



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

SÉRVIO QUESADO JÚNIOR

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO
EXTRATO METANÓLICO E FRAÇÕES DA ALGA PARDA**

Spatoglossum schroederi

FORTALEZA – CE

2012

SÉRVIO QUESADO JÚNIOR

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO
EXTRATO METANÓLICO E FRAÇÕES DA ALGA PARDA *Spatoglossum schroederi*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas

Fortaleza

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

Q54a

Quesado Júnior, Sérgio.

Atividade antioxidante, antibacteriana e ant-inflamatória do extrato metanólico e frações de alga parda *Spatoglossum schroederi*. / Sérgio Quesado Júnior. – 2012.
97f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2012.

Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientação: Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas.

Coorientação: Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa.

1. Alga. 2. Agentes antiinfecciosos. 3. Agentes antiinflamatórios. 4. Antioxidantes.
5. Flavonóides. I. Título.

CDD 574.192

SÉRVIO QUESADO JÚNIOR

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO
EXTRATO METANÓLICO E FRAÇÕES DA ALGA PARDA *Spatoglossum schroederi*

Dissertação apresentada à Coordenação do curso de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Bioquímica.

Aprovada em: 16/08/2012

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa (Co-orientador)
Universidade Federal do Piauí – UFPI

Prof^a. Dra. Márcia Maria Mendes Marques
Universidade Estadual do Ceará - UECE

A Deus, por ter me dado a possibilidade de entrar e concluir esse Mestrado,
À minha namorada Fabrícia, pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis,
E à minha mãe Helda, pelo apoio, incentivo e paciência.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas pela orientação nesses mais de dois anos de mestrado.

Ao Professor André Luiz dos Reis Barbosa pela co-orientação, inclusive tirando dúvidas aos fins de semana, e também a toda a sua equipe nos experimentos com inflamação.

À Professora Márcia Maria Mendes Marques pela atenção, mesmo em momentos em que o tempo era bem curto, para esclarecimentos de dúvidas e algumas sugestões.

Ao Professor Fábio, também por esclarecer minhas dúvidas, e toda a equipe pelo auxílio no ensaio de atividade antibacteriana.

Ao Professor Ícaro Gusmão e à Luzara pela marcha química que ainda irá gerar resultados.

A todos os amigos do Laboratório de Algas Marinhas, Luciano, Victor, César, Thais, Jacilane, Juliana, Raquel, Maysa que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação.

Agradecimento especial ao Luciano pelos conhecimentos transmitidos, auxílio nos experimentos e na utilização do programa estatístico.

Agradecimento especial ao Victor pelo auxílio nos experimentos, em especial nos momentos em que me faltou tempo para o laboratório.

Agradecimento especial ao César pelo auxílio nos experimentos, nas coletas de algas e pelo incentivo nos momentos mais difíceis.

Aos amigos Rafael e Antônio, desde o primeiro semestre, pelas discussões científicas intermináveis e estimulantes.

A todos os colegas e amigos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, que compartilhamos alegrias e sofrimentos ao longo desses mais de dois anos.

À minha namorada Fabrícia pelos momentos de apoio, incentivo e paciência, e pelos momentos de falta de paciência também.

À minha mãe Helda e ao meu irmão Jefferson por todo apoio e companheirismo ao longo dos vários anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A todo o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Algas	17
1.2 A Alga <i>Spatoglossum schroederi</i>	19
<i>1.2.1 Classificação Biológica</i>	19
<i>1.2.2 Atividades Biológicas de <i>Spatoglossum schroederi</i></i>	21
<i>1.2.3 Atividades Biológicas de Outras Algas do Gênero <i>Spatoglossum</i></i>	23
1.3 Atividade Antioxidante	24
<i>1.3.1 Radicais Livres e Estresse Oxidativo</i>	24
<i>1.3.2 Antioxidantes e Suas Funções Endógenas</i>	27
<i>1.3.3 Atividade Antioxidante de Algas</i>	29
1.4 Atividade Antibacteriana	30
<i>1.4.1 Atividade Antibacteriana de Algas</i>	33

1.5 Atividade Anti-Inflamatória	35
<i>1.5.1 Processo Inflamatório</i>	35
<i>1.5.2 Eventos Celulares da Inflamação</i>	36
<i>1.5.3 Eventos humorais do processo inflamatório</i>	38
<i>1.5.4 Inflamação Crônica e Anti-inflamatórios</i>	39
<i>1.5.5 Atividade Anti-Inflamatória de Algas</i>	40
1.6 Justificativa	42
2 OBJETIVOS	43
2.1 Objetivo Geral	43
2.2 Objetivos Específicos	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 Preparo do extrato metanólico e das frações hexânica e clorofórmica	44
3.2 Atividade antioxidante	45
<i>3.2.1 Conteúdo Fenólico Total</i>	45
<i>3.2.2 Teor de Flavonoide Total</i>	46
<i>3.2.3 Capacidade Antioxidante Total</i>	46
<i>3.2.4 Atividade Redutora</i>	47
<i>3.2.5 Atividade Sequestradora do Radical DPPH</i>	47
<i>3.2.6 Ensaio de Quelação do Íon Ferroso</i>	47
3.3 Atividade Antibacteriana	48
<i>3.3.1 Microrganismos Testados</i>	48
<i>3.3.2 Atividade Antimicrobiana pelo Método de Difusão em Ágar</i>	49

3.4 Atividade Anti-inflamatória	49
3.4.1 <i>Animais</i>	50
3.4.2 <i>Reagentes e Soluções Usados para Avaliar a Atividade Anti-Inflamatória</i>	50
3.4.3 <i>Edema de Pata Induzido por Carragenina (Cg) e Dextrana (Dxt)</i>	52
3.4.4 <i>Ensaio da Migração de Leucócitos para a Cavidade Peritoneal Induzida por Carragenina</i>	52
3.4.5 <i>Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase (MPO)</i>	53
3.4.6 <i>Dosagem das Citocinas IL-1β e IL-10</i>	54
3.5 Análise estatística	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1 Atividade Antioxidante	56
4.1.1 <i>Rendimento, Conteúdo Fenólico Total e Flavonoides Totais</i>	56
4.1.2 <i>Capacidade Antioxidante Total</i>	58
4.1.3 <i>Atividade Redutora</i>	62
4.1.4 <i>Sequestro do Radical DPPH</i>	64
4.2 Atividade Antibacteriana	68
4.3 Atividade Anti-inflamatória	73
4.3.1 <i>Edema de Pata Induzido por Carragenina</i>	73
4.3.2 <i>Edema de Pata Induzido por Dextrana</i>	76
4.3.3 <i>Contagem da Migração Total e Diferencial de Leucócitos em Cavidade Peritoneal Induzida por Carragenina</i>	79
4.3.4 <i>Atividade da Mieloperoxidase (MPO)</i>	81

<i>4.3.5 Dosagem das citocinas IL-1β e IL-10</i>	83
5 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	88

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Taxonomia da alga marinha <i>Spatoglossum schroederi</i>	19
Tabela 2 – Rendimento, conteúdo fenólico total e flavonoides totais do extrato metanólico e frações de <i>Spatoglossum schroederi</i>	56
Tabela 3 – Atividade antibacteriana do extrato MET e frações de <i>S. schroederi</i> pelo método de difusão em ágar	69

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Aspecto da alga <i>Spatoglossum schroederi</i> . (A) Alga fresca, coloração marrom-esverdeada	20
Figura 2 – Distribuição geográfica por país de <i>Spatoglossum schroederi</i> e frequência de registros	21
Figura 3 – Migração de leucócitos e suas fases	37
Figura 4 – Fluxograma do preparo do extrato MET bruto e frações de <i>Spatoglossum schroederi</i>	45
Figura 5 – Capacidade Antioxidante Total do extrato MET e frações de <i>Spatoglossum schroederi</i>	59
Figura 6 – Relação entre Capacidade Antioxidante Total e conteúdo fenólico total em (A) e Capacidade Antioxidante Total e flavonoides totais em (B)	61
Figura 7 – Atividade Redutora do extrato MET e frações de <i>Spatoglossum schroederi</i>	62
Figura 8 – Relação entre Atividade Redutora e conteúdo fenólico total em (A) e Atividade Redutora e flavonoides totais em (B)	64
Figura 9 – Atividade de Sequestro do Radical DPPH do extrato MET e frações de <i>Spatoglossum schroederi</i>	65
Figura 10 – Relação entre Sequestro do Radical DPPH e conteúdo fenólico total em (A) e Sequestro do Radical DPPH e flavonoides totais em (B)	67
Figura 11 – Halos de inibição da atividade antibacteriana do extrato MET e frações HEX e CLR de <i>S. schroederi</i>	70
Figura 12 – Efeito do extrato MET e frações HEX e CLR de <i>Spatoglossum schroederi</i> sobre edema de pata induzido por carragenina	74
Figura 13 – Efeito do extrato MET e frações HEX e CLR de <i>S. schroederi</i> sobre edema pata induzido por carragenina na 4 ^a hora (pico do edema)	75
Figura 14 – Efeito do extrato MET e frações HEX e CLR de <i>Spatoglossum schroederi</i> sobre edema de pata induzido por dextrana	77

- Figura 15** – Efeito extrato MET e frações HEX e CLR de *S. schroederi* sobre edema de pata induzido por dextrana em 30 minutos (pico do edema) 78
- Figura 16** – Efeito extrato MET e frações HEX e CLR de *S. schroederi* na migração de leucócitos induzida por carragenina na cavidade peritoneal 80
- Figura 17** – Efeito extrato MET e frações HEX e CLR de *S. schroederi* na atividade da mieloperoxidase 82
- Figura 18** – Efeito extrato MET e frações HEX e CLR de *S. schroederi* na dosagem de IL-1 β induzida por carragenina na cavidade peritoneal 84
- Figura 19** – Efeito extrato MET e frações HEX e CLR de *S. schroederi* na dosagem de IL-10 induzida por carragenina na cavidade peritoneal 85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ACE	Fração acetato de etila
AQU	Fração aquosa
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
Cg	Carragenina
CLR	Fração clorofórmica
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
Dxt	Dextrana
EAAsc	Equivalente de Ácido Ascórbico
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
EPM	Erro Padrão da Média
EQ	Equivalente de Quercetina
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	U. S. Food and Drug Administration
FRAP	Potencial Antioxidante de Redução do Ferro
HEX	Fração hexânica
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
i.p.	Intra-peritonal
i.pl.	Intraplantarmente
ICAM1	Molécula de Adesão Intercelular-1
IL	Interleucina
IND	Indometacina
LB	Meio Luria-Bertani
LFA1	Antígeno 1 associado a função de linfócito
LPS	Lipopolissacarídeo
MAC1	Antígeno 1 do macrófago

MET	Extrato metanólico
MPO	Mieloperoxidase
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato salino
PSGL-1	Ligante 1 de glicoproteína selectina-P
TGF	Fator de crescimento transformante
TNF	Fator de necrose tumoral
TSA	Ágar triptona de soja
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
v.o.	Via oral

RESUMO

O extrato metanólico (MET) e as frações hexânica (HEX) e clorofórmica (CLR) da alga parda *Spatoglossum schroederi* foram avaliados quanto às atividades antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória. A atividade antioxidante foi realizada pelos métodos capacidade antioxidante total, atividade redutora, sequestro de radical DPPH e quelação do íon ferroso, e seus resultados foram correlacionados com teor de fenóis e flavonoides. As amostras apresentaram baixo conteúdo fenólico total (6,84 a 14,10 mg EAG/g) e elevado teor de flavonoides totais (215,39 a 279,63 mg EQ/g). Também apresentaram boa atividade antioxidante para capacidade antioxidante total (120 mg EAAsc/g) e atividade redutora (0,414 para HEX, valor mais elevado), resultados que foram fortemente relacionados ao teor de flavonoides totais, $R^2 > 0,9$. No DPPH as frações apresentaram ação pró-oxidante para concentração acima de 1,5 mg/mL. Não foi detectada atividade para quelação do íon ferroso. A atividade antibacteriana foi testada pelo método de difusão em ágar contra duas Gram-positivas e três Gram-negativas. Nenhuma das amostras nas concentrações testadas (50 e 100 mg/mL) apresentou efeito bactericida. A atividade anti-inflamatória foi avaliada pelos ensaios de edema de pata induzido por carragenina e dextrana, migração de leucócitos, atividade de mieloperoxidase e dosagem de citocinas. Todas as amostras apresentaram boa atividade anti-inflamatória nos ensaios realizados. No edema de pata, inibiram a atividade anti-inflamatória no pico do edema, com melhores resultados de HEX (próximo a 100%) para carragenina, e CLR (79%) e HEX (77%) para dextrana. HEX também apresentou o melhor resultado inibitório na migração de leucócitos, tanto total (71%) quanto diferencial (74%). CLR apresentou melhor valor na atividade da mieloperoxidase (87%). As amostras apresentaram redução de IL-1 β muito próxima, da ordem de 43%. MET não alterou a produção de IL-10, porém HEX e CLR induziram produção de IL-10, tendo HEX o melhor valor (80%). Tais resultados podem ser justificados pelo elevado teor de flavonoides. *S. schroederi*, especialmente a fração hexânica, apresenta potencial uso farmacológico e como antioxidante. No entanto, novos estudos são necessários para esclarecer com maior profundidade os mecanismos envolvidos e isolar as moléculas bioativas.

Palavras-chave: *Spatoglossum schroederi*. Antioxidante. Antibacteriana. Anti-inflamatória. Flavonoides.

ABSTRACT

Methanol extract (MET) and hexane (HEX) and chloroform (CLR) fractions of brown seaweed *Spatoglossum schroederi* were evaluated for antioxidant, antibacterial and anti-inflammatory activities. Antioxidant activity was performed by total antioxidant capacity, reducing power, DPPH radical scavenging activity and ferrous ion chelating assay, which results were correlated with total phenol and flavonoid contents. The samples showed low total phenol content (6.84 to 14.10 mg GAE/g) and high total flavonoid content (215.39 to 279.63 mg QE/g). They also showed good antioxidant activity for total antioxidant capacity (120 mg ascorbic acid equivalent antioxidant capacity / g) and reducing activity (0.414 to HEX, the highest value), which results were strongly associated with their total flavonoid content, $R^2 > 0.9$. For DPPH radical scavenging activity, fractions showed pro-oxidant action to a concentration above 1.5 mg/mL. No activity was detected for ferrous ion chelating assay. Antibacterial activity was tested by agar diffusion method against two Gram-positive and three Gram-negative bacteria. None of the samples at the concentrations tested (50 and 100 mg/mL) showed bactericidal effect. Anti-inflammatory activity was evaluated by paw edema induced by carrageenan and dextran, leukocyte migration, myeloperoxidase activity and cytokine measurements. All samples showed good anti-inflammatory activity in such tests. In paw edema, anti-inflammatory activity inhibited at the peak edema, with better results for HEX (near 100%) for carrageenan, and for CLR (79%) and HEX (77%) for dextran. HEX also showed the best results in inhibition of leukocyte migration, both total (71%) and differential (74%). CLR showed the best value in myeloperoxidase activity (87%). The samples showed a very close reduction in IL-1 β , nearby 43%. MET did not affect production of IL-10, but HEX and CLR induced production of IL-10, HEX having the best value (80%). Such results can be explained by flavonoids high content. *S. schroederi*, especially hexane fraction, has potential for pharmacologic and antioxidant uses. However, further studies are needed to elucidate the metabolic pathways involved and to isolate the bioactive molecules.

Keywords: *Spatoglossum schroederi*. Antioxidant. Antibacterial. Anti-inflammatory. Flavonoids.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Algas

As algas são organismos eucariotos fotossintetizantes, não relacionados, sem órgãos reprodutores multicelulares e exercem função ecológica semelhante à das plantas terrestres (Raven, Evert e Eichhorn, 2010). As algas microscópicas fazem parte do fitoplâncton e são responsáveis pela maior produtividade primária dos oceanos. Já as algas macroscópicas, também ditas macroalgas, dividem-se em Rodófitas, Feófitas e Clorófitas, diferindo entre si basicamente pela presença de pigmentos predominantes. A cor das Clorófitas (algas verdes) é devida à presença de clorofila a e b na mesma proporção das “plantas superiores”. A dominância do pigmento de xantofila, fucoxantina, é responsável pela cor marrom das Feófitas (algas pardas), que mascara outros pigmentos. Já ficoeritrina e ficocianina mascaram pigmentos como clorofila a e beta-caroteno e são responsáveis pela cor vermelha das Rodófitas (algas vermelhas) (Gupta e Abu-Ghannam, 2011).

Algas de água doce ou marinha desenvolveram estratégias de defesa que resultam em uma enorme diversidade de compostos de diferentes vias metabólicas. Pesquisas recentes de drogas a partir de fontes naturais demonstraram que as algas são organismos promissores para fornecer novos compostos bioquimicamente ativos (Cardozo *et al.*, 2007). Algas podem ser fontes promissoras de compostos antioxidantes, por exemplo, pois ocorrem em ambientes ricos em luz e oxigênio, o que resulta na geração de radicais livres e outros agentes oxidantes, porém sem grandes danos a seus componentes celulares mais sensíveis (ácidos graxos poli-insaturados) durante o armazenamento (Zubia, Robledo e Freile-Peigrín, 2007; Gupta e Abu-Ghannam, 2011). Além de fonte de antioxidantes, diversas espécies de algas possuem extensas propriedades biológicas de potencial uso farmacológico, e têm sido pesquisadas ao longo dos anos, tais como atividades antibacteriana, anticoagulante, antifúngica, antiprotozoária, anti-helmíntica, antiviral, anti-inflamatória, que afetam o sistema imunológico, cardiovascular e nervoso, entre outras (Mayer e Hamann, 2005; Mayer *et al.*, 2007; Mayer *et al.*, 2009; Mayer *et al.*, 2011).

Devido ao seu baixo teor em lipídeos, alta concentração em polissacarídeos, sua riqueza natural em minerais, ácidos graxos poli-insaturados e vitaminas, assim como seu conteúdo em moléculas bioativas, as algas marinhas são conhecidas por serem uma boa fonte de alimento saudável. Algas são excelentes fontes de vitaminas (B1, B12, C, D, E, riboflavina, niacina, ácido pantotânico e ácido fólico) e minerais (Ca, P, Na e K) (Gupta e Abu-Ghannam, 2011).

Uma categoria específica de compostos fenólicos, os flavonoides, vem recebendo especial atenção após a descoberta do “paradoxo francês”, isto é, baixo risco de doenças cardiovasculares em populações do Mediterrâneo que consomem vinho tinto associado com altas taxas de gordura saturada. Estudos sugerem correlação inversa entre consumo de flavonoides e mortalidade por doenças cardiovasculares (Nijveldt *et al.*, 2001).

Em plantas terrestres, os quatro principais grupos de flavonoides são flavonas, flavanonas, catequinas e antocianinas (Nijveldt *et al.*, 2001). Já em algas, os flavonoides encontrados são distintos das plantas terrestres. Análise de flavonoides de 27 algas japonesas (6 clorófitas, 11 pardas e 10 vermelhas) por HPLC depois de hidrólise, encontrou rutina, ácido caféico, catecol, hesperidina, quercitrina (apenas 2 algas, ambas pardas), miricetina (apenas 2, parda e vermelha) e morina. Não foi detectada presença de quercetina, apigenina, kempferol e baicaleína. Morina foi encontrada em todas as algas do estudo, sendo que, em geral, as pardas continham mais do que as outras. Hesperidina foi encontrada em todas as algas vermelhas. Catecol foi detectado em todas as vermelhas e verdes (Yoshie-Stark, Hsieh e Suzuki, 2003).

D’Orazio *et al.* (2012) ressaltam ainda que compostos marinhos, como peptídeos, carotenóides e polifenóis, são superiores quando comparados com os recursos terrestres análogos, devido à presença simultânea nas algas de maior variedade dessas substâncias: suas ações positivas são sinérgicas, e assim mais potentes, quando comparadas àquelas de origem terrestre.

1.2 A Alga *Spatoglossum schroederi*

1.2.1 Classificação Biológica

Spatoglossum schroederi pertence à classe Phaeophyceae, família Dictyotaceae. Sua taxonomia é mostrada na Tabela 1. A alga possui talo foliáceo ereto, marrom-esverdeado e em forma de fita larga, com altura de 20 a 30 cm, fixando-se ao substrato por uma massa rizoidal. Ramifica-se dicotômica e irregularmente, de forma que um dos lados se desenvolve mais que o outro (figura 1). A ocorrência ecológica do gênero *Spatoglossum* engloba os mares tropicais e algumas regiões temperadas quentes (Paula, Vallim e Teixeira, 2011). No Brasil, foi registrada do Ceará a Santa Catarina, com exceção de Sergipe, e também em Fernando de Noronha. A figura 2 mostra a distribuição mundial da espécie.

Tabela 1 – Taxonomia da alga marinha *Spatoglossum schroederi*.

Categoria Taxonômica	Classificação
DOMÍNIO	Eukaryota
REINO	Chromista
FILO	Ochrophyta
CLASSE	Phaeophyceae
ORDEM	Dictyotales
FAMÍLIA	Dictyotaceae
GÊNERO	<i>Spatoglossum</i>
ESPÉCIE	<i>Spatoglossum schroederi</i> (C.Agardh) Kützing

Fonte: www.algaebase.org

Figura 1 – Aspecto da alga *Spatoglossum schroederi*. (A) Alga fresca, coloração marrom-esverdeada. (B) Excicata, ramificação dicotômica e irregular.

