk *et al.*, 2007; Jirge & Chaudhari, 2010). Devido a estas condições adversas, as macroalgas revelam ser produtoras de variados metabolitos secundários estruturalmente diferentes e únicos, tais como os terpenos, acetogeninas, alcalóides e polifenóis, de modo a se protegerem e sobreviverem nestes ambientes (Watson & Cruz-Rivera, 2003).

Como uma fonte rica em compostos bioativos, diversos compostos com atividade biológica já foram isolados e identificados a partir de macroalgas. Por exemplo, os diterpenos Dictyodial, Dictyol C e Dictyol H foram isolados de diferentes espécies do género da alga *Dictyota* (Gupta & Abu-Ghannam, 2011). Awad e seus colaboradores (2008) isolaram os compostos 18,19-epoxyxenic-19-methoxy-18-hydroxy-4-acetoxy-6,9,13-triene e 18,19-epoxyxenic-18,19-dimethoxy-4-hydroxy-6,9,13-triene do extrato

metanólico da macroalga *Padina pavonia*, demonstrando terem atividade antitumoral em linhas celulares tumorais hepáticas (HepG-2) e pulmonares (H460) (Gupta & Abu-Ghannam, 2011). Diversas florotaninas como o phloroglucinol, eckol, fucodiphloroethol G, 7-phloroeckol e dieckol foram isoladas a partir de diferentes espécies do género *Ecklonia* (*E. cava*, *E. kurome* e *E. bicyclis*) (Shin *et al.*, 2014), demonstrando um elevado potencial antioxidante e um efeito protetor contra danos celulares induzidos por peróxido de hidrogénio (Li *et al.*, 2011).

Uma das principais características do habitat das macroalgas, a zona intertidal, são as elevadas concentrações de oxigénio e a exposição intensa à luz visível e ultravioleta proporcionando que estes organismos se encontrem em condições favoráveis à formação de radicais livres e outros agentes oxidantes, que poderão conduzir a uma condição de *stress* oxidativo no organismo. Contudo, as algas raramente sofrem danos oxidativos no seu metabolismo nestas condições. Este facto é uma das evidências que as macroalgas apresentam alguns mecanismos e compostos antioxidantes protetores, podendo ser uma fonte rica em antioxidantes (Heo *et al.*, 2005; Gupta & Abu-Ghannam, 2011). Muitos dos compostos antioxidantes presentes nas algas já foram identificados como pigmentos, como a fucoxantina, astaxantina, ácido fenólico, flavonoides e taninas (Bravo, 1998; Heo *et al.*, 2005).

Na última década, os compostos fenólicos voltaram a despertar o interesse de diversos investigadores, principalmente pelo reconhecimento das suas propriedades antioxidantes que apresentam mecanismos que incluem a eliminação de radicais livres e de metais quelantes (Dutot *et al.*, 2012). Um dos grupos de compostos fenólicos que apresenta um elevado interesse são os polifenóis que constituem um dos maiores e amplamente distribuídos grupos de substâncias do reino vegetal, sendo conhecidas mais de 8 000 estruturas fenólicas, desde os fenóis mais simples como os ácidos fenólicos, passando pelos flavonoides, até estruturas mais complexas como as taninas (Bravo, 1998; Urquiaga & Leighton, 2000; Ferguson, 2001). Estes compostos englobam uma gama considerável de substâncias que possuem um ou mais anéis aromáticos ligados a um ou mais grupos hidroxilo (Urquiaga & Leighton, 2000; Manach *et al.*, 2004).

Os polifenóis são antioxidantes naturais, encontrando-se em abundância em alguns alimentos como frutas e vegetais, e estão descritos como protetores dos constituintes celulares aeróbios contra danos oxidativos, podendo prevenir a ocorrência de diversas

doenças degenerativas associadas ao *stress* oxidativo (Manach *et al.*, 2004; Kwon *et al.*, 2005; Scalbert *et al.*, 2005).

Desta forma, as macroalgas podem ter uma elevada aplicabilidade industrial, principalmente ao nível da produção de compostos antioxidantes, uma vez que a procura e o interesse por compostos naturais com propriedades antioxidantes, que retardem o envelhecimento e previnam a ocorrência de doenças tumorais, é cada vez maior não só pela indústria farmacêutica mas também pela indústria cosmética, para o desenvolvimento de novas formulações de loções corporais (Heo *et al.*, 2005).

1.1.2. Bactérias associadas a macroalgas como fonte de novos compostos bioativos

O ambiente marinho é um ecossistema extremamente complexo com uma enorme diversidade de formas de vida que se encontram associadas entre si (Debbab *et al.*, 2010; Soria-Mercado *et al.*, 2012). As superfícies dos eucariotas marinhos fornecem um habitat único para os microrganismos que habitam aderentes à sua superfície (Egan *et al.*, 2008; Penesyan *et al.*, 2010; Soria-Mercado *et al.*, 2012).

As bactérias marinhas são muitas vezes encontradas na superfície de muitas espécies de algas recolhidas do seu habitat natural (Villarreal-Gómez *et al.*, 2010). Para os organismos marinhos sésseis, como as macroalgas, esta associação é muito importante uma vez que os microrganismos marinhos reforçam o mecanismo de defesa do seu hospedeiro, produzindo vários tipos de metabolitos secundários bioativos. Muitos destes metabolitos são reconhecidos por serem ricos em propriedades químicas e biológicas como uma resposta a pressões ecológicas, como a competição, predação e reprodução, no ambiente em que habitam (Debbab *et al.*, 2010; Goecke *et al.*, 2010; Villarreal-Gómez *et al.*, 2010; Penesyan *et al.*, 2011; Horta *et al.*, 2014). A importância deste tipo de simbiose tem sido bastante estudada, e alguns trabalhos têm demonstrado uma associação altamente específica de comunidades bacterianas com as macroalgas marinhas (Goecke *et al.*, 2010; Villarreal-Gómez *et al.*, 2010; Penesyan *et al.*, 2011). Nomeadamente bactérias do género *Vibrio* sp. foram isoladas e identificadas em associação especificamente com a macroalga *Ulva reticulate* (Kannagasabhapathy *et al.*, 2008). As bactérias pertencentes ao género *Pseudoalteromonas* também foram isoladas a partir da macroalga verde *Ulva lactuca*, apresentando atividade anti-bacteriana, anti-fungica e anti-incrustante (Egan *et al.*, 2000).

Por sua vez, os gêneros de *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Erwinia* foram isolados da alga *Laminaria* (Goecke *et al.*, 2010), enquanto bactérias do gênero *Alteromonas* foram encontradas em associação com a alga *Laurencia pacifica* (Soria-Mercado *et al.*, 2012).

Estas associações compreendem um número de novas espécies de bactérias, gêneros e até mesmo ordens, provando que as macroalgas representam uma fonte rica de novos microrganismos (Goecke *et al.*, 2010), pelo que estudos filogenéticos de bactérias associadas são necessários para obter uma melhor visão sobre a complexidade das comunidades bacterianas associadas a macroalgas (Penesyan *et al.*, 2009).

Diversos produtos naturais de invertebrados marinhos mostram semelhanças estruturais notáveis com os metabolitos de origem microbiana, sugerindo que os microrganismos são a verdadeira fonte destes metabolitos, ou estão intrinsecamente envolvidos na sua biossíntese (Anand *et al.*, 2006). De acordo com diversos estudos da biossíntese de produtos naturais marinhos, existem compostos bioativos que inicialmente foram reportados como sendo derivados de organismos como moluscos, mas posteriormente descobriu-se que a sua verdadeira fonte eram bactérias marinhas associadas (Zheng *et al.*, 2005; Bhatnagar & Kim, 2010; Soria-Mercado *et al.*, 2012; Hamid *et al.*, 2013). Os compostos Brentuximab vedotin (SGN-35), aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) e Glembatumumab vedotin (CDX-011), que se encontra em ensaios clínicos do tipo II, foram inicialmente identificados como compostos derivados do molusco *Dolabella auricularia*, mas posteriormente verificou-se que eram provenientes de cianobactérias (Gerwick & Moore, 2012; Martins *et al.*, 2014).

Por este motivo, nos últimos anos os microrganismos associados com as superfícies de eucariotas marinhos têm sido alvos importantes para a descoberta de novos metabolitos bioativos (Penesyan *et al.*, 2011; Horta *et al.*, 2014).

Devido à limitação do fornecimento biológico de compostos ativos por parte dos macrorganismos marinhos, diversos estudos têm-se debruçado no potencial dos microrganismos marinhos como uma potencial fonte sustentável de compostos bioativos (Zheng *et al.*, 2005; Hamid *et al.*, 2013). As bactérias marinhas apresentam um elevado interesse como uma nova e rica fonte de produtos biologicamente ativos, sendo que o número de metabolitos secundários encontrados em bactérias marinhas tem aumentado constantemente ao longo dos últimos anos (Debbab *et al.*, 2010; Goecke *et al.*, 2010; Penesyan *et al.*, 2010).

As bactérias produzem uma variedade de compostos ativos tais como substâncias antibióticas e antitumorais, o que reflete o potencial das comunidades bacterianas associadas à superfície de organismos marinhos, em contraste com as comunidades bacterianas de vida livre (Zheng *et al.*, 2005, Kanagasabhpathy *et al.*, 2008; Goecke *et al.*, 2010; Soria-Mercado *et al.*, 2012).

Os microorganismos simbiotes são considerados uma fonte quase inesgotável para a descoberta de compostos bioativos com potencial farmacêutico (Bhatnagar & Kim, 2010). A este nível diversos compostos já foram isolados de bactérias associadas a macroalgas, como o Thallusin isolado de uma bactéria epífita obtida da superfície da macroalga verde *Monostroma oxyspermum* (Blunt *et al.*, 2007). Diversos tetrapeptidos cíclicos foram isolados de uma cultura de bactérias de *Pseudomonas* sp. recolhidas da macroalga *Diginea* sp. (Blunt *et al.*, 2010). Também Ayamycin é um metabolito com largo especto antimicrobiano isolado da bactéria *Nocardia* sp. obtida da macroalga *Laurencia spectabilis* (Blunt *et al.*, 2010).

Em comparação com as macroalgas, os microrganismos marinhos têm a vantagem de uma produção viável e sustentável de grandes quantidades de metabolitos secundários, devido ao facto destes apresentarem taxas de multiplicação mais rápidas e maior facilidade para o cultivo em larga escala (Debbab *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2011; Horta *et al.*, 2014).

A descoberta de novos compostos bioativos envolve a necessidade de estudos de diversidade, para que através do conhecimento do tipo de microrganismos seja possível conceber técnicas de cultivo adaptadas para as comunidades microbianas presentes em determinado ambiente (Soria-Mercado *et al.*, 2012). Contudo, a ocorrência natural de comunidades bacterianas em macroalgas permanece pouco clara, pelo que a maioria das espécies bacterianas ainda não foram identificadas (Ivanova *et al.*, 2002; Goecke *et al.*, 2010; Horta *et al.*, 2014). Por isso, é importante identificar as bactérias associadas que produzam metabolitos secundários bioativos de interesse e preservar as espécies que representam uma potencial fonte para o desenvolvimento de novos medicamentos (Soria-Mercado *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2013).

1.2. Condição de *stress* oxidativo em sistemas biológicos

Ao longo das últimas décadas diversos estudos têm associado o *stress* oxidativo ao desenvolvimento de diversas patologias como o cancro, doenças neurodegenerativas,

artrite, arteriosclerose e o envelhecimento, sendo uma área de estudo que atrai o interesse de investigadores de diferentes áreas científicas (Ferreira & Matsubara, 1997; Farah, 2005; Murray *et al.*, 2013).

A condição de *stress* oxidativo num organismo vivo ocorre quando existe um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e os mecanismos de defesa antioxidantes endógenos que visam a remoção ou reparação dos efeitos induzidos por estas espécies. Num sistema biológico humano, em condições normais, os mecanismos de defesa antioxidantes, como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase desempenham um papel de extrema importância na destoxificação destas espécies reativas (Halliwell, 1997; Farah, 2005). Das várias espécies reativas que ocorrem nos sistemas biológicos podem-se destacar as espécies reativas de azoto (RNS), que contêm na sua constituição átomos de azoto, e as espécies reativas de oxigénio (ROS) que contêm átomos de oxigénio. Estas espécies reativas podem encontrar-se na forma de radicais livres ou não radicais. Os radicais livres podem ser definidos como moléculas que contêm um ou mais eletrões desemparelhados conferindo-lhes um elevado grau de reatividade. Por sua vez, as espécies não radicais não contêm quaisquer eletrões desemparelhados, estando todos os eletrões dispostos em pares, conferindo estabilidade (Ferreira & Matsubara, 1997; McCord, 2000).

Nas células animais, a respiração aeróbia é a grande responsável pela produção de espécies reativas, nomeadamente ROS, uma vez que neste tipo de respiração o oxigénio é o aceitador final de eletrões e existe uma forte tendência para a produção de radicais livres de oxigénio, fazendo naturalmente parte do sistema metabólico (Bahar *et al.*, 2010; Ryu *et al.*, 2011; Alfadda & Sallam, 2012).

A maioria do oxigénio consumido pelo organismo humano, mais de 95%, é canalizado para as mitocôndrias onde é utilizado como último aceitador de eletrões, na produção de energia, sob a forma de ATP, durante a fosforilação oxidativa. No entanto, uma pequena percentagem do oxigénio que é respirado (1-3%) é convertida em ROS (Halliwell, 1997; Lenaz, 1998).

Quando ocorre a produção de radicais em excesso no organismo, o fluxo de eletrões gera espécies reativas de oxigénio, como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxilo ($\bullet OH$) e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), que contribuem para a ocorrência de danos celulares (Halliwell, 1997; Lenaz, 1998; Farah, 2005; Heo *et al.*, 2005; Ryu *et al.*, 2011). As reações entre os sistemas celulares e as espécies reativas, especialmente ROS,

provocam a oxidação de biomoléculas celulares importantes, tais como lípidos, proteínas e ácidos nucleicos. Estas reações de oxidação estão implicadas na etiologia de uma grande variedade de doenças, incluindo arteriosclerose, artrite reumatoide, distrofia muscular, cataratas, distúrbios neurológicos, envelhecimento, lesões inflamatórias, doenças tumorais e doenças cardiovasculares (Ferreira & Matsubara, 1997; Halliwell, 1997; Ruberto *et al.*, 2001; Heo *et al.*, 2005; Bahar *et al.*, 2010; Ryu *et al.*, 2011).

De modo a proteger e minimizar os danos celulares provocados pelas espécies reativas, as células aeróbias desenvolveram um complexo sistema antioxidante que consiste na utilização de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), que converte os radicais superóxido em peróxido de hidrogénio, a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GSH), que convertem o peróxido de hidrogénio em produtos não nocivos, como a água e o oxigénio molecular (Ryu *et al.*, 2011; Alfadda & Sallam, 2012). Contudo, quando no organismo ocorrem níveis reduzidos ou disfunção de SOD, CAT ou GSH pode conduzir a uma acumulação de peróxido de hidrogénio ou superóxido, contribuindo para o aumento de danos celulares, através da oxidação de ácidos nucleicos, proteínas e lípidos (Ryu *et al.*, 2011).

O H_2O_2 é conhecido como a mais estável das espécies reativas de oxigénio, encontrando-se envolvido em processos de envelhecimento e morte celular. A elevada quantidade de H_2O_2 no organismo é conhecida por ter um impacto negativo no sistema nervoso central, estando associado por vários autores ao desenvolvimento de diversas doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson (Salimi *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2013).

As células humanas, assim como de outros organismos vivos estão constantemente expostas a uma grande variedade de agentes oxidantes, alguns dos quais são essenciais para a vida. Estes agentes podem estar presentes no ar, nos alimentos e na água, ou podem ser produzidos pelas atividades metabólicas presentes no interior das células. Deste modo é necessário manter um equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes para sustentar as condições fisiológicas ótimas do organismo (Liu, 2003).

Um dos modos de evitar a condição de *stress* oxidativo num organismo é mantendo uma dieta rica em antioxidantes naturais. As frutas e os vegetais contêm na sua constituição uma grande variedade de compostos antioxidantes, como compostos fenólicos e carotenoides, que podem ajudar a proteger os sistemas celulares de danos oxidativos e diminuir o risco de doenças crónicas (Liu, 2003; Dutot *et al.*, 2012).

Assim, os antioxidantes utilizados na alimentação têm demonstrado notáveis resultados como agentes efetivos na prevenção e tratamento de doenças tumorais, doenças cardiovasculares, diabetes, cataratas e doenças inflamatórias (Svillas *et al.*, 2004), uma vez que os antioxidantes são capazes de remover ou prevenir a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigénio (Gordon, 1996; Namvar *et al.*, 2014).

1.2.1. Prevenção da condição de *stress* oxidativo por compostos bioativos marinhos

Nos últimos anos, muitos têm sido os novos metabolitos com potentes atividades biológicas e propriedades farmacológicas descobertos a partir de organismos marinhos, como bactérias marinhas, invertebrados e algas (Smit, 2004). Estes compostos bioativos com potencial biotecnológico podem ter um papel importante na prevenção ou tratamento de diversas doenças humanas, como doenças associadas a danos oxidativos, por exemplo doenças neurodegenerativas, que tem um grande impacto na sociedade mundial (Horta *et al.*, 2014). Assim, com a crescente necessidade de descoberta de novos fármacos, é necessário compreender as potenciais bioatividades associadas aos compostos marinhos.

Diversos estudos têm descrito o efeito de compostos bioativos naturais de origem marinha na prevenção de *stress* oxidativo. No estudo realizado por Heo e colaboradores (2012), a florotanina diphlorethohydroxycarmalol, isolada da alga *Ishige okamurae*, demonstrou um elevado efeito protetor em condições de *stress* oxidativo induzido por H₂O₂ numa linha celular neuronal (HT22). Também Heo e Jeon (2009), verificaram no seu estudo o efeito protetor da fucoxantina, isolada da macroalga *Sargassum siliquastrum*, em condições de *stress* oxidativo induzido por radiação UV-B.

As bactérias associadas de macroalgas também são uma fonte metabolitos ricos em propriedades químicas e biológicas. O facto de não haver estudos referentes ao efeito de compostos isolados de bactérias associadas de macroalgas na proteção de danos oxidativos reforça o interesse da realização deste trabalho, em bactérias marinhas associadas de macroalgas.

Objetivo

2.1. Objetivo Geral

Os organismos marinhos ao longo dos últimos anos têm-se revelado uma fonte única de moléculas com interesse biotecnológico, fornecendo novos compostos com elevada atividade biológica. Contudo, os organismos que se encontram na costa portuguesa, nomeadamente bactérias associadas a macroalgas, encontram-se pouco estudadas quanto ao seu potencial para produzir moléculas com elevada bioatividade. Deste modo o objetivo deste trabalho consistiu na avaliação da sensibilidade das linhas celulares SH-SY5Y, MCF-7 e HepG-2 em condições de *stress* oxidativo induzido pelo H₂O₂, e verificar o efeito preventivo dos extratos (com maior atividade antioxidante) de bactérias associadas às macroalgas *Asparagopsis armata*, *Bifurcaria bifurcata* e *Sphaerococcus coronopifolius* da costa de Peniche nos modelos celulares nas mesmas condições de *stress* oxidativo.

2.2. Objetivos específicos

- i. Isolar e identificar as bactérias associadas a macroalgas em estudo por métodos fenotípicos e moleculares de sequenciação do gene 16 S RNA.
- ii. Extrair compostos bioativos das bactérias associadas, efetuando-se extratos com recurso aos solventes orgânicos metanol e diclorometano.
- iii. Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos através do método fluorimétrico ORAC, pela quantificação total de polifenóis (QTP) e pelo método de redução do radical DPPH.
- iv. Avaliar o efeito citotóxico do H₂O₂ na viabilidade celular dos modelos celulares SH-SY5Y, MCF-7 e HepG-2, através de ensaios de dose-resposta para determinação do valor de IC₅₀, após 24 horas de incubação.
- v. Os extratos que demonstraram maior potencial antioxidante foram utilizados para:

- a.** Avaliar o seu efeito citotóxico na viabilidade celular das linhas celulares SH-SY5Y, MCF-7 e HepG-2, pelo método de MTT, após 24 horas de incubação.

- b.** Avaliar o efeito protetivo nos modelos celulares SH-SY5Y, MCF-7 e HepG-2, em condições de *stress* oxidativo induzido pelo H₂O₂, através da realização de ensaios de dose-resposta para determinação do valor de IC₅₀, após 24 horas de incubação.