(A)

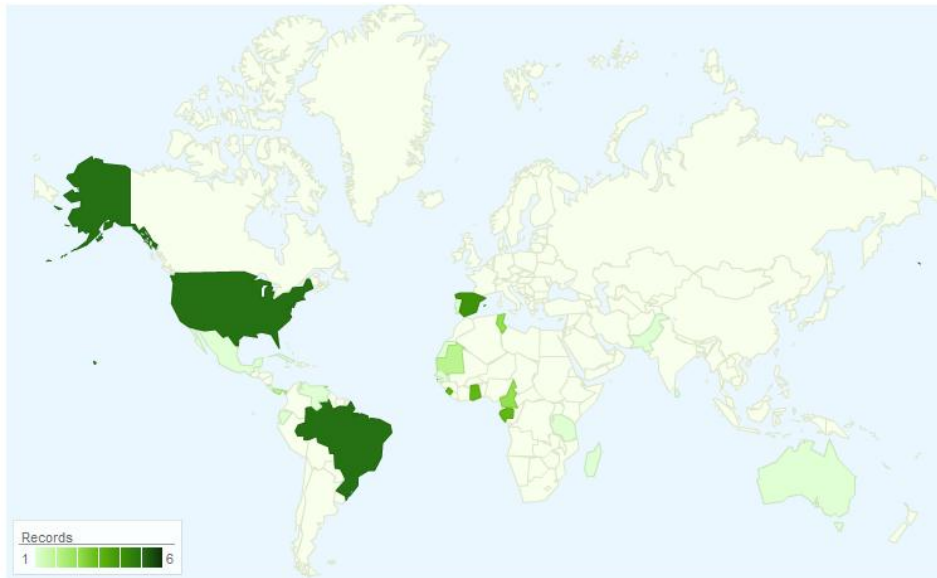


(B)



Fonte www.algaemarisbrasilis.ccb.ufsc.br/busca3.php?id=630

Figura 2 – Distribuição geográfica por país de *Spatoglossum schroederi* e frequência de registros.



Fonte: www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=870

1.2.2 Atividades Biológicas de *Spatoglossum schroederi*

Algumas atividades biológicas foram descritas para a alga parda *Spatoglossum schroederi*, notadamente de seus três principais polissacarídeos sulfatados, denominados fucanas A, B e C.

Leite *et al.* (1998) purificaram uma xilofucoglucurana de *S. schroederi* (fucana A). Encontraram que a atividade desse polissacarídeo é tão eficiente quanto a heparina na estimulação da síntese de uma heparana sulfatada antitrombótica de células endoteliais. Também foi encontrado que o composto é praticamente desprovido de atividade anticoagulante e hemorrágica *in vivo*, sugerindo que esse composto possa ser um agente antitrombótico ideal. Rocha *et al.* (2005) trabalharam com a fucana B, caracterizada como uma galactofucana sulfatada, e chegaram à mesma conclusão. O polissacarídeo não apresentou atividade anticoagulante, porém mostrou potente atividade antitrombótica resultando da síntese de heparana sulfatada pelas células do endotélio vascular.

Araújo *et al.* (2004) avaliaram o uso da fucana A como suporte para imobilização de antibiótico frente às bactérias *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados do antibiograma para o antibiótico imobilizado foram semelhantes aos do antibiótico livre, porém após a diálise os valores de

inibição do antibiótico imobilizado foram muito menores, sugerindo que a diálise removeu os antibióticos não ligados covalentemente ou outras moléculas pequenas. O heteropolissacarídeo e o heteropolissacarídeo ativado não demonstraram atividade antibacteriana, além disso, o composto foi hidrolisado pelos microrganismos. Os resultados sugerem que a imobilização de antibióticos em xilofucoglucurana pode ser usada como um sistema controlado de entrega de droga.

Queiroz *et al.* (2008) estudaram fucanas das algas pardas *S. schroederi* (A e B), *Lobophora variegata* (galactofucana), *Dictyota mertensii* (A) e *Fucus vesiculosus* (fucose sulfatada) em relação à atividade inibitória da enzima transcriptase reversa do HIV. A fucana A isolada de *S. schroederi* inibiu a enzima em 99,03% na concentração de 1,0 µg/mL, porém a fucana B da mesma alga inibiu apenas 53,9%. O efeito inibitório de todas as fucanas testadas foi eliminado por dessulfatação, e apenas a fucana A de *S. schroederi* perdeu atividade por carboxirredução.

Lima *et al.* (2009) avaliaram a possibilidade de polissacarídeos sulfatados de *S. schroederi* terem atividade imunoestimulante em juvenis de camarão *Litopenaeus vannamei* frente a estresse por hipóxia. Seus resultados demonstraram um aumento de sobrevivência entre os grupos tratados com o polissacarídeo, porém sem diferenças significativas em relação ao crescimento.

Costa *et al.* (2010) avaliaram as atividades *in vitro* anticoagulante, antioxidante e antiproliferativa de polissacarídeos sulfatados de 11 espécies de algas da costa de Natal. A alga *S. schroederi* não teve potencial anticoagulante testado no trabalho, mas apresentou atividade antioxidante pela metodologia de capacidade antioxidante e poder redutor, porém não apresentou atividade para radical hidroxila, ânion superóxido e quelação do íon ferroso. Apresentou efeito antiproliferativo de células HeLa, porém não foi elevado em comparação a algumas das outras algas do estudo.

Algumas atividades com outros compostos ou extratos da alga também foram relatadas na literatura. Hodgson (1984) avaliou atividades antimicrobiana e antineoplásica de extratos clorofórmico, metanólico e aquoso de onze espécies de algas da Flórida. Entre as quatro algas pardas testadas, apenas *S. schroederi*

apresentou atividade antimicrobiana, nos extratos clorofórmico (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) e aquoso (*Beneckea harveyi*).

Domingos *et al.* (2012) avaliaram a capacidade de extratos de *S. schroederi*, obtidos por extração sequencial com hexano, diclorometano e acetato de etila, de inibir os efeitos do veneno da serpente *Lachesis muta* (surucucu). Os extratos acetato de etila, principalmente, e diclorometano apresentaram os melhores resultados de inibição do veneno, e, por seus perfis de moléculas polares e apolares, foi sugerido que as moléculas polares são responsáveis pelo efeito inibitório.

1.2.3 Atividades Biológicas de Outras Algas do Gênero *Spatoglossum*

Outras substâncias com potencial biológico no gênero *Spatoglossum*, além de carboidratos, foram identificadas no gênero, tais como compostos diterpenóides espatano, espatozoato e varninasterol, auronas e ésteres de ácido cinâmico (Teixeira *et al.*, 2007).

Zheng, Chen e Lu (2001) testaram atividade de 23 espécies de algas da China, cujos extratos brutos foram obtidos com etanol, acetona e metanol-tolueno (3:1), frente a bactérias e fungos. O extrato acetânico de *Spatoglossum pacificum* apresentou atividade frente a duas bactérias Gram-negativas e duas Gram-positivas, e o extrato etanólico apresentou atividade antifúngica.

Ara *et al.* (2005) analisaram várias atividades biológicas das frações hexânica, clorofórmica e metanólica de um extrato bruto etanólico de *Spatoglossum asperum*. A fração que apresentou maior espectro de atividades foi a hexânica, apresentando efeito antifúngico e antinematocida. Frações oleosas do extrato bruto mostraram a presença de ésteres de ácidos graxos e tiveram efeito hipolipidêmico *in vivo*.

Rizvi (2010) testou a atividade antibacteriana do extrato metanólico de 26 espécies de algas do Paquistão contra onze bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas). *Spatoglossum variabile* foi testada contra seis bactérias, não apresentando qualquer atividade contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*,

Escherichia coli, *Pseudomonas aeruginosa* e *Shigella flexneri*, e contra *Salmonella typhi* apresentou um halo de inibição de 10 mm, cujo valor foi considerado não significativo (entre 9-21 mm).

1.3 Atividade Antioxidante

1.3.1 Radicais Livres e Estresse Oxidativo

Radicaís livres são “quaisquer espécies [químicas] capazes de existência independente que contêm um ou mais elétrons desemparelhados” (Halliwell, 1994). São formados em um contexto de oxirredução em que ocorre perda ou ganho de um elétron de uma espécie não radicalar. Em geral, possuem tempo de vida muito reduzido, com meia vida de mili, micro ou nano segundos (Devasagayam *et al.*, 2004).

Inicialmente, os radicaís livres foram relacionados apenas às doenças e processos de degeneração celular. No entanto, após a descoberta de que radicaís hidroxilas podem atuar na formação de mensageiros secundários, diversas evidências têm sido acumuladas de que os seres vivos estão adaptados não só a coexistir com radicaís livres, como também desenvolveram mecanismos vantajosos para usá-los em várias funções fisiológicas (Dröge, 2002; Valko *et al.*, 2007).

Os radicaís livres mais importantes são as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e as Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs). As EROs incluem espécies radicalares, tais como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}), radical peroxila (ROO^{\cdot}), e não-radicalares, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroperóxido orgânico (ROOH), oxigênio singlete (1O_2) e ozônio (O_3). As ERNs incluem espécies tais como óxido nítrico (NO), peroxinitrila ($ONOO^{\cdot}$), ácido peroxinitroso (ONOOH) e dióxido de nitrogênio (NO_2) (Devasagayam *et al.*, 2004).

Alguns radicaís livres são formados em condições fisiológicas normais nas células. Nas concentrações corretas, NO, $O_2^{\cdot-}$, e outras EROs relacionadas desempenham importante papel como mediadores de regulação em processos de sinalização, dentre esses, a regulação do tônus vascular, a monitoração da tensão

de oxigênio no controle da ventilação, produção de eritropoietina e transdução de sinal a partir de receptores de membrana em vários processos fisiológicos. NO e EROs também podem atuar em proteínas de sinalização, na qual o ataque oxidativo pode induzir perda, ganho ou mudança para uma função distinta (Dröge, 2002). Além de sinalização, uma série de respostas imunológicas, como apoptose de células danificadas e eliminação de microrganismos invasores e células cancerígenas, também dependem da atuação de radicais livres (Devasagayam *et al.*, 2004).

O processo fisiológico mais importante envolvendo radicais livres é a respiração celular. Durante respiração aeróbica, os elétrons passam pela Cadeia Transportadora de Elétrons e, ao seu término, ligam-se ao oxigênio molecular para formar água. Vários intermediários reativos entre o oxigênio e a molécula de água são formados. Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria, e a reatividade das EROs é neutralizada com a entrada de quatro elétrons (Ferreira e Matsubara, 1997). A reação inicia-se pela formação do $O_2^{\cdot -}$ a partir do oxigênio molecular em reações mediadas por enzimas, tais como NAD(P)H oxidases e xantina oxidases, ou por processos não-enzimáticos durante a cadeia transportadora de elétrons. A enzima Superóxido Desmutase converte o superóxido em H_2O_2 . O peróxido de hidrogênio pode ser convertido em água pela catalase ou glutathione peroxidase. Esta última enzima é oxidada a glutathione dissulfida, que pode ser reconvertida pela ação da glutathione redutase com consumo de NADPH (Dröge, 2002). Para que as reações ocorram normalmente, é necessária a presença das enzimas chaves em quantidades suficientes ou sua rápida reposição.

Estudos sugerem que de 1 a 3% dos elétrons que passam pela cadeia transportadora de elétrons escapam prematuramente, nos Complexos I e III, para o oxigênio, formando ânions superóxidos que não colaboram com a redução do oxigênio a água. Esse fenômeno pode estar associado a diversas doenças (Valko *et al.*, 2007).

Em certas circunstâncias, o H_2O_2 pode ser decomposto em radicais hidroxilas, como na presença de metais de transição reduzidos (íons ferroso e cuproso) e radiação UV. Os radicais hidroxilas são as EROs mais reativas em sistemas biológicos. Sua meia vida é de aproximadamente 10^{-9} s, reagindo próximo

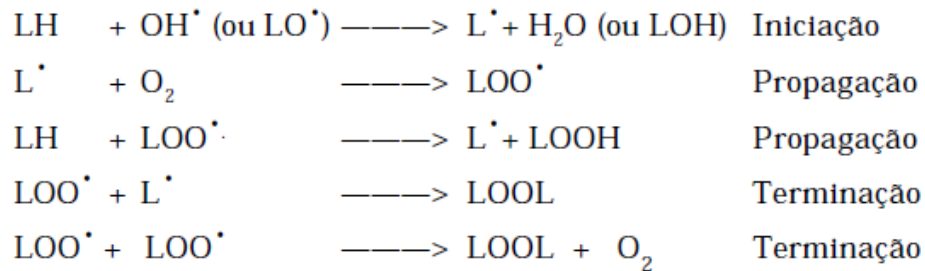
ao local de formação, o que acarreta danos à estrutura celular. O peróxido de hidrogênio por si só não é perigoso, mas essa molécula é lipossolúvel e pode atravessar membranas e, caso haja presença de metais no meio, formar radicais hidroxilas através de reações de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$). Ânions superóxidos também podem formar radicais hidroxilas através de reações de Haber-Weiss ($\text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$) que repõem Fe^{2+} para a reação de Fenton (Ferreira e Matsubara, 1997; Valko *et al.*, 2007).

Nos casos em que a produção de agentes pró-oxidantes supera a defesa antioxidante do organismo, tem-se um quadro conhecido como estresse oxidativo, em que o desequilíbrio entre pró-oxidante/antioxidante resulta em dano celular. Esse quadro pode ocorrer devido a poluentes ambientais, fumaça de cigarro, escapamento de automóvel, radiação UV, poluição do ar, pesticidas, etc. (Aher *et al.*, 2011). Nestas circunstâncias, os alvos dos radicais livres dependem do local de produção e podem danificar macromoléculas como lipídios de membrana, proteínas e DNA, ocasionando danos teciduais que podem progredir e originar diversas doenças associadas ao quadro de estresse oxidativo, dentre elas aterosclerose, infarto do miocárdio, hipertensão, diabetes, envelhecimento, câncer, doenças neuronais como Parkinson e Alzheimer, doença de Huntington, doenças autoimunes e outras (Ratnam *et al.*, 2006).

A membrana é um dos componentes celulares mais atingidos pelas EROs devido à susceptibilidade de seus ácidos graxos poli-insaturados à peroxidação lipídica, alterando a estrutura e a permeabilidade das membranas celulares, o que resulta na perda da seletividade da troca iônica e liberação de conteúdo de organelas, formando produtos tóxicos e podendo culminar em morte celular. Também pode estar associada a processos como envelhecimento e câncer. Os processos de peroxidação nem sempre são prejudiciais, pois seus produtos estão associados à formação de prostaglandinas e, portanto, à resposta inflamatória. Entretanto, o excesso desses produtos pode ser lesivo (Ferreira e Matsubara, 1997).

A peroxidação lipídica ocorre em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Inicia-se com o sequestro do hidrogênio de um ácido graxo poli-insaturado da membrana por um OH^\bullet , formando um radical lipídico (L^\bullet). Este reage rapidamente com o O_2 para formar o radical peroxila (LOO^\bullet), que por sua vez

sequestra novo hidrogênio de outro ácido graxo poli-insaturado, formando novamente L^\bullet e este reinicia a reação. A peroxidação só termina quando os radicais produzidos (L^\bullet e LOO^\bullet) reagem entre si e se neutralizam. A reação também pode ser iniciada por íons ferrosos (Ferreira e Matsubara, 1997). As etapas da peroxidação lipídica estão resumidas a seguir:



Fonte: Ferreira e Matsubara (1997)

No DNA, EROs podem produzir diretamente quebras de DNA simples ou dupla hélice, purina, pirimidina, ou modificações desoxirribose, e ligações cruzadas de DNA. Caso os danos ocasionados não sofram os reparos adequados, estabelece-se uma mutação no DNA que pode resultar em interrupção ou indução de transcrição, indução das vias de transdução de sinal, erros de replicação e instabilidade genômica, todos processos relacionados a carcinogênese (Klaunig e Kamendulis, 2004).

1.3.2 Antioxidantes e Suas Funções Endógenas

Antioxidantes são “quaisquer substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em comparação com um substrato oxidável, atrasam significativamente ou impedem a oxidação desse substrato” (Halliwell *et al.*, 1995). São capazes de neutralizar radicais livres em três estágios: prevenção, interceptação ou reparo. A prevenção visa interromper a formação de EROs. Por exemplo, a superóxido desmutase catalisa a transformação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e este é convertido em água pela catalase. Interceptação ocorre principalmente por sequestradores de radicais, incluindo vitaminas E e C, glutathione, carotenóides, flavonoides, etc. O último estágio envolve as enzimas de reparo (Devasagayam *et al.*, 2004).

Antioxidantes podem ser classificados em dois grupos maiores: enzimáticos e não enzimáticos. Antioxidantes da dieta são classificados em várias classes, das quais polifenóis é a maior classe. Esses consistem em ácidos fenólicos e flavonoides. Outras classes de antioxidantes na dieta incluem vitaminas, carotenóides, compostos organossulfurais e minerais (Ratnam *et al.*, 2006).

Anteriormente ao surgimento da agricultura a ingestão de antioxidantes derivados de plantas era muitas vezes maior do que a atual. Além disso, o estilo de vida moderno leva as pessoas a se exporem a grande quantidade de poluentes oxidantes (Ratnam *et al.*, 2006). Assim, torna-se necessária a suplementação de antioxidantes na dieta. Estima-se que mudanças na alimentação poderiam reduzir em um terço as mortes por câncer nos EUA. Frutas e vegetais contêm uma grande variedade de compostos fenólicos e antioxidantes e, embora ainda não se saiba o mínimo exigido em quantidades diárias de antioxidantes, recomenda-se de cinco a nove porções diárias de frutas e verduras. A ingestão diária aproximada de compostos fenólicos da dieta americana, por exemplo, é em média 450 mg de equivalentes de ácido gálico por pessoa (Chun *et al.*, 2005), já a dieta mediterrânea espanhola, considerada uma das melhores do mundo, é de 1.171 mg de equivalentes de ácido gálico por pessoa (Saura-Calixto e Goñi, 2006).

Além de utilizados na dieta, os antioxidantes são necessários na conservação de alimentos, em especial alimentos gordurosos. A oxidação lipídica é responsável por alterações no sabor e odor de alimentos gordurosos tornando o alimento inapropriado para o consumo, tanto pela degradação de compostos úteis, tais como vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos poli-insaturados, quanto pela formação de compostos tóxicos. Lipídios poli-insaturados podem sofrer oxidação com certa facilidade, sendo sensíveis a fatores como luz, calor, umidade, oxigênio entre outros. Portanto, para aumentar a vida útil de alimentos industrializados, são acrescentados antioxidantes, geralmente sintéticos. Os antioxidantes sintéticos mais usados são: butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG). Entretanto, alguns estudos toxicológicos em animais têm demonstrado a possibilidade destes antioxidantes apresentarem efeito carcinogênico (Ramalho e Jorge, 2006).

Além do uso em dietas e na preservação de alimentos, antioxidantes também são acrescentados em outros produtos industriais, tais como produtos farmacêuticos e cosméticos, e também combustíveis e lubrificantes de motores (Aher *et al.*, 2011). Neste contexto, as pesquisas com antioxidantes de fontes naturais procuram substituir ou reduzir o uso de antioxidantes sintéticos, em especial nos produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos.

1.3.3 Atividade Antioxidante de Algas

Várias classes de compostos de algas apresentaram atividade antioxidante, dentre eles terpenóides e florotaninos (em algas pardas), carotenóides, polissacarídeos sulfatados e compostos fenólicos (Cardozo *et al.*, 2007; Gupta e Abu-Ghannam, 2011). Em algumas situações, como por exemplo na presença de íons de metais de transição, compostos e extratos de algas podem apresentar atividade pró-oxidante (Tutour *et al.*, 1998, Santoso, Yoshie e Suzuki, 2004; Raymundo, Horta e Fett, 2004). Outros antioxidantes naturais como por exemplo ácido ascórbico, α -tocoferol, flavonoides e carotenóides que em excesso, ou em contato com um metal, podem ter atividade pró-oxidante (Ferreira e Matsubara, 1997; Rietjens *et al.*, 2002).

Uma das pesquisas envolvendo maior número de algas analisadas pela atividade antioxidante foi feita por Zubia, Robledo e Freile-Pelegri (2007). Os autores avaliaram extratos de 48 algas do México frente ao radical DPPH, sendo as algas de melhores resultados *Lobophora variegata* (parda), *Avrainvillea longicaulis* (verde) e *Chondria baileyana* (vermelha), cujos valores foram equivalentes aos de alguns antioxidantes comerciais como α -tocoferol, ácido ascórbico, BHA e BHT.

Souza *et al.* (2007) avaliaram polissacarídeos sulfatados de algas pardas e vermelhas pelos métodos de sequestro de ânion superóxido e radical hidroxila. Os autores encontraram boa atividade antioxidante entre os carboidratos testados, sendo que fucoídano e lambda carragenina exibiram as maiores atividades. Houve também correlação positiva entre o conteúdo de sulfato e atividade antioxidante.

Zahra *et al.* (2007) analisaram os extratos aquoso e metanólico da alga parda *Sargassum boveanum* pelos métodos de peroxidação lipídica e DPPH. O

extrato aquoso apresentou ótima atividade na inibição da peroxidação lipídica e o extrato etanólico demonstrou também ótima atividade no sequestro de DPPH. Para os autores as atividades se devem, pelo menos em parte, aos constituintes fenólicos dos extratos.

Demirel *et al.* (2009) avaliaram a atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos metanólico, diclorometanólico e hexânico e óleo essencial de cinco algas pardas da Turquia. O extrato hexânico de *Dictyota dichotoma* var. *implexa* apresentou o maior conteúdo fenólico, o extrato diclorometanólico de *Scytosiphon lomentaria* foi o que apresentou maior atividade antioxidante pelo método ABTS e, no geral, os extratos diclorometanólicos foram mais ativos do que os demais extratos.

Costa *et al.* (2010) testaram polissacarídeos sulfatados de 11 espécies de algas de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil, frente as atividades *in vitro* anticoagulante, antioxidante e antiproliferativa. Todas as espécies demonstraram atividade antioxidante, e quatro delas (*Caulerpa sertularioides*, *Dictyota cervicornis*, *Sargassum filipendula* e *Dictyopteris delicatula*) apresentaram grande potencial frente aos ensaios capacidade antioxidante total, poder redutor e quelação do íon ferroso.

Kelman *et al.* (2012) estudaram 30 espécies de algas do Hawaí, nas quais todas apresentaram atividade pelo método FRAP e as algas pardas foram estatisticamente as mais ativas. A alga mais ativa foi *Turbinaria ornata* e diferentes carotenoides foram identificados como os princípios ativos, sendo o carotenoide fucoxantina o maior componente responsável pela atividade antioxidante.

1.4 Atividade Antibacteriana

Bactérias são organismos unicelulares procariontes e estão disseminadas por toda a biosfera. São classificadas em Gram-positivas e Gram-negativas de acordo com as propriedades da parede celular, tendo as positivas parede rica em peptídeoglicano e as negativas pequena quantidade de peptídeoglicano e uma membrana externa à parede (Madigan, Martinko e Parker, 2004). A maioria das

bactérias não causam doenças a seres humanos e animais, algumas delas são inclusive vitais para a sobrevivência dos mesmos. Pele e mucosas saudáveis abrigam normalmente microbiotas bem caracterizadas, evitando ou dificultando a instalação de microrganismos patogênicos vindos do ambiente externo. Uma pequena proporção de bactérias patogênicas pode ser mortal (Davies, 2007). A patogenicidade de certas bactérias, normalmente inofensivas, pode inclusive estar associada à sua instalação em tecido ou órgão não usual, ou ainda à baixa imunidade.

Dentre as bactérias de maior interesse em processos infecciosos humanos estão: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*. Podem causar inúmeras infecções, dentre elas endocardite bacteriana aguda, infecções respiratórias, bacteremia, septicemia, osteomielite aguda e crônica, piomiosite aguda purulenta, abscesso cerebral, infecções de próteses articulares e do trato urinário (Porfírio *et al.*, 2009).

Infecções bacterianas foram responsáveis por grande quantidade de mortes até a Segunda Guerra Mundial. Porém, após o início do uso e sucesso dos primeiros antibióticos (penicilina e estreptomicina) na década de 1940, especulava-se que as infecções bacterianas seriam consideradas “coisa do passado” em poucos anos. No final da década seguinte foram isoladas cepas multirresistentes e teme-se que a presença de grande quantidade de bactérias resistentes faça o mundo retroceder à era “pré-antibiótica” (Davies, 2007).

Já foram identificados vários mecanismos pelos quais as bactérias desenvolvem resistência a antibióticos, dentre eles espessamento na parede celular, modificações na molécula-alvo, aumento do efluxo do antibiótico ou diminuição do influxo, inativação enzimática do antibiótico, proteção da molécula-alvo e outros (Arias e Murray, 2009; Davies, 2007). Esses mecanismos podem ser decorrentes de mutações espontâneas ou adquiridas através de transferência de genes pela troca de plasmídeos de bactérias resistentes para não resistentes, podendo essa troca de genes de resistência ocorrer entre diferentes cepas da mesma espécie ou mesmo entre espécies diferentes (WHO, 2007). O uso inadequado de antibióticos pode, por exemplo, selecionar cepas resistentes de bactérias da microbiota normal do ser

humano, e estas podem eventualmente transmitir os genes de resistência a bactérias patogênicas.

Além do uso inadequado de antibióticos para o tratamento de doenças humanas, outras fontes de resistência ou propagação menos óbvias também devem ser levadas em consideração. Pesquisas em hospitais públicos do Estado do Rio de Janeiro detectaram a presença de bactérias multirresistentes, incluindo os gêneros *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Gemella* e *Klebsiella*, carregadas por formigas, constituindo possível vetor de propagação de bactérias resistentes entre pacientes infectados e outros pacientes. Medidas de saneamento e controle de formigas em ambiente hospitalar são consideradas necessárias para diminuição de risco para os pacientes (Moreira *et al.*, 2005).

Medidas de controle também devem ser tomadas para além do ambiente hospitalar, por exemplo, no tratamento de animais para alimentação humana. Há evidências de que o tratamento indiscriminado de animais com antibióticos tornam seus produtos e derivados fonte para resistência aos antibióticos na espécie humana. Para ganhar peso mais rápido, alguns animais como frangos são alimentados com ração contendo pequenas doses de antibióticos e quimioterápicos, atuando de maneira subterapêutica, o que favorece o surgimento de resistência microbiana. Resíduos de antibióticos e bactérias resistentes foram isolados de carnes bovinas e de frango. Entre os mais comumente encontrados estavam estreptomicina, cloranfenicol e gentamicina. Em galinhas, 67% das amostras estavam contaminadas com resíduos de antibióticos. Até mesmo no leite é detectada a presença de antibióticos, sendo estes os contaminantes mais estudados em todo o mundo e os responsáveis pelas maiores regulamentações internacionais (Mota *et al.*, 2005).

Atualmente, o desenvolvimento de resistência por certas bactérias patogênicas é mais rápido que a capacidade da indústria para produzir novas drogas (Mota *et al.*, 2005). A maioria dos antibióticos usados atualmente foi desenvolvida nas décadas de 1950 e 1960 (Davies, 2007). São vários os motivos que levaram a esse contexto, mas todos eles se referem ao pequeno retorno financeiro comparado com o investimento requerido. Calcula-se que sejam necessários 400 a 800 milhões de dólares por agente aprovado pela FDA (agência que fiscaliza os alimentos e

medicamentos nos EUA). A terapia desses agentes dura não mais de duas semanas e são medicamentos muito mais controlados e difíceis de adquirir em farmácias. Dessa forma, a atenção da indústria farmacêutica se volta para medicamentos de uso constante e retorno mais garantido. Em 2004 havia apenas 5 novos sistemas moleculares antibacterianos em desenvolvimento pelas maiores empresas americanas, enquanto que para a disfunção erétil eram 4 no mesmo período (Spellberg *et al.*, 2008).

É difícil imaginar procedimentos cirúrgicos, transplantes, quimioterapia contra o câncer, ou atendimentos a doentes crônicos ou infectados por HIV sem agentes antimicrobianos eficazes (Arias e Murray, 2009). Portanto, dada a ineficiência do modelo atual para gerar novos antibióticos, é urgente a busca por novos compostos com atividade antibacteriana, principalmente por parte das universidades e instituições públicas, ou o aumento de financiamento para empresas privadas.

1.4.1 Atividade Antibacteriana de Algas

A maioria dos compostos de algas marinhas apresenta atividade antibacteriana (Vijayabaskar e Shiyamala, 2011), entretanto, pode ocorrer grande variação na produção de substâncias antibacterianas intraespecíficas. Essas variações podem ocorrer devido a variações ecológicas, fase de crescimento, maturidade sexual, estação do ano, ambiente e até nos protocolos de extração (Salvador *et al.*, 2007; Osman, Abushady e Elshobary, 2010).

Dentre os compostos encontrados em algas com atividade antibacteriana podem ser citados aminoácidos, terpenóides, florotaninos, ácido acrílico, compostos fenólicos, esteróides, bromofenol, cetonas e alcanos halogenados, polissulfonas cíclicas e ácidos graxos (Shanmughapriya *et al.*, 2008; Mayer e Hamann, 2005; Mayer *et al.*, 2007; Mayer *et al.*, 2011).

Hellio *et al.* (2000) testaram os efeitos inibitórios de frações aquosa, etanólica e diclorometano de 16 espécies de algas da costa nordeste da França contra microrganismos frequentemente encontrados em superfícies imersas e algumas bactérias patogênicas ao homem. Os extratos aquosos não apresentaram

nenhuma inibição, porém extratos etanólicos e diclorometano parecem ser bem específicos contra gram-positivas. Não ocorreu diferença significativa entre os extratos etanólicos e diclorometano para cada alga.

Lima-Filho *et al.* (2002) estudaram a atividade de seis algas verdes e vermelhas da praia do Pacheco, Estado do Ceará, Brasil. As extrações foram realizadas com hexano, clorofórmio e etanol em aparelho Soxhlet. Os valores da inibição antibacteriana considerados válidos (acima de 10 mm) foram observados apenas para o extrato hexânico. O resultado mais promissor contra as bactérias testadas foi da alga vermelha *Amansia multifida*; já a alga verde *Caulerpa cupressoides* apresentou atividade contra três bactérias (duas Gram-positivas e uma Gram-negativa); e as algas *Ulva fasciata*, *Caulerpa prolifera* e *Gracilaria domingensis* não apresentaram atividade para nenhuma bactéria testada.

Salvador *et al.* (2007) estudaram o potencial antibacteriano e antifúngico de 82 algas da península Ibérica, comparando os valores obtidos com diferentes técnicas de extração e diferentes estações do ano. As algas pardas tiveram as percentagens mais elevadas de taxa ativos, embora não exibissem a maior atividade entre os taxa testados. As atividades variaram com as estações do ano, sendo melhores no outono e na primavera com maior percentagem de taxa ativos.

Wang *et al.* (2009) estudaram o efeito bactericida de florotanino isolado da alga parda *Ascophyllum nodosum* e taninos de plantas terrestres frente a cepas de *Escherichia coli*. Os autores concluíram que o florotanino da alga apresentou atividade de inibição de crescimento e bactericida superior aos taninos terrestres.

Osman, Abushady e Elshobary (2010) pesquisaram atividade antibacteriana de extratos metanólicos, etanólicos e acetônicos de nove algas egípcias (entre vermelhas, pardas e verdes). Os autores concluíram que os extratos acetônicos apresentaram maior atividade do que os metanólicos, que por sua vez foram mais eficientes do que os etanólicos. As algas com melhores atividades foram as verdes, seguidas pelas vermelhas e por último as pardas. Todas as algas e extratos apresentaram atividade contra gram-positivas, gram-negativas e *Candida albicans*, sendo *Ulva fasciata* a mais ativa das algas contra todos os microrganismos testados.

1.5 Atividade Anti-Inflamatória

1.5.1 Processo Inflamatório

Inflamação é a resposta do organismo frente a lesões teciduais ou infecções que pode levar à restauração da estrutura e função do tecido normal. Pode ser de curta duração, fase aguda, ou perdurar por longos períodos, fase crônica. A inflamação aguda é um processo de benefício limitado, particularmente em resposta a agentes infecciosos, enquanto que a inflamação crônica é um fenômeno persistente não desejável, que pode levar à evolução de doenças inflamatórias, como síndrome metabólica, aterosclerose, obesidade, doença cardiovascular, artrite reumatóide e câncer (Chiu *et al.*, 2012).

O processo inflamatório é caracterizado por dor, calor, rubor, edema e perda de função. Na área afetada pela inflamação, ocorrem eventos vasculares, como a dilatação das arteríolas (levando a um aumento do fluxo sanguíneo) e o aumento da permeabilidade dos vasos capilares às proteínas do plasma (que leva ao vazamento de plasma e edema local), e eventos celulares, como o movimento de leucócitos da circulação para o local da lesão, seguido pela ativação tanto das células migratórias quanto das células do tecido local (Lees *et al.*, 2004). Esses eventos são mediados por substâncias que podem ser divididas em quatro categorias: metabólitos lipídicos inflamatórios como os derivados do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas); três cascatas de proteases/substratos solúveis (coagulação, complemento e cininas); óxido nítrico (um potente vasodilatador); e polipeptídeos derivados de células, as citocinas (Feghali e Wright, 1997).

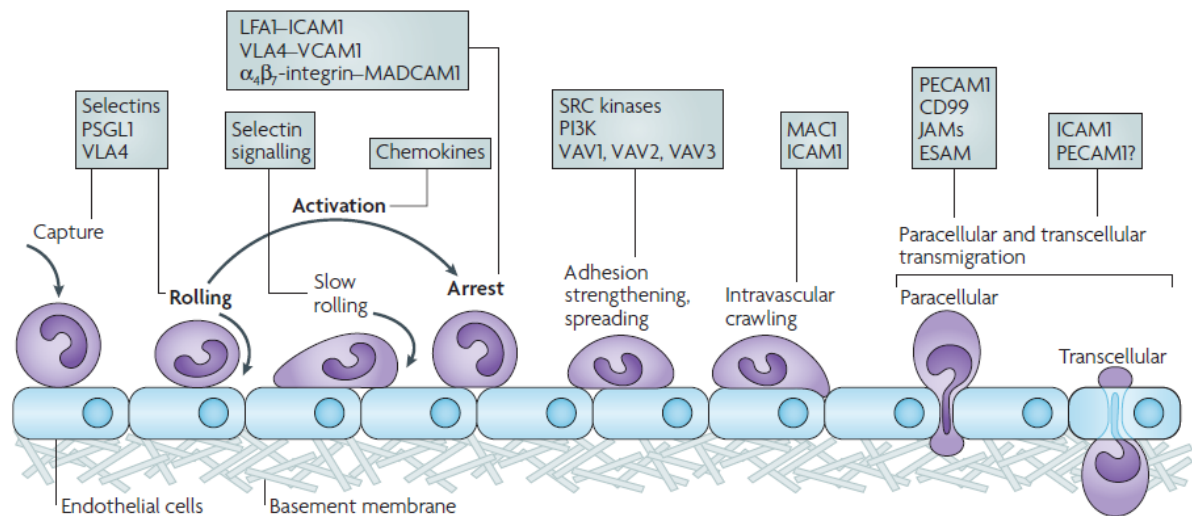
Os eventos vasculares iniciam-se com vasoconstrição reflexa que persiste apenas por alguns minutos quando então dá lugar à vasodilatação que vai, por sua vez, gerar o eritema e o calor característicos da inflamação. Essa transição de vasoconstrição para vasodilatação é mediada por diversos fatores, por exemplo, produtos endoteliais e fatores derivados de mastócitos como leucotrienos, prostaglandinas e, em particular, histamina, contribuem para vasodilatação. Outro sinal da inflamação é o edema, causado por fluxo de fluido vascular do compartimento intravascular para o interstício como resultado do aumento da

permeabilidade vascular. A principal função da mudança da permeabilidade vascular é facilitar a disponibilidade de células e mediadores inflamatórios para os locais de lesão (Aller *et al.*, 2006).

1.5.2 Eventos Celulares da Inflamação

Os eventos celulares envolvem o recrutamento de leucócitos para o sítio de inflamação, o qual envolve as seguintes etapas: captura, rolagem, ativação de integrinas, adesão estável, rastejamento intravascular e transmigração (figura 3). Nos locais de inflamação, as células residentes, principalmente fagócitos mononucleares ativados, produzem citocinas (tais como TNF e IL-1) que induzem as células endoteliais a produzir selectinas, ligantes de integrinas e quimiocinas. Na captura, o endotélio inflamado expressa selectina-L e selectina-P, que vão se ligar a PSGL-1 (Ligante 1 de glicoproteína selectina-P) dos leucócitos circulantes. PSGL-1 também pode se ligar a selectina-L de outros leucócitos circulantes, facilitando a captura de leucócitos secundários. O processo de rolagem vem logo em seguida. As ligações selectinas-ligantes de selectinas quebram-se devido ao fluxo sanguíneo e se restabelecem rapidamente, fazendo o leucócito rolar sobre o endotélio. A rolagem lenta é mediada por selectina-E e integrinas (usualmente LFA1 ou MAC1), diminuindo a velocidade de rolagem de neutrófilos para 5 μm por segundo. A ativação se dá pela atuação de quimiocinas sobre os leucócitos, induzindo mudanças conformacionais de suas integrinas do estado de baixa afinidade para estados intermediário e de alta afinidade, este último expondo seu sítio de ligação. A adesão estável se dá pela ligação das integrinas ativadas aos ligantes de integrinas do endotélio, resultando numa ligação estabilizada sob condições de fluxo sanguíneo. O leucócito pode passar pela fase de rastejamento intravascular, locomovendo-se de forma dependente de MAC1 e ICAM1 até locais preferenciais para transmigração, neste caso, ocorre transmigração paracelular, em que o leucócito passa por entre células do endotélio. Caso não haja a etapa de rastejamento, o leucócito migra preferencialmente por via transcelular, ou seja, passa por dentro de uma célula do endotélio. (Ley *et al.*, 2007; Abbas, Lichtman e Pillai, 2008).

Figura 3 – Migração de leucócitos e suas fases.



Fonte: Ley *et al.* (2007).

Após chegarem ao sítio da inflamação, os polimorfonucleares neutros (os neutrófilos) atuam sobre os patógenos invasores principalmente por opsonização. Inicialmente, o microrganismo é fagocitado e incorporado em um fagossomo intracelular. Segue-se um grande consumo de oxigênio que é convertido em EROs. Além disso, os grânulos citoplasmáticos são descarregados no fagossomo, resultando na morte do microrganismo. Dentre os sistemas antimicrobianos formados, destacam-se mieloperoxidase (MPO), liberada durante a desgranulação, peróxido de hidrogênio, formado no *burst* respiratório, e um haleto, normalmente cloreto. O produto inicial desses sistemas é o ácido hipocloroso, e subsequentemente tem sido proposta a formação de cloro, cloraminas, radicais hidroxilas, oxigênio singlete e ozônio. Os mesmos compostos podem ser liberados para o exterior da célula, podendo atacar tecido saudável, o que pode agravar a doença (Klebanoff, 2005).

Após eliminação do estímulo inflamatório, as células recrutadas devem ser eliminadas de maneira coordenada. A via de remoção inclui a recirculação ou morte local de neutrófilos, eosinófilos ou linfócitos, seguido por fagocitose de macrófagos derivados dos monócitos recrutados. Completada a fagocitose, os macrófagos podem deixar o sítio de inflamação por drenagem linfática ou podem morrer no local por apoptose. Esse é o processo usual, causando pouco dano ao

tecido lesado e dando pouca oportunidade para o surgimento de inflamação crônica. Se houver predisposição genética, a inflamação aguda não é resolvida e desenvolve-se a inflamação crônica, caracterizada pelo acúmulo de neutrófilos e fibrose inflamatória, prolongando a inflamação e podendo levar a reações a antígenos próprios. Para a resolução adequada da inflamação aguda é necessário cessar o fluxo de leucócitos circulantes, sinalização eficiente para monócitos/macrófagos fagocitarem os leucócitos e remoção dos monócitos/macrófagos, uma vez que não há mais estímulo de novas ameaças (Lawrence e Gilroy, 2007).

1.5.3 Eventos humorais do processo inflamatório

As citocinas representam uma classe de mediadores de extrema importância para a regulação do processo inflamatório, pois formam um grupo de substâncias multifuncionais envolvidas em diversas etapas da inflamação, podendo influenciar a resposta inflamatória de forma a favorecer ou inibir o processo. Geralmente as citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-18, estão envolvidas no início e na amplificação da resposta, enquanto que as anti-inflamatórias como IL-10 e fator de crescimento transformante (TGF) β , modulam esses eventos de forma negativa, no intuito de controlar o estabelecimento do processo. Dentre as pró-inflamatórias, IL-1 (α e β) e TNF são moléculas com extremo potencial inflamatório: são as citocinas primárias que medeiam, dentre outros, o recrutamento de leucócitos (Calixto *et al.*, 2004; Feghali e Wright, 1997).

Devido à importância das citocinas primárias, seu bloqueio poderia controlar doenças inflamatórias. A família IL-1 está associada com inflamação aguda e crônica. Seus membros, notadamente IL-1 β , têm sido estudados como alvo para o tratamento de síndromes inflamatórias locais e sistêmicas denominadas doenças “auto-inflamatórias”. Essas doenças distinguem-se das autoimunes pela célula-alvo, as células T nas autoimunes e monócito-macrófago nas auto-inflamatórias, que promove diretamente a inflamação. Algumas doenças auto-inflamatórias comuns sensíveis à neutralização de IL-1 β são: gota, diabetes tipo 2, insuficiência cardíaca, pericardite recorrente, artrite reumatoide e mieloma latente (Dinarello, 2011).

1.5.4 Inflamação Crônica e Anti-inflamatórios

O estabelecimento de inflamação crônica pode desencadear câncer. Estudos de populações revelam que indivíduos mais propensos a doenças inflamatórias crônicas têm risco mais elevado de desenvolver câncer. Além disso, acredita-se que 15% de todos os cânceres humanos podem ser causados, indiretamente, por condições infecciosas crônicas. Um possível mecanismo é a indução de danos ao DNA devido à grande produção de EROs pelos fagócitos, o que pode levar a mutações, primeiro passo para a formação de câncer. Macrófagos em especial podem ter um papel fundamental no processo. Além de recrutar e ativar leucócitos, os macrófagos também podem ativar fibroblastos para gerar reparação tecidual. Entretanto, a resposta exagerada na recuperação tecidual pode levar à formação de novos vasos sanguíneos, aumentando o aporte nutricional do câncer. Em certas condições, tumores derivados de macrófagos produzem uma quimiocina que medeia o tráfico de linfócito T regulador (cuja função é suprimir a ativação do sistema imune adaptativo para garantir a tolerância a antígenos próprios) para o sítio do tumor. Outros estudos sugerem que a resposta imune adaptativa associada a células *natural killers* constituem uma resposta eficiente ao desenvolvimento de tumores. Baseadas nessas evidências, várias pesquisas estão sendo feitas visando novas estratégias anticâncer baseadas em imunoterapias que podem fortalecer a imunidade adaptativa ou neutralizar as propriedades pró-câncer da imunidade inata (Visser, Eichten e Coussens, 2006).

Para evitar que a inflamação torne-se crônica utilizam-se compostos anti-inflamatórios, que podem agir em muitos passos do processo inflamatório. Por exemplo, um composto pode bloquear a biossíntese de mediadores pró-inflamatórios por interação direta com uma enzima chave (p. ex., inibição de COX-2) ou diminuindo a expressão da enzima (p. ex., compostos anti-inflamatórios esteroidais) ou reduzindo os níveis de substrato (p. ex., diminuição da liberação de ácido araquidônico). Além disso, um composto pode atuar tanto inibindo a liberação de mediadores estocados pré-formados (p. ex., liberação de histamina) ou bloqueando a interação do receptor mediador nas células alvo (p. ex., antagonistas de receptores de histamina). Um composto anti-inflamatório pode também atuar por imuno-estimulação (p. ex., maturação de células mieloides ou estimulação de fagocitose) que por sua vez promove um aumento da remoção de moléculas

sinalizadoras atacantes, que resulta em uma resposta inflamatória menos agressiva ao alérgeno desafiante (Andrade *et al.*, 2007).