Materials e Métodos

3.1. Recolha e preparação de amostras

As macroalgas *Asparagopsis armata*, *Bifurcaria bifurcata* e *Sphaerococcus coronopifolius* foram recolhidas na praia da Gamboa (39° 21' 52" N 9° 22' 20" W) e na praia do Quebrado (39° 22' 3" N 9° 22' 26" W), em Peniche, Portugal. Após a recolha, todas as algas foram colocadas em sacos estéreis para garantir a não contaminação das amostras por microrganismos que não se encontrassem naturalmente em associação com as algas em estudo. Em laboratório, as diferentes amostras foram lavadas 3 vezes com água do mar estéril, de modo a remover areias, detritos e microrganismos que não se encontrassem em associação natural com as algas. Após a lavagem destas, passou-se com uma zaragatoa em toda a superfície das algas de modo a recolher o maior número possível de bactérias associadas presentes nas amostras. Depois da recolha das bactérias presentes na superfície de cada uma das algas realizou-se um espalhamento numa placa de cultura microbiana cujo meio continha a seguinte composição: 5 g/L de peptona, 1 g/L de extrato de levedura, 0,1 g/L de FePO₄, 15 g/L de agar-agar dissolvido em água do mar, a pH 7,2-7,6.

Após uma incubação de 7 dias à temperatura climatizada de 20°C, as unidades formadoras de colónias (UFC's) com diferente morfologia e pigmentação foram recolhidas individualmente para uma nova placa de cultura. Para garantir o isolamento e purificação de todas as bactérias selecionadas procedeu-se por seis vezes à técnica do riscado.

3.2. Processo de extração de DNA e identificação das bactérias associadas

O DNA das bactérias associadas das macroalgas em estudo foi extraído com recurso ao kit comercial de extração GeneJET™ (Thermo Fisher Scientific, Lithuania), de acordo com as instruções do fabricante. A identificação ao nível do género dos isolados foi determinada pela sequenciação do gene 16S rRNA. Os genes 16S rRNA, com aproximadamente 1500 bp, foram amplificados usando os primers universais de bactérias F27 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e R1492 (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'). As misturas de reação (25mL) foram preparadas do seguinte modo: 8,75µL de água ultrapura, 5µL de GoTaq® Flexi DNA Polymerase Buffer, 3µL de MgCl₂ a 25mM, 2,5µL de dNTPs a 2mM, 1,5µL de cada primer a 10µM, 1,25µL de DMSO a 100%, 0,5µL de GoTaq® Flexi DNA Polymerase 5U/µL (Promega, U.S.A.) e 1µL de DNA.

O processo de amplificação foi iniciado por uma desnaturação a 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos e por fim 72°C durante 10 minutos. Todas as amplificações por PCR foram realizadas num termociclador (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.), sendo verificadas posteriormente à luz UV após uma eletroforese em gel de agarose a 1,5% corada com RedSafe™ (iNtRON Biotechnology, Korea). Os produtos de PCR foram purificados com as colunas DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research Europe GmbH, Germany) e submetidos ao processo de sequenciação utilizando o método de Sanger. Os reagentes BigDye Terminator 3 (Applied Biosystems, U.S.A.) e o sequenciador ABI 3730XL (SeqGen, U.S.A.) foram utilizados em todo o processo de sequenciação. As relações filogenéticas, dos isolados após a sequenciação, foram obtidas usando o Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) na base de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information).

3.3. Preparação da cultura bacteriana

As bactérias marinhas isoladas foram crescidas em 500mL de meio (5 g/L de peptona, 1 g/L de extrato de levedura, 0,1 g/L de FePO₄ dissolvido em água do mar filtrada (0,22µm), pH 7,2 – 7,6) em balões com arejamento constante durante 3 dias à temperatura climatizada de aproximadamente 20°C. Após o período de crescimento bacteriano procedeu-se à separação das células do meio recorrendo a um processo de centrifugação (5minutos a 10000 rpm). No fim do processo de separação, as células foram congeladas a -80°C para a posterior liofilização.

3.4. Preparação dos extratos de bactérias

Para a preparação dos extratos das bactérias utilizou-se 1,50g de bactéria liofilizada à qual foi adicionada uma mistura de solventes com diferentes polaridades, metanol (VWR Chemicals, France) e diclorometano (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) (1:1). A amostra liofilizada foi colocada num gobelé no qual se adicionou 150 mL da mistura de solventes durante 16 horas com agitação constante, sendo posteriormente filtrada (Whatman N°4, U.K.).

Os extratos obtidos após o processo de filtração foram concentrados através da utilização de um evaporador rotativo Laborota 4000 (Heidolph) a 40°C, obtendo-se no final a biomassa das bactérias. Para garantir a total evaporação de vestígios dos solventes orgânicos todos os extratos passaram por uma corrente de azoto. Os extratos foram dissolvidos em DMSO (Dimetil sulfóxido) (Sigma Aldrich, Germany) e mantidos a -20°C para posterior utilização.

3.5. Avaliação da capacidade antioxidante

3.5.1. Método fluorimétrico ORAC

O método fluorimétrico ORAC (oxygen radical absorbance capacity) consiste basicamente na capacidade dos antioxidantes neutralizarem radicais livres (Kohri *et al.*, 2009). Neste trabalho experimental o método de ORAC foi adaptado a partir do trabalho realizado por Dávalos e seus colaboradores (2004). Em cada poço da microplaca de 96 poços foram adicionados 20µL de cada amostra/branco (tampão fosfato)/padrão e 120µL de fluoresceína a 0,117µM (Sigma Aldrich, U.S.A.). Durante 15 minutos leu-se a fluorescência no leitor de microplacas (Synergy H1 Multi-Mode Microplate Reader, BioTeK® Instruments, U.S.A.) a 37°C de modo a verificar a ausência de fluorescência. Posteriormente adicionou-se 60µL de AAPH a 40mM (Sigma Aldrich, U.S.A.) em cada poço e procedeu-se à leitura de fluorescência (excitação 485nm, emissão 528nm) a 37°C a cada minuto durante 4 horas. De modo a calcular a capacidade antioxidante dos extratos utilizou-se o padrão Trolox (Sigma Aldrich, U.S.A.), sendo realizada uma curva de calibração com diferentes concentrações (0, 5, 10, 20, 40 e 80µM) para cada ensaio.

Os resultados foram expressos em micromole de equivalentes de Trolox por grama de extrato. Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

A curva antioxidante (fluorescência vs tempo) é normalizada com a curva do branco correspondente ao mesmo ensaio, multiplicando os dados pelo fator de fluorescência_{branco, t=0} /fluorescência_{amostra, t=0}. A partir da curva normalizada a área abaixo da curva (AUC) é calculada através da seguinte equação:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=n-1} \frac{f_i}{f_0} + \frac{f(x_n)}{f(x_0)}$$

Onde f_0 é a leitura de fluorescência inicial ao tempo 0 minutos e f_i é a leitura de fluorescência ao tempo i minutos. A AUC total corresponde a uma amostra e é calculada subtraindo-se a AUC correspondente ao branco. Equações de regressão entre a AUC total e a concentração antioxidante foram calculadas para todas as amostras. Os valores de ORAC foram expressos em micromole de equivalentes de Trolox por grama de extrato usando a curva padrão calculada para cada ensaio.

3.5.2. Quantificação Total de Polifenóis (QTP)

A Quantidade Total de Polifenóis (QTP) foi avaliada através do método de Folin-Ciocalteu, adaptado a partir do trabalho realizado por Yu e seus colaboradores (2002). Em cada poço da microplaca de 96 poços foram adicionados 158 μ L de água destilada, 2 μ L de amostra, 10 μ L de reagente Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich, Switzerland) e 30 μ L de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 20% (p/v) (Merck, Germany). As amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 1 hora protegidas da luz. Os resultados foram obtidos espectralmente num leitor de microplacas (Synergy H1 Multi-Mode Microplate Reader, BioTeK[®] Instruments, U.S.A.) a um comprimento de onda de 755nm.

O ácido gálico (Sigma Aldrich, Germany) foi utilizado como padrão para a curva de calibração (0,01; 0,03; 0,1; 0,3 e 1 mg.mL⁻¹). A QTP foi expressa em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato. Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

3.5.3. Capacidade de redução do radical DPPH

A capacidade de redução do radical DPPH foi avaliada a partir da adaptação do método descrito por Duan e seus colaboradores (2006). Em cada poço da microplaca de 96 poços foram adicionados 198 μ L da solução de DPPH (0,1mM, dissolvido em etanol) (Sigma Aldrich, Germany) e 2 μ L de amostra. As amostras foram incubadas durante 1 hora protegidas da luz. Os resultados foram obtidos espectralmente num leitor de microplacas (Synergy H1 Multi-Mode Microplate Reader, BioTeK[®] Instruments, U.S.A.) a um comprimento de onda de 517nm. Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

Os resultados da capacidade de redução do radical DPPH encontram-se representados em percentagem de redução, sendo calculados através da seguinte equação:

$$(\% \text{ redução}) = [1 - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})/Abs_{controle}] \times 100$$

Onde a $Abs_{amostra}$ corresponde à absorvância da solução de DPPH com a adição de amostra, a Abs_{branco} corresponde à absorvância da amostra testada com a adição de etanol e $Abs_{controle}$ corresponde à absorvância da solução de DPPH com a adição de DMSO.

3.6. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos de bactérias associadas em três modelos celulares em condições de *stress* oxidativo

3.6.1. Manutenção das culturas celulares

O efeito antioxidante dos diferentes extratos de bactérias associadas foi avaliado em três diferentes modelos celulares, provenientes do carcinoma hepatocelular de fígado humano (HepG-2) (ATCC number: HB-8065), do adenocarcinoma mamário humano (MCF-7) (DSMZ number: ACC 115) e do neuroblastoma humano (SH-SY5Y) (DSMZ number: ACC 209) em condições de *stress* oxidativo.

As células HepG-2 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich, U.S.A.) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) e 1% de antibiótico/antimicótico (Sigma Aldrich, U.S.A.). As células MCF-7 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich, U.S.A.), enriquecido com 10% soro fetal bovino (FBS) (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.), 1% antibiótico/antimicótico (Sigma Aldrich, U.S.A.), 1% MEM non-essential amino acids (Sigma Aldrich, U.S.A.), 1mM de piruvato de sódio (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) e 10µg/mL de insulina humana (Sigma Aldrich, U.S.A.). Por sua vez as células SH-SY5Y foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's/Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma Aldrich, U.S.A.) suplementado com 20% de soro fetal bovino (FBS) (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) e 1% de antibiótico/antimicótico (Sigma Aldrich, U.S.A.).

As células foram mantidas em cultura numa incubadora de CO₂ (CO₂ Unitherm, Germany) a uma temperatura constante de 37°C, 95% de humidade e 5% de CO₂. As células em cultura foram semeadas em placas de 25 cm² com o respetivo meio, demorando em média 5 dias até atingir a confluência total das placas. Após este período, realizou-se uma subcultura em que as células presentes nas placas 25 cm² foram levantadas com 1mL de tripsina (Sigma Aldrich, U.S.A.) e semeadas em placas de 96 poços adicionando-se

180µL de meio com soro e 20µL de suspensão celular em cada poço. O meio de cultura foi substituído após 24 horas do processo de *seeding* e de seguida de dois em dois dias até atingir a confluência total.

3.6.2. Indução da condição de *stress* oxidativo nos modelos celulares

Para testar o efeito de toxicidade do peróxido de hidrogénio (H₂O₂) (Sigma Aldrich, Germany) nas diferentes linhas celulares, foi necessário esperar aproximadamente 5 dias até as placas de 96 poços atingirem a confluência total. Foram preparadas soluções com diferentes concentrações de H₂O₂ para testar nas células SH-SY5Y (0,1; 0,3; 0,5; 0,7 e 1mM), MCF-7 (0,05; 0,2; 0,5; 0,7 e 1mM) e HepG-2 (0,1; 0,3; 0,5; 1 e 3mM) em meio de cultura sem soro. Após as placas atingirem a confluência total em todos os poços, removeu-se o meio das placas e adicionou-se 200µL das diferentes concentrações anteriormente preparadas, nos poços previamente definidos. Para todas as situações foram realizados ensaios durante 24 horas de incubação.

Os efeitos induzidos pelas soluções testadas nas células foram revelados através do método de 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) permitindo avaliar a viabilidade celular. O procedimento para o método de MTT encontra-se descrito no ponto 3.6.4.

3.6.3. Efeito dos extratos de bactérias associadas nos modelos celulares em condições de *stress* oxidativo

Para avaliar o efeito dos extratos de bactérias associadas sobre a viabilidade celular nas células em condições de *stress* oxidativo, foi necessário esperar aproximadamente 5 dias até as células atingirem a confluência total em placas de 96 poços. Para os extratos de bactérias associadas com maior potencial antioxidante foram testados nas seguintes concentrações: 1mg.mL⁻¹, 0,5mg.mL⁻¹, 0,3mg.mL⁻¹, 0,1mg.mL⁻¹ e 0,05mg.mL⁻¹. As soluções foram preparadas em meio de cultura sem soro, testadas na ausência e na presença de diferentes concentrações de H₂O₂, anteriormente definidas para cada modelo celular. Todas as soluções foram filtradas em ambiente estéril (0,22µm, Whatman, U. K.). Após as células atingirem a confluência total em todos os poços, removeu-se o meio celular, tendo-se posteriormente adicionado 200µL das diferentes soluções, contendo os

extratos de bactérias e o oxidante H₂O₂, previamente preparadas. Todos os ensaios foram realizados durante 24 horas de incubação.

O efeito dos diferentes extratos de bactérias nas linhas celulares foi revelado pelo método de MTT, avaliando a viabilidade celular.

3.6.4. Método de 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)

O método de MTT baseia-se na redução de sais tetrazólicos por desidrogenases mitocondriais metabolicamente ativas (células viáveis) em cristais de formazan. Estes cristais são dissolvidos num solvente orgânico, isopropanol (Panreac, Spain), para que posteriormente sejam quantificados espectrofotometricamente, permitindo uma relação com o número de células viáveis, pois quanto maior o número de células viáveis maior o número de cristais formados (Datki *et al.*, 2003). Neste trabalho experimental o método de MTT foi adaptado a partir do trabalho realizado por Yuan & Walsh (2006). Após o período de 24 horas de incubação aspirou-se o meio contendo as soluções testadas e lavou-se as células com 200µL de tampão Hank's (Composição do meio em mM: NaCl 137; KCl 5; MgSO₄ 0,8; Na₂HPO₄ 0,33; KH₂PO₄ 0,44; CaCl₂ 0,25; MgCl₂ 1,0; Tris HCl 0,15; butirato de sódio 1,0. pH=7,4). Após a lavagem com o tampão adicionou-se 100µL de MTT a 1,2mM (Sigma Aldrich, Germany), sendo este dissolvido em tampão Hank's para determinar o efeito provocado na viabilidade celular. De seguida, as células foram incubadas durante 3 horas a 37°C, com 5% de CO₂ em atmosfera humidificada de 95%. Após este período de tempo, solubilizou-se os cristais de formazan resultantes da reação adicionando-se em todos os poços 100µL de isopropanol contendo 0,04M de HCl, homogeneizando com o auxílio de uma micropipeta (processo realizado em gelo). Posteriormente as células foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente protegidas da luz. Finalmente, os resultados foram obtidos espectrofotometricamente num leitor de microplacas (Synergy H1 Multi-Mode Microplate Reader, BioTeK[®] Instruments, U.S.A.) a um comprimento de onda de 570nm.

Os resultados da indução de *stress* oxidativo e a avaliação da capacidade protetiva de extratos de bactérias associadas em condições de *stress* oxidativo nos modelos celulares

em estudo encontram-se representados em percentagem do controlo, sendo calculados através da seguinte equação:

$$(\% \text{ controlo}) = (Abs_{amostra}/Abs_{controlo}) \times 100$$

Onde a $Abs_{controlo}$ corresponde à absorvância do controlo e $Abs_{amostra}$ corresponde à absorvância da amostra testada.

3.7. Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados mediante análise de variância (ANOVA) com 1 fator, seguido (sempre que adequado) pelo teste de Dunnett (Zar, 2010). Os dados experimentais foram comparados com os respetivos controlos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de 5% ($p < 0,05$), ao nível de 1% ($p < 0,01$) ou ao nível de 0,1% ($p < 0,001$). Todas as análises foram realizadas no software GraphPad InStat.

A concentração de IC_{50} foi calculada a partir da análise de regressão não-linear utilizando o software GraphPad Prism5 com a seguinte equação:

$$Y = [100 / 1 + 10^{x - \text{Log } IC_{50}}]$$

A análise de componentes principais (ACP) foi realizada para as bactérias de cada macroalga com todos os dados dos métodos antioxidantes (ORAC, QTP e DPPH), utilizando o software CANOCO for Windows 4.5. A ACP permitiu a deteção de semelhanças e diferenças entre as diferentes amostras, bem como identificar as principais associações entre variáveis que são responsáveis pela variabilidade total dos dados estudados.

Sempre que adequado os resultados são apresentados sob a forma média \pm erro padrão da média (SEM).

Resultados

4.1. Identificação de bactérias associadas às macroalgas em estudo

As bactérias associadas isoladas das macroalgas *Asparagopsis armata*, *Bifurcaria bifurcata* e *Sphaerococcus coronopifolius* foram identificadas através da sequenciação do 16S RNA, a partir do qual foi possível obter os gêneros das bactérias isoladas, estando os resultados representados nas tabelas I, II e III.

A partir da macroalga *Asparagopsis armata* foi possível isolar 30 bactérias associadas através das suas diferentes características fenotípicas e que posteriormente foram identificadas por sequenciação do gene do 16S RNA.

Tabela I: Identificação das bactérias associadas isoladas da macroalga *Asparagopsis armata* relativamente ao seu género.

Bactérias associadas	Género	Ocorrência (%)
Asp2	<i>Bacillus</i> sp.	3,33
Asp7; Asp26; Asp94; Asp101	<i>Shewanella</i> sp.	13,33
Asp11; Asp24; Asp25; Asp28; Asp33; Asp34; Asp35; Asp39; Asp49; Asp54; Asp100; Asp127	<i>Vibrio</i> sp.	40,00
Asp23; Asp84	<i>Photobacterium</i> sp.	6,67
Asp65; Asp77; Asp89; Asp93; Asp114; Asp118; Asp124	<i>Staphylococcus</i> sp.	20,00
Asp105	<i>Cobetia</i> sp.	3,33
Asp146	<i>Erwinia</i> sp.	3,33
Asp40; Asp129	< 90% blast match	6,67

De acordo com os dados obtidos (Tabela I), verificou-se que o género *Vibrio* sp. foi o que apresentou uma maior abundância entre as bactérias isoladas a partir da alga *Asparagopsis armata*, representando 40,00% de todas as bactérias. Os géneros *Staphylococcus* sp., *Shewanella* sp. e *Photobacterium* sp. representaram 20,00%, 13,33% e 6,67% de ocorrência, respetivamente. Por sua vez os géneros menos representativos foram *Bacillus* sp., *Cobetia* sp. e *Erwinia* sp. ocorrendo apenas 3,33%.

Associadas à macroalga *Bifurcaria bifurcata* foi possível isolar 38 bactérias através das suas diferentes características fenotípicas, sendo estas posteriormente identificadas por sequenciação do gene 16S RNA.

Tabela II: Identificação das bactérias associadas isoladas da macroalga *Bifurcaria bifurcata* relativamente ao seu género.

Bactérias associadas	Género	Ocorrência (%)
BB1	<i>Citricoccus</i> sp.	2,56
BB2; BB3; BB10; BB11; BB13; BB14; BB15; BB18; BB20; BB21; BB22; BB23; BB29; BB31; BB35; BB39; BB40; BB50; BB51	<i>Vibrio</i> sp.	48,72
BB4	<i>Cellulophaga</i> sp.	2,56
BB6; BB12; BB28; BB30; BB34	<i>Alteromonas</i> sp.	12,82
BB16; BB17; BB25; BB26	<i>Shewanella</i> sp.	10,26
BB27	<i>Ruegeria</i> sp.	2,56
BB32	<i>Staphylococcus</i> sp.	2,56
BB8; BB9; BB24; BB36; BB38; BB44	< 90% blast match	15,38

Das bactérias associadas isoladas da macroalga *Bifurcaria bifurcata* verificou-se que o género em maior abundância foi o *Vibrio* sp., representando 48,72% de ocorrência (Tabela II). *Alteromonas* sp. e *Shewanella* sp. foram os géneros seguintes com maior representação, com 12,82% e 10,26% de ocorrência, respetivamente. Por sua vez, os géneros *Citricoccus* sp., *Cellulophaga* sp., *Ruegeria* sp. e *Staphylococcus* sp. apresentaram apenas uma ocorrência de 2,56%.