1.5.5 Atividade Anti-Inflamatória de Algas

Encontram-se na literatura diversos trabalhos envolvendo atividade anti-inflamatória de plantas e algas, sendo mais comuns os estudos com plantas terrestres, justificados geralmente pelo seu uso na medicina popular. Já os estudos com algas justificam-se pela grande quantidade de compostos isolados de organismos marinhos com interessantes propriedades biológicas e farmacológicas.

Foram identificados diversos compostos anti-inflamatórios isolados de algas, tais como flavonoides, terpenoides, policetídeos, peptídeos, esterol glicosídeo, carboidratos, ácido quimímico e derivados (Meenakshi *et al.*, 2009; D'Orazio *et al.*, 2012; Mayer e Lehmann, 2000; Mayer e Hamann, 2004; Mayer *et al.*, 2009; Mayer *et al.*, 2011; Marques *et al.*, 2012; Araújo *et al.*, 2011).

Khan *et al.* (2008) avaliaram a atividade anti-inflamatória dos extratos metanólicos de 37 espécies de algas, sendo 6 clorófitas, 17 feófitas e 14 rodófitas coletadas na costa da Coréia. O ensaio foi feito pela metodologia de inflamação da orelha de camundongo, em que cada animal recebeu, como estímulo inflamatório, forbol e extrato dissolvido em etanol. Uma alga verde, quatro pardas e duas vermelhas apresentaram atividade de inibição acima de 70%, com destaque para *Ulva linza* (clorófitas), com 84% de inibição, e *Undaria pinnatifida* (feófitas), com 85%. Os autores sugeriram que ácidos graxos presentes nas algas podem ser responsáveis pela atividade anti-inflamatória.

Ananthi *et al.* (2010) estudaram o polissacarídeo bruto solúvel em água da alga parda *Turbinaria ornata* em relação a atividade antioxidante (frente aos testes: DPPH, consumo de óxido nítrico, inibição da peroxidação lipídica e ABTS) e anti-inflamatória (edema de pata induzido por carragenina e teste da permeabilidade vascular). A administração oral do polissacarídeo reduziu o edema de pata de maneira dose-dependente comparada ao edema de carragenina. De maneira semelhante, o polissacarídeo apresentou efeito inibitório dose-dependente na

permeabilidade vascular. Os autores consideraram o polissacarídeo bruto de *T. ornata* como potencial agente antioxidante e anti-inflamatório.

Mhadhebi *et al.* (2012) estudaram a atividade anti-inflamatória, por edema de pata induzido por carragenina, e efeito antiproliferativo *in vitro* de frações orgânicas (clorofórmio, acetato de etila e metanol) da alga parda *Cystoseira compressa*. As frações clorofórmio e acetato de etila exibiram atividade anti-inflamatória dose dependente. As frações apresentaram atividade anti-inflamatória interessante associada com atividade antiproliferativa, podendo estar relacionadas ao conteúdo fenólico total.

Poucos trabalhos de pesquisadores brasileiros foram realizados com atividade anti-inflamatória de algas. Bitencourt *et al.* (2008) testaram uma lectina da alga vermelha *Hypnea cervicornis* frente aos modelos de nocicepção e inflamação pelos modelos de contorção provocada por ácido acético, teste de formalina e placa quente, para nocicepção, e edema de pata induzido por carragenina e dextrana e modelo de peritonite. A lectina mostrou importante atividade antinociceptiva e anti-inflamatória através do sítio de ligação carboidrato-lectina.

Mais recentemente foram realizadas pesquisas com carboidratos sulfatados de algas e efeito anti-inflamatório. Marques *et al.* (2012) analisaram fucanas sulfatadas de *Padina gymnospora* e obtiveram redução de influxo de leucócitos pelo ensaio de células do exsudado peritoneal, mas nenhuma atividade citotóxica. Já Araújo *et al.* (2011) analisaram um polissacarídeo sulfatado isolado de *Solieria filiformis* nos ensaios de nocicepção e inflamação. O polissacarídeo diminuiu o número de contorções e a segunda fase do teste de formalina, entretanto não apresentou efeito antinociceptivo pelo teste da placa quente e também não apresentou atividade anti-inflamatória significativa pelos modelos de edema de pata por carragenina e dextrana.

1.6 Justificativa

Não há um grande número de estudos com atividades biológicas do gênero *Spatoglossum* com metabólitos secundários. Neste contexto, procurou-se avaliar o potencial das atividades antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória de extrato metanólico e frações da alga *S. schroederi*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as atividades antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória do extrato metanólico e frações da alga parda *Spatoglossum schroederi*.

2.2 Objetivos Específicos

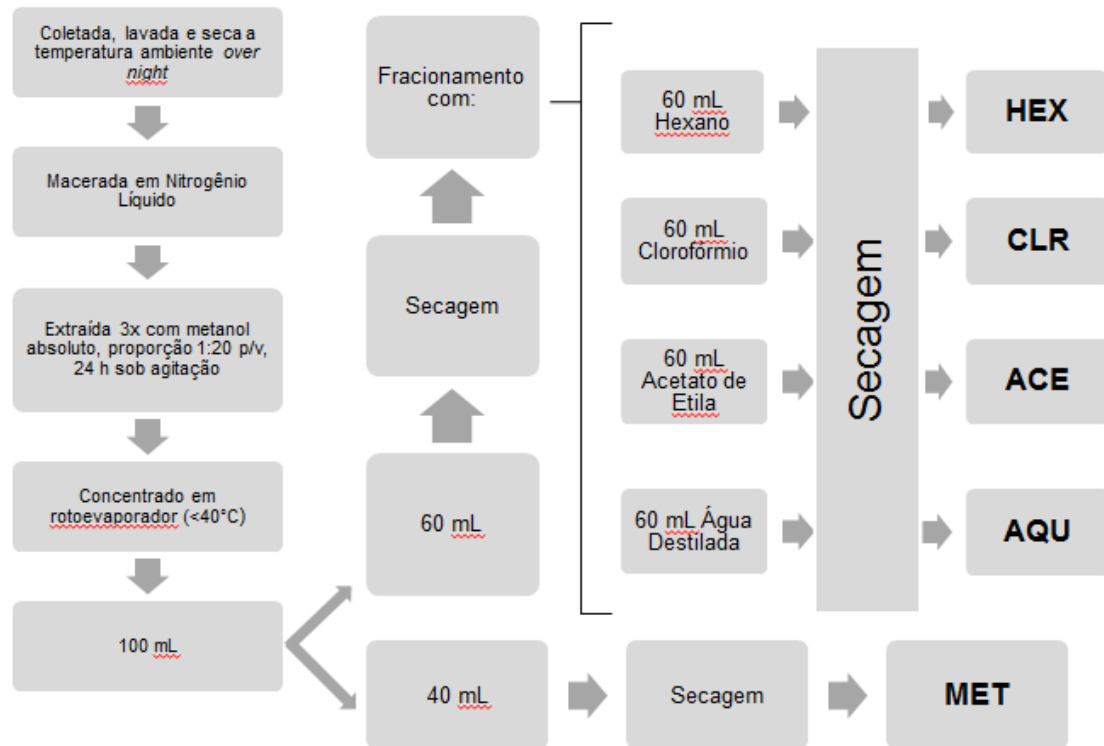
- Obter o extrato metanólico bruto (MET) de *Spatoglossum schroederi* e fracioná-lo sequencialmente com hexano (HEX), clorofórmio (CLR), acetato de etila (ACE) e água destilada (AQU);
- Dosar o conteúdo fenólico e teor de flavonoides do extrato MET e frações;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato MET e frações pelos métodos de Capacidade Antioxidante Total, Atividade Redutora, Sequestro do Radical DPPH e Quelação do Íon Ferroso;
- Determinar a atividade antimicrobiana do extrato MET e frações pelo método de difusão em ágar;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato MET e frações pelos ensaios de edema de pata induzido por carragenina e por dextrana, migração de leucócitos em peritonite induzida por carragenina, atividade da mieloperoxidase e dosagem de IL-1 β e IL-10.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparo do extrato metanólico e das frações hexânica e clorofórmica

A alga parda *Spatoglossum schroederi* foi coletada na Praia do Pacheco (Município de Caucaia, CE) e congelada. Posteriormente, foi lavada em água corrente, separada das epífitas e lavada com água destilada. Depois de secar à temperatura ambiente *over night*, a alga foi macerada em nitrogênio líquido. As amostras maceradas foram submetidas à extração por três vezes com metanol 100% na proporção de 1:20 (p:v) sob agitação mecânica e temperatura ambiente por 24 h, sendo depois centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min a 25°C. O sobrenadante foi concentrado em evaporador rotativo (temperatura máxima de 40°C) até volume de 100 mL, dos quais 40 mL foram separados e secos para obtenção do extrato bruto metanólico (MET), e os outros 60 mL foram secos e ressuspensos em água para obtenção das frações. Em seguida, foram particionados sequencialmente em três solventes diferentes: hexano (HEX), clorofórmio (CLR) e acetato de etila (ACE), fracionando os componentes do extrato MET de acordo com sua polaridade (Cho *et al.*, 2010). Para cada fração ou extrato, foi estimado o peso através de medições gravimétricas em triplicata usando 1 mL de cada. O rendimento de MET foi calculado tomando-se o peso da alga seca como referência, e o rendimento de cada fração foi calculado usando-se o peso total de MET como referência. As frações resultantes foram evaporadas em evaporador rotativo resultando nas frações HEX, CLR, ACE e aquosa (AQU). Devido aos rendimentos de ACE e AQU terem sido muito baixos, só foram utilizados MET, HEX e CLR. O extrato e as frações foram estocados a -20°C até o momento das análises. A figura 4 mostra o fluxograma da preparação do extrato MET e frações de *S. schroederi*.

Figura 4 – Fluxograma do preparo do extrato MET bruto e frações de *Spatoglossum schroederi*. MET – extrato metanólico; HEX – fração hexânica; CLR – fração clorofórmica; ACE – fração acetato de etila; AQU – fração aquosa



3.2 Atividade antioxidante

Para realização dos ensaios com atividade antioxidante, foram preparadas soluções estoques com metanol, a partir do extrato MET e frações secas HEX e CLR, na concentração de 2,0 mg/mL e as demais concentrações (1,5; 1,0; e 0,5 mg/mL) foram obtidas a partir dessa. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

3.2.1 Conteúdo Fenólico Total

Seguiu-se protocolo estabelecido por López *et al.* (2011). Amostras de 100 µL de cada concentração de MET, HEX ou CLR foram colocadas em tubos de ensaio com 8,4 mL de água; foram adicionados em seguida 0,5 mL do reagente de

Folin-Ciocalteu e 1 mL de carbonato de sódio a 20%. Os tubos foram agitados e deixados em repouso por 1 hora em temperatura ambiente e escuro. A absorvância foi medida a 765 nm. Uma curva de calibração de ácido gálico em metanol também foi preparada. Os resultados foram expressos como mg de Equivalente de Ácido Gálico (EAG)/g de extrato.

3.2.2 Teor de Flavonoide Total

Seguiu-se o protocolo estabelecido por Cox, Abu-Ghannam e Gupta (2010). Uma alíquota de 250 μ L de cada concentração de MET, HEX ou CLR foi misturada com 1,25 mL de água destilada e 75 μ L de solução NaNO₂ a 5%. Após 6 min, 150 μ L de solução AlCl₃.H₂O a 10% foram adicionados. Após 5 min, 0,5 mL de solução NaOH 1 M foi adicionado e em seguida o volume total foi ajustado para 2,5 mL com água destilada. Após homogeneização completa da solução, a absorvância contra branco foi determinada a 510 nm. A Quercetina foi usada para preparar a curva padrão e os resultados foram expressos como mg de Equivalente de Quercetina (EQ)/g de extrato.

3.2.3 Capacidade Antioxidante Total

Seguiu-se metodologia de Sun *et al.* (2011) com pequenas modificações. Alíquotas de 0,15 mL de cada concentração de MET, HEX ou CLR foram misturadas com 1,5 mL da solução reagente (ácido sulfúrico 0,6 M, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM). Os tubos foram lacrados com filme plástico e incubados a 95°C por 90 min em ambiente escuro. Os tubos foram, então, resfriados até a temperatura ambiente e a absorvância foi medida a 695 nm contra branco. Foi preparada uma curva padrão com ácido ascórbico e os resultados foram expressos em mg de Equivalente de Ácido Ascórbico (EAAsc)/mg de extrato. BHT 0,1 mg/mL foi usado como controle positivo.

3.2.4 Atividade Redutora

A atividade redutora foi avaliada de acordo com Zubia, Robledo e Freile-Pelegrin (2007) com pequenas modificações. Esse ensaio mede a capacidade antioxidante total de um extrato avaliando os potenciais redox dos compostos. Alíquotas de 0,5 mL de cada concentração de MET, HEX ou CLR foram misturadas com tampão fosfato (1,25 mL, 0,2 M, pH 6,6) e ferrocianeto de potássio ($K_3Fe(CN)_6$; 1,25 mL, 1%) e incubadas a 50°C por 20 min, depois resfriadas e misturadas com 1,25 mL de ácido tricloroacético (10%). Dessa mistura, 1,25 mL foi transferido para outros tubos de ensaio aos quais foram adicionados água destilada (1,25 mL) e $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (0,25 mL, 0,1%). A mistura foi mantida à temperatura ambiente por 10 min e a leitura da absorbância foi feita a 700 nm. BHT 0,1 mg/mL foi usado como controle positivo.

3.2.5 Atividade Sequestradora do Radical DPPH

Seguiu-se o protocolo de Cho *et al.* (2010) com adaptações. Uma alíquota de 0,75 mL de cada concentração de MET, HEX ou CLR foi misturada com 0,75 mL de DPPH 0,1 mM seguido de incubação por 1 h. A absorbância de cada amostra foi lida em 515 nm. A percentagem de DPPH sequestrado foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Sequestro de DPPH (\%)} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

Onde A_c é a absorbância do controle (0,75 mL de metanol com 0,75 mL de DPPH) e A_s é a absorbância da amostra. BHT 0,1 mg/mL foi usado como controle positivo.

3.2.6 Ensaio de Quelação do Íon Ferroso

O ensaio de quelação do íon ferroso foi baseado em Chew *et al.* (2008) com pequenas modificações. Foram misturados 0,5 mL de cada uma das seguintes

soluções: 0,1 mM FeSO₄, extrato MET ou frações HEX e CLR de várias diluições (variando de 0,5 a 2,0 mg/mL) e 0,25 mM de ferrozina. As misturas (em triplicata) foram incubadas por 10 min e a absorbância foi medida em 562 nm. O resultado foi expresso em percentagem de habilidade de quelação (% de habilidade de quelação), usando a seguinte equação:

$$\text{Habilidade de quelação (\%)} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

Onde A_c é a absorbância do controle (0,5 mL de FeSO₄, 0,5 mL de metanol e 0,5 mL de ferrozina) e A_s é a absorbância da amostra.

3.3 Atividade Antibacteriana

Para o ensaio antimicrobiano, o extrato MET e frações foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) 10% em água Milli-Q para solução estoque de 100 mg/mL, conforme metodologia estabelecida por Osman, Abushady e Elshobary (2010). As concentrações testadas foram de 50 e 100 mg/mL em triplicata para cada bactéria.

3.3.1 *Microrganismos Testados*

Para o ensaio antimicrobiano foram usadas duas bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*) e três Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* cepa resistente e *Pseudomonas aeruginosa*).

3.3.2 Atividade Antimicrobiana pelo Método de Difusão em Ágar

A atividade antimicrobiana iniciou-se na etapa de enriquecimento, na qual as bactérias foram ativadas pela transferência para eppendorfs com 2 mL de meio Luria-Bertani – LB (20 g/L) e deixadas sob agitação (100 a 120 rpm) a 37°C *over night*. Em seguida, na etapa de crescimento, as bactérias foram repicadas para tubos de ensaio contendo 6 mL de ágar triptona de soja – TSA (40 g/L) inclinado, e deixados *over night* para crescimento a 37°C. Preparou-se, então, usando alça de platina, uma suspensão bacteriana em solução salina até se obter concentração aproximada de $1,8 \times 10^8$ UFC (unidades formadoras de colônias)/mL na escala 0,5 de McFarland. Os tubos foram vortexados e os inóculos foram transferidos para placas de Petri com ágar Müller-Hinton usando Swab estéril.

A atividade antimicrobiana foi avaliada pela técnica de difusão de ágar segundo metodologia de Osman, Abushady e Elshobary (2010) com modificações. Os poços no meio ágar foram perfurados com o auxílio de um tubo de Durham (diâmetro de 6 mm), e 50 µL de cada concentração de MET, HEX ou CLR ou de solvente puro (controle negativo) foi adicionado aos poços. Para cada bactéria foram usados em triplicata dois controles positivos, sendo usados um disco de ampicilina e um segundo de penicilina ou gentamicina. As placas foram incubadas a 37°C por 24h e as leituras dos halos de inibição formados foram feitas com o auxílio de um paquímetro.

3.4 Atividade Anti-inflamatória

Para realização dos ensaios com animais, o extrato MET e frações foram dissolvidos em Tween 80 a 10% em salina e aplicados na dose de 100 mg/kg, conforme metodologia estabelecida por Pereira *et al.* (2008).

3.4.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Swiss (*Mus musculus*), pesando de 20 a 25 gramas, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os ensaios com os animais seguiram os padrões exigidos de ética e biossegurança, sendo a pesquisa submetida à Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (Protocolo CEPA/UFC N° 36/12).

3.4.2 Reagentes e Soluções Usados para Avaliar a Atividade Anti-Inflamatória

Tween 80, carragenina, dextrana e indometacina foram adquiridas de SIGMA ALDRICH (USA). Solução diluente consistiu de Tween 80 a 10% salina ou tampão PBS. Os kits para dosagem de citocinas foram da RD SYSTEM (USA). As demais soluções usadas são descritas a seguir.

Solução de turk (diluidor de glóbulos brancos):

- Ácido acético Glacial P. A (Merck)..... 20 mL;
- Violeta Genciana..... 2,0 mL;
- Água destilada..... 1000 mL.

Solução para pletismógrafo:

- Cloreto de Sódio (Vetec)..... 45,0 mg;
- Solução Padrão..... 0,3 mL;
- Água destilada..... 100 mL.

O pH foi ajustado para 1,8 – 2,0 com HCl (5 mL/L). As diluições foram feitas em solução salina 0,9%.

Solução de hematoxilina e eosina:

- Solução de hematoxilina de Carazzi;
- Solução saturada de carbonato de lítio;
- Soluções de eosina acidificadas com ácido acético;
- Creosoto xileno.

Solução para o ensaio de mieloperoxidase:

- Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB):

HTAB (Sigma) ----- 5 g;

Tampão fosfato de potássio ----- 1 L.

- Peróxido de hidrogênio 0,1%:

Peróxido de hidrogênio 30% (Vetec) -----1 mL;

Água destilada -----29 mL.

Solução de o-dianisidina (DDI):

- O-dianisidina (Sigma) -----16,7 mg;

- Tampão fosfato de potássio -----10,0 mL;

- H₂O₂ -----50,0 µL;

- Água destilada -----90,0 mL.

3.4.3 Edema de Pata Induzido por Carragenina (Cg) e Dextrana (Dxt)

O modelo do edema de pata induzido por Cg e Dxt foi realizado segundo o método descrito por Barbosa *et al.* (2009). Para cada ensaio, os animais foram divididos em seis grupos (n=5), a saber: Tween, carragenina ou dextrana, indometacina mais carragenina ou dextrana e cada uma das três amostras (MET, HEX e CLR, diluídos em solvente Tween 80 a 10% em salina) mais carragenina ou dextrana. A indometacina, na dose de 10 mg/kg, e cada extrato, na dose de 100 mg/kg, foram administrados por via intra-peritoneal (i.p.). O volume da pata traseira direita de cada camundongo foi medido usando pletismômetro (UGO BASILI) antes da injeção do estímulo inflamatório (tempo zero). Após uma hora, foram administrados 0,1 mL intraplantarmente (i.pl.) de Tween 80, carragenina (500 µg/pata, 100 µL) ou dextrana (500 µg/pata, 100 µL) na mesma pata. O volume da pata foi avaliado usando o mesmo pletismômetro em 1, 2, 3 e 4 h após a injeção da carragenina ou 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 h após a injeção da dextrana. O edema foi calculado pela diferença entre o volume da pata em um determinado tempo após o estímulo e o seu volume antes do estímulo inflamatório (tempo zero).

3.4.4 Ensaio da Migração de Leucócitos para a Cavidade Peritoneal Induzida por Carragenina

Os animais foram divididos em seis grupos (n=5): Tween, carragenina, indometacina mais carragenina e cada uma das três amostras (MET, HEX e CLR, diluídos em solvente Tween 80 a 10% em salina) mais carragenina. Para avaliar a migração de leucócitos, os animais foram tratados por via oral (v.o.) com indometacina (10 mg/kg) ou extrato (100 mg/kg) e, após uma hora, foram injetados intraperitonealmente 300 µg de carragenina diluídos em 250 µL de Tween 80 a 10% em salina ou apenas 250 µL de Tween. Após quatro horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a cavidade peritoneal foi lavada com 1,5 mL da solução de PBS heparinizado, massageada e incisada com bisturi para coleta do líquido com pipeta Pasteur.

Do líquido colhido, 20 µL foram diluídos em 380 µL de líquido de Turk (diluição de 1:20) e utilizados para contagem total de células em câmara de

Neubauer. Dessa solução foram pipetados 20 μ L e realizada a contagem total. Foi feita essa contagem nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer e o resultado foi multiplicado por 50 (20 da diluição e 2,5 do fator de correção da câmara). Para contagem diferencial de células, 20 μ L do exsudato foram colocados em citocentrífuga (10 min a 2800 rpm). Em seguida, as lâminas foram coradas com corante rápido HEMA3. A leitura foi realizada no microscópio óptico, com objetiva de imersão (aumento de 100x). Foram contadas 100 células em cada orifício (100 células por lâmina). O número total de neutrófilos foi estimado calculando-se as porcentagens do número total de células encontradas (Souza e Ferreira, 1985).