Da macroalga *Sphaerococcus coronopifolius* foi possível isolar 22 bactérias associadas pelas suas diferentes características fenotípicas, sendo estas posteriormente identificadas por sequenciação do gene 16S RNA.

Tabela III: Identificação das bactérias associadas isoladas da macroalga *Sphaerococcus coronopifolius* relativamente ao seu género.

Bactérias associadas	Género	Ocorrência (%)
Sp1; Sp10; Sp16; Sp17	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	19,05
Sp2; Sp36	<i>Bacillus</i> sp.	9,52
Sp12; Sp21; Sp22; Sp29	<i>Shewanella</i> sp.	19,05
Sp7; Sp11; Sp13; Sp14; Sp25; Sp27	<i>Vibrio</i> sp.	28,57
Sp23; Sp28	<i>Holomonas</i> sp.	9,52
Sp4; Sp9; Sp30; Sp32	< 90% blast match	19,05

Através dos dados obtidos (Tabela III), observa-se que as bactérias associadas isoladas a partir da macroalga *Sphaerococcus coronopifolius* que representaram uma maior abundância pertenciam ao género *Vibrio* sp., *Shewanella* sp. e *Pseudoalteromonas* sp., com uma percentagem de ocorrência de 28,57%, 19,05% e 19,05%, respetivamente.

Por sua vez, os géneros *Bacillus* sp. e *Holomonas* sp. foram os menos representativos, ocorrendo ambos apenas em 9,52%.

4.2. Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de bactérias associadas

A capacidade antioxidante dos extratos de bactérias associadas isoladas das macroalgas *Asparagopsis armata*, *Bifurcaria bifurcata* e *Sphaerococcus coronopifolius* foi avaliada através do método fluorimétrico ORAC (oxygen radical absorbance capacity), do método de quantificação total de polifenóis (QTP) e do método de redução do radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). De modo a compreender melhor o potencial antioxidante dos extratos das bactérias associadas isoladas neste estudo, utilizou-se o antioxidante sintético BHT (2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol) como padrão.

4.2.1. ORAC (oxygen radical absorbance capacity)

A avaliação da capacidade antioxidante dos extratos de bactérias associadas a macroalgas em estudo foi realizada pelo método fluorimétrico ORAC, obtendo-se os resultados em micromole de equivalentes de trolox por grama de extrato ($\mu\text{mol eq. Trolox/g extrato}$).

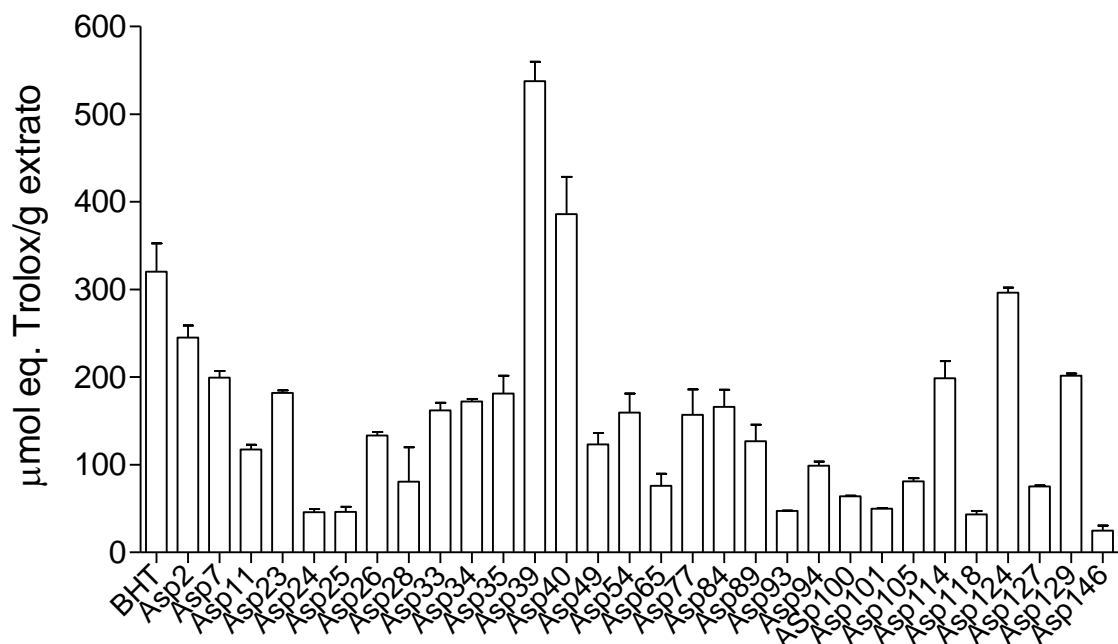


Figura 1: Capacidade antioxidante dos extratos de bactérias associadas da macroalga *Asparagopsis armata*. Resultados obtidos através do método fluorimétrico ORAC. Os valores correspondem à média \pm SEM (n=3).

Através dos resultados obtidos pelo método fluorimétrico ORAC (Figura 1), os extratos das bactérias associadas de *Asparagopsis armata*, Asp39 e Asp40 apresentaram a capacidade antioxidante mais elevada ($537,57 \pm 22,42$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g extrato}$ e $386,00 \pm 42,55$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g extrato}$, respetivamente), comparativamente com os restantes extratos de bactérias testados. Por sua vez, o extrato da bactéria associada Asp146 foi o que demonstrou menor capacidade antioxidante ($24,71 \pm 6,03$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g extrato}$).

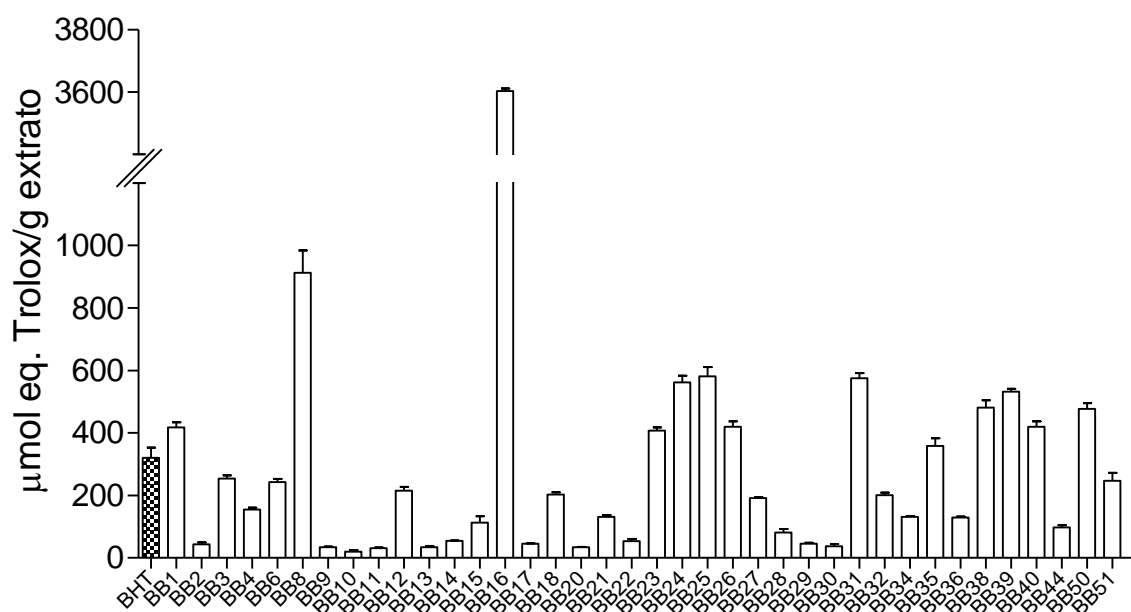


Figura 2: Capacidade antioxidante dos extratos de bactérias associadas da macroalga *Bifurcaria bifurcata*. Resultados obtidos através do método fluorimétrico ORAC. Os valores correspondem à média \pm SEM (n=3).

No que concerne aos extratos das bactérias associadas da macroalga *Bifurcaria bifurcata* (Figura 2), o potencial antioxidante foi bastante marcante no extrato correspondente à bactéria BB16, apresentando $3603,66 \pm 80,14$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g extrato}$, seguido do extrato da bactéria BB8 que obteve um valor de $912,62 \pm 70,88$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g extrato}$. Por outro lado, o extrato de bactéria associada BB10 foi o que apresentou uma menor capacidade antioxidante ($20,40 \pm 4,99$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g extrato}$).

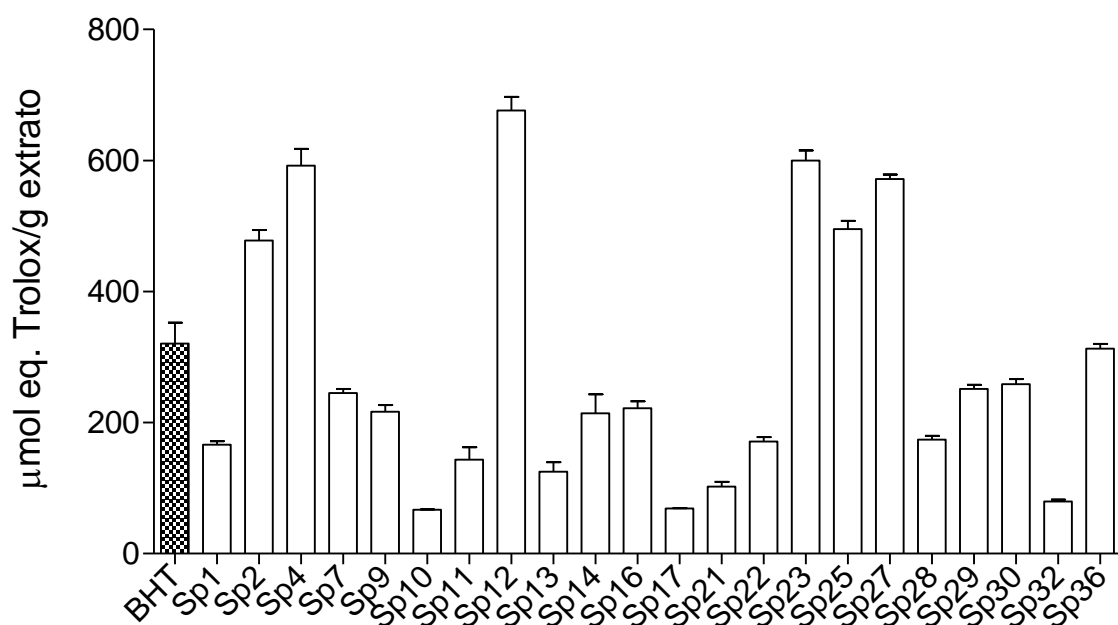


Figura 3: Capacidade antioxidante dos extratos de bactérias associadas da macroalga *Sphaerococcus coronopifolius*. Resultados obtidos através do método fluorimétrico ORAC. Os valores correspondem à média \pm SEM (n=3).

De acordo com os resultados (Figura 3), os extratos de bactérias associadas de *Sphaerococcus coronopifolius* que apresentaram uma maior capacidade antioxidante foram os extratos Sp12 ($676,53 \pm 20,45$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g extrato}$), seguida das bactérias Sp23 e Sp4 ($599,90 \pm 15,27$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g extrato}$ e $592,30 \pm 25,69$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g extrato}$, respetivamente). Os extratos de bactérias associadas que demonstraram menor capacidade antioxidante foram Sp10 e Sp17 ($67,16 \pm 0,57$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g extrato}$ e $68,98 \pm 0,37$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g extrato}$, respetivamente).

Em comparação com o antioxidante sintético BHT, que obteve um valor de $320,00 \pm 32,31$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g BHT}$, os extratos de bactérias Asp39 e Asp40, associados à macroalga *Asparagopsis armata*, apresentaram uma capacidade antioxidante superior ($537,57 \pm 22,42$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g extrato}$ e $386,00 \pm 42,55$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g extrato}$, respetivamente; ver Figura 1). Também foi possível verificar que 13 dos 38 extratos de bactérias associadas da macroalga *Bifurcaria bifurcata* apresentaram uma capacidade antioxidante superior ao antioxidante sintético BHT, sendo que os mais potentes foram BB24 ($562,09 \pm 21,17$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g extrato}$), BB25 ($580,67 \pm 30,50$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g extrato}$), BB31 ($575,28 \pm 15,61$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g extrato}$) e os extratos das bactérias BB16 e BB8 (Figura 2). Relativamente aos extratos de bactérias associadas da macroalga

Sphaerococcus coronopifolius, 6 dos 22 extratos de bactérias associadas testados apresentaram uma capacidade antioxidante superior ao antioxidante sintético BHT, sendo que os extratos de bactérias mais potentes foram Sp4 ($592,30 \pm 25,69$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g extrato}$), Sp12 ($676,53 \pm 20,45$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g extrato}$) e Sp23 ($599,90 \pm 15,27$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g extrato}$; ver Figura 3).

4.2.2. Quantificação total de polifenóis (QTP) e capacidade de redução do radical DPPH

A avaliação da capacidade antioxidante dos extratos de bactérias associadas às macroalgas em estudo foi realizada também através da quantificação total de polifenóis pelo método de Folin-Ciocalteu. Os resultados obtidos para as bactérias associadas isoladas a partir das macroalgas *Asparagopsis armata*, *Bifurcaria bifurcata* e *Sphaerococcus coronopifolius* encontram-se apresentados nas Tabelas IV, V e VI, respectivamente e encontram-se expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato ($\text{mg eq. ácido gálico/g extrato}$) e pelo método de redução do radical DPPH, sendo os resultados expressos pelo valor de IC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Tabela IV: Capacidade antioxidante dos extratos de bactérias associadas da macroalga *Asparagopsis armata*. Resultados obtidos pelo método de QTP e de DPPH. Os valores correspondem à média \pm SEM (n=3).

Bactérias Associadas	QTP (mg eq. ácido gálico/g extrato)	DPPH IC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Asp2	$3,607 \pm 0,06$	>1000
Asp7	$1,679 \pm 0,01$	>1000
Asp11	$2,352 \pm 0,05$	>1000
Asp23	$3,063 \pm 0,16$	>1000
Asp24	$2,348 \pm 0,04$	>1000
Asp25	$5,135 \pm 0,11$	>1000
Asp26	$2,050 \pm 0,10$	>1000
Asp28	$3,085 \pm 0,22$	>1000
Asp33	$4,047 \pm 0,11$	>1000
Asp34	$2,023 \pm 0,07$	>1000
Asp35	$1,966 \pm 0,09$	>1000

Asp39	1,887 ± 0,07	>1000
Asp40	2,144 ± 0,05	>1000
Asp49	2,751 ± 0,01	>1000
Asp54	3,044 ± 0,15	>1000
Asp65	2,730 ± 0,30	>1000
Asp77	1,286 ± 0,03	>1000
Asp84	3,368 ± 0,13	>1000
Asp89	3,326 ± 0,30	>1000
Asp93	2,290 ± 0,05	>1000
Asp94	1,414 ± 0,02	>1000
Asp100	2,217 ± 0,15	>1000
Asp101	2,426 ± 0,28	>1000
Asp105	1,929 ± 0,15	>1000
Asp114	2,777 ± 0,02	>1000
Asp118	3,237 ± 0,13	>1000
Asp124	2,698 ± 0,04	>1000
Asp127	1,186 ± 0,10	>1000
Asp129	2,290 ± 0,06	585,9 (364-943)
Asp146	2,609 ± 0,08	>1000
BHT	-	40,55 (27,39-60,05)

Através dos dados obtidos (Tabela IV), verificou-se que os extratos de bactérias associadas a *Asparagopsis armata* com maior quantidade total de polifenóis foram Asp25 (5,135±0,11 mg eq. ácido gálico/g extrato) e Asp33 (4,047±0,11 mg eq. ácido gálico/g extrato). Por sua vez, o extrato de bactéria associada com menor teor em polifenóis foi Asp127 (1,186 ± 0,10 mg eq. ácido gálico/g extrato).

Relativamente aos resultados obtidos pelo método de DPPH, o extrato de bactéria associada de *Asparagopsis armata* que apresentou uma maior capacidade de redução do radical DPPH foi Asp129 apresentando um valor de IC₅₀ de 585,9 (364-943) µg.mL⁻¹. Contudo, o antioxidante sintético BHT apresentou um potencial bastante superior ao do extrato de bactéria, ou seja, com um valor de IC₅₀ de 40,55 (27,39-60,05) µg.mL⁻¹ (Tabela IV).

Tabela V: Capacidade antioxidante dos extratos de bactérias associadas da macroalga *Bifurcaria bifurcata*. Resultados obtidos pelo método de QTP e de DPPH. Os valores correspondem à média \pm SEM (n=3).

Bactérias Associadas	QTP (mg eq. ácido gálico/g extrato)	DPPH IC ₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
BB1	3,040 \pm 0,32	>1000
BB2	7,120 \pm 0,05	>1000
BB3	2,080 \pm 0,19	>1000
BB4	1,352 \pm 0,09	>1000
BB6	2,923 \pm 0,05	>1000
BB8	14,222 \pm 4,25	164,40 (109,40-247,10)
BB9	4,870 \pm 0,02	>1000
BB10	6,090 \pm 0,07	>1000
BB11	6,530 \pm 0,05	183,80 (118,50-285,20)
BB12	2,540 \pm 0,30	>1000
BB13	9,750 \pm 0,04	>1000
BB14	5,990 \pm 0,06	>1000
BB15	5,390 \pm 0,07	>1000
BB16	53,854 \pm 3,02	20,21 (14,41-28,34)
BB17	6,470 \pm 0,09	>1000
BB18	1,633 \pm 0,19	>1000
BB20	7,140 \pm 0,01	>1000
BB21	1,668 \pm 0,06	>1000
BB22	0,878 \pm 0,06	>1000
BB23	2,035 \pm 0,15	>1000
BB24	3,220 \pm 0,25	>1000
BB25	9,380 \pm 0,06	>1000
BB26	5,656 \pm 0,13	521,00 (366,90-739,70)
BB27	2,640 \pm 0,01	>1000
BB28	1,848 \pm 0,21	>1000
BB29	1,117 \pm 0,13	>1000
BB30	3,502 \pm 0,12	>1000
BB31	8,556 \pm 1,89	>1000
BB32	1,963 \pm 0,21	>1000

BB34	2,220 ± 0,16	>1000
BB35	2,770 ± 0,04	>1000
BB36	10,376 ± 1,58	587,70 (442,00-781,40)
BB38	5,340 ± 0,07	>1000
BB39	7,150 ± 0,03	23,62 (19,45-28,68)
BB40	5,900 ± 0,02	>1000
BB44	3,772 ± 0,44	>1000
BB50	4,106 ± 0,02	>1000
BB51	1,586 ± 0,89	>1000
BHT	-	40,55 (27,39-60,05)

O extrato da bactéria associada BB16 foi o que apresentou um maior potencial antioxidante em teor total de polifenóis com $53,854 \pm 3,02$ mg eq. ácido gál./g extrato, seguido dos extratos das bactérias associadas BB8 ($14,222 \pm 4,25$) e BB36 ($10,376 \pm 1,58$) (Tabela V). Por sua vez, o extrato de bactéria associada BB22 foi o que apresentou a menor quantidade total de polifenóis ($0,878 \pm 0,06$ mg eq. ácido gál./g extrato).

De acordo com os resultados (Tabela V), os extratos de bactérias associadas de *Bifurcaria bifurcata* com maior potencial de redução do radical DPPH foram BB16 e BB39 que apresentam um valor de IC_{50} de $20,21$ ($14,41-28,34$) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $23,62$ ($19,45-28,68$) $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, sendo inferiores ao valor de IC_{50} obtido pelo antioxidante sintético BHT ($40,55$ ($27,39-60,05$) $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Os extratos das bactérias BB8, BB11, BB26 e BB36 também demonstraram uma interessante capacidade antioxidante de redução do DPPH com um IC_{50} de $164,40$ ($109,40-247,10$) $\mu\text{g.mL}^{-1}$, $183,80$ ($118,50-285,20$) $\mu\text{g.mL}^{-1}$, $521,00$ ($366,90-739,70$) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $587,70$ ($442,00-781,40$) $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

Tabela VI: Capacidade antioxidante dos extratos de bactérias associadas da macroalga *Sphaerococcus coronopifolius*. Resultados obtidos pelo método de QTP e de DPPH. Os valores correspondem à média \pm SEM (n=3).

Bactérias Associadas	QTP (mg eq. ácido gálico/g extrato)	DPPH IC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Sp1	$1,349 \pm 0,01$	>1000
Sp2	$6,664 \pm 0,03$	>1000
Sp4	$54,497 \pm 0,53$	>1000

Sp7	3,095 ± 0,04	>1000
Sp9	4,006 ± 0,18	>1000
Sp10	1,071 ± 0,20	>1000
Sp11	1,194 ± 0,08	>1000
Sp12	3,508 ± 0,37	>1000
Sp13	2,477 ± 0,03	>1000
Sp14	5,173 ± 0,30	>1000
Sp16	4,021 ± 0,20	>1000
Sp17	2,273 ± 0,03	>1000
Sp21	2,970 ± 0,02	>1000
Sp22	3,407 ± 0,10	>1000
Sp23	3,501 ± 0,23	>1000
Sp25	5,325 ± 0,12	>1000
Sp27	0,314 ± 0,13	>1000
Sp28	0,237 ± 0,15	>1000
Sp29	0,511 ± 0,10	>1000
Sp30	0,912 ± 0,04	>1000
Sp32	0,000 ± 0,00	>1000
Sp36	0,895 ± 0,07	>1000
BHT	-	40,55 (27,39-60,05)

No que respeita ao extrato de bactéria associada Sp4, esta apresentou o maior teor total de polifenóis de 54,497±0,53 mg eq. ácido gál./g extrato (Tabela VI). Os extratos de bactérias associadas seguintes com maior quantidade total de polifenóis foram Sp2 e Sp25 apresentando 6,664±0,03 mg eq. ácido gál./g extrato e 5,325±0,12 mg eq. ácido gál./g extrato, respetivamente. O extrato de bactéria associada Sp28 foi o que apresentou menor potencial antioxidante pelo método de QTP (0,237 ± 0,15mg eq. ácido gál./g extrato), sendo que Sp32 não evidenciou nenhuma quantidade em polifenóis.

De acordo com os resultados obtidos pelo método de DPPH, nenhum dos extratos de bactérias associadas de *Sphaerococcus coronopifolius* apresentou um valor de IC₅₀ de redução do radical DPPH inferior a 1000 µg.mL⁻¹ (Tabela VI).

4.3. Análise de componentes principais (ACP)

Para verificar a relação existente entre os três métodos, ORAC, DPPH e QTP, utilizados na avaliação da capacidade antioxidante dos extratos de bactérias associadas às macroalgas *Asparagopsis armata*, *Bifurcaria bifurcata* e *Sphaerococcus coronopifolius*, procedeu-se à realização de uma análise de componentes principais (ACP) para as bactérias associadas de cada macroalga (Figura 4).

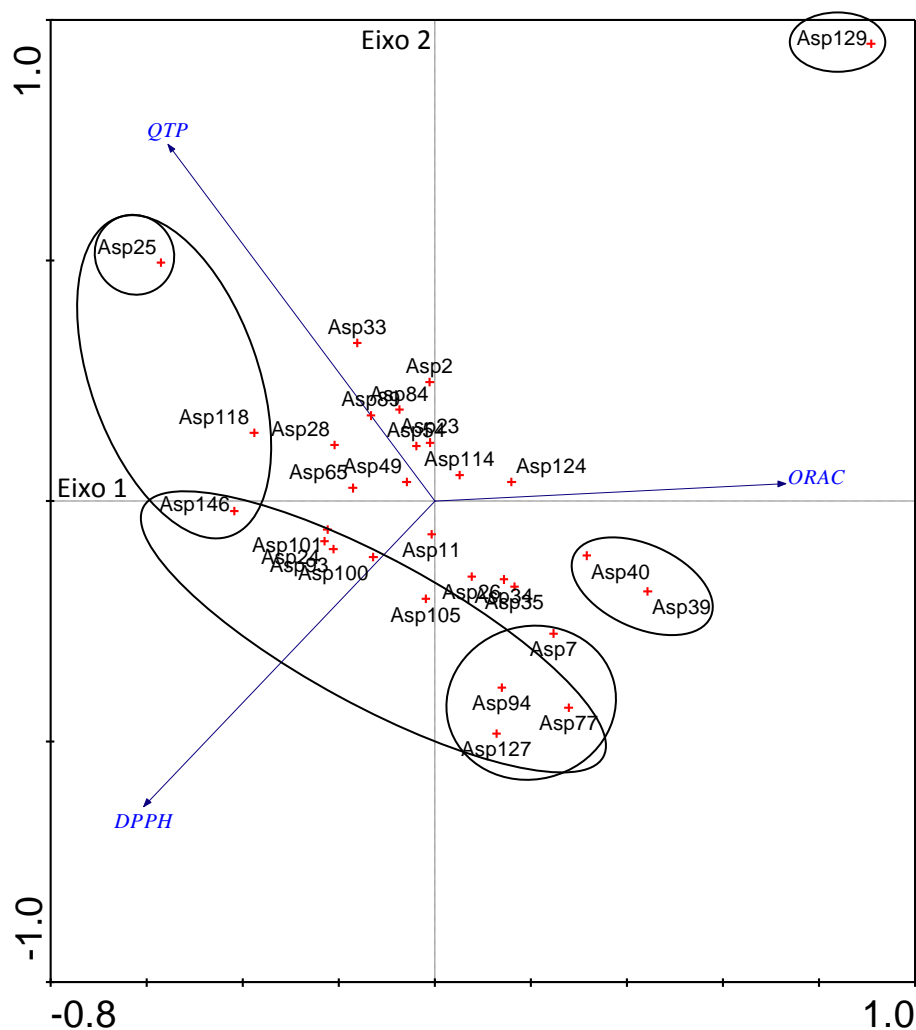


Figura 4: Diagrama da Análise de Componentes Principais (ACP) das bactérias associadas da macroalga *Asparagopsis armata* referentes aos vários métodos de avaliação da capacidade antioxidante, ORAC, QTP e DPPH.

De acordo com a análise do diagrama (Figura 4) verifica-se que os resultados obtidos pelos três métodos de avaliação da capacidade antioxidante (ORAC, QTP e DPPH)

apresentam entre si uma correlação inversa¹. Por conseguinte, tal significa que o padrão de comportamento entre os métodos é oposto.

O eixo 1 explica 40,4% da variabilidade total dos dados e o eixo 2 explica 31,8% da variabilidade total dos dados.

As bactérias associadas de *Asparagopsis armata* Asp39, Asp40 e Asp129 através do método ORAC apresentaram um grande potencial antioxidante em oposição às bactérias Asp25, Asp118 e Asp146.

A bactéria associada Asp25 apresentou uma atividade antioxidante elevada associada à QTP em oposição às bactérias Asp7, Asp77, Asp94 e Asp127.

A bactéria associada de *Asparagopsis armata* Asp129 demonstrou uma atividade antioxidante elevada pelo método DPPH em oposição às bactérias Asp146, Asp101, Asp24, Asp93, Asp100, Asp105, Asp94, Asp127 e Asp77.

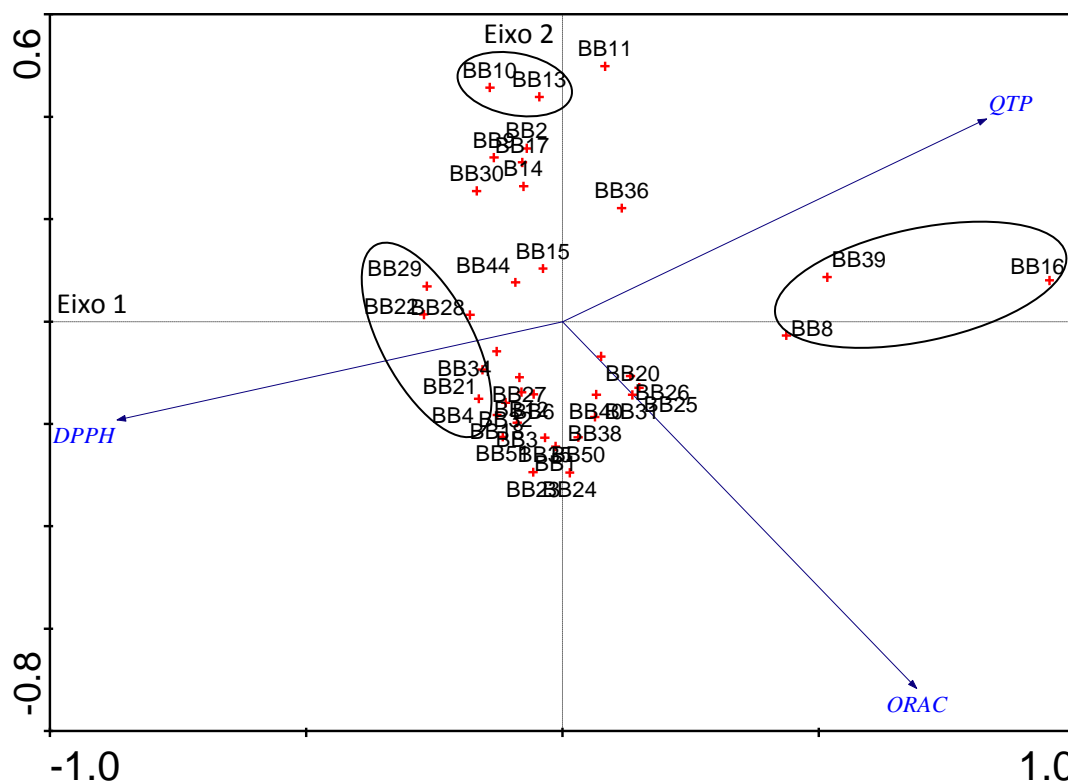


Figura 5: Diagrama da Análise de Componentes Principais (ACP) das bactérias associadas da macroalga *Bifurcaria bifurcata* associadas aos vários métodos de avaliação da capacidade antioxidante, ORAC, QTP e DPPH.

¹ Por definição, numa análise de componentes principais assume-se que a relação é inversa sempre que o ângulo formado pelos vectores correspondentes é superior a 90°C.

De acordo com a análise do diagrama das bactérias associadas da macroalga *Bifurcaria bifurcata* para os métodos de avaliação da capacidade antioxidante, ORAC, QTP e DPPH (Figura 5), verifica-se que os valores obtidos pelo método de DPPH têm uma correlação inversa com os resultados obtidos nas outras duas metodologias analisadas (ORAC e QTP). Os valores das bactérias obtidos pelo método de ORAC apresentaram uma correlação praticamente nula com os valores obtidos no método de QTP².

O eixo 1 explica 63,9% da variabilidade total dos dados e o eixo 2 explica 23,6% da variabilidade total dos dados.

As bactérias associadas de *Bifurcaria bifurcata* BB16, BB8 e BB39 apresentam um elevado potencial antioxidante através dos métodos de QTP, DPPH e ORAC em oposição às bactérias BB22, BB29, BB21 e BB4 para o método de QTP e DPPH, BB10 e BB13 para o método de ORAC.

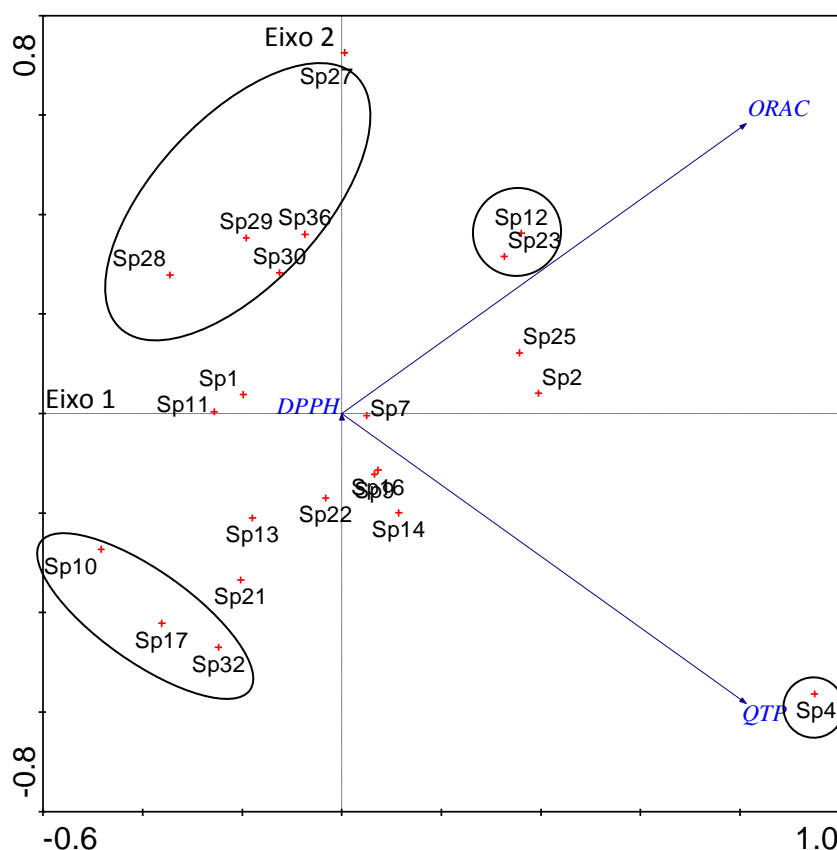


Figura 6: Diagrama da Análise de Componentes Principais (ACP) das bactérias associadas da macroalga *Sphaerococcus coronopifolius* associadas aos vários métodos de avaliação da capacidade antioxidante, ORAC, QTP e DPPH.

² Por definição, numa análise de componentes principais assume-se que a relação é nula sempre que o ângulo formado pelos vectores correspondentes é de 90° (ou aproximadamente).

De acordo com o diagrama referente às bactérias associadas da macroalga *Sphaerococcus coronopifolius* para os vários métodos de avaliação da capacidade antioxidante, ORAC, QTP e DPPH (Figura 6), observa-se que os resultados obtidos através do método de QTP têm correlação positiva com o método de ORAC³. Por sua vez os resultados obtidos pelo método de redução do radical DPPH não são relevantes, pois para todos os extratos o valor de IC₅₀ foi superior a 1000 µg.mL⁻¹.

O eixo 1 explica 44,0% da variabilidade total dos dados e o eixo 2 explica 22,7% da variabilidade total dos dados.

A bactéria associada de *Sphaerococcus coronopifolius* Sp4 apresenta uma atividade antioxidante elevada através dos resultados obtidos pelo método de QTP em oposição às bactérias Sp29, Sp28, Sp30, Sp36 e Sp27.

As bactérias associadas Sp12 e Sp23 apresentam um elevado potencial antioxidante através do método de ORAC em oposição às bactérias Sp10, Sp17 e Sp32.

Assim, os resultados obtidos através da ACP indica que os resultados obtidos pelo método de ORAC e pelo método de QTP apresentam uma correlação positiva para as bactérias associadas de *Bifurcaria bifurcata* e *Sphaerococcus coronopifolius*. Por sua vez, os resultados obtidos pelo método de DPPH apresentaram uma correlação inversa com os métodos de ORAC e de QTP para as bactérias associadas das macroalgas de *Asparagopsis armata* e *Bifurcaria bifurcata*. Por conseguinte, verifica-se que existe uma correlação entre os três métodos de avaliação antioxidante, pelo que quando existe um baixo valor de IC₅₀, existe elevados valores nos resultados de ORAC e QTP e vice-versa.

4.4. Indução da condição de *stress* oxidativo nos modelos celulares

A indução da condição de *stress* oxidativo nas linhas celulares SH-SY5Y, MCF-7 e HepG-2 foi efetuada após as células atingirem a confluência total. De seguida, as células foram incubadas com diferentes concentrações de H₂O₂ (0,1 – 1mM (SH-SY5Y), 0,05 – 1mM (MCF-7) e 0,1 – 3mM (HepG-2)). Os resultados obtidos demonstram o efeito das diferentes concentrações de H₂O₂ testadas na viabilidade celular das células SH-SY5Y, MCF-7 e HepG-2 após 24 horas de incubação (Figura 7).

³ Por definição, numa análise de componentes principais assume-se que a relação é positiva sempre que o ângulo formado pelos vectores correspondentes é inferior a 90°.

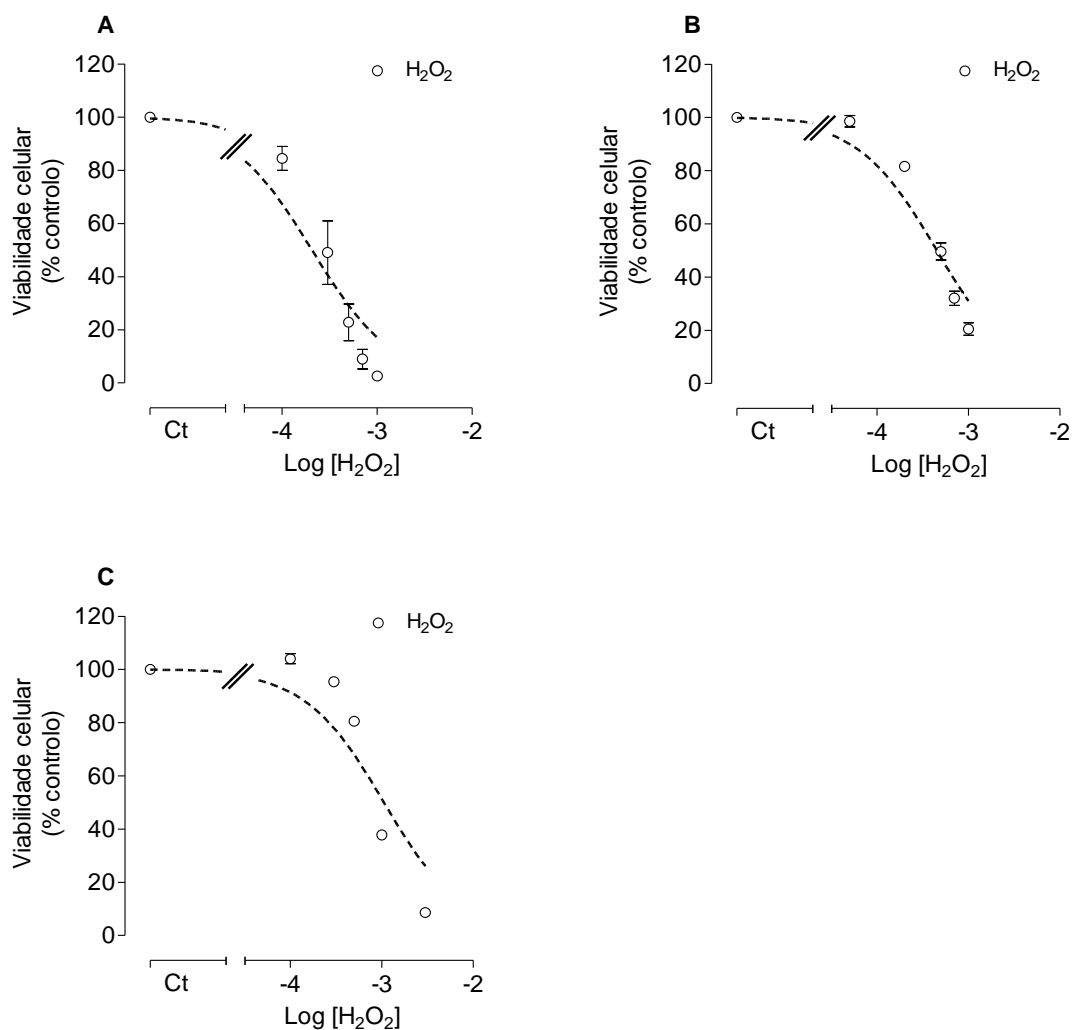


Figura 7: Efeito de diferentes concentrações de H_2O_2 na viabilidade celular das linhas celulares SH-SY5Y (0,1 – 1mM) (A), MCF-7 (0,05 – 1mM) (B) e HepG-2 (0,1 – 3mM) (C) após 24 horas de incubação. Resultados obtidos através do método de MTT. Os valores correspondem à média \pm SEM (n=8).