3.4.5 Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase (MPO)

Os animais submetidos ao ensaio de edema de pata por carragenina também foram utilizados neste ensaio. Após a quarta hora da aplicação da carragenina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a região plantar da pata traseira direita foi removida cirurgicamente. As amostras foram estocadas a -70°C para posterior dosagem da atividade de MPO no tecido.

A MPO é uma enzima encontrada predominantemente em grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares e tem sido usada como índice quantitativo para avaliar a inflamação em vários tecidos. Para tanto, as amostras foram suspensas em tampão de hexadeciltrimetilamônio (pH 6,0; 50mg de tecido por mL de tampão) e depois trituradas com um homogeneizador de tecidos. As amostras foram congeladas, descongeladas e trituradas três vezes. Posteriormente, foram centrifugadas a 4500 rpm, durante 12 min a uma temperatura de 4°C ; o sobrenadante foi, então, colhido. Os níveis teciduais da atividade de MPO foram determinados por meio da técnica descrita por Bradley, Christensen e Rothstein (1982), utilizando peróxido de hidrogênio 0,0005% como substrato para MPO, sendo uma unidade de MPO definida como a quantidade capaz de converter 1 μ mol de peróxido de hidrogênio a água em 1 min a 22°C . No ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio foi degradado, ocorreu a produção de ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianisidina em composto de cor marrom. A variação da densidade óptica da mistura das amostras com a solução de o-

dianisidina em função do tempo de reação foi medida por espectrofotômetro a 450 nm. Os resultados foram expressos como unidade de MPO/mg de tecido.

3.4.6 Dosagem das Citocinas IL-1 β e IL-10

A dosagem de citocinas foi realizada com líquido intraperitoneal extraído dos mesmos animais utilizados na contagem total e diferencial de leucócitos. Uma alíquota do líquido intraperitoneal foi reservada e congelada a -70°C até o momento da dosagem. Fez-se um ensaio de ELISA não convencional (ELISA sanduíche) em placa de 96 poços conforme protocolo descrito por Tavares-Murta *et al.* (2008) com modificações. O líquido intraperitoneal foi adicionado a um tampão inibidor de protease (1:200, v/v) e depois centrifugado a 3000 rpm a 4°C por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e incubado com 2 $\mu\text{g/mL}$ de anticorpo (anticorpo de captura) diluído em tampão de bicarbonato (pH 8.2), 100 μL por poço por 24 horas a 4°C . A placa foi lavada com PBS-Tween 20 a 0,1%. A reação foi bloqueada com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, 100 μL por poço por 2 horas à temperatura ambiente. Depois a placa foi novamente lavada usando a mesma solução. Amostras não diluídas e padrões foram colocadas na placa. A placa foi incubada com a curva padrão das citocinas (IL-1 β e IL-10) diluídas em tampão de lavagem, 100 μL por poço por 24 horas a 4°C . A placa foi novamente lavada e depois incubada com o anticorpo biotilado (1:1000) diluído em tampão de lavagem contendo 1% de soro de carneiro por 1h à temperatura ambiente. Novamente a placa foi lavada e depois incubada com avidina peroxidase (DAKO) diluída 1:5000 em tampão de lavagem, 100 μL por poço por 15 minutos à temperatura ambiente. A placa foi então lavada e incubada com o-fenilenediamina diidrocloreto (OPD) em tampão substrato, 100 μL por poço, no escuro à temperatura ambiente por um período que variou de 5 a 20 minutos dependendo da citocina. A reação foi parada com 150 μL por poço de H_2SO_4 1 M. A intensidade da coloração foi então medida em espectrofotômetro a 490 nm e os resultados foram expressos como média \pm EPM da quantidade de IL-1 β e IL-10 em pg/mL.

3.6 Análise estatística

Nos ensaios para avaliar efeito antioxidante, os resultados foram expressos como média e desvio padrão da média. A comparação das variáveis quantitativas foi feita usando análise de variância e diferenças estatisticamente significativas foram calculadas usando-se teste de Tukey para $p < 0,05$. Regressão linear foi feita para indicar relação entre conteúdo fenólico ou flavonoides e os resultados dos ensaios antioxidantes.

Nos ensaios para avaliar efeito anti-inflamatório, os resultados foram expressos como média e erro padrão da média para cada grupo de animais. Diferenças entre grupos experimentais foram comparadas por meio de Análise de Variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni. O critério para significância estatística foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade Antioxidante

Os resultados obtidos dos ensaios de atividade antioxidante para o extrato metanólico (MET) e das frações hexânica (HEX) e clorofórmica (CLR) da alga *Spatoglossum schroederi* são apresentados a seguir. No entanto, nenhum deles apresentou atividade de quelação do íon ferroso nas concentrações testadas.

4.1.1 Rendimento, Conteúdo Fenólico Total e Flavonoides Totais

O rendimento, conteúdo fenólico e flavonoides totais do extrato MET e das frações HEX e CLR da alga *S. schroederi* são mostrados na tabela 2. Os rendimentos das frações acetato de etila (ACE) e aquoso (AQU) também foram medidos, porém foram muito baixos e, portanto, não foram analisadas em ensaios posteriores. O rendimento de MET foi 11% (comparado ao peso original da alga macerada seca), o de HEX 36,2% (comparado ao peso total de MET) e o de CLR 56,6% (comparado ao peso total de MET), obtendo maior rendimento entre as frações. O conteúdo fenólico total de MET foi 11,75 mg EAG/g de amostra, HEX, que teve o valor mais elevado, foi de 14,10 mg EAG/g, e CLR, apesar de ter apresentado maior rendimento entre as frações, apresentou o menor conteúdo fenólico de 6,84 mg EAG/g. Os valores de flavonoides totais foram 215,39 mg EQ/g de amostra para MET, 278,79 mg EQ/g para HEX e 279,63 mg EQ/g para CLR.

Tabela 2 – Rendimento, conteúdo fenólico total e flavonoides totais do extrato metanólico e frações de *Spatoglossum schroederi*.

	Rendimento (%) [*]	Conteúdo Fenólico Total (mg EAG/g)	Flavonoides Totais (mg EQ/g)
MET	11,0	11,75±0,04	215,39±10,76
HEX	36,2	14,10±0,17	278,79±29,12
CLR	56,6	6,84±0,10	279,63±8,91

^{*} O rendimento do extrato metanólico foi calculado em p/p da alga seca, e o rendimento das frações foi calculado em p/p total do extrato metanólico.

Muitos autores consideram o solvente metanol como sendo capaz de gerar extratos com elevados rendimentos e conteúdo fenólico total em relação a outros solventes. Matanjun *et al.* (2008) obtiveram extratos de oito espécies de algas de Bornéu utilizando dois solventes diferentes (com metanol e dietil éter) e concluíram que os extratos metanólicos apresentaram os melhores rendimentos para todas as algas, variando de 1,88% (*Eucheuma spinosum*, rodófito) a 40,33% (*Dictyota dichotoma*, feófito). Também relataram que o maior rendimento de polifenóis por extração de metanol ocorreu em 72 horas. Airanthi, Hosokawa e Miyashita (2011) avaliaram o rendimento de extratos extraídos com os solventes metanol, etanol, acetona, clorofórmio, acetato de etila e hexano de cinco espécies de algas pardas comestíveis japonesas. Os maiores rendimentos foram obtidos com os extratos metanólicos variando de 7,25% (*Kjellmaniella crassifolia*) a 14,61% (*Alaria crassifolia*). Cho *et al.* (2010) analisaram os extratos brutos com metanol a quente e quatro frações derivadas destes (hexano, clorofórmio, acetato de etila e água) de quatro algas verdes da Coreia. O rendimento do extrato bruto variou de 3,5% a 14,8%.

A comparação dos resultados obtidos para conteúdo fenólico total deste trabalho com os da literatura é dificultada devido ao uso de diferentes unidades e preparações dos extratos metanólicos. Por exemplo, os valores de conteúdo fenólico total obtidos por Matanjun *et al.* (2008) foram expressos em mg de equivalente de floroglucinol/g de extrato, sendo *Sargassum polycystum* a espécie de maior teor de fenóis (45,16 mg EF/g). Airanthi, Hosokawa e Miyashita (2011) obtiveram os maiores rendimentos para fenóis nos extratos metanólicos variando de 5,94 a 31,33 mg de equivalente de pirocatecol/g de extrato. Lim *et al.* (2002) utilizaram EAG/g de extrato para expressar o conteúdo de fenóis e analisaram o extrato metanólico bruto (obtido por Soxhlet), bem como frações diclorometano, acetato de etila, butanol e água da alga parda *Sargassum siliquastrum*. O extrato metanólico bruto tinha 51 mg EAG/g de amostra, as frações diclorometano (62,2 mg EAG/g) e acetato de etila (64,1 mg EAG/g) apresentaram os maiores conteúdos de fenóis. Cho *et al.* (2010) obtiveram valores variados entre os extratos brutos de 9,0 a 26,2 mg EAG/g de amostra, e entre as frações variando de 7,5 a 43,8 mg EAG/g de amostra. Entre as frações, geralmente as clorofórmicas apresentaram valores mais elevados de fenóis. Cox,

Abu-Ghannam e Gupta (2010) analisaram extratos metanol, etanol e acetona (60%) de seis algas comestíveis da Irlanda, tendo resultados promissores de conteúdo fenólico variando de 37,66 a 151,33 mg EAG/g de extrato.

A determinação de flavonoides totais em algas é um dado importante, uma vez que possuem uma grande variedade de atividades biológicas, tais como antimicrobiano, antiviral, antiulcerogênico, citotóxico, antineoplásico, antioxidante, antihepatotóxico, antihipertensivo, hipolipidêmico, antiinflamatório, antiplaquetário (Machado *et al*, 2008). Para flavonoides totais Cho *et al.* (2010) obtiveram valores variados entre os extratos brutos de 27,4 a 131,1 mg EQ/g de amostra, e entre as frações variando de 8,6 a 180,3 mg EAG/g de amostra. Cox, Abu-Ghannam e Gupta (2010) obtiveram valores menores para flavonoides, variando de 7,66 a 42,5 mg EQ/g.

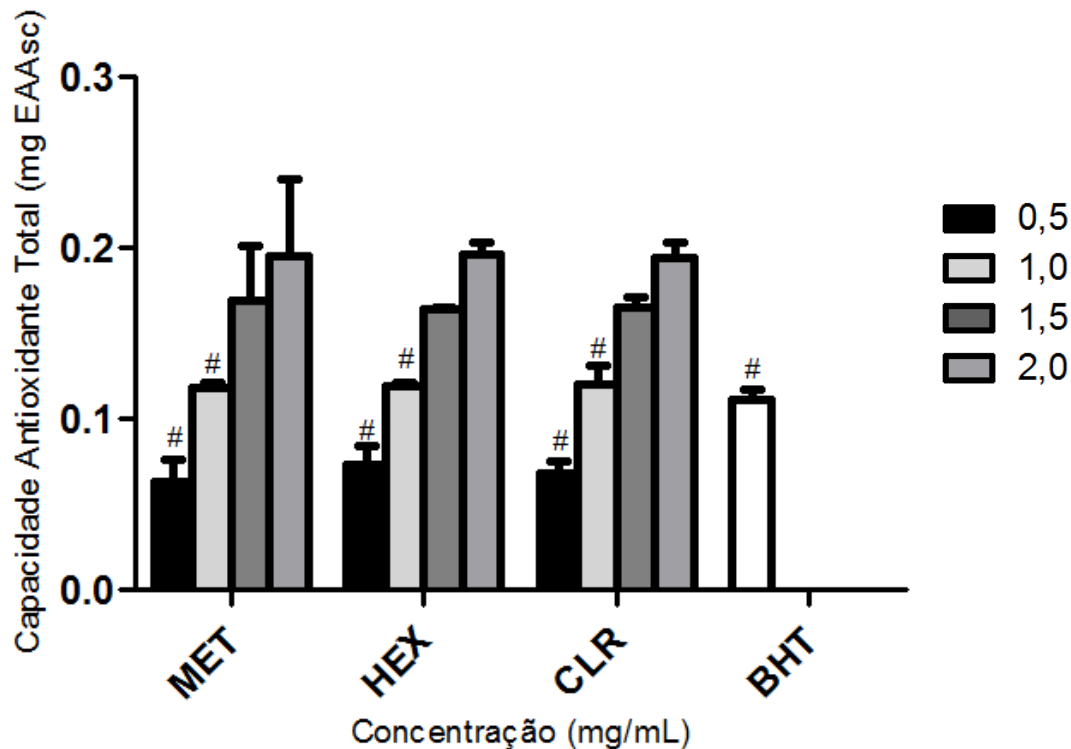
Portanto, resumidamente, obteve-se um bom rendimento para o extrato bruto de *S. schroederi*; o conteúdo fenólico do extrato bruto e das frações foi baixo, em especial comparando-se a outras algas pardas, e os valores foram elevados para flavonoides variando de 215 a 279 mg EQ/g.

4.1.2 Capacidade Antioxidante Total

A capacidade antioxidante total reflete a capacidade de um sistema de defesa antioxidante não enzimático. No método fosfomolibdênio, o molibdênio VI (Mo^{6+}) é reduzido para formar um complexo verde de fosfato/ Mo^{5+} em pH ácido (Sun *et al.*, 2011).

A figura 5 mostra a capacidade antioxidante total de extrato metanólico e frações hexânica e clorofórmica de *S. schroederi*. Nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL todas as amostras testadas mostraram atividade semelhante ao controle positivo (BHT a 0,1 mg/mL), e todas foram estatisticamente superiores ao controle nas concentrações de 1,5 e 2,0 mg/mL. Para cada concentração, as amostras demonstraram valores muito próximos entre si neste ensaio. Na concentração de 1,0 mg/mL, os valores foram de aproximadamente 120 mg EAAsc/g.

Figura 5 – Capacidade Antioxidante Total do extrato MET e frações de *Spatoglossum schroederi*. As concentrações do extrato MET e frações foram de 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 mg/mL, e do controle positivo BHT foi de 0,1 mg/mL. (#) Valores estatisticamente equivalentes ao BHT, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). MET – extrato metanólico; HEX – fração hexânica; CLR – fração clorofórmica.



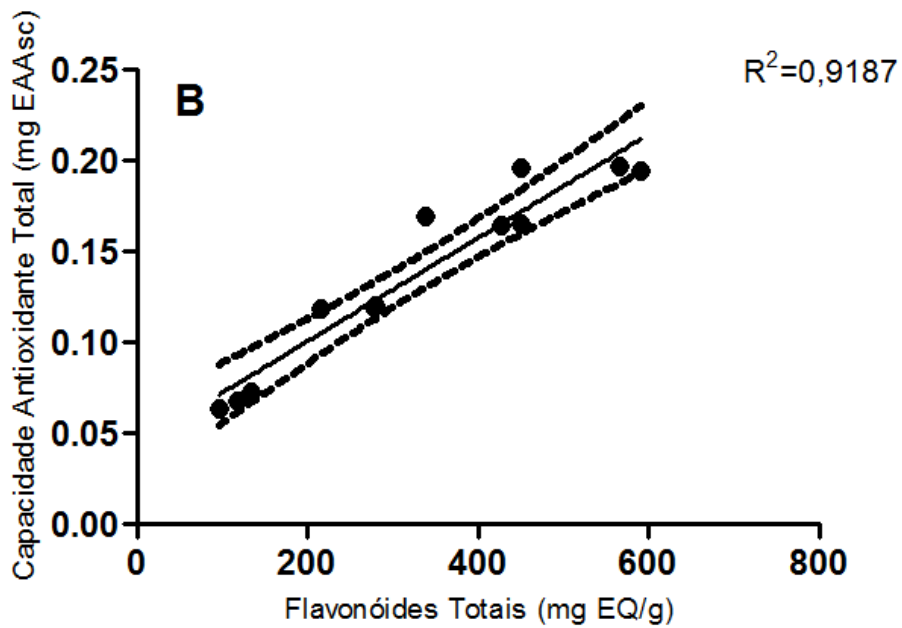
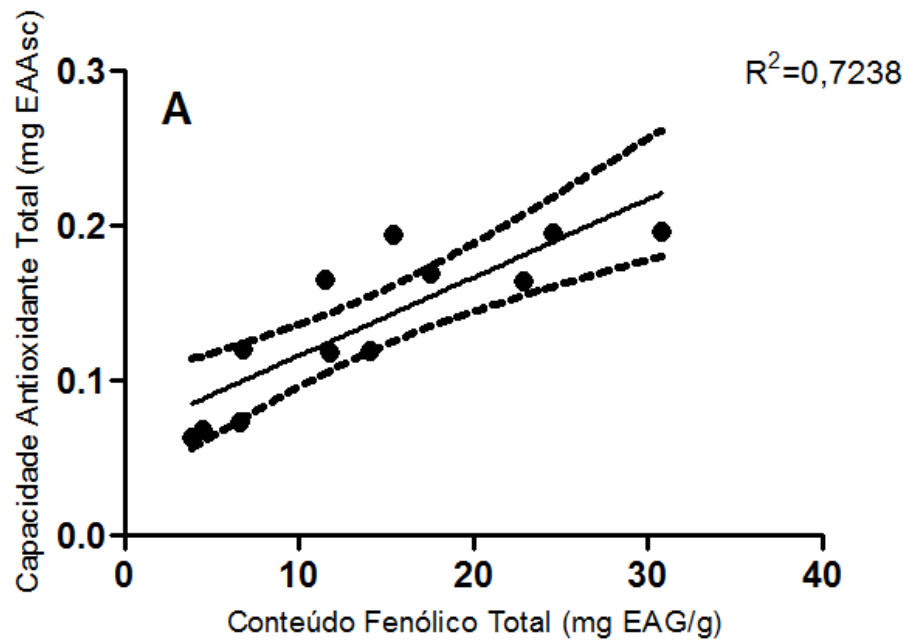
Ganesan, Kumar e Bhaskar (2008) pesquisaram extratos brutos metanólicos e cinco frações de três algas vermelhas da Índia. A maior atividade para capacidade antioxidante total foi para a fração acetato de etila de *Acanthophora spicifera*, com valor de 32,01 mg EAAsc/g de extrato. Chandini, Ganesan e Bhaskar (2008) pesquisaram extratos gerados pela mesma metodologia citada anteriormente para três algas pardas da Índia. A maior atividade foi observada para fração acetato de etila de *Sargassum marginatum*, com valor de 39,62 mg EAAsc/g. Entretanto, plantas terrestres exibem valores mais elevados nessa atividade antioxidante. Kumaran e Karunakan (2007) pesquisaram extratos metanólicos de cinco espécies do gênero *Phyllanthus* da Índia e encontraram valores que variam de 245 a 376 mg EAAsc/g de extrato da planta.

Diante do exposto, os resultados do trabalho são bastante promissores, pois demonstram que o extrato metanólico e as frações hexânica e clorofórmica de *S. schroederi* possuem elevada capacidade antioxidante.

Neste estudo foi realizada uma análise comparativa entre Capacidade Antioxidante Total do extrato MET e frações HEX e CLR de *S. schroederi* e conteúdo de fenólico total e flavonoides totais (figura 6). A figura 6A mostra alguma correlação ($R^2=0,7238$) entre Capacidade Antioxidante Total e conteúdo fenólico total. A figura 6B mostra que ocorreu correlação ($R^2=0,9187$), ou seja, quanto maior a concentração de flavonoides maior a Capacidade Antioxidante Total. Pelos dados obtidos, pode-se afirmar que a Capacidade Antioxidante Total de *S. schroederi* deve-se à presença de flavonoides.

Outros autores indicam que há correlação entre atividade antioxidante de algas e compostos fenólicos ou flavonoides. Matanjun *et al.* (2008) encontraram forte correlação entre conteúdo fenólico e poder redutor ($R^2=0,96$) nos extratos de oitos espécies de Bornéu. Sadati *et al.* (2011) encontram correlação entre conteúdo fenólico total e as frações metanol:água (1:1) ($R^2=0,999$) e clorofórmio ($R^2=0,9794$) de três algas pardas do golfo pérsico. Cho *et al.* (2010) encontraram, nas quatro clorófitas pesquisadas, forte correlação entre flavonoides totais e efeito sequestrador do radical hidroxila ($R^2=0,96$), e alguma correlação entre flavonoides e DPPH ($R^2=0,73$) e atividade redutora ($R^2=0,79$). Entretanto, há também muitos trabalhos na literatura que não encontraram relação entre atividade antioxidante e conteúdo fenólico, sugerindo que essas atividades sejam devidas a outros compostos como carotenoides (como a fucoxantina), tocoferol e clorofilas (Airanthi, Hosokawa e Miyashita, 2011; Lim *et al.*, 2002).

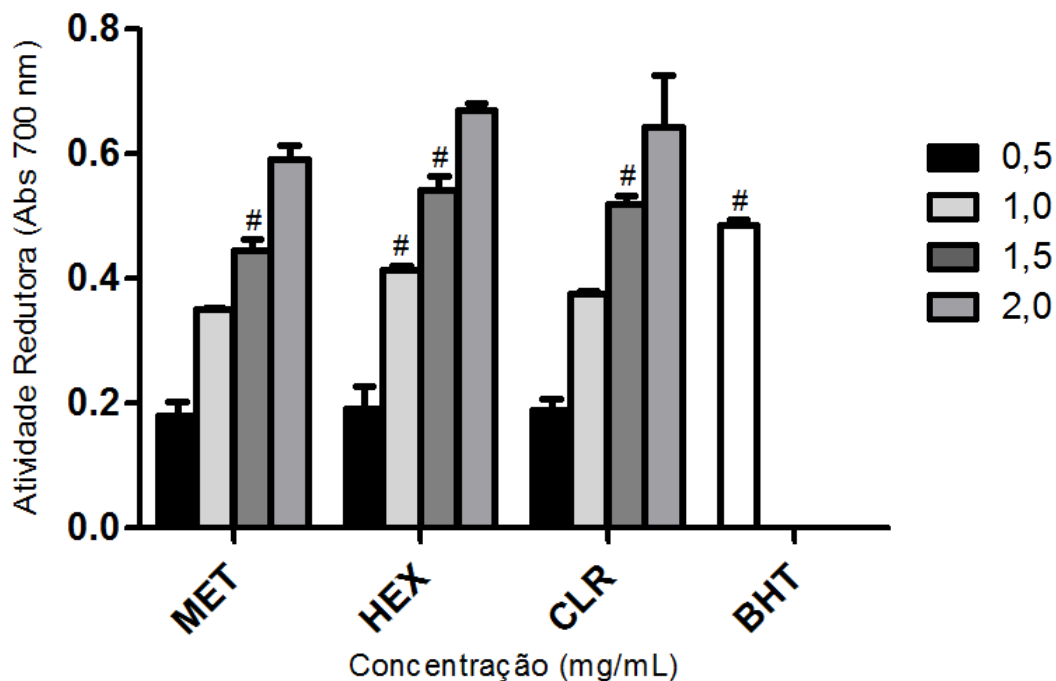
Figura 6 – Relação entre Capacidade Antioxidante Total e conteúdo fenólico total em (A) e Capacidade Antioxidante Total e flavonoides totais em (B). Linhas cheias representam a curva de regressão linear e linhas pontilhadas delimitam os intervalos de confiança em 95%.