Através da análise da Figura 7 é possível verificar que as diferentes concentrações de H_2O_2 testadas provocaram um efeito dependente da concentração sobre a viabilidade celular das linhas celulares SH-SY5Y (A), MCF-7 (B) e HepG-2 (C) após 24 horas de tratamento, sendo que o efeito mais potente sobre a viabilidade celular foi observado na linha celular SH-SY5Y, apresentando um valor de IC_{50} de 206,0 μ M (150,4 – 282,2), seguida da linha celular MCF-7 com um valor de IC_{50} de 450,2 μ M (388,0 – 522,5). Por sua vez, a linha celular HepG-2 apresentou um valor de IC_{50} de 1058,0 μ M (847,3 – 1321,0) (Tabela 7), sendo este valor superior aos obtidos nas anteriores linhas celulares.

Tabela 7: Valores de IC₅₀ obtidos para o efeito de H₂O₂ sobre a viabilidade celular das células SH-SY5Y (0,1 – 1mM), MCF-7 (0,05 – 1mM) e HepG-2 (0,1 – 3mM) após 24 horas de tratamento.

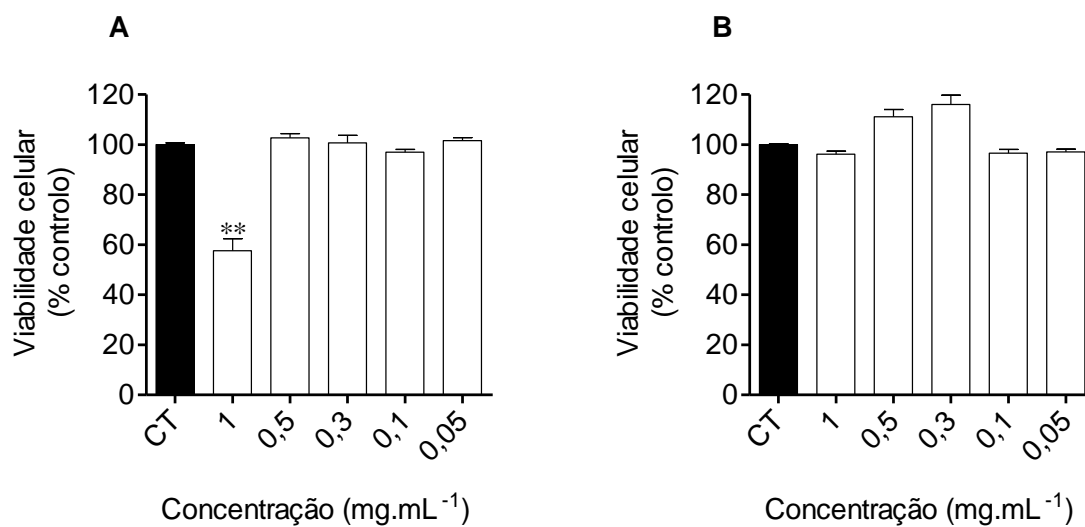
Linha Celular	IC ₅₀ H ₂ O ₂ (μM)
SH-SY5Y	206,0 (150,4 – 282,2)
MCF-7	450,2 (388,0 – 522,5)
HepG-2	1058,0 (847,3 – 1321,0)

4.5. Avaliação da capacidade citotóxica dos extratos de bactérias associadas de macroalgas nos modelos celulares

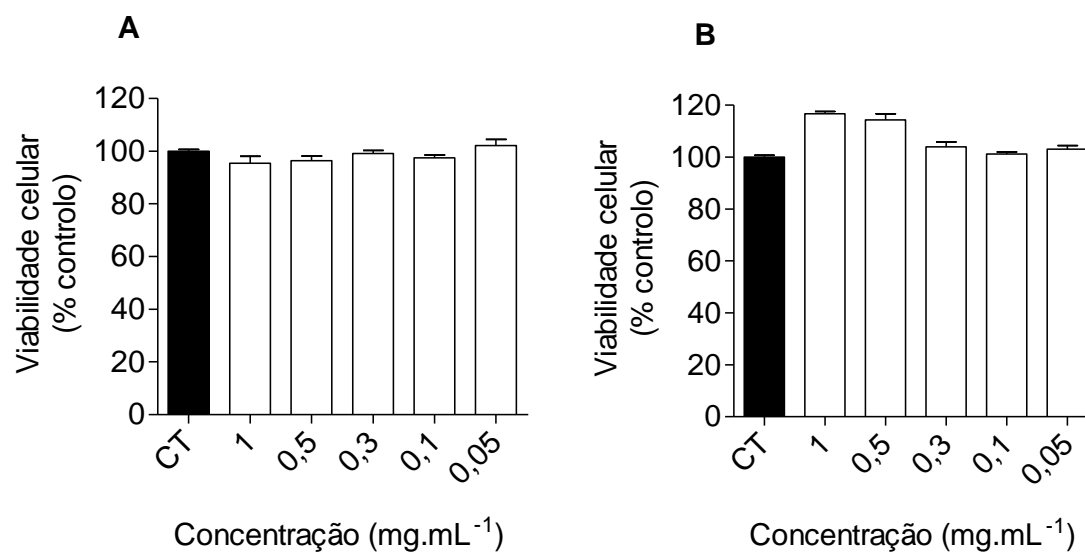
Em ensaios preliminares, os extratos de bactérias associadas das macroalgas em estudo que apresentaram uma capacidade antioxidante (métodos de ORAC, QTP e DPPH) superior ao potencial do antioxidante sintético BHT, foram testados nas diferentes linhas celulares (1mg/mL; 24 horas), SH-SY5Y, MCF-7 e HepG-2, de modo a avaliar o potencial protetor dos extratos de bactérias associadas na viabilidade celular das células em condições de *stress* oxidativo. Deste modo, a bactéria que demonstrou maior potencial foi a BB16 (bactéria associada da macroalga *Bifurcaria bifurcata*) sendo selecionada para a realização da avaliação do potencial antioxidante em condições de *stress* oxidativo induzido por H₂O₂.

A avaliação da citotoxicidade do antioxidante sintético BHT e do extrato da bactéria associada BB16 sobre a viabilidade celular dos modelos em estudo foi realizada previamente. Para esta avaliação procedeu-se a incubação das linhas celulares com o BHT ou o extrato da bactéria BB16 a diferentes concentrações teste: 1mg.mL⁻¹, 0,5mg.mL⁻¹, 0,3mg.mL⁻¹, 0,1mg.mL⁻¹ e 0,05mg.mL⁻¹. Os resultados obtidos demonstram o efeito das duas soluções testadas na viabilidade celular das células SH-SY5Y, MCF-7 e HepG-2 após 24 horas de incubação (Figura 8).

SH-SY5H



MCF-7



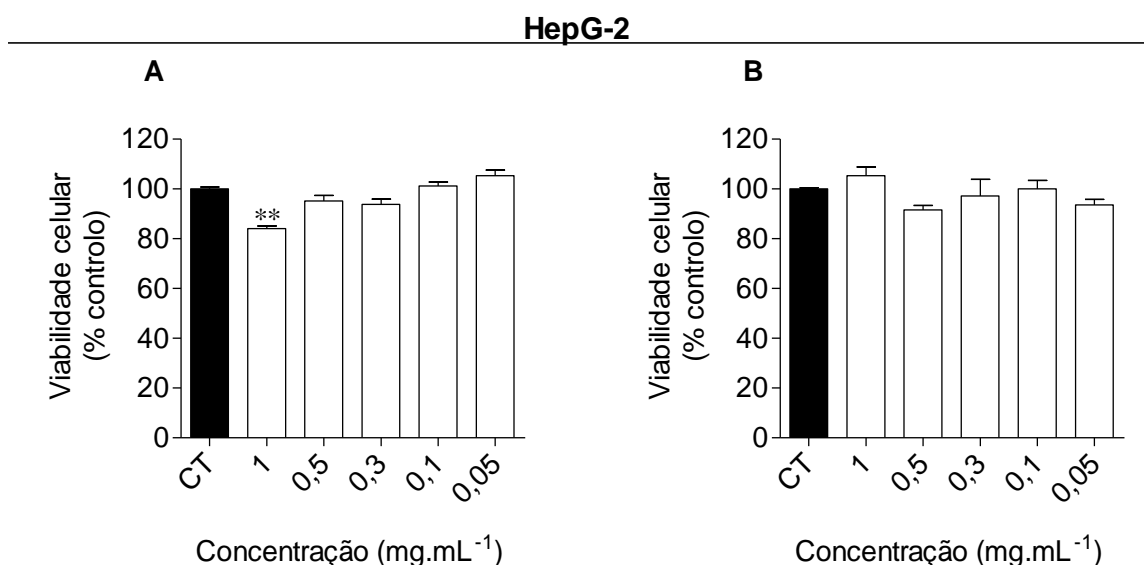


Figura 8: Efeito de diferentes concentrações do antioxidante sintético BHT (A) e do extrato de bactéria BB16 (B) na viabilidade celular das células SH-SY5Y, MCF-7 e HepG-2 após 24 horas de incubação. Os valores correspondem à média \pm SEM (n=8). ** $p < 0,01$, representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo (ANOVA, teste de Dunnett).

Pelos resultados alcançados (Figura 8), verifica-se que na linha celular SH-SY5Y o antioxidante sintético BHT, à concentração máxima de 1mg.mL^{-1} , induziu toxicidade nas células. Contudo, esse efeito não se observou na concentração seguinte de $0,5\text{mg.mL}^{-1}$. Por sua vez, o extrato de bactéria BB16 não teve qualquer efeito na viabilidade celular das células SH-SY5Y nas concentrações testadas.

Relativamente às células MCF-7, tanto o antioxidante sintético BHT como o extrato de bactéria BB16, não apresentaram qualquer efeito na viabilidade celular das células nas diferentes concentrações testadas.

Na linha celular HepG-2, o antioxidante sintético BHT, à concentração de 1mg.mL^{-1} , induziu toxicidade nas células HepG-2, verificando-se uma redução da viabilidade celular. Contudo à concentração seguinte de $0,5\text{mg.mL}^{-1}$ tal efeito não se verificou. Por sua vez, o extrato de bactéria BB16 não demonstrou qualquer efeito na viabilidade celular nas células HepG-2 nas concentrações em estudo.

De todos efeitos citotóxicos verificados sobre as linhas celulares, apenas a concentração de 1mg.mL^{-1} de BHT na linha celular SH-SY5Y apresentou um efeito bastante acentuado que de algum modo poderia condicionar os resultados obtidos durante o ensaio de indução de *stress* oxidativo no modelo celular SH-SY5Y. Deste modo, esta concentração não foi utilizada durante o ensaio.

4.6. Avaliação do efeito protetor dos extratos da bactéria associada BB16 em condições de *stress* oxidativo nos modelos celulares

A avaliação do efeito protetor do extrato da bactéria associada BB16 e do antioxidante sintético BHT foi efetuada nos modelos celulares SH-SY5Y, MCF-7 e HepG-2 quando sujeitos a condições de *stress* oxidativo por diferentes concentrações de H_2O_2 . O efeito obtido para cada um dos modelos encontra-se descrito de seguida.

4.6.1. Avaliação do potencial protetor do BHT e do extrato da bactéria associada BB16 na linha celular SH-SY5Y, em condições de *stress* oxidativo

O efeito protetor do extrato da bactéria associada BB16 e do antioxidante sintético BHT no modelo celular SH-SY5Y, em condições de *stress* oxidativo foi avaliado após as células atingirem a confluência total. As células foram incubadas com diferentes concentrações de H_2O_2 (0,1 – 1mM) e com as soluções a testar (0,05 – 1mg.mL⁻¹) (Figura 9).

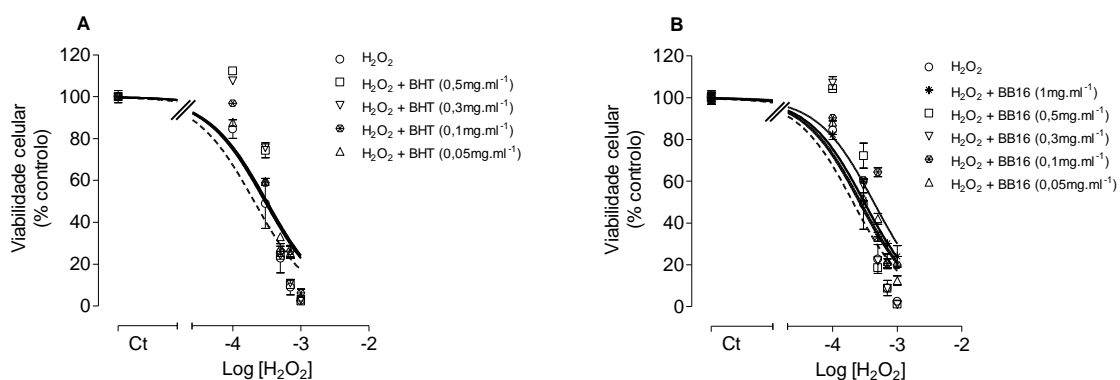


Figura 9: Efeito do H_2O_2 a diferentes concentrações (0,1 – 1mM) na presença do antioxidante sintético BHT (0,05 – 1mg.mL⁻¹) (A) e do extrato de bactéria associada BB16 (0,05 – 1mg.mL⁻¹) (B) na linha celular SH-SY5Y após 24 horas de incubação. Resultados obtidos através do método de MTT. Os valores correspondem à média \pm SEM (n=8).

Pela observação dos resultados obtidos (Figura 9), verifica-se que as diferentes concentrações do antioxidante sintético BHT (Figura 9A) e do extrato de bactéria associada BB16 (Figura 9B) testadas em condições de *stress* oxidativo, possuíram

capacidade de alterar a curva induzida pelo H_2O_2 na viabilidade celular das células SH-SY5Y após 24 horas de tratamento, ocorrendo um aumento da viabilidade celular.

Tabela 8: Valores de IC_{50} obtidos para o efeito de H_2O_2 (0,1 – 1mM) na presença do antioxidante sintético BHT (0,05 – 1mg.mL⁻¹) e do extrato de bactéria associada BB16 (0,05 – 1mg.mL⁻¹) na viabilidade celular do modelo SH-SY5Y.

H_2O_2		IC_{50} (μ M)	
		206,0 (150,4 – 282,2)	
Concentração (mg.mL ⁻¹)		H_2O_2 + BHT	H_2O_2 + BB16
	1	-----	311,2 (280,4 – 345,5)
	0,5	315,4 (218,3 – 455,7)	274,4 (184,9 – 407,2)
	0,3	318,5 (230,9 – 439,3)	257,6 (178,1 – 372,8)
	0,1	298,4 (242,6 – 367,2)	431,7 (360,1 – 517,6)
	0,05	293,8 (247,5 – 348,7)	305,2 (263,5 – 353,6)

Em comparação com a situação de *stress* oxidativo induzido apenas por H_2O_2 em que se obteve um valor de IC_{50} de 206,0 μ M (150,4 – 282,2), verifica-se que quando o H_2O_2 foi incubado juntamente com o antioxidante sintético BHT os valores de IC_{50} obtidos apresentaram uma tendência de aumento. Na presença do antioxidante sintético BHT verifica-se uma dependência do valor de IC_{50} , sendo que à concentração 0,5mg.mL⁻¹ de BHT o valor de IC_{50} é 315,4 μ M (218,3 – 455,7) (Tabela 8).

Contudo, na presença do extrato de bactéria BB16 em condições de *stress* oxidativo, não se verificou dependência da concentração do extrato. A concentração de extrato que apresentou um maior valor de IC_{50} foi de 0,1mg.mL⁻¹ (431,7 μ M (360,1 – 517,6), apresentando diferenças significativas em relação à condição de *stress* oxidativo induzido apenas por H_2O_2 . Por sua vez, a concentração máxima de 1mg.mL⁻¹ de BB16 apresentou um valor de IC_{50} de 311,2 μ M (280,4 – 345,5) (Tabela 8).

4.6.2. Avaliação do potencial protetor do BHT e do extrato da bactéria associada BB16 na linha celular MCF-7, em condições de *stress* oxidativo

O efeito protetor do extrato da bactéria associada BB16 e do antioxidante sintético BHT no modelo celular MCF-7, em condições de *stress* oxidativo foi avaliado após as células atingirem a confluência total. As células foram incubadas com diferentes concentrações de H_2O_2 (0,05 – 1mM) e com as soluções a testar (0,05 – 1mg.mL⁻¹) (Figura 10).

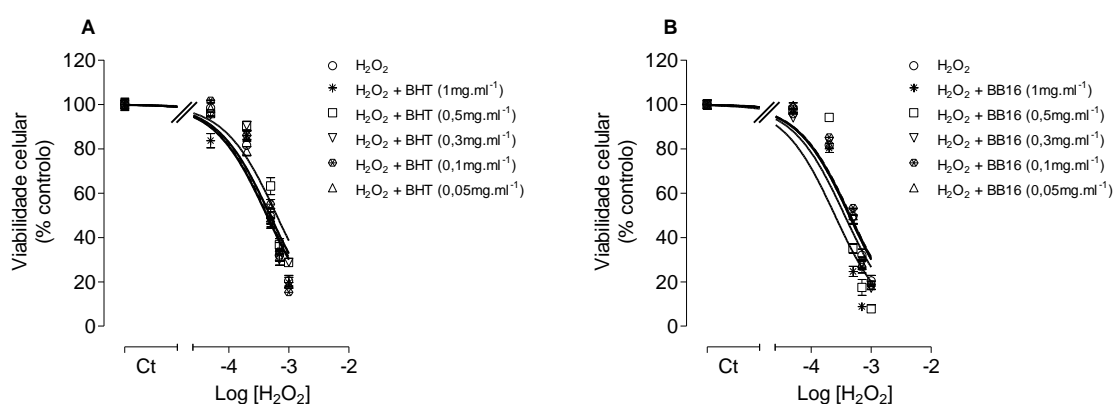


Figura 10: Efeito do H_2O_2 a diferentes concentrações (0,05 – 1mM) na presença do antioxidante sintético BHT (0,05 – 1mg.mL⁻¹) (A) e do extrato de bactéria associada BB16 (0,05 – 1mg.mL⁻¹) (B) na linha celular MCF-7 após 24 horas de incubação. Resultados obtidos através do método de MTT. Os valores correspondem à média \pm SEM (n=8).

Assim, as diferentes concentrações do antioxidante sintético BHT (Figura 10A) e do extrato de bactéria BB16 (Figura 10B) testadas em condições de *stress* oxidativo, não tiveram capacidade de alterar a curva induzida pelo H_2O_2 na viabilidade celular das células MCF-7 após 24 horas de tratamento.

Tabela 9: Valores de IC₅₀ para o efeito de H₂O₂ (0,05 – 1mM) na presença do antioxidante sintético BHT (0,05 – 1mg.mL⁻¹) e do extrato de bactéria associada BB16 (0,05 – 1mg.mL⁻¹) na viabilidade celular do modelo MCF-7.

		IC ₅₀ (μM)	
H ₂ O ₂		450,2 (388,0 – 522,5)	
		H ₂ O ₂ + BHT	H ₂ O ₂ + BB16
Concentração (mg.mL ⁻¹)	1	437,2 (350,6 – 545,3)	249,2 (179,3 – 346,5)
	0,5	630,1 (530,3 – 748,7)	361,6 (259,9 – 503,1)
	0,3	492,5 (418,6 – 579,5)	427,9 (354,8 – 516,0)
	0,1	484,9 (403,6 – 582,6)	446,8 (376,2 – 530,6)
	0,05	428,9 (361,4 – 509,0)	431,0 (366,9 – 506,5)

Em comparação com a situação de *stress* oxidativo induzido por H₂O₂ em que o valor de IC₅₀ é de 450,2 μM (388,0 – 522,5), verifica-se que na presença de antioxidante sintético BHT, em condições de *stress* oxidativo, os valores de IC₅₀ são tendencialmente superiores e dependentes da concentração, exceto à concentração máxima de BHT a 1mg.mL⁻¹ (437,2 μM (350,6 – 545,3)). No entanto, o único valor significativo e com IC₅₀ mais elevado verificou-se para concentração de 0,5mg.mL⁻¹ (630,1 μM (530,3 – 748,7)) (Tabela 9).

Na presença do extrato de bactéria BB16, em condições de *stress* oxidativo, os valores de IC₅₀ mantiveram-se similares e não apresentaram qualquer linearidade na dependência da concentração, sendo que o IC₅₀ superior foi à concentração de 0,1mg.mL⁻¹, com um valor de 446,8 μM (376,2 – 530,6). No entanto, o único valor com significado estatístico e que revelou um efeito pro-oxidante foi obtido para a concentração máxima testada (1mg.mL⁻¹) com um IC₅₀ de 249,2 μM (179,3 – 346,5) (Tabela 9).

4.6.3. Avaliação do potencial protetor do BHT e do extrato de bactéria associada BB16 na linha celular HepG-2, em condições de *stress* oxidativo

O efeito protetor do extrato da bactéria associada BB16 e do antioxidante sintético BHT no modelo celular HepG-2, em condições de *stress* oxidativo foi avaliado após as

células atingirem a confluência total. As células foram incubadas com diferentes concentrações de H₂O₂ (0,1 – 3mM) e com as soluções a testar (0,05 – 1mg.mL⁻¹) (Figura 11).

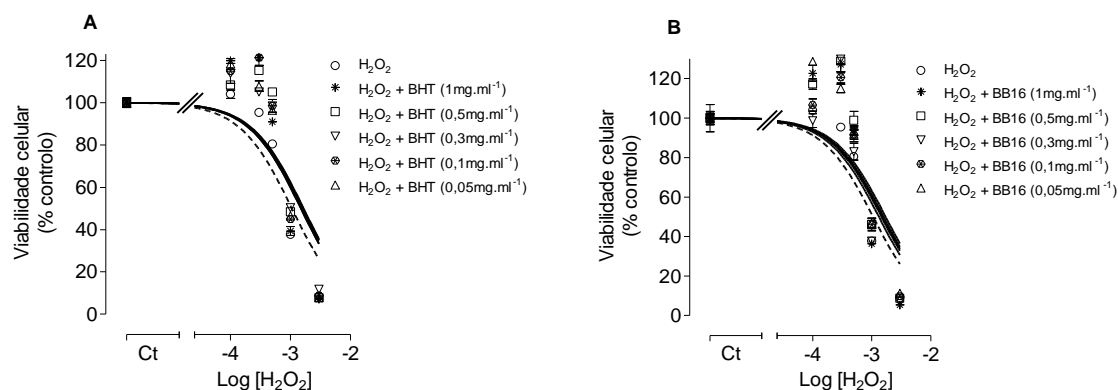


Figura 11: Efeito do H₂O₂ a diferentes concentrações (0,1 – 3mM) na presença do antioxidante sintético BHT (0,05 – 1mg.mL⁻¹) (A) e do extrato de bactéria associada BB16 (0,05 – 1mg.mL⁻¹) (B) na linha celular HepG-2 após 24 horas de incubação. Resultados obtidos através do método de MTT. Os valores correspondem à média ± SEM (n=8).

Pela observação dos resultados obtidos (Figura 11), as diferentes concentrações do antioxidante sintético BHT (Figura 11A) e do extrato da bactéria associada BB16 (Figura 11B) testadas em condições de *stress* oxidativo demonstraram capacidade de alterar a curva induzida pelo H₂O₂ na viabilidade celular das células HepG-2 após 24 horas de tratamento, aumentando tendencialmente a viabilidade celular.

Tabela 10: Valores de IC₅₀ para o efeito de H₂O₂ (0,1 – 3mM) na presença do antioxidante sintético BHT (0,05 – 1mg.mL⁻¹) e do extrato de bactéria associada BB16 (0,05 – 1mg.mL⁻¹) na viabilidade celular do modelo HepG-2.

		IC ₅₀ (µM)	
H ₂ O ₂		1058,0 (847,3 – 1321,0)	
		H ₂ O ₂ + BHT	H ₂ O ₂ + BB16
Concentração (mg.mL ⁻¹)	1	1501,0 (892,0 – 2525,0)	1466,0 (822,2 – 2614,0)
	0,5	1663,0 (1041,0 – 2657,0)	1725,0 (976,8 – 3047,0)
	0,3	1604,0 (1079,0 – 2383,0)	1326,0 (794,5 – 2214,0)
	0,1	1622,0 (988,0 – 2664,0)	1534,0 (979,6 – 2401,0)
	0,05	1499,0 (975,2 – 2305,0)	1601,0 (977,8 – 2622,0)

Em comparação com a situação de *stress* oxidativo induzido por H₂O₂ na linha celular HepG-2, em que o valor de IC₅₀ é de 1058,0 µM (847,3 – 1321,0), observou-se que na presença de antioxidante sintético BHT, em condições de *stress* oxidativo, os valores de IC₅₀ foram tendencialmente superiores, embora sem significado estatístico. O valor mais elevado de IC₅₀ verificou-se à concentração de 0,5mg.mL⁻¹ (1663,0 µM (1041,0 – 2657,0) (Tabela 10).

Na presença do extrato de bactéria BB16, em condições de *stress* oxidativo, também não se verificou qualquer dependência da concentração do extrato de bactéria BB16, contudo, os valores de IC₅₀ também foram tendencialmente superiores, sendo o valor de IC₅₀ mais elevado 1725,0 µM (976,8 – 3047,0) à concentração de 0,5mg.mL⁻¹ (Tabela 10).

Discussão e Conclusão

O ambiente marinho apresenta uma enorme biodiversidade ecológica com um potencial biotecnológico associado praticamente ilimitado, tornando-se uma fonte de produtos naturais estruturalmente únicos que se encontram acumulados principalmente nos organismos vivos (Jha & Zi-rong, 2004; Costa- Lotufo *et al.*, 2009). As macroalgas têm sido estudadas devido ao seu enorme potencial bioativo, contudo, as bactérias associadas a macroalgas têm demonstrado produzir moléculas bioativas muito semelhantes às produzidas pelo hospedeiro, sugerindo que as bactérias associadas apresentam vias metabólicas secundárias idênticas, ou por outro lado podendo mesmo ser a verdadeira fonte de metabolitos bioativos, sendo deste modo importante estudar estes microrganismos (Anand *et al.*, 2006; Bhatnagar & Kim, 2010; Soria-Mercado *et al.*, 2012). Neste trabalho, para se proceder à identificação das bactérias associadas das macroalgas *Asparagopsis armata*, *Bifurcaria bifurcata* e *Sphaerococcus coronopifolius*, foram utilizados os dois tipos de análises, fenotípica e molecular, pela sequenciação do gene 16S RNA. Vários foram os géneros de bactérias marinhas identificados neste estudo, onde o género *Vibrio* foi o que apresentou maior ocorrência em associação com todas as macroalgas, *Asparagopsis armata*, *Bifurcaria bifurcata* e *Sphaerococcus coronopifolius* (40%, 48,72% e 28,57%, respetivamente). Estes resultados são os esperados, uma vez que os géneros de bactérias pertencentes à família Vibrionaceae, como *Vibrio*, são comuns no ambiente marinho, sendo particularmente abundantes na superfície de macrorganismos marinhos como corais, esponjas, algas e peixes, onde formam associações simbióticas, patogénicas ou comensais (Mansson *et al.*, 2011; Hamid *et al.*, 2013; Horta *et al.*, 2014). Um estudo realizado por Duan e colaboradores (1995) revelou que caracteristicamente espécies bacterianas dos géneros *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Aeromonas* e *Corynebacterium* constituem a flora microbiana associada às macroalgas *Laminaria japonica*, *Porphyra yezoensis* e *Ulva pertusa*, sendo o género *Vibrio* predominante em todas as algas. Num outro estudo desenvolvido por Mahmud e seus colaboradores (2008), o género *Vibrio* demonstrou ser, uma vez mais, o mais abundante associado às macroalgas do género *Porphyra*, *Undaria*, *Laminaria* e *Fucus*, que pertencem ao grupo de algas castanha e vermelhas. Os resultados obtidos neste trabalho são concordantes com os trabalhos supracitados, tanto para as algas vermelhas (*Asparagopsis armata* e *Sphaerococcus coronopifolius*) como para as algas castanhas (*Bifurcaria bifurcata*), onde foi constatado que o género *Vibrio* é o género que se encontra em maior abundância na superfície de macroalgas.

Neste estudo foram também identificados outros géneros de bactérias, como o género *Shewanella*. Este género pertencente à família Shewanellaceae encontra-se extensivamente distribuído na natureza, maioritariamente em ambientes marinhos (Bozal *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2008). O género em análise foi identificado em associação com as macroalgas *Asparagopsis armata*, *Bifurcaria bifurcata* e *Sphaerococcus coronopifolius* (13,33%, 10,26% e 19,05% de ocorrência, respetivamente).

Neste trabalho o género *Staphylococcus* também foi identificado em associação com as macroalgas *Asparagopsis armata* e *Bifurcaria bifurcata*. No entanto a percentagem de ocorrência foi muito díspar de alga para alga, em *Asparagopsis armata* a ocorrência foi de 20% e em *Bifurcaria bifurcata* apenas de 3,33%. Este resultado demonstra a elevada especificidade nas associações biológicas entre algas e bactérias. Outros resultados de ocorrência, observados neste estudo, confirmam essa especificidade, nomeadamente os géneros *Photobacterium* (6,67%), *Cobetia* e *Erwinia* (ambas com 3,33%) que foram identificados apenas em associação com a macroalga *Asparagopsis armata*. O género *Bacillus* também demonstrou alguma especificidade, uma vez que apenas foi identificado em *Asparagopsis armata* (3,33%) e em *Sphaerococcus coronopifolius* (9,52%). A especificidade de cada comunidade microbiana tem-se demonstrado uma constante em diferentes estudos. Por exemplo, ao contrário do observado neste estudo, Menezes e colaboradores (2010) identificaram bactérias associadas a diferentes algas e esponjas onde o género *Bacillus* foi o mais abundante associado à macroalga *Sargassum sp.*, seguido do género *Staphylococcus* (27% e 8% de ocorrência respetivamente). Também o género *Photobacterium* foi identificado neste estudo, contudo apenas em associação com a esponja marinha *Mycale laxissima* (5% de ocorrência) (Menezes *et al.*, 2010). Num estudo realizado por Ivanova e colaboradores (2005), com diferentes algas uma das espécies do género *Cobetia* foi isolada e identificada associada apenas à macroalga *Fucus evanescens*. Os géneros descritos pelos autores em cima referidos são concordantes com os identificados neste trabalho, apesar da ocorrência não ser idêntica, que pode ser explicada pelo facto das características de cada local estudado serem variáveis e a resposta dos microrganismos também se modificam em função do hospedeiro em que as bactérias que se encontram associadas. O género *Erwinia* é descrito em diversos estudos associado a plantas como agentes patogénicos, saprófitos ou epífitos (Verdonck *et al.*, 1987). Contudo, num estudo realizado por McCarter-Zorner e colaboradores (1984) identificaram bactérias do género *Erwinia* em águas marinhas na costa da Escócia e na costa dos Estados Unidos

da América. Apesar de muitos estudos sobre este género ser relativo a ambientes terrestres, o estudo de McCarter-Zorner e colaboradores (1984) comprova que *Erwinia* também se encontra em associação com hospedeiros marinhos. Sendo estes resultados concordantes com o trabalho realizado, onde este género foi identificado em associação apenas com *Asparagopsis armata*, demonstrando uma vez mais a elevada especificidade deste tipo de simbioses.

Diferentes trabalhos têm identificado outros géneros de bactérias associadas a macroalgas. Nomeadamente, o género *Alteromonas* que foi identificado em associação com a macroalga castanha *Lessonia sp.* recolhida no Japão, por Akagawa-Matsushita e seus colaboradores (1992). Por sua vez, o género *Cellulophaga* foi identificado por Johansen e colaboradores (1999), em associação com a macroalga castanha *Fucus serratus*, na costa da Dinamarca. A associação de bactérias dos mesmos géneros a espécies de algas do mesmo grupo pode ser evidenciada, uma vez mais, nos estudos anteriores e reforçada com o presente estudo, onde os géneros *Alteromonas* e *Cellulophaga* foram identificados em associação com algas, que apesar de estarem geograficamente distantes e de serem de espécies diferentes são do mesmo grupo: as algas castanhas. No presente estudo os géneros referidos foram identificados apenas em associação com *Bifurcaria bifurcata*.

Neste estudo foram identificados mais dois géneros exclusivamente associados à macroalga *Bifurcaria bifurcata* nomeadamente, *Citrococcus* e *Ruegeria* em que ambos apresentaram a mesma ocorrência, 2,56%. Na mesma linha, a alga *Sphaerococcus coronopifolius* também apresentou associações específicas e exclusivas com bactérias dos géneros *Pseudoalteromonas* e *Holomonas* (19,05% e 9,52% de ocorrência, respetivamente). Estes mesmos géneros têm demonstrado, noutros estudos, uma elevada especificidade. No supracitado estudo realizado por Ivanova e colaboradores (2002) foram também identificadas bactérias do género *Pseudoalteromonas* e *Holomonas* em associação apenas com a macroalga *Fucus evanescens*. Os microrganismos do género *Pseudoalteromonas* são frequentemente encontrados em águas marinhas, associados a invertebrados marinhos e algas, enquanto bactérias do género *Holomonas* encontram-se distribuídas em vários habitats naturais como águas marinhas e estuários (Ivanova *et al.*, 2002). Apesar das bactérias referidas no estudo anterior se encontrarem associadas a algas do filo Heterokontophyta, enquanto no presente estudo encontram-se em associação com algas do filo Rodophyta, indica que bactérias marinhas do mesmo género podem se

encontrar associadas com macroalgas de grupos distintos, consoante as condições ecológicas que as rodeiam.

Muitos dos géneros de bactérias identificados neste trabalho encontram-se descritos em outros estudos por possuírem diversas bioatividades com um potencial biotecnológico. Dupont e seus colaboradores (2013) verificaram que duas espécies de bactérias do género *Vibrio*, isoladas da esponja *Phorbas tenacior*, apresentaram atividade antioxidante. Hentschel e seus colaboradores (2001) isolaram bactérias do género *Pseudoalteromonas* associadas das esponjas marinhas *Aplysina aerophoba* e *Aplysina cavernicola* que apresentaram atividade antimicrobiana. Também Brammavidhya & Usharani (2013) isolaram da esponja marinha *Hyatella cribriforme* uma espécie do género *Bacillus*, que demonstrou uma elevada capacidade antioxidante. Estes dados são muito interessantes, uma vez que a descoberta de novas fontes de compostos com bioatividades interessantes tornou-se ainda mais importante, pois estas podem ter diversas aplicabilidades em diferentes áreas (Al-Zereini, 2014).

Atualmente existe um elevado interesse em descobrir e identificar novos compostos naturais com uma elevada capacidade antioxidante. Isto deve-se ao facto dos antioxidantes sintéticos, tais como butylated hydroxyanisole (BHA) e butylated hydroxytoluene (BHT), apresentarem alguns efeitos tóxicos (Abdel-Wahab *et al.*, 2013; Brammavidhya & Usharani, 2013). Um dos mecanismos utilizados pelos compostos antioxidantes naturais para desempenharem a sua função é a captação de radicais livres, protegendo assim as células de agentes oxidantes (Abdel-Wahab *et al.*, 2013; Brammavidhya & Usharani, 2013). Desta forma a avaliação do efeito protetor de moléculas naturais tem sido bastante estudada. A avaliação da atividade antioxidante de metabolitos secundários tem sido também amplamente estabelecida em sistemas *in vitro* (Gopi *et al.*, 2014). Diversos métodos têm sido utilizados para avaliar esta atividade dos quais podemos destacar o método de ORAC, QTP e DPPH (Prior *et al.*, 2003; Alam *et al.*, 2013; Carochó & Ferreira, 2013).

Os organismos marinhos encontram-se expostos a elevados níveis de ROS através de uma combinação de fotossíntese, produção e/ou consumo de oxigénio, elevada intensidade de luz solar e consequente exposição de radiação UV. Neste sentido e estando desta forma os organismos marinhos expostos a fatores oxidativos extremos, a produção de antioxidantes ocorrerão de forma obrigatória e natural (Abdel-Wahab *et al.*, 2013).

As bactérias marinhas são uma de muitas fontes de novos antioxidantes com elevadas aplicabilidades na indústria biomédica, alimentar e cosmética (Al-Zereini, 2014). Um estudo realizado por Krishna e seus colaboradores (2011) demonstrou que a espécie *Bacillus subtilis* apresentava uma elevada capacidade antioxidante. Também Abdel-Wahab e seus colaboradores (2013) isolaram uma espécie do género *Bacillus*, de macroalgas do Mar Vermelho, que verificaram possuir uma elevada capacidade antioxidante. Estes estudos estão de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, sendo que extratos de bactérias associadas das macroalgas pertencentes ao género *Bacillus* (Asp2, Sp2 e Sp36) demonstraram uma elevada capacidade antioxidante pelo método de ORAC, sendo no caso do extrato Sp2 esse valor superior ao do antioxidante sintético BHT.

Dos 90 extratos de bactérias associadas isoladas das macroalgas em estudo, vinte e quatro dos extratos demonstraram uma elevada capacidade antioxidante. Os extratos de bactérias associadas da macroalga *Asparagopsis armata* Asp 39 (*Vibrio*) e Asp40 (<90% BLAST) demonstraram uma elevada capacidade antioxidante pelo método fluorimétrico ORAC ($537,57 \pm 22,42$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g extrato}$ e $386,00 \pm 42,55$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g extrato}$, respetivamente), sendo os valores obtidos superiores aos obtidos pelo antioxidante sintético BHT ($320,00 \pm 32,31$ $\mu\text{mol eq. Trolox/g extrato}$). Este resultado é extremamente interessante tendo em conta que o BHT é uma substância química pura, enquanto os extratos em estudo encontram-se no estado bruto, contendo uma ou mais moléculas que podem ser responsáveis pela sua elevada bioatividade.

Num estudo realizado por Dupont e colaboradores (2013) verificaram que espécies do género *Vibrio* apresentaram atividade antioxidante. O facto do extrato de bactéria associada Asp39 pertencer ao género *Vibrio*, reforça a importância deste género como uma fonte de compostos antioxidantes. Além de pouco explorado relativamente à produção de metabolitos secundários com bioatividade, já foram isolados mais de 90 compostos da família Vibrionaceae, como o caso do composto Andrimid que possui atividade antimicrobiana e do composto Kahalalide F que possui atividade anti-tumoral (Mansson *et al.*, 2011; Hamid *et al.*, 2013). Estes estudos indicam uma enorme variabilidade de bioatividades que se encontram associadas ao género *Vibrio*, o que pode se encontrar relacionado com a capacidade antioxidante reportada nos extratos das bactérias associadas deste género pela presença de diversos compostos bioativos.

O extrato de bactéria associada ASP129 (<90% BLAST) também demonstrou uma interessante capacidade antioxidante, em que os valores obtidos no método fluorimétrico

ORAC foram inferiores aos obtidos pelo antioxidante sintético BHT, a quantidade total de polifenóis foi reduzida, porém a redução do radical DPPH foi elevada. Estes resultados podem sugerir que estamos na presença de extratos com diferentes tipos de moléculas que podem ter diferentes mecanismos de ação que por outro lado são moléculas com atividade antioxidante que não fenóis (Niki, 2010; Alam *et al.*, 2013). A análise de componentes principais, realizada para as bactérias associadas da macroalga *Asparagopsis armata*, corrobora os resultados obtidos, ocorrendo uma correlação inversa entre os três métodos de avaliação de capacidade antioxidante, o que significa que quando ocorre valores elevados pelo método fluorimétrico ORAC, ocorre reduzida quantidade total de polifenóis e uma elevada redução do radical DPPH.