4.1.3 Atividade Redutora

A propriedade poder redutor indica que os compostos antioxidantes são doadores de elétrons e podem reagir com intermediários oxidados do processo de peroxidação lipídica, atuando na interceptação de radicais livres (Yen e Chen, 1995). A figura 7 mostra a atividade redutora do extrato MET e frações de *S. schroederi*. As amostras nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL demonstraram atividade antioxidante inferior ao controle positivo (BHT 0,1 mg/mL), porém HEX, na concentração de 1,0 mg/mL, apresentou-se estatisticamente semelhante ao controle, indicando atividade antioxidante superior aos demais. Na concentração de 1,5 mg/mL todos foram equivalentes ao controle, e em 2,0 mg/mL todos foram superiores.

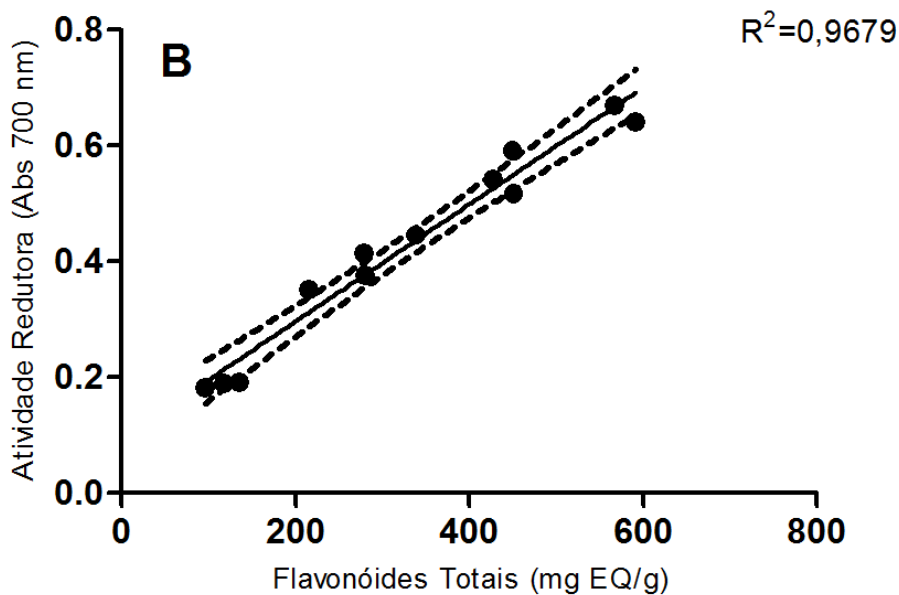
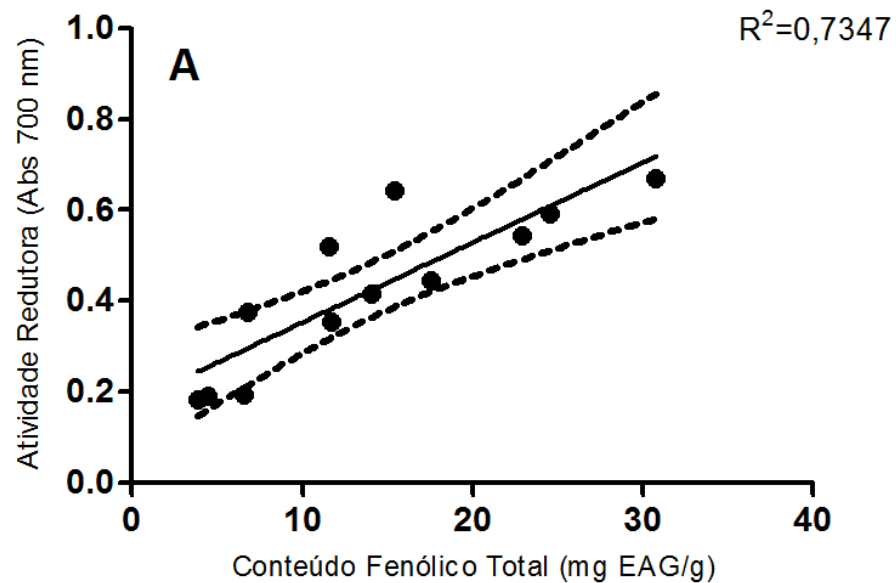
Figura 7 – Atividade Redutora do extrato MET e frações de *Spatoglossum schroederi*. As concentrações do extrato MET e frações foram de 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 mg/mL, e do controle positivo BHT foi de 0,1 mg/mL. (#) Valores estatisticamente equivalentes ao BHT, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). MET – extrato metanólico; HEX – fração hexânica; CLR – fração clorofórmica.



Ganesan, Kumar e Bhaskar (2008) obtiveram, dentre os extratos metanólicos, maior valor nessa atividade em *Euchema kappaphycus*, com valor próximo a 0,180 para uma concentração de 1,0 mg/mL. Chandini, Ganesan e Bhaskar (2008) obtiveram, dentre os extratos metanólicos, maior valor na atividade em *Turbinaria conoides*, com valor próximo de 0,100 para uma concentração de 1,0 mg/mL. Os valores obtidos para *S. schroederi* na concentração de 1,0 mg/mL superam os valores de *E. kappaphycus* e *T. conoides*, sendo 0,352 para MET, 0,414 para HEX e 0,376 para CLR. Entretanto Zubia, Robledo e Freile-Pelegrin (2007) obtiveram atividade redutora superior a 1,000 para o extrato bruto de *Lobophora variegata* na concentração de 0,5 mg/mL, ressaltando-se que essa alga foi uma das três espécies, dentre as 48 testadas, com maior atividade antioxidante pelo método DPPH.

A figura 8 traz a relação entre a atividade redutora e conteúdo fenólico total, e atividade redutora e flavonoides totais. Ocorreu alguma relação entre a atividade antioxidante e conteúdo fenólico total ($R^2=0,7347$), mas a correlação foi muito superior para flavonoides totais ($R^2=0,9679$). Esses dados evidenciam que a atividade redutora do extrato MET e frações HEX e CLR de *S. schroederi* se deve à presença de flavonoides.

Figura 8 – Relação entre Atividade Redutora e conteúdo fenólico total em (A) e Atividade Redutora e flavonóides totais em (B). Linhas cheias representam a curva de regressão linear e linhas pontilhadas delimitam os intervalos de confiança em 95%.

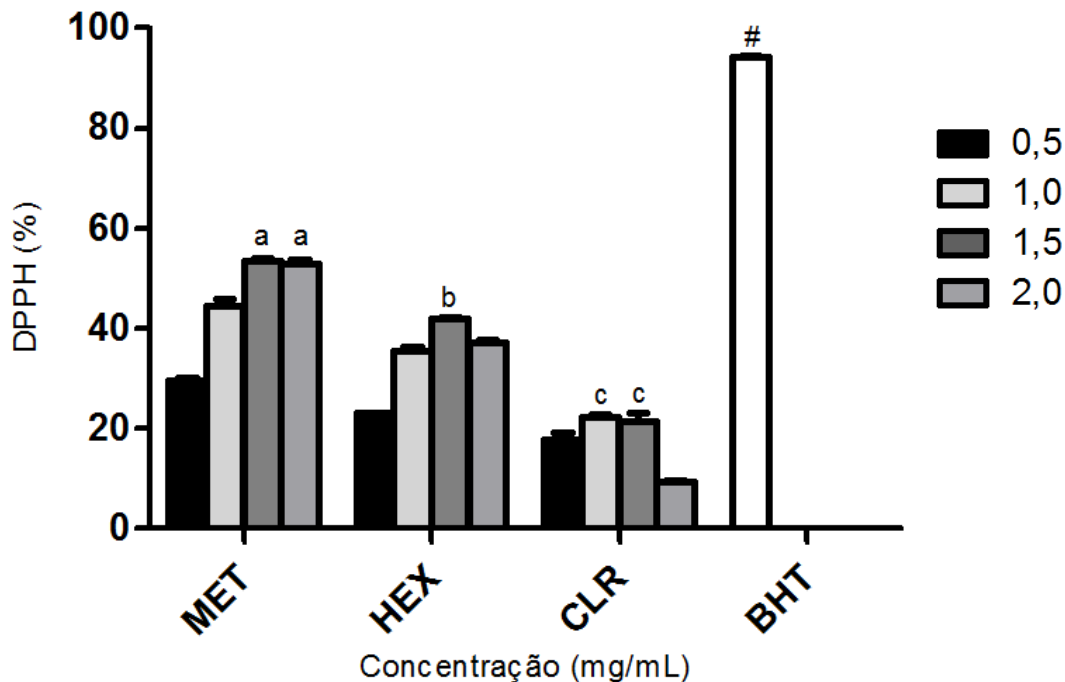


4.1.4 Sequestro do Radical DPPH

O sequestro do radical DPPH fornece um meio rápido e fácil de avaliar a atividade de consumo de radicais por antioxidantes. Certos compostos reduzem o número de moléculas de DPPH de maneira correspondente ao número de hidroxilas disponíveis (Brand-Williams, Cuvelier e Berset, 1995). A figura 9 mostra a atividade sequestradora do radical DPPH do extrato MET e frações HEX e CLR de *S. schroederi*. Todos apresentaram atividade antioxidante inferior à do antioxidante

sintético BHT (0,1 mg/mL) em todas as concentrações testadas. A maior capacidade de sequestro de radicais foi de MET, variando de cerca de 30% a 53%. Os resultados mostram que o pico de atividade antioxidante de todos os grupos ocorre na concentração de 1,5 mg/mL. Para as frações HEX e CLR ocorreu atividade pró-oxidante na concentração de 2,0 mg/mL, evidenciada especialmente por CLR.

Figura 9 – Atividade de Sequestro do Radical DPPH do extrato MET e frações de *Spatoglossum schroederi*. As concentrações do extrato MET e frações foram de 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 mg/mL, e do controle positivo BHT foi de 0,1 mg/mL. Em cada grupo, a concentração de 1,5 mg/mL apresentou atividade mais elevada e recebeu uma letra; concentrações com atividade equivalente receberam a mesma letra. Os maiores valores de cada grupo foram diferentes entre si. Nenhum grupo obteve atividade comparável ao BHT (#). Análises estatísticas realizadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). MET – extrato metanólico; HEX – fração hexânica; CLR – fração clorofórmica.

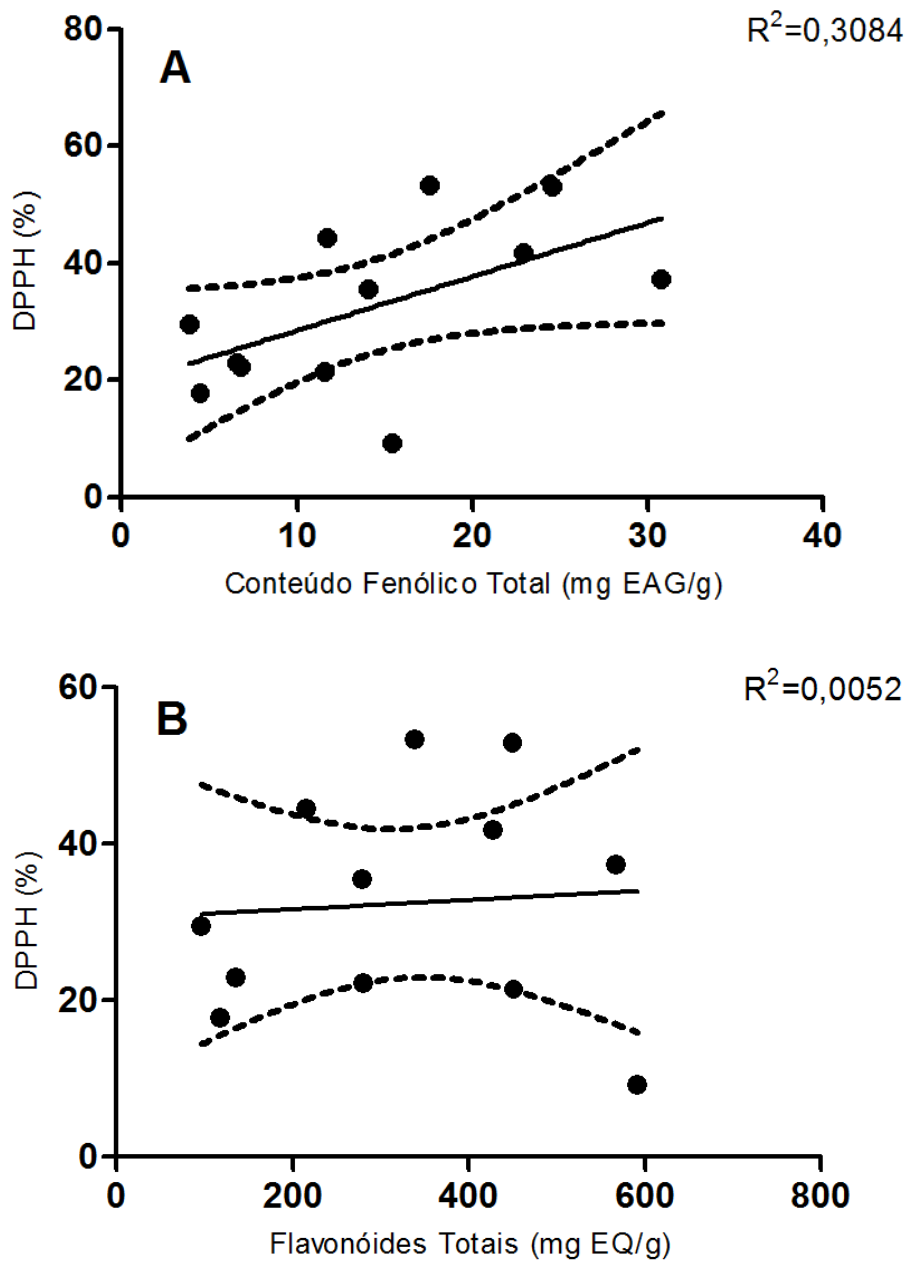


A literatura menciona vários compostos antioxidantes que, sob determinadas condições como concentração elevada, adquirem atividade pró-oxidante. As vitaminas, ácido ascórbico e α -tocoferol, por exemplo, já tiveram essa atividade evidenciada em ensaios *in vitro* (Ratnam *et al.*, 2006; Zubia, Robledo e Freile-Pelegrin, 2007). Alguns extratos e substâncias extraídas de algas também apresentam atividade pró-oxidante. Raymundo, Horta e Fett (2004) encontraram atividade pró-oxidante, nos estágios iniciais da auto-oxidação do ácido linoléico, nos

extratos etéreos de *Ulva fasciata* e *Enteromorpha intestinalis*, e nos extratos metanólicos de *U. fasciata* e *Chaetomorpha decorticatum*. Tutour *et al.* (1998) encontraram atividade pró-oxidante para a fração metanólica-aquosa de *Laminaria digitata* no procedimento de auto-oxidação sinergista com vitamina E. Zubia, Robledo e Freile-Pelegrin (2007) encontraram atividade pró-oxidante em extrato de *Chondria baileyana* pela atividade sequestradora do radical superóxido. Entretanto, os mesmos autores ressaltam que a atividade pró-oxidante de um extrato não pode ser devidamente explicada até a identificação do composto responsável por essa atividade. Wanasundara e Shahidi (1998) encontraram efeito pró-oxidante de extrato aquoso-etanólico de chá verde em óleos comestíveis, possivelmente ligado ao efeito catalítico de suas clorofilas. Após desclorofilação do extrato, o mesmo passou a exibir atividade antioxidante. Para Yoshie-Stark, Hsieh e Suzuki (2003) os flavonoides, devido aos vários grupos hidroxilas fora dos anéis aromáticos, podem algumas vezes apresentar efeito pró-oxidante, atuando como fonte geradora de EROs.

A figura 10 apresenta relação entre DPPH e conteúdo fenólico total (em A) e flavonoides totais (em B). Não ocorreu relação entre os ensaios ($R^2=0,3084$ para conteúdo fenólico total e $R^2=0,0052$ para flavonoides totais) possivelmente pela atividade pró-oxidante das frações.

Figura 10 – Relação entre Sequestro do Radical DPPH e conteúdo fenólico total em (A) e Sequestro do Radical DPPH e flavonoides totais em (B). Linhas cheias representam a curva de regressão linear e linhas pontilhadas delimitam os intervalos de confiança em 95%.



4.2 Atividade Antibacteriana

Alguns autores afirmam que a busca de novos compostos antibacterianos vem diminuindo com o passar dos anos, apesar do surgimento de bactérias cada vez mais resistentes (Mota *et al.*, 2005; Davies, 2007). As algas podem ser uma fonte promissora de compostos antibacterianos. Algas de água doce ou marinha desenvolveram estratégias de defesa que resultam em uma enorme diversidade de compostos de diferentes vias metabólicas, que, segundo pesquisas recentes, demonstram ser fontes promissoras de novos compostos bioquimicamente ativos (Cardozo *et al.*, 2007). Existem evidências de que várias macroalgas são capazes de impedir por meios químicos a instalação de outros organismos em sua superfície (Hellio *et al.*, 2000).

A tabela 3 apresenta os valores da zona de inibição da atividade antibacteriana frente ao extrato MET e frações HEX e CLR de *Spatoglossum schroederi*. Foram testadas duas bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*) e três Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* cepa resistente e *Pseudomonas aeruginosa*). As amostras, devido à sua natureza apolar, foram dissolvidos em DMSO 10% em água Milli-Q na concentração de 50 e 100 mg/mL.

Para cada bactéria foram preparadas seis placas, nas quais foram colocadas: amostras (50 µL de extrato MET ou fração), controle negativo (diluyente), controle positivo (disco de antibiótico). Essa distribuição garantiu a triplicata de cada extrato e controles positivo e negativo para cada bactéria. A tabela 3 mostra os resultados obtidos da atividade antibacteriana em mm do halo de inibição para as amostras e controles. Nenhum halo de inibição foi formado pelas amostras nas concentrações testadas. A ausência de inibição pelo controle negativo (dado não mostrado) e inibição pelos controles positivos (antibióticos) valida os resultados do experimento.

Tabela 3 – Atividade antibacteriana do extrato MET e frações de *S. schroederi* pelo método de difusão em ágar. Os controles positivos (antibióticos) foram usados em disco. O controle negativo (DMSO 10%) não apresentou inibição (resultado não mostrado).

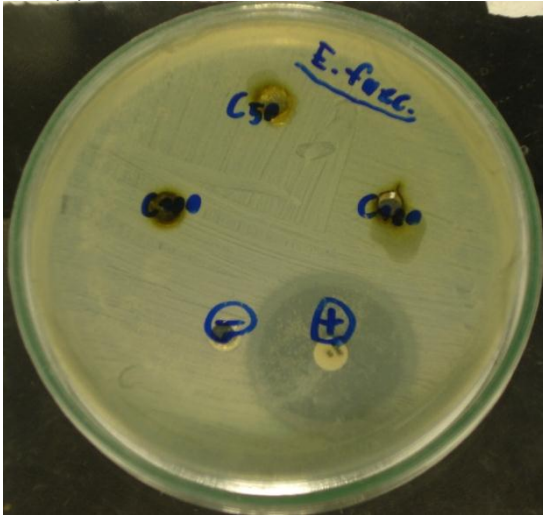
Material	Concentração (mg/mL)	Zona de inibição (mm)				
		<i>E.f.</i>	<i>S.a.</i>	<i>E.c.</i>	<i>K.p.</i>	<i>P.a.</i>
Amp		27,5±1,9	15,4±1,2	15,2±3,6	-	31,0±0,6
Pen		ND	ND	ND	-	20,7±0,8
Gen		29,1±0,7	19,3±0,8	16,8±2,3	ND	ND
MET	50	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-
HEX	50	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-
CLR	50	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-

Os valores foram expressos em mm da média do halo de inibição ± desvio padrão. Abreviaturas: Amp: disco de ampicilina; Pen: disco de penicilina; Gen: disco de gentamicina; *E.f.*: *Enterococcus faecalis*; *S.a.*: *Staphylococcus aureus*; *E.c.*: *Escherichia coli*; *K.p.*: *Klebsiella pneumoniae*; *P.a.*: *Pseudomonas aeruginosa*; ND: não determinado; -: sem inibição.