Das bactérias associadas à macroalga *Bifurcaria bifurcata*, treze extratos de bactérias associadas apresentaram uma elevada capacidade antioxidante através dos valores obtidos pelo método fluorimétrico ORAC, superiores aos valores obtidos pelo antioxidante sintético BHT. O extrato que mais se destacou foi o da bactéria associada BB16, pertencente ao género *Shewanella*, que obteve elevados valores no método fluorimétrico ORAC. Este extrato também demonstrou elevada quantidade total de polifenóis. As bactérias marinhas em simbiose com o hospedeiro podem produzir substâncias essenciais para este, o que de algum modo explica os resultados obtidos na quantidade total de polifenóis, visto que os polifenóis possuem propriedades antioxidantes (Yordy *et al.*, 2012). Não existem muitos estudos relativos à quantificação total de fenólicos de bactérias marinhas, especialmente associadas a macroalgas. Contudo, verificou-se que *Actinobacteria* obteve um teor total de polifenóis de 0,22mg eq. ácido gálico/ g extrato, o que é extremamente baixo quando comparado com os resultados obtidos para a bactéria BB16 ($53,854 \pm 3,02$ mg eq. ácido gálico/ g extrato) (Horta *et al.*, 2014). Uma elevada redução do radical DPPH também foi observada no extrato da bactéria associada BB16, sendo esta redução superior à obtida pelo antioxidante sintético BHT. Os elevados valores obtidos pelo método de DPPH podem dever-se à presença de polifenóis no extrato da bactéria associada BB16, visto que estes compostos antioxidantes podem atuar como doadores de elétrões, estabilizando deste modo o radical DPPH (Matsukawa *et al.*, 1997). O facto dos valores obtidos pelos três métodos terem sido elevados, sendo até superiores aos obtidos pelo antioxidante sintético BHT, realça o interesse e o potencial deste extrato. Devido a tratar-se de um extrato bruto tem uma interessante capacidade antioxidante, pelo que é presumível que ao isolar-se os compostos bioativos encontraremos

moléculas com elevada bioatividade. O género do extrato de bactéria associada BB16, *Shewanella*, é conhecido por produzir ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa que estão associados a um eficiente sistema antioxidante, que funciona como protetor primário de todos os organismos marinhos que o possuem, o que pode explicar a elevada atividade antioxidante demonstrada pelo extrato de BB16 (Okuyama *et al.*, 2008).

Também o extrato da bactéria associada BB8 (<90% BLAST) demonstrou uma capacidade antioxidante semelhante à obtida pelo extrato de bactéria associada BB16 nos três métodos de avaliação de capacidade antioxidante, demonstrando resultados antioxidantes elevados, apesar dos valores obtidos serem muito inferiores quando comparados com os obtidos pela BB16. Os extratos das bactérias associadas BB26 (*Shewanella*) e BB39 (*Vibrio*) apresentaram elevados valores no método fluorimétrico ORAC e no método de DPPH, contudo o teor em polifenóis obtido para ambos os extratos foi reduzido. Por sua vez, os extratos das bactérias associadas BB11 (*Vibrio*) e BB36 (<90% BLAST) apresentaram valores no método fluorimétrico ORAC inferiores aos obtidos pelo antioxidante sintético BHT, contudo os valores de redução do radical DPPH foram bastante elevados, o que realça o seu interesse. A análise de componentes principais realizada para as bactérias associadas da macroalga *Bifurcaria bifurcata* corrobora os dados obtidos anteriormente, havendo uma correlação positiva entre os métodos de ORAC e de QTP, e inversa com o método de DPPH, sendo que quando existe elevados valores no método fluorimétrico ORAC, ocorre elevados teores em polifenóis e um reduzido valor de IC₅₀ no método de DPPH.

Das bactérias associadas da macroalga *Sphaerococcus coronopifolius*, seis (Sp2, Sp4, Sp12, Sp23, Sp25 e Sp27) foram os extratos que apresentaram elevada capacidade antioxidante, principalmente associada ao valor de equivalentes de trolox revelado pelo método fluorimétrico ORAC, sendo superiores aos valores obtidos pelo antioxidante sintético BHT. Estes mesmos extratos demonstraram uma baixa redução do radical DPPH. O extrato de bactéria associada que mais se destacou pela sua capacidade antioxidante foi Sp4, que apresentou elevada quantidade total de polifenóis, sendo este valor muito semelhante ao obtido pelo extrato da bactéria associada BB16, referido anteriormente.

A estrutura química dos polifenóis permite-lhes atuar como neutralizadores de radicais livres (Yordy *et al.*, 2012). Este resultado indica a presença de compostos antioxidantes pertencentes ao grupo dos polifenóis que são conhecidos pela sua elevada capacidade antioxidante (Yordy *et al.*, 2012). A análise de componentes principais

realizada para as bactérias associadas da macroalga *Sphaerococcus coronopifolius* corrobora os dados obtidos anteriormente, havendo uma correlação positiva entre os métodos de ORAC e de QTP. Contudo o método de redução do radical DPPH não foi relevante, pois nenhum dos extratos apresentou um valor de IC₅₀ inferior a 1000µg/mL. Assim, verifica-se que quando existe elevados valores no método de ORAC, ocorre elevado teor em polifenóis, enquanto os valores no método de DPPH são considerados nulos.

Como referido anteriormente, diversos estudos indicam que as moléculas antioxidantes são capazes de remover ou prevenir a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigénio nas células antes destas provocarem oxidação lipídica ou proteica (Gordon, 1996; Namvar *et al.*, 2014). O H₂O₂ é uma espécie reativa de oxigénio que se encontra associado ao desenvolvimento de diversas patologias como o cancro, doenças neurodegenerativas e o envelhecimento (Farah, 2005; Alam *et al.*, 2013). Esta espécie reativa de oxigénio também se encontra associada a processos de indução de apoptose em células, sendo que o processo de morte celular por apoptose induzido por H₂O₂ depende da concentração e do tempo de exposição (Han *et al.*, 2014). As células de neuroblastoma humano SH-SY5Y são amplamente utilizadas como modelo celular para estudar a morte celular induzida por *stress* oxidativo (Ruffels *et al.*, 2004). No estudo elaborado por Kim e seus colaboradores (2005), demonstraram uma redução de aproximadamente 50% da viabilidade celular das células SH-SY5Y a uma concentração de 0,1mM de H₂O₂. As células do carcinoma mamário humano MCF-7, são muito utilizadas em investigações de toxicológicas, sendo adequadas para a avaliação *in vitro* de *stress* oxidativo. Alafiri (2011) verificou no seu estudo a sensibilidade do modelo celular MCF-7 a diferentes concentrações de H₂O₂, verificando que as concentrações superiores a 0,5mM de H₂O₂ foram consideradas citotóxicas. Por sua vez, as células do hepatoma humano HepG-2, são amplamente utilizadas em ensaios bioquímicos e em estudos toxicológicos. Num estudo realizado por Chen e seus colaboradores (2011), verificaram uma redução da viabilidade celular de aproximadamente 50% nas células HepG-2 a uma concentração de 0,5mM de H₂O₂.

Os três modelos celulares em estudo, SH-SY5Y, MCF-7 e HepG-2 demonstraram dependência da concentração de H₂O₂, ocorrendo uma diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração, contudo verificou-se diferentes níveis de sensibilidade à presença de H₂O₂ através das doses-resposta realizadas para cada modelo celular.

No presente estudo, no modelo celular SH-SY5Y, verificou-se uma enorme sensibilidade destas células para com o H₂O₂ obtendo um valor de IC₅₀ de 206,0 µM (150,4 – 282,2), seguidas pela linha celular MCF-7 com um valor de IC₅₀ de 450,2 µM (388,0 – 522,5) e por fim a linha celular HepG-2 que exibiu a menor sensibilidade ao H₂O₂, obtendo um valor de IC₅₀ de 1058,0 µM (847,3 – 1321,0).

Estes resultados demonstram elevado interesse pois revelam a existência de diferentes mecanismos que variam de acordo com o modelo celular aos efeitos citotóxicos provocados pelo H₂O₂, podendo estes exercer uma atividade por mecanismos de indução de morte celular, por apoptose ou necrose, ou bloqueio do ciclo celular (Kannan & Jain, 2000). Estes resultados eram de algum modo expectáveis, visto que o modelo HepG-2 provém do fígado que é o órgão responsável pela destoxificação dos compostos nocivos presentes no organismo, sendo deste modo esperado que esta linha celular apresente uma menor sensibilidade a compostos tóxicos, como o H₂O₂. Por sua vez, a linha SH-SY5Y, células neuronais, são extremamente sensíveis. Um dos principais fatores que as torna sensíveis é a reduzida regeneração celular quando comparado com outros tipos de células, sendo que a presença de toxinas pode causar graves danos no sistema nervoso, sendo previsível a sua elevada sensibilidade ao H₂O₂ (Kim *et al.*, 2005). A linha celular MCF-7 apresenta uma sensibilidade intermédia visto que são células epiteliais, não são tão sensíveis como as células neuronais. Contudo, a sua sensibilidade também não é tão reduzida quanto as células hepáticas, pois as células MCF-7 não se encontram expostas a elevadas quantidades de compostos tóxicos.

A pesquisa e caracterização de novas substâncias bioativas para o desenvolvimento de novos produtos com aplicação na indústria farmacêutica, cosmética e alimentar tem vindo a ser intensificada. Vários estudos têm demonstrado resultados controversos relativamente a antioxidantes exógenos, pelo que o tipo e a dosagem dos antioxidantes podem ser fatores determinantes no equilíbrio entre os efeitos benéficos e prejudiciais destes compostos naturais (Bouayed & Bohn, 2010). Alguns estudos indicam que antioxidantes como os polifenóis, atuam como pro-oxidantes, em determinadas condições, tais como concentrações elevadas ou na presença de iões metálicos (Bouayed & Bohn, 2010), que podem levar a danos em biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas e lípidos, e a conseqüente morte celular (Yordy *et al.*, 2012). No entanto, se os antioxidantes forem administrados em doses adequadas desempenham um papel importante na manutenção e restabelecimento de sistemas biológicos saudáveis (Yordy *et al.*, 2012).

Os antioxidantes sintéticos, como o BHT, estão possivelmente associados a fenómenos de toxicidade, o que reforça a procura de antioxidantes de origem natural (Abdel-Wahab *et al.*, 2013). A avaliação da viabilidade celular no modelo celular SH-SY5Y revelou um potente efeito citotóxico do antioxidante sintético BHT à concentração máxima de $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, reforçando a sensibilidade desta linha celular e o potencial tóxico associado a este antioxidante sintético. Também no modelo celular HepG-2 o antioxidante sintético BHT provocou um efeito citotóxico à concentração máxima de $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Nos modelos celulares SH-SY5Y e HepG-2 verifica-se que as diferentes concentrações do antioxidante sintético BHT e do extrato da bactéria associada BB16 testadas em condições de *stress* oxidativo são tendencialmente superiores ao efeito provocado apenas pelo H_2O_2 na viabilidade celular. Contudo, apenas no modelo celular SH-SY5Y o extrato de BB16 demonstrou resultados significativos à concentração de $0,1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($431,7\ \mu\text{M}$ ($360,1 - 517,6$)) em comparação com o valor de IC_{50} de H_2O_2 ($206,0\ \mu\text{M}$ ($150,4 - 282,2$)). Por sua vez, no modelo celular MCF-7 o antioxidante sintético BHT demonstrou à concentração de $0,5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($630,1\ \mu\text{M}$ ($530,3 - 748,7$)) valores significativos em comparação com o IC_{50} de H_2O_2 ($450,2\ \mu\text{M}$ ($388,0 - 522,5$)), reduzindo assim o efeito do H_2O_2 na viabilidade celular. No entanto, o extrato de bactéria associada BB16, em condições de *stress* oxidativo, não teve capacidade de reduzir o efeito induzido pelo H_2O_2 na viabilidade celular das células MCF-7, observando-se nas concentrações mais elevadas um efeito pro-oxidante, verificando-se uma redução da viabilidade celular. Estes dados são relevantes, pois demonstram que o efeito antioxidante depende da tipologia celular e das características químicas dos próprios antioxidantes. Os resultados demonstraram ser promissores, visto que o extrato de bactéria associada BB16 encontra-se em extrato bruto, contendo várias moléculas com bioatividades, que uma vez isoladas essa bioatividade será potenciada. A quercitina, um dos flavonoides conhecido pela sua atividade antioxidante, tem sido em diversos estudos referida por também possuir atividade pro-oxidante, este facto deve-se a um efeito dependente da concentração a nível celular, podendo atuar como um agente protetor ou citotóxico. Também se encontra referido que este antioxidante pode ser oxidado pelo superóxido, formando peróxido de hidrogénio (Metodiewa *et al.*, 1999). Estes estudos podem de algum modo explicar os resultados obtidos neste trabalho, sendo que pode existir no extrato da bactéria BB16 compostos pertencentes a classes dos polifenóis, como flavonoides, que podem reagir com o H_2O_2 , e não terem capacidade de prevenir o seu efeito citotóxico. Deste modo, é

essencial isolar as moléculas bioativas do extrato de bactéria BB16 de forma a tentar perceber o seu verdadeiro potencial antioxidante.

De acordo com Halliwell (2008), o meio da linha celular SH-SY5Y, Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM), tem na sua constituição iões metálicos que podem reagir com os antioxidantes testados *in vitro*, levando a reações de oxidação, sendo um dos produtos detetados o H_2O_2 . O H_2O_2 é um precursor de radicais oxidantes, e é conhecido pela sua toxicidade (Halliwell, 2008; Carochó & Ferreira, 2013). Esta espécie reativa de oxigénio é gerada a partir de quase todas as fontes de *stress* oxidativo e o H_2O_2 exógeno tem a capacidade de entrar nas células e induzir citotoxicidade devido à sua elevada permeabilidade na membrana celular (Alarifi *et al.*, 2011).

Nos ensaios realizados, o efeito induzido pelo H_2O_2 atuou ao nível da viabilidade celular, contudo o método de ORAC utilizado para avaliação da capacidade antioxidante tem como princípio a capacidade antioxidante de radicais peróxido que estão normalmente associados à peroxidação lipídica (Prior *et al.*, 2003). A elevada atividade antioxidante pelo método ORAC poderá sugerir que existam compostos nestes extratos de bactérias que tenham alguma especificidade para mediar efeitos a nível da inibição da peroxidação lipídica. Este tipo de estudo não foi avaliado neste trabalho.

Em suma, os organismos marinhos têm-se revelado uma fonte de novos compostos com múltiplas propriedades farmacológicas (Montaser & Luesch, 2012). No caso específico das bactérias epífitas associadas das macroalgas *Asparagopsis armata*, *Bifurcaria bifurcata* e *Sphaerococcus coronopifolius*, poucos são os estudos que se debruçam especificamente sobre estes organismos em questão. No presente trabalho evidenciou-se a clara associação que existe entre bactérias e macroalgas, tal como o potencial antioxidante que os extratos das mesmas bactérias possuem, sendo que o extrato da bactéria associada BB16 foi o que demonstrou um maior interesse devido aos excelentes resultados antioxidantes obtidos. Apesar de se ter verificado um efeito protetor em um dos modelos celulares pelo extrato da bactéria BB16, torna-se importante com esta biblioteca de extratos de bactérias proceder futuramente à análise de outras atividades biológicas de modo a avaliar todo o seu potencial biotecnológico.

Perspetivas Futuras

O trabalho realizado e os resultados obtidos realçam o potencial biotecnológico dos recursos marinhos da costa de Peniche, nomeadamente das bactérias associadas das macroalgas *Asparagopsis armata*, *Bifurcaria bifurcata* e *Sphaerococcus coronopifolius*. No entanto, estes foram os primeiros passos de um longo percurso de investigação onde muitos ensaios serão necessários para comprovar a possível aplicabilidade destes extratos/moléculas produzidos por estes organismos marinhos.

A próxima etapa para os extratos de bactéria associada BB16 e outros extratos de bactérias com potencial antioxidante será o processo de identificação, isolamento e purificação das moléculas responsáveis pela atividade antioxidante. Neste campo de trabalho poderá ser interessante começar por elaborar técnicas de cromatografia simples que fracionem os extratos brutos obtidos em grupos de moléculas mais reduzidos. Esta etapa inicial pode ser concretizada pela realização de uma cromatografia líquida em vácuo (VLC), onde são utilizados solventes orgânicos com diferentes polaridades que ao passar por uma coluna de cromatografia, com características específicas (por exemplo sílica gel 60), irá eluir um grupo específico de compostos. Numa fase mais adiantada, técnicas analíticas como por exemplo a cromatografia líquida (LC) e/ou gasosa (GC) e espectrometria de massa (MS) serão essenciais para identificar de forma específica cada molécula. Este processo deverá ser acompanhado em paralelo com ensaios *in vitro*, de modo a verificar se existe aumento ou perda de atividade. Para complementar este trabalho será necessário realizar ensaios de avaliação do efeito protetor de outros extratos de bactérias associadas nos modelos celulares que demonstraram também potencial antioxidante. Além dos modelos celulares utilizados, seria interessante testar estes efeitos em células normais de modo a compreender se existe alguma seletividade para as células tumorais.

Devido à enorme biblioteca de bactérias associadas obtida seria interessante proceder à análise de outras atividades biológicas, como antimicrobiana, antitumoral e anti-inflamatória, de modo a avaliar todo o potencial biotecnológico destas bactérias, sendo este trabalho apenas um tipo de abordagem.

Tendo por base os resultados obtidos, fará sentido prosseguir com estudos das bactérias associadas que exibiram os efeitos mais marcantes na avaliação da capacidade antioxidante, contribuindo deste modo para a descoberta e desenvolvimento novas moléculas com potencial antioxidante e, obviamente, para a divulgação do conhecimento junto da comunidade científica nacional e internacional.

Referências Bibliográficas

- Abdel-Wahab, N., Ahmed, E. F., Taie, H. A. A., Hassan, H. M., Hameed, M. S. A., Hammouda, O. (2013). Investigation of the antioxidant activity of some marine bacteria associated with some seaweeds from the Red Sea. *New York Science Journal*, 6 (11): 27-32.
- Akagawa-Matsushita, M., Matsuo, M., Koga, Y., Yamasato, K. (1992). *Alteromonas atlantica* sp. nov. and *Alteromonas carrageenovora* sp. nov., Bacteria That Decompose Algal Polysaccharides. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42 (4): 621-627.
- Al-Zereini, W. A. (2014). Bioactive Crude Extracts from Four Bacterial Isolates of Marine Sediments from Red Sea, Gulf of Aqaba, Jordan. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 7 (2): 133-137.
- Alafiri, S. (2011). Assessment of MCF-7 cells as an *in vitro* model system for evaluation of chemical oxidative stressors. *African Journal of Biotechnology*, 10 (9): 3872-3879.
- Alam, M. N., Bristi, N. J., Rafiquzzaman, M. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21 (2): 143-152.
- Alfadda, A. A., Sallam, R. M. (2012). Reactive Oxygen Species in Health and Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012: 1-14.
- Anand, T. P., Bhat, A. W., Shouche, Y. S., Roy, U., Siddharth, J., Sarma, S. P. (2006). Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiological Research*, 161 (3): 252-262.
- Andrade, P. B., Barbosa, M., Matos, R. P., Lopes, G., Vinholes, J., Mouga, T., Valentão, P. (2013). Valuable compounds in macroalgae extracts. *Food Chemistry*, 138 (2-3): 1819-1828.
- Athukorala, Y., Lee, K.-W., Kim, S.-K., Jeon, Y.-J. (2007). Anticoagulant activity of marine green and brown algae collected from Jeju Island in Korea. *Bioresource Technology*, 98 (9): 1711-1716.
- Awad, N. E., Selim, M. A., Metawe, H. M., Matloub, A. A. (2008). Cytotoxic xenicane diterpenes from the brown alga *Padina pavonia* (L.) Gaill. *Phytotherapy Research*, 22 (12): 1610-1613.
- Baker, D. D., Chu, M., Oza, U., Rajgarhia, V. (2007). The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Natural Product Reports*, 24 (6): 1225-1244.
- Bahar, M., Khaghani, S., Pasalar, P., Paknejad, M., Khorramizadeh, M. R., Mirmiranpour, H., Nejad, S. G. (2010). Exogenous coenzyme Q10 modulates MMP-2 activity in MCF-7 cell line as a breast cancer cellular model. *Nutrition Journal*, 9 (62): 1-8.
- Bhakuni, D. S., Rawat, D. S. (2005). *Bioactive Marine Natural Products*. Springer, New York, United States of America.