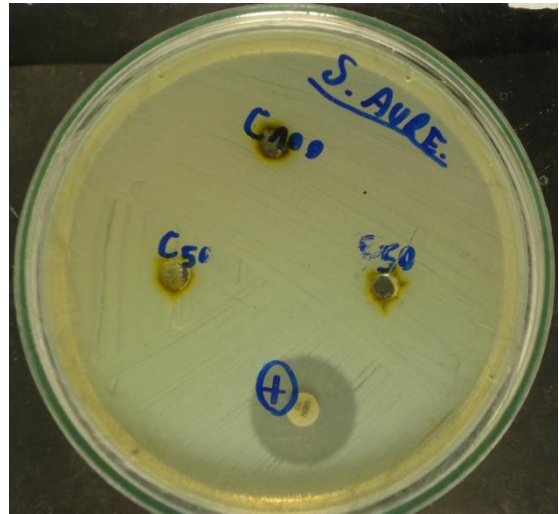
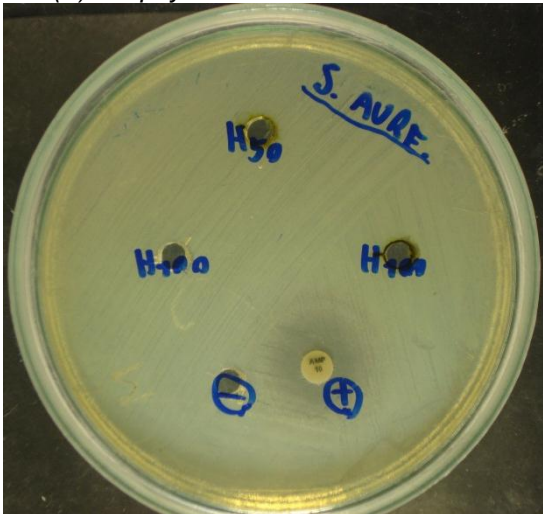
A figura 11 mostra algumas das placas, evidenciando a formação de halo de inibição apenas nos controles positivos (discos de antibiótico), e nenhum halo na cepa resistente de *K. pneumoniae*.

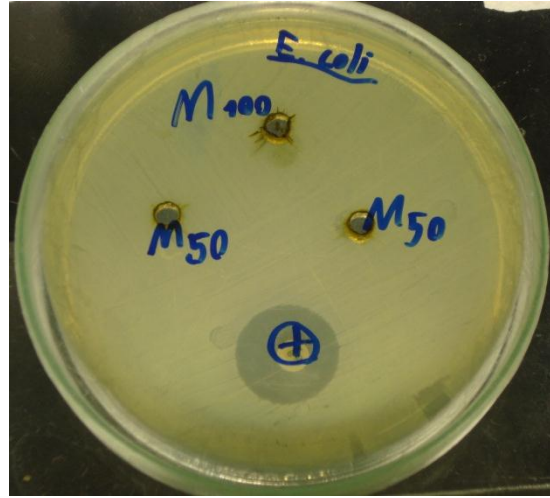
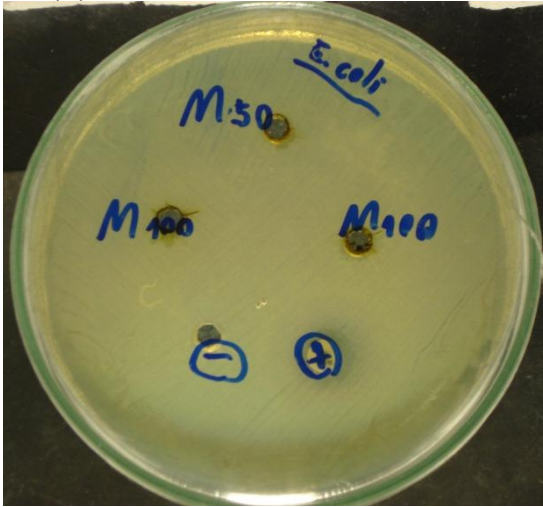
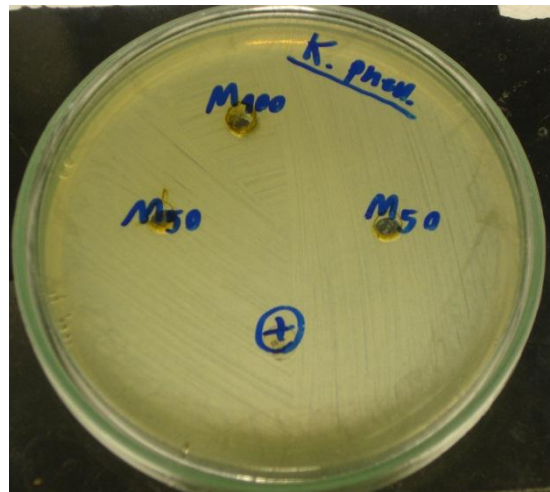
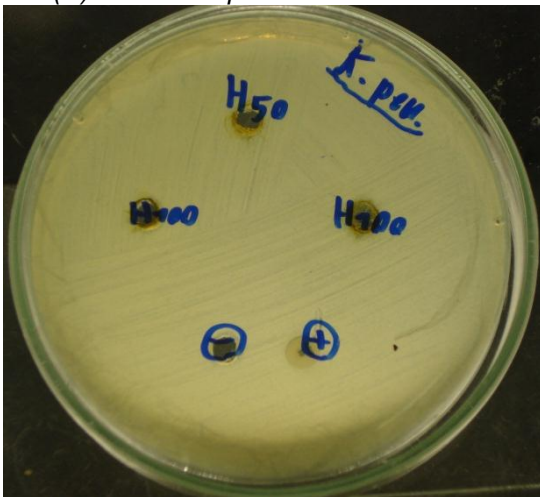
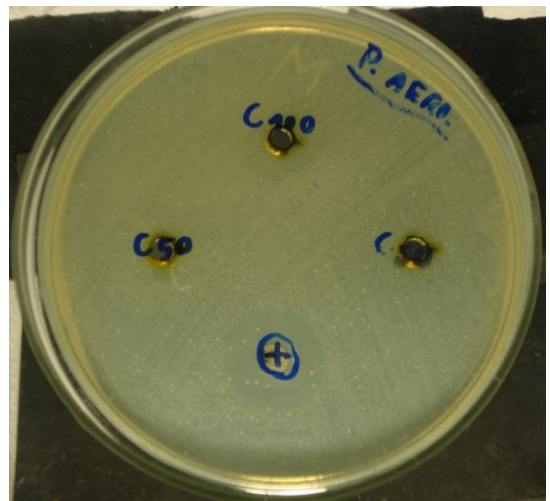
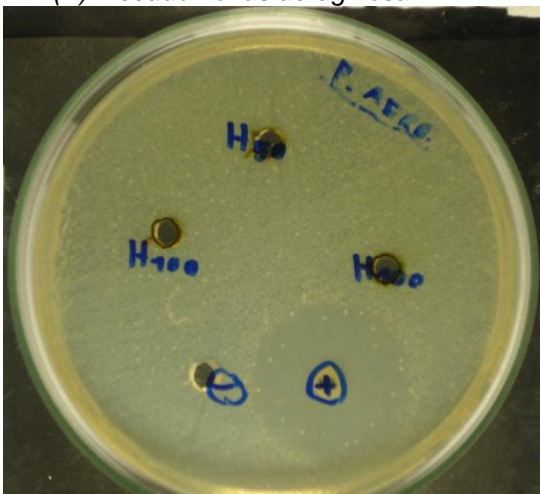
Figura 11 – Halos de inibição da atividade antibacteriana do extrato MET e frações HEX e CLR de *S. schroederi*. Para cada bactéria foram utilizadas 6 placas, sendo 2 para cada amostra (extrato bruto ou fração). Os pontos continham amostra em poços na concentração de 50 ou 100 mg/mL, disco com controle positivo (antibióticos ampicilina, gentamicina ou penicilina) ou controle negativo (poço contendo apenas DMSO 10%). Essa distribuição garantiu a triplicata para cada extrato e controles em cada bactéria. (A) *Enterococcus faecalis*; (B) *Staphylococcus aureus*; (C) *Escherichia coli*; (D) *Klebsiella pneumoniae*; (E) *Pseudomonas aeruginosa*. M₅₀ = 50 mg/mL de MET; M₁₀₀ = 100 mg/mL de MET; H₅₀ = 50 mg/mL de HEX; H₁₀₀ = 100 mg/mL de HEX; C₅₀ = 50 mg/mL de CLR; C₁₀₀ = 100 mg/mL de CLR; (+) = ampicilina, gentamicina ou penicilina; (-) = diluente (DMSO 10% em água Mili-Q).

(A) *Enterococcus faecalis*



(B) *Staphylococcus aureus*



(C) *Escherichia coli*(D) *Klebsiella pneumoniae*(E) *Pseudomonas aeruginosa*

Os resultados obtidos estão de acordo com Hodgson (1984), que não obteve ação antibacteriana para extrato metanólico de *S. schroederi* coletada na Flórida, embora tenha obtido atividade para os extratos clorofórmico (contra *S. aureus* e *B. subtilis*) e aquoso (contra *Beneckea harveyi*). Entretanto, vale ressaltar que o autor realizou extração sequencial com clorofórmio, metanol e água, respectivamente, diferindo do protocolo usado no presente trabalho, feito o extrato bruto com metanol absoluto e frações a partir deste.

É comum o relato de atividades antibacterianas divergentes para uma mesma espécie de alga pesquisada por diferentes autores. *Ulva fasciata*, por exemplo, foi relatada por Osman, Abushady e Elshobary (2010) como a alga de maior atividade antibacteriana dentre as nove espécies testadas, porém Lima-Filho *et al.* (2002) não detectaram inibição dessa alga contra nenhuma das 11 bactérias testadas.

Encontram-se, comumente, relatos de extratos de algas sem atividade antibacteriana. Chiheb *et al.* (2009) testaram 32 espécies de algas (verdes e pardas) do Marrocos e nove delas, sendo seis feófitas, não apresentaram atividade contra cinco bactérias testadas. Zheng, Chen e Lu (2001) testaram 23 espécies de algas da China com três extratos diferentes (etanol, acetona e metanol:tolueno 3:1). Cada alga testada teve pelo menos um extrato mostrando atividade contra pelo menos uma das quatro bactérias testadas, entretanto, extratos metanólicos de seis algas não apresentaram atividade antibacteriana. Freile-Pelegrin e Morales (2004) testaram dois extratos (etanólico e clorofórmio:metanol 2:1) de 21 espécies de algas do México contra três bactérias, sendo que três algas não apresentaram atividade.

Diferenças na atividade antibacteriana podem ocorrer devido a vários fatores, dentre eles protocolo de extração, variações sazonais, geográficas, estágio de maturidade sexual e outros fatores podem interferir nos metabólitos secundários sintetizados pela alga (Zheng, Chen e Lu, 2001; Salvador *et al.*, 2007; Osman, Abushady e Elshobary, 2010).

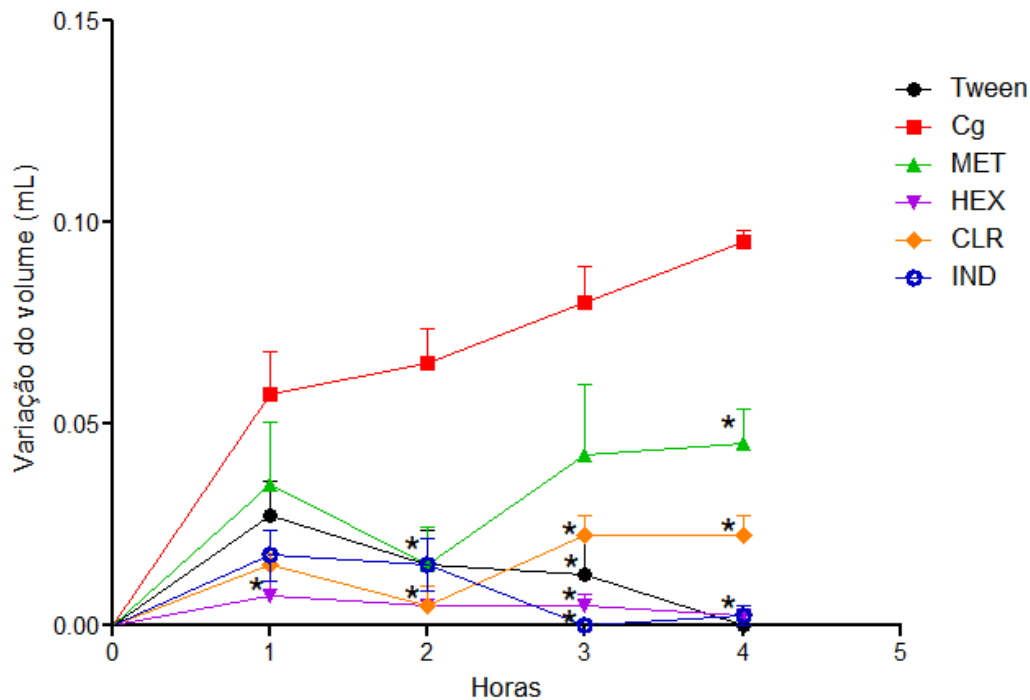
4.3 Atividade Anti-inflamatória

4.3.1 Edema de Pata Induzido por Carragenina

O desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina é bifásico. Na fase inicial ocorrem eventos vasculares, resultantes do aumento da concentração de histamina e serotonina do espaço extracelular. Na fase mais tardia ocorrem eventos celulares dependentes de citocinas produzidas pelas células residentes e infiltração de neutrófilos (Barbosa *et al*, 2009).

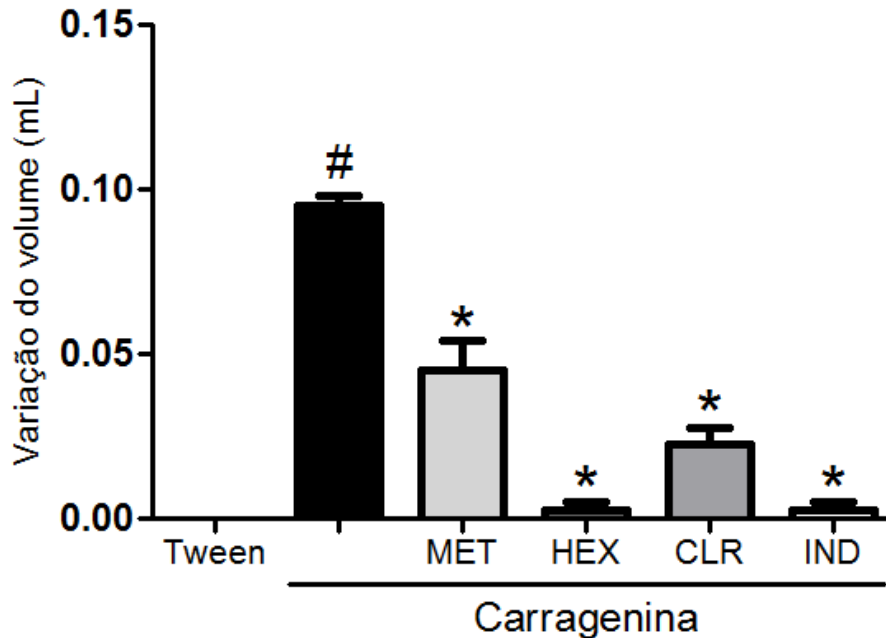
A figura 12 apresenta o efeito do extrato MET e frações de *S. schroederi* sobre o edema de pata induzido por carragenina (Cg). A melhor atividade foi de HEX, comparável estatisticamente à de indometacina. A fração HEX apresentou os melhores resultados na redução do edema, com os seguintes valores de variação do volume da pata e percentual de inibição: 0,0075 mL (equivalendo a 87% de inibição), 0,0050 mL (92%), 0,0050 mL (94%) e 0,0025 mL (97%), nas horas 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Os resultados para indometacina foram 0,0175 mL (70%), 0,0150 mL (77%), 0,0000 mL (100%) e 0,0025 mL (97%) nas horas 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Vale ressaltar que na primeira hora, apenas HEX foi significativamente diferente de Cg, sendo superior à indometacina nesse período. O extrato MET pareceu apresentar a inibição mais suave dentre os grupos testados, sendo o único grupo que não foi significativamente diferente de Cg na terceira hora.

Figura 12 – Efeito do extrato MET e frações HEX e CLR de *Spatoglossum schroederi* sobre edema de pata induzido por carragenina. Tween é o grupo que recebeu apenas o solvente i.pl. (Tween 80 a 10% em salina); Cg é o grupo controle que recebeu apenas carragenina i.pl. (500 µg/pata); IND é o grupo que recebeu indometacina i.p. uma hora antes da aplicação de carragenina. O extrato MET e as frações foram diluídos no solvente Tween para uma dose de 100 mg/mL e aplicados i.p. uma hora antes da carragenina. As medidas foram feitas após 1, 2, 3 e 4 horas após aplicação da carragenina. Em cada grupo n=5 e os pontos representam a média + E.P.M. da variação do volume das patas (mL). (*) p<0,05 indica diferença significativa quando comparado ao grupo Cg (ANOVA, Teste de Bonferroni). Cg – Carragenina; MET – extrato metanólico; HEX – fração hexânica; CLR – fração clorofórmica; IND – indometacina.



O pico do edema ocorreu na quarta hora após a aplicação do estímulo (figura 13). Todos os grupos foram significativamente diferentes de Cg, sendo os valores de MET 0,0450 mL (53%), e de CLR 0,0225 mL (76%).

Figura 13 – Efeito do extrato MET e frações HEX e CLR de *S. schroederi* sobre edema de pata induzido por carragenina na 4ª hora (pico do edema). Em cada grupo n=5 e as colunas representam a média + E.P.M. da variação do volume das patas (mL). (*) p<0,05 indica diferença significativa quando comparado ao grupo Cg e (#) p<0,05 indica valores estatisticamente equivalentes a Cg (ANOVA, Teste de Bonferroni).



Vários autores trabalharam com produtos de algas atuando sobre edema de pata induzido por carragenina. Ananthi *et al.* (2010) avaliaram um polissacarídeo da alga parda *Turbinaria ornata* e encontraram maior inibição, de 60,09%, para a concentração de 10 mg/kg na quinta hora. Dar *et al.* (2007) fizeram extração sequencial com hexano, metanol e butanol da alga *Sargassum wightii* em diferentes estações do ano, obtendo a maior inibição no extrato butanólico coletado no inverno, de 86,7%. Hong, Hien e Anh (2011) testaram extratos metanólicos de *Sargassum swartzii* e *Ulva reticulata* nas concentrações 175 e 350 mg/kg, em 2, 4, 6 e 24 horas. Para 4 horas *U. reticulata* não apresentou inibição e a inibição da dose mais elevada de *S. swartzii* foi de 17,99%. Mhadhebi *et al.* (2012) fizeram o extrato bruto metanólico da alga parda *Cystoseira compressa* e o fracionaram nas frações clorofórmio, acetato de etila e metanol, testando essas frações nas concentrações de 25 e 50 mg/kg, sendo o melhor resultado obtido na terceira hora para acetato de etila na concentração de 50 mg/mL, com inibição de 78,3%.

O ensaio de edema de pata induzido por carragenina mostrou que o extrato MET e frações de *S. schroederi* foram capazes de inibir a inflamação na

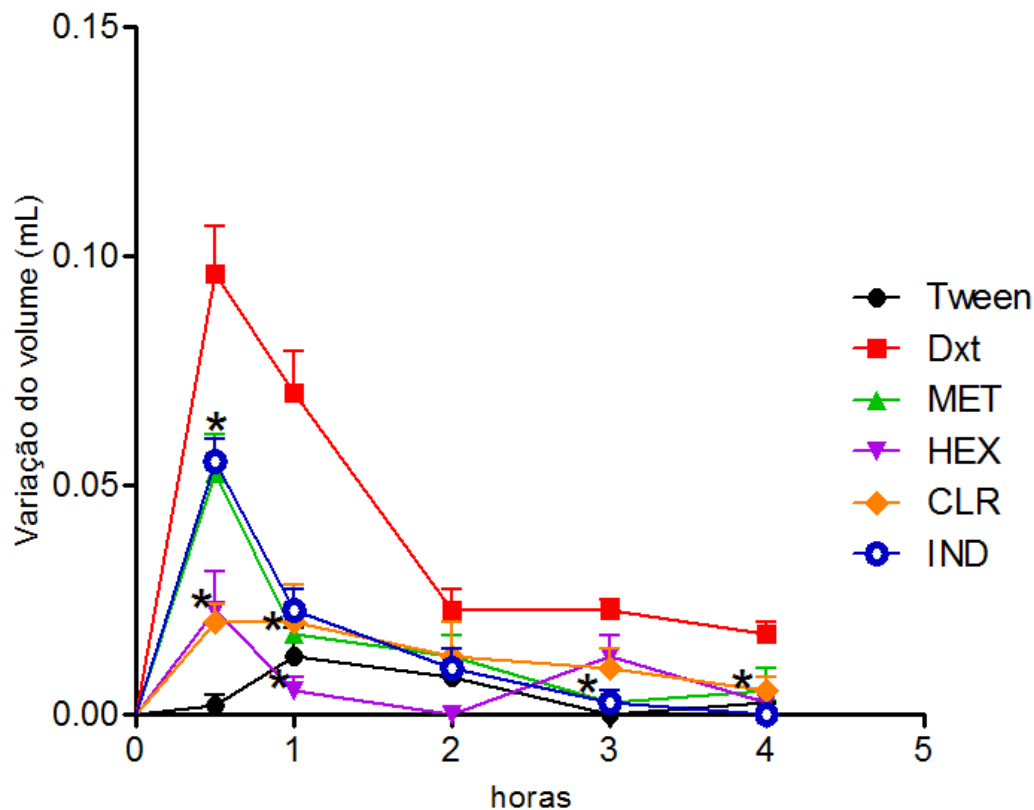
quarta hora, indicando uma possível redução dos eventos celulares (fase tardia). A fração HEX pode ter também um bom potencial inibidor de eventos vasculares, pois foi o único grupo significativamente diferente de Cg na fase inicial. Portanto, conclui-se que HEX também possui excelente efeito inibidor no pico do edema de pata induzido por carragenina, chegando próximo a 100%.

4.3.2 Edema de Pata Induzido por Dextrana

O modelo de edema de pata induzido por dextrana está relacionado a eventos vasculares. A inoculação de dextrana em extremidades de camundongos e ratos induz reação anafilática, que induz extravasamento de líquido e formação de edema, como consequência da liberação de histamina e serotonina pelos mastócitos (Andrade *et al.*, 2007).