- Bhatnagar, I., Kim, S.-K. (2010). Immense Essence of Excellence: Marine Microbial Bioactive Compounds. *Marine Drugs*, 8 (10): 2673- 2701.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Hu, W.-P., Munro, M. H. G., Northcote, P. T., Prinsep, M. R. (2007). Marine Natural Products. *Natural Product Reports*, 24 (1): 31-86.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H. G., Northcote, P. T., Prinsep, M. R. (2010). Marine Natural Products. *Natural Product Reports*, 27 (2): 165-237.
- Bocanegra, A., Bastida, S., Benedí, J., Ródenas, S., Sánchez-Muniz, F. J. (2009). Characteristics and Nutricional and Cardiovascular-Health Properties of Seaweeds. *Journal of Medicinal Food*, 12 (2): 236-258.
- Bouayed, J., Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3 (4): 228-237.
- Bozal, N., Montes, M. J., Tudela, E., Jiménez, F., Guinea, J. (2002). *Shewanella frigidimarina* and *Shewanella livingstonensis* sp. nov., isolated from Antarctic coastal areas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 195-205.
- Brammavidhya, S., Usharani, G. (2013). Cytotoxic and antioxidant activity of marine sponge associated bacterium *Bacillus cereus*. *Golden Research Thoughts*, 2 (12): 1-7.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56 (11): 317-333.
- Carocho, M., Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51: 15-25.
- Chang, H.-W., Roh, S. W., Kim, K.-H., Nam, Y.-D., Jeon, C. O., Oh, H.-M., Bae, J.-W. (2008). *Shewanella basaltis* sp. nov. a marine bacterium isolated from black sand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 1907-1910.
- Chen, X., Zhong, Z., Xu, Z., Chen, L., Wang, Y. (2011). No protective effect of curcumin on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in HepG2 cells. *Pharmacology Reports*, 63 (3): 724-732.
- Chin, Y.-W., Balunas, M. J., Chai, H. B., Kinghorn, A. D. (2006). Drug Discovery From Natural Sources. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, 8 (2): 239-253.
- Costa-Lotufo, L. V., Wilke, D. V., Jimenez, P. C. (2009). Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico e Perspectivas. *Química Nova*, 32 (3): 703-716.
- Datki, Z., Juhász, A., Gálfi, M., Soós, K., Papp, R., Zádori, D., Penke, B. (2003). Method for measuring neurotoxicity of aggregating polypeptides with the MTT assay differentiated neuroblastoma cells. *Brain Research Bulletin*, 62 (3): 223-229.

- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B. (2004). Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (1): 48-54.
- Davidson, B. S. (1995). New dimensions in natural products research: cultured marine microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 6 (3): 284-291.
- Debbab, A., Aly, A. H., Lin, W. H., Proksch, P. (2010). Bioactive Compounds from Marine Bacteria and Fungi. *Microbial Biotechnology*, 3 (5): 544-563.
- Dhargalkar, V. K., Pereira, N. (2005). Seaweed: Promising plant of the millennium. *Science and Culture*, 71 (3-4): 60-66.
- Duan, D., Xu, L., Fei, X., Xu, H. (1995). Short Communication: Marine organisms attached to seaweed surfaces in Jiaozhou Bay, China. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11 (3): 351-352.
- Duan, X.-J., Zhang, W.-W., Li, X.-M., Wang, B.-G. (2006). Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from red alga, *Polyphonia urceolata*. *Food Chemistry*, 95 (1): 37-43.
- Dupont, S., Carré-Mlouka, A., Descarrega, F., Ereskovsky, A., Longeon, A., Mouray, E., Florent, I., Bourguet-Kondracki, M. L. (2013). Diversity and biological activities of the bacterial community associated with the marine sponge *Phorbas tenacior* (Porifera, Demospongiae). *Letters in Applied Microbiology*, 58 (1):42-52.
- Dutot, M., Fagon, R., Hemon, M., Rat, P. (2012). Antioxidant, Anti-inflammatory, and Anti-senescence Activities of a Phlorotannin-Rich Natural Extract from Brown Seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167 (8): 2234-2240.
- Egan, S., Thomas, T., Holmström, C., Kjelleberg, S. (2000). Phylogenetic relationship and antifouling activity of bacteria epiphytes from marine alga *Ulva lactuca*. *Environmental Microbiology*, 2 (3): 343-347.
- Egan, S., Thomas, T., Kjelleberg, S. (2008). Unlocking the diversity and biotechnological potential of marine surface associated microbial communities. *Current Opinion in Microbiology*, 11 (3): 219-225.
- Farah, I. O. (2005). Assessment of Cellular Responses to Oxidative Stress using MCF-7 Breast Cancer Cells, Black Seed (*N. Sativa L.*) Extracts and H₂O₂. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2 (3): 411-419.
- Ferguson, L. R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, 475 (1-2): 89-111.
- Ferreira, A. L. A., Matsubara, L. S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 43 (1): 61-68.

- Gerwick, W. H., Moore, B. S. (2012). Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chemistry and Biology*, 19 (1): 85-98.
- Goecke, F., Labes, A., Wiese, J., Imhoff, J. J. (2010). Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 409: 267-299.
- Gordon, M. H. (1996). Dietary antioxidants in disease prevention. *Natural Product Reports*, 13 (4): 265-273.
- Gupi, M., Dhayanithi, N. B., Devi, K. N., Kumar, T. T. A. (2014). Marine natural product, Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro- (C₇H₁₀N₂O₂) of antioxidant properties from *Bacillus* species at Lakshadweep archipelago. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2 (8): 632-637.
- Gupta, S., Abu-Ghannam, N. (2011). Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science & Technology*, 22 (6): 315-326.
- Haefner, B. (2003). Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today*, 8 (12): 536-544.
- Halliwell, B. (1997). Antioxidants and Human Disease: A General Introduction. *Nutrition Reviews*, 55 (1): 44-52.
- Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies?. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476 (2): 107-112.
- Hamid, R., Usup, G., Ahmad, A. (2013). Antimicrobial Activity of Bacteria Associated with Various Marine Sources. *Advances in Environmental Biology*, 7 (2): 356-365.
- Han, S. M., Kim, J. M., Park, K. K., Chang, Y. C., Pak, S. C. (2014). Neuroprotective effects of melittin on hydrogen peroxide-induced apoptotic cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *BMC Complementary & Alternative Medicine*, 14 (1): 286-297.
- Harvey, A. L. (2008). Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13 (19-20): 894-901.
- Hentschel, U., Schmid, M., Wagner, M., Fieseler, L., Gernert, C., Hacker, J. (2001). Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiology Ecology*, 35 (3): 305-312.
- Heo, S.-J., Park, E.-J., Lee, K.-W., Jeon, Y.-J. (2005). Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technology*, 96 (14): 1613-1623.
- Heo, S.-J., Jeon, Y.-J. (2009). Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 95 (2): 101-107.

- Heo, S.-J., Cha, S.-H., Kim, K.-N., Lee, S.-H., Ahn, G., Kang, D.-H., Oh, C., Choi, Y.-U., Affan, A., Kim, D., Jeon, Y.-J. (2012). Neuroprotective Effect of Phlorotannin Isolated from *Ishige okamurae* Against H₂O₂-Induced Oxidative Stress in Murine Hippocampal Neuronal Cells, HT22. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166 (6): 1520-1532.
- Horta, A., Pinteus, S., Alves, C., Fino, N., Silva, J., Fernandez, S., Rodrigues, A., Pedrosa, R. (2014). Antioxidant and Antimicrobial Potential of the *Bifurcaria bifurcata* Epiphytic Bacteria. *Marine Drugs*, 12 (3): 1676-1689.
- Hu, G.-P., Yuan, J., Sun, L., She, Z.-G., Wu, J.-H., Lan, X.-J., Zhu, X., Lin, Y.-C., Chen, S.-P. (2011). Statistical Research on Marine Natural Products Based on Data Obtained between 1985 and 2008. *Marine Drugs*, 9 (4): 514-525.
- Ivanova, E. P., Bakunina, I. Y., Sawabe, T., Hayashi, K., Alexeeva, Y. V., Zhukova, N. V., Nicolau, D. V., Zvaygintseva, T. N., Mikhailov, V. V. (2002). Two Species of Culturable Bacteria Associated With Degradation of Brown Algae *Fucus Evanescons*. *Microbial Ecology*, 43 (2): 242-249.
- Ivanova E. P., Christen, R., Sawabe, T., Alexeeva, Y. V., Lysenko, A. M., Chelomin, V. P., Mikhailov, V. V. (2005). Presence of Ecophysiologically Diverse Populations within *Cobetia marina* Strains Isolated from Marine Invertebrate, Algae and the Environments. *Microbes and Environment*, 20 (4): 200-207.
- Jha, R. K., Zi-rong, X. (2004). Biomedical Compounds from Marine organisms. *Marine Drugs*, 2 (3): 123-146.
- Jirge, S. S., Chaudari, Y. S. (2010). Marine: The ultimate source of bioactives and drug metabolites. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 1 (1): 55-62.
- Johansen, J. E., Nielsen, P., Sjøholm, C. (1999). Description of *Cellulophaga baltica* gen. nov., sp. nov. and *Cellulophaga fucicola* gen. nov., sp. nov. and reclassification of [*Cytophaga*] *lytica* to *Cellulophaga lytica* gen. nov., comb. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49 (3): 1231-1240.
- Kanagasabhapathy, M., Sasaki, H., Nagata, S. (2008). Phylogenetic identification of epibiotic bacteria possessing antimicrobial activities isolated from red algal species of Japan. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24 (10): 2315-2321.
- Kannan, K., Jain, S. K. (2000). Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, 7 (27): 153-163.
- Kelman, D., Posner, E. K., McDermid, K. J., Tabandera, N. K., Wright, P. R., Wright, A. D. (2012). Antioxidant Activity of Hawaiian Marine Algae. *Marine Drugs*, 10 (2): 403-416.
- Kim, S.-S., Park, R.-Y., Jeon, H.-J., Kwon, Y.-S., Chun, W. (2005). Neuroprotective Effects of 3,5-Dicaffeoylquinic Acid on Hydrogen Peroxide-induced Cell Death in SH-SY5Y Cells. *Phytotherapy Research*, 19 (3): 243-245.

- Kohri, S., Fujii, H., Oowada, S., Endoh, N., Sueishi, Y., Kusakabe, M., Shimmei, M., Kotake, Y. (2009). An oxygen radical absorbance capacity-like assay that directly quantifies the antioxidant's scavenging capacity against AAPH-derived free radicals. *Analytical Biochemistry*, 386 (2): 167-171.
- Kong, C.-S., Kim, J.-A., Yoon, N.-Y., Kim, S.-K. (2009). Induction of apoptosis by phloroglucinol derivate from *Ecklonia Cava* in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 47 (7): 1653-1658.
- Krishna, E. R., Kumar, P. S., Kumar, B. V. (2011). Study on Antioxidant activity and strain development of *Bacillus subtilis* (MTCC No.10619). *Journal of Agricultural Technology*, 7 (6): 1693-1703.
- Kwon, H.-M., Choi, Y.-J., Jeong, Y.-J., Kang, S.-W., Kang, I.-J., Lim, S. S., Kang, Y.-H. (2005). Anti-inflammatory Inhibition of Endothelial Cell Adhesion Molecule Expression by Flavone Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (13): 5150-5157.
- Lee, J.-C., Hou, M.-F., Huang, H.-W., Chang, F.-R., Yeh, C.-C., Tang, J.-Y., Chang, H.-W. (2013). Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. *Cancer Cell International*, 13 (55): 1-7.
- Lenaz, G. (1998). Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochimica et Biophysica Acta*, 3166 (1-2): 53-67.
- Li, Y.-X., Wijesekara, I., Li, Y., Kim, S.-K. (2011). Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochemistry*, 46 (12): 2219-2224.
- Liu, R. H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78 (3): 517-520.
- Lordan, S., Ross, R. P., Stanton, C. (2011). Marine Bioactives as Functional Food Ingredients: Potential to Reduce the Incidence of Chronic Disease. *Marine Drugs*, 9 (6): 1056-1100.
- Mahmud, Z. H., Neogi, S. B., Kassu, A., Huong, B. T. M., Jahid, I. K., Islam, M. S., Ota, F. (2008). Occurrence, seasonality and genetic diversity of *Vibrio vulnificus* in coastal seaweeds and water along the Kii Channel, Japan. *FEMS Microbiology Ecology*, 64 (2): 209-218.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79 (5): 727-747.
- Mansson, M., Gram, L., Larsen, T. O. (2011). Production of Bioactive Secondary Metabolites by Marine *Vibrionaceae*. *Marine Drugs*, 9 (9): 1440-1468.
- Martins, A., Vieira, H., Gaspar, H., Santos, S. (2014). Marketed Marine Natural Products in the Pharmaceutical and Cosmeceutical Industries: Tips for Success. *Marine Drugs*, 12 (2): 1066-1101.

- Matsukawa, R., Dubinsky, Z., Kishimoto, E., Masaki, K., Masuda, Y., Takeuchi, T., Chihara, M., Yamamoto, Y., Niki, E., Karube, I. (1997). A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 9 (1): 29-35.
- McCarter-Zorner, N. J., Franc, G. D., Harrison, M. D., Michaud, J. E., Quinn, C. E., Sells, I. A., Graham, D. C. (1984). Soft rot *Erwinia* bacteria in surface and underground waters in southern Scotland and in Colorado, United States. *Journal of Applied Bacteriology*, 57 (1): 95-105.
- McCord, J. M. (2000). The Evolution of free Radicals and Oxidative Stress. *The American Journal of Medicine*, 108 (8): 652-659.
- Menezes, C. B. A., Bonugli-Santos, R. C., Miqueletto, P. B., Passarini, M. R. Z., Silva, C. H. D., Justo, M. R., Leal, R. R., Fantinatti-Garboggini, F., Oliveira, V. M., Berlinck, R. G. S., Sette, L. D. (2010). Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiological Research*, 165 (6): 166-182.
- Metodiewa, D., Jaiswal, A. K., Cenas, N., Dickancaite, E., Segura-Aguilar, J. (1999). Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radical & Medicine*, 26 (1-2): 107-116.
- Minh, C. V., Kiem, P. V., Dang, N. H. (2005). Marine natural products and their potential application in the future. *ASEAN Journal for Science and Technology Development*, 22 (4): 297-311.
- Montaser, R., Luesch, H. (2011). Marine natural products: a new wave of drugs?. *Future Medicinal Chemistry*, 3 (12): 1475-1489.
- Murray, P. M., Moane, S., Collins, C., Beletskaya, T., Thomas, O. P., Duarte, A. W. F., Nobre, F. S., Owoyemi, I. O., Pagnocca, F. C., Sette, L. D., McHugh, E., Causse, E., Pérez-López, P., Feijoo, G., Moreira, M. T., Rubiolo, J., Leirós, M., Botana, L. M., Pinteus, S., Alves, C., Horta, A., Pedrosa, R., Jeffryes, C., Agathos, S. N., Allewaert, C., Verween, A., Vyverman, W., Laptev, I., Sineoky, S., Bisio, A., Manconi, R., Ledda, F., Marchi, M., Pronzato, R., Walsh, D. J. (2013). Sustainable production of biologically active molecules of marine based production. *New Biotechnology*, 30 (6): 839-850.
- Namvar, F., Baharara, J., Mahdi, A. A. (2014). Antioxidant and Anticancer Activities of Selected Persian Gulf Algae. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 29 (1): 13-20.
- Niki, E. (2010). Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology & Medicine*, 49 (4): 503-515.
- Okuyama, H., Orikasa, Y., Nishida, T. (2008). Significance of Antioxidative Functions of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids in Marine Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (3): 570-574.
- Pangestuti, R., Kim, S.-K. (2011). Neuroprotective Effects of Marine Algae. *Marine Drugs*, 9 (5): 803-818.

- Penesyán, A., Marshall-Jones, Z., Holmstrom, C., Kjelleberg, S., Egan, S. (2009). Antimicrobial activity observed among cultured marine epiphytic bacteria reflects their potential as a source of new drugs. *FEMS Microbiology Ecology*, 69 (1): 113-124.
- Penesyán, A., Kjelleberg, S., Egan, S. (2010). Development of Novel Drugs from Marine Surface Associated Microorganisms. *Marine Drugs*, 8 (3): 438-459.
- Penesyán, A., Tebben, J., Lee, M., Thomas, T., Kjelleberg, S., Harder, T., Egan, S. (2011). Identification of the Antibacterial Compounds Produced by the Marine Epiphytic Bacterium *Pseudovibrio* sp. D323 and Related Sponge-Associated Bacteria. *Marine Drugs*, 9 (8): 1391-1402.
- Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., Jacob, R. (2003). Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (11): 3273-3279.
- Ruberto, G., Baratta, M., Biondi, D. M., Amico, V. (2001). Antioxidant activity of extracts of the marine algal genus *Cystoseira* in a micellar model system. *Journal of Applied Phycology*, 13 (5): 403-407.
- Ruffels, J., Griffin, M., Dickenson, J. M. (2004). Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of ERK1/2 in H₂O₂-induced cell death. *European Journal of Pharmacology*, 483 (2-3): 163-173.
- Ryu, B., Himaya, S. W. A., Qian, Z.-J., Lee, S.-H., Kim, S.-K. (2011). Prevention of hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HDF cells by peptides derived from seaweeds pipefish, *Syngnathus schlegeli*. *Peptides*, 32 (4): 639-647.
- Salimi, A., Hallaj, R., Soltanian, S., Mamakhezri, H. (2007). Nanomolar detection of hydrogen peroxide on glassy carbon electrode modified with electrodeposited cobalt oxide nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, 594 (1): 24-31.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2005). Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45 (4): 287-306.
- Shin, T., Ahn, M., Hyun, J. W., Kim, S. H., Moon, C. (2014). Antioxidant marine algae phlorotannis and radioprotection: A review of experimental evidence. *Acta Histochemica*, 116 (5): 669-674.
- Smit, A. J. (2004). Medicinal and pharmaceutical uses of seaweeds natural products: A review. *Journal of Applied Phycology*, 16 (4): 245-262.
- Soria-Mercado, I. E., Villarreal-Gómez, L. J., Rivas, G. G., Ayala-Sánchez, N. E. (2012). Bioactive Compounds from Bacteria Associated to Marine Algae, In *Biotechnology-Molecular Studies and Novel Applications for Improved Quality of Human Life*, InTech. 25-44.

- Stirk, W. A., Reinecke, D. L., Staden, J. V. (2007). Seasonal variation in antifungal, antibacterial and acetylcholinesterase activity in seven South African seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 19 (3): 271-276.
- Svillas, A., Sakhi, A. K., Andersen, L. F., Svilaas, T., Ström, E. C., Jacobs, D. R., Ose, L., Blomhoff, R. (2004). Intakes of Antioxidants in Coffee, Wine, and Vegetables Are Correlated with Plasma Carotenoids in Humans. *The Journal of Nutrition*, 134 (3): 562-567.
- Thomas, N. V., Kim, S.-K. (2013). Beneficial Effects of Marine Algal Compounds in Cosmeceuticals. *Marine Drugs*, 11 (1): 146-164.
- Urquiaga, I., Leighton, F. (2000). Plant Polyphenol Antioxidants and Oxidative Stress. *Biological Research*, 33 (2): 55-64.
- Verdonk, L., Mergaret, J., Rijckaert, C., Swings, J., Kersters, K., Ley, J. (1987). Genus *Erwinia*: Numerical Analysis of Phenotypic Features. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37 (1): 4-18.
- Villarreal-Gómez, L. J., Soria-Mercado, I. E., Guerra-Rivas, G., Ayala-Sánchez, N. E. (2010). Antibacterial and anticancer activity of seaweeds and bacteria associated with their surface. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 45 (2): 267-275.
- Watson, S. B., Cruz-Rivera, E. (2003). Algal chemical ecology: an introduction to the special issue. *Phycologia*, 42 (4): 319-323.
- Yan, H. Y. (2004). Harvesting Drugs from Seas and How Taiwan Could Contribute to This Effort. *Changhua Journal of Medicine*, 9 (1): 1-6.
- Yordi, E. G., Pérez, E. M., Matos, M. J., Villares, E. U. (2012). Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Polyphenolic Compounds and Structure-Activity Relationship Evidence. *Nutrition, Well-Being and Health, InTech*. 23-49.
- Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., Qian, M. (2002). Free radical Scavenging Properties of Wheat Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (6): 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 (7): 1144-1150.
- Zar, J. H. (2010). *Biostatistical Analysis*, 5th edition. Prentice Hall.
- Zhang, L., An, R., Wang, J., Sun, N., Zhang, S., Hu, J., Kuai, J. (2005). Exploring novel bioactive compounds from marine microbes. *Current Opinion in Microbiology*, 8 (3): 276-281.
- Zhao, J., Yan, Y., Zhu, L., Li, X., Li, G. (2013). An amperometric biosensor for the detection of hydrogen peroxide released from human breast cancer cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 41: 815-819.

Zheng, L., Han, X., Chen, H., Lin, W., Yan, X. (2005). Marine bacteria associated with marine macroorganisms: the potential antimicrobial resources. *Annals of Microbiology*, 55 (2): 119-124.