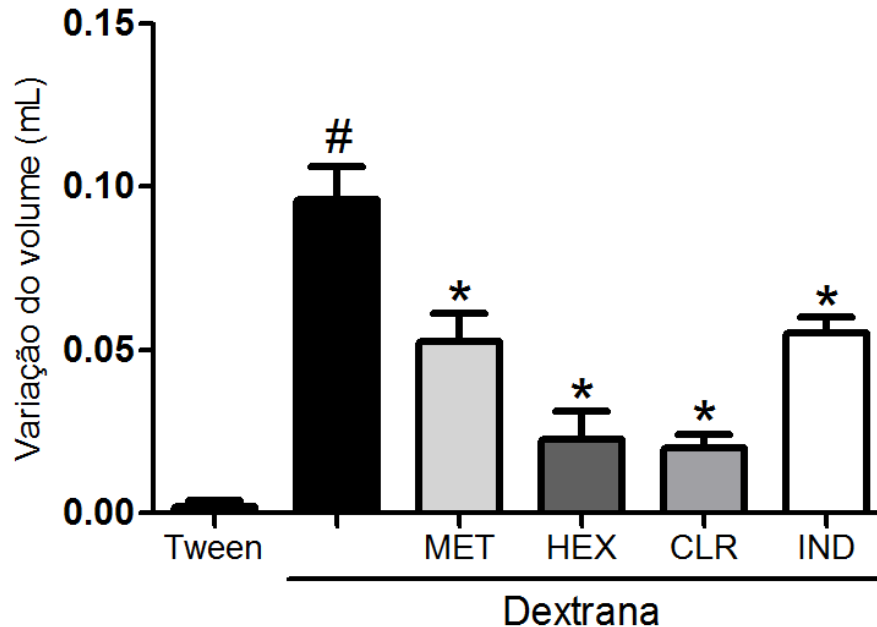
A figura 14 apresenta o efeito do extrato MET e frações de *S. schroederi* sobre o edema de pata induzido por dextrana (Dxt). A indometacina apresentou os valores de variação de volume e percentual de inibição: 0,0550 mL (equivalendo a 43% de inibição), 0,0225 mL (68%), 0,0100 mL (56%), 0,0025 mL (89%) e 0,0000 mL (100%) nos tempos 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 horas, respectivamente. A fração HEX apresentou, em geral, os melhores resultados, sendo o da primeira hora 0,0050 mL (93%) e o da segunda hora 0,0000 mL (100%), porém na terceira hora foi 0,0125 mL (44%).

Figura 14 – Efeito do extrato MET e frações HEX e CLR de *Spatoglossum schroederi* sobre edema de pata induzido por dextrana. Tween é o grupo que recebeu apenas o solvente i.pl. (Tween 80 a 10% em salina); Dxt é o grupo controle que recebeu apenas dextrana i.pl. (500 µg/pata); IND é o grupo que recebeu indometacina i.p. uma hora antes da aplicação de dextrana. O extrato MET e as frações foram diluídos no solvente Tween para uma dose de 100 mg/mL e aplicados i.p. uma hora antes da dextrana. As medidas foram feitas após 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 horas após aplicação da dextrana. Em cada grupo n=5 e os pontos representam a média + E.P.M. da variação do volume das patas (mL). (*) p<0,05 indica diferença significativa quando comparado ao grupo Dxt (ANOVA, Teste de Bonferroni). Dxt – Dextrana; MET – extrato metanólico; HEX – fração hexânica; CLR – fração clorofórmica; IND – indometacina.



O pico do edema ocorreu 30 minutos após a aplicação do estímulo (figura 15). Todos os grupos foram significativamente diferentes de Dxt, sendo os valores de: 0,0525 mL (45%) para MET, 0,0225 mL (77%) para HEX, e 0,0200 mL (79%) para CLR. Os valores do pico do edema de HEX e CLR são equivalentes, entretanto os valores seguintes, à exceção da terceira hora, sugerem superioridade de HEX.

Figura 15 – Efeito do extrato MET e frações HEX e CLR de *S. schroederi* sobre edema de pata induzido por dextrana em 30 minutos (pico do edema). Em cada grupo n=5 e as colunas representam a média + E.P.M. da variação do volume das patas (mL). (*) p<0,05 indica diferença significativa quando comparado ao grupo Dxt e (#) p<0,05 indica valores estatisticamente equivalentes a Dxt (ANOVA, Teste de Bonferroni).



Vários autores trabalharam com produtos de algas atuando sobre edema de pata induzido por dextrana. Araújo *et al.* (2011) analisaram o polissacarídeo da alga vermelha *Solieria filiformis*, que, administrado na dose de 1 mg/kg, diminuiu o aumento da permeabilidade vascular em 38,57%, porém o tratamento com doses maiores não teve efeito em relação a dextrana. Coura *et al.* (2012) analisaram o polissacarídeo sulfatado da alga vermelha *Gracilaria cornea* nas doses de 3, 9 e 27 mg/kg, obtendo inibição de 52,8, 47,3 e 40,2%, respectivamente, no pico do edema (30 minutos). Sousa *et al.* (2011) pesquisaram a galactana da alga vermelha *Gelidium crinale* nas doses de 0,01, 0,1 e 1 mg/kg, obtendo resultado satisfatório no pico do edema (30 minutos) apenas para a dose mais elevada, de 34%, apresentando as doses mais baixas um atraso na atividade. A dose intermediária inibiu 33% em 60 minutos, e a mais baixa 39% em 120 minutos.

Os resultados confirmam o potencial do extrato MET e frações de *S. schroederi* para inibirem os eventos vasculares, sendo todos significativamente distintos de Dxt, o que indica redução na liberação de histamina e serotonina pelos

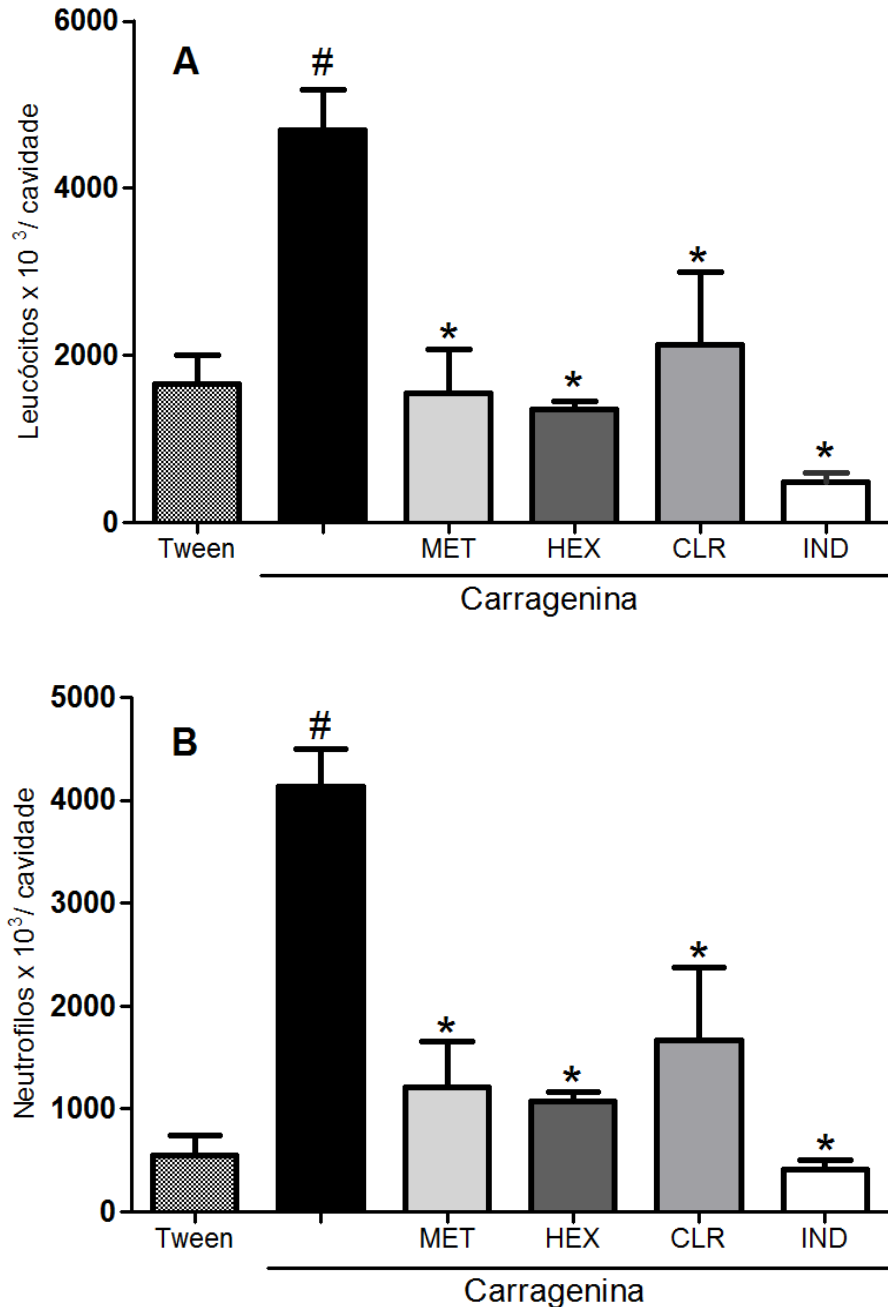
mastócitos. As frações HEX e CLR apresentaram valores similares comparados à literatura.

4.3.3 Contagem da Migração Total e Diferencial de Leucócitos em Cavidade Peritoneal Induzida por Carragenina

A contagem da migração de neutrófilos é considerada um bom método para estimar os eventos celulares da inflamação. Neste modelo, carragenina induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal por ativação indireta dos macrófagos (Souza *et al.*, 1988).

A figura 16 apresenta o efeito do extrato MET e frações de *S. schroederi* sobre a migração de leucócitos induzida por carragenina na cavidade peritoneal. Todos reduziram significativamente a migração de leucócitos totais (Figura 16A) e diferenciais (Figura 16B). HEX apresentou os melhores resultados para migração de leucócitos, tanto totais quanto diferenciais, inibindo 71% e 74%, respectivamente. A indometacina apresentou inibições de 90% em ambos os casos, superiores às das amostras.

Figura 16 – Efeito do extrato MET e frações HEX e CLR de *S. schroederi* na migração de leucócitos induzida por carragenina na cavidade peritoneal. Em (A) contagem total e em (B) contagem diferencial. As amostras, tween ou indometacina foram administrados por v.o. e, após 1 hora, foram aplicados 300 µg de carragenina i.p. Em cada grupo n=5 e as barras representam a média + E.P.M. do número de células x 10³/mL de fluido peritoneal. (*) p<0,05 indica diferença significativa quando comparado ao grupo carragenina e (#) p<0,05 indica valores estatisticamente equivalentes ao grupo carragenina (ANOVA, Teste de Bonferroni).



Vários trabalhos mostram produtos de algas atuando sobre a peritonite induzida por carragenina. Rodrigues *et al.* (2012) analisaram uma fração de polissarídeo sulfatado de *Caulerpa cupressoides*, que mostrou inibição significativa

de 46, 49 e 53% na migração de leucócitos e 64, 69 e 73% para neutrófilos, para as doses de 3, 9 e 27 mg/kg, respectivamente. Vanderlei *et al.* (2011) analisaram a fração do polissacarídeo sulfatado da alga vermelha *Gracilaria birdiae*, que, na dose de 10 mg/kg, inibiu 52% da migração de leucócitos. Mediram também inibição de neutrófilos (54,76%) e mononucleares (54%).

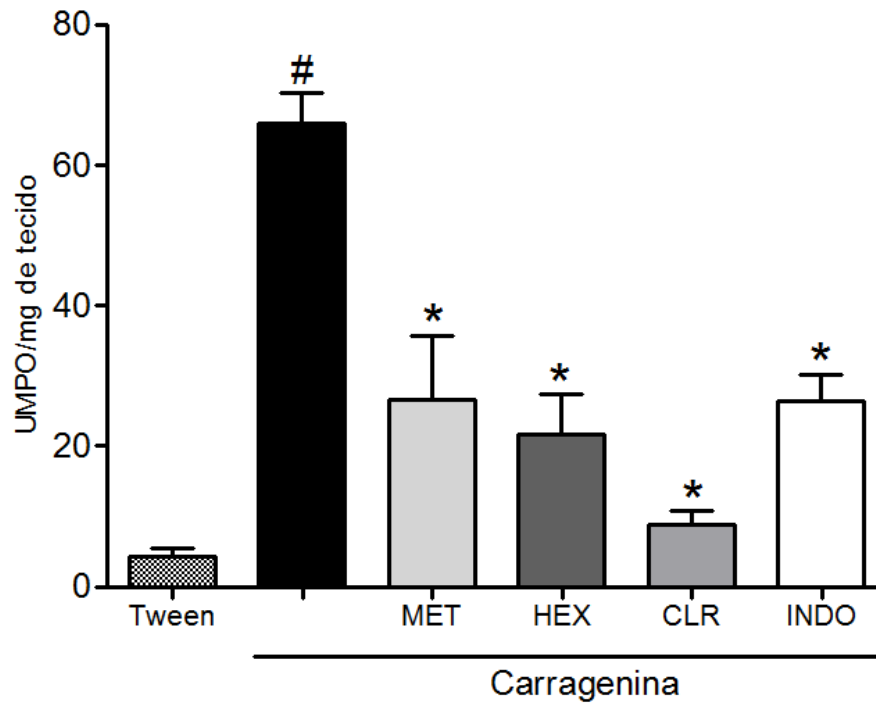
Os resultados do extrato MET e frações de *S. schroederi* na migração de leucócitos na peritonite induzida por carragenina corroboram com os resultados de edema de pata induzido por carragenina, confirmando que houve redução marcante dos eventos celulares, notadamente migração de neutrófilos. Os resultados desses dois ensaios sugerem que a fração HEX apresenta a melhor atividade inibitória frente aos eventos celulares da inflamação, também apresentando bons valores comparados à literatura.

4.3.4 Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase é uma proteína encontrada em grânulos azurófilos de neutrófilos. É uma hemoproteína microbicida, que está relacionada ao fagossomo ou ao espaço extracelular na presença de neutrófilos ativados (Faurichou e Borregaard, 2003). Essa enzima reage com peróxido de hidrogênio e produz EROs que combatem microrganismos invasores e ocasionalmente resultam em dano tecidual (Klebanoff, 2005). Portanto a atividade de MPO é considerada importante indicativo de progressão do processo inflamatório.

A figura 17 mostra o efeito do extrato MET e frações de *S. schroederi* na atividade de MPO. Todos os grupos foram significativamente distintos de Cg. Não ocorreu diferença estatística entre as amostras e a indometacina. CLR obteve a maior inibição percentual (87%), superior à indometacina (60%).

Figura 17 – Efeito do extrato MET e frações HEX e CLR de *S. schroederi* na atividade da mieloperoxidase. Os grupos são os mesmos do ensaio de edema de pata por carragenina. Cada extrato foi diluído no solvente Tween para uma dose de 100 mg/mL e aplicado 1 hora antes da carragenina. Em cada grupo n=5 e as colunas representam a média + E.P.M. de unidades de MPO/mg de tecido. (*) p<0,05 indica diferença significativa quando comparado ao grupo Cg e (#) p<0,05 indica valores estatisticamente equivalentes ao grupo Cg (ANOVA, Teste de Bonferroni).



Vários autores trabalharam com produtos de algas atuando sobre a atividade da MPO. Coura *et al.* (2012) obtiveram valores de inibição mais elevados entre as menores doses testadas para o polissacarídeo sulfatado de *Gracilaria cornea*. Araújo *et al.* (2011) obtiveram resultados em MPO semelhantes aos seus próprios para edema de pata por carragenina, tendo as doses mais elevadas (3 e 9 mg/kg) estimulado a migração de leucócitos em relação ao grupo que recebeu apenas carragenina. Vanderlei *et al.* (2011) encontraram para a fração do polissacarídeo sulfatado de *G. birdiae* nas doses de 10 e 20 mg/kg inibição da acumulação de leucócitos, medida por dosagem de MPO, de 59,3% e 36,92%, respectivamente. A dose de 5 mg/kg não apresentou inibição em relação ao grupo carragenina.

No resultado desse ensaio para o extrato MET e frações de *S. schroederi*, foram obtidos bons valores de inibição da atividade de MPO quando comparados à literatura, em especial para a fração CLR, confirmando redução da presença de neutrófilos no infiltrado. No entanto, esse resultado difere do edema de pata induzido

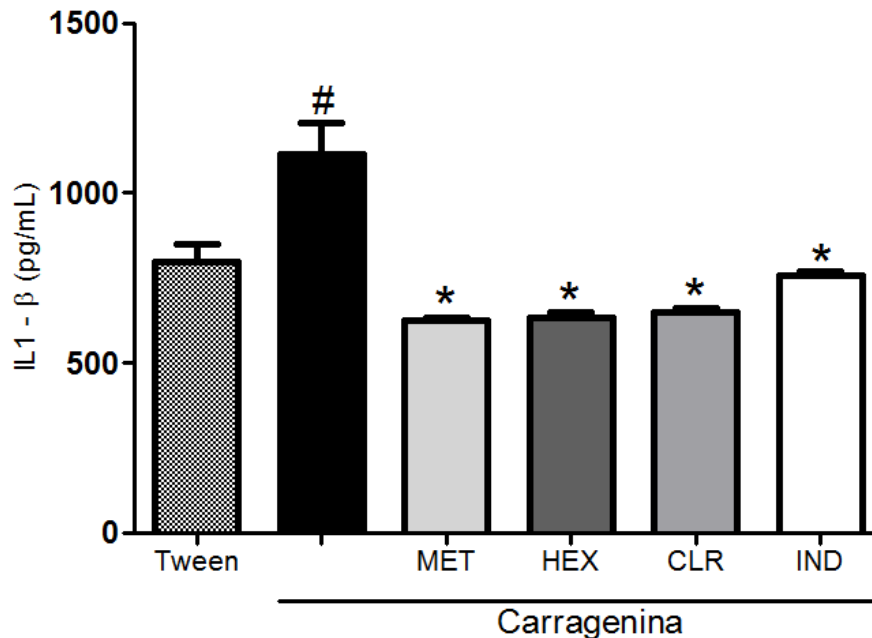
por carragenina e migração de leucócitos, no qual a fração HEX mostrou ter melhor atividade inibitória frente à fração CLR.

4.3.5 Dosagem das citocinas IL-1 β e IL-10

A interleucina-1 (IL-1) é uma forte citocina pró-inflamatória. As maiores fontes celulares de IL-1 são fagócitos mononucleares, fibroblastos, queratinócitos e linfócitos B e T. IL-1 pode induzir febre pela promoção da síntese de prostaglandina E2 pelo endotélio vascular do hipotálamo e proliferação de células T. Também induz liberação de histamina pelos mastócitos, que resultam em vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, e induz as células do endotélio a produzirem selectinas, ligantes de integrinas e quimiocinas, promovendo a migração de neutrófilos (Feghali e Wright, 1997; Ley et al, 2007; Abbas, Lichyman e Pillai, 2008).

A figura 18 mostra o efeito do extrato MET e frações de *S. schroederi* na produção de IL-1 β em peritonite induzida por carragenina. Os grupos tratados com extrato MET ou frações e também o grupo indometacina foram estatisticamente diferentes de Cg e apresentaram atividade semelhante entre si, reduzindo a produção de IL-1 β da ordem de 43% para a alga e 32% para indometacina. Não houve diferença significativa entre a indometacina e as amostras.

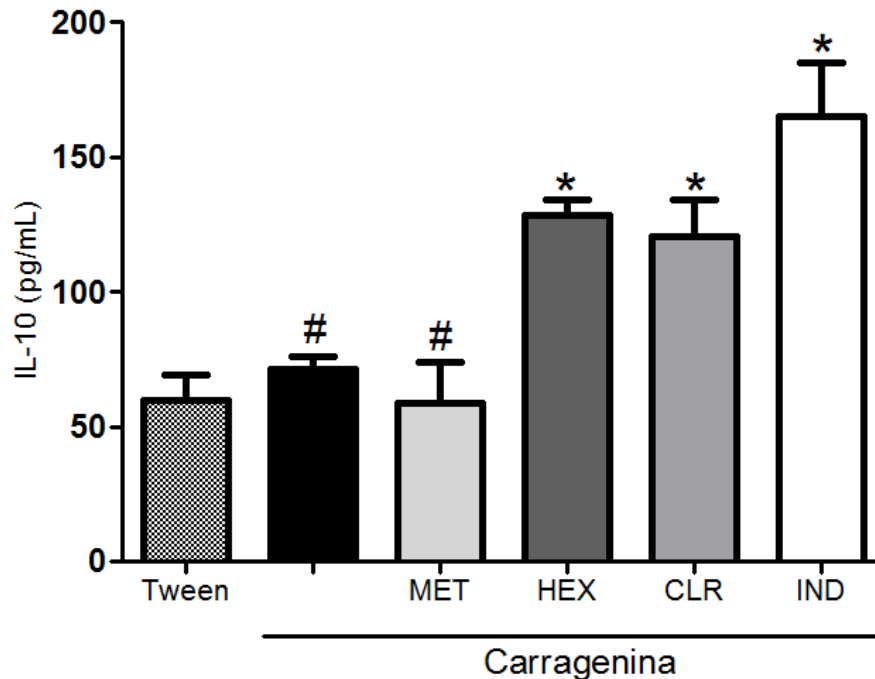
Figura 18 – Efeito do extrato MET e frações HEX e CLR de *S. schroederi* na dosagem de IL-1 β induzida por carragenina na cavidade peritoneal. As amostras, tween ou indometacina foram administrados por v.o. e, após 1 hora, foram aplicados 300 μ g de carragenina i.p. Em cada grupo n=5 e as barras representam a média + E.P.M. de picogramas de citocina/mL de fluido peritoneal. (*) p<0,05 indica diferença significativa quando comparado ao grupo carragenina e (#) p<0,05 indica valores estatisticamente equivalentes ao grupo carragenina (ANOVA, Teste de Bonferroni).



Interleucina-10 (IL-10) também é conhecida como “fator inibitório da síntese de citocinas”, pois inibe produção de diversas citocinas. Atua sobre várias células do sistema imune, reduzindo a proliferação de células T antígeno-específicas, inibindo a produção de IL-2 por células NK e também inibindo a produção de citocinas inflamatórias por macrófagos (Feghali e Wright, 1997).

A figura 19 mostra o efeito do extrato MET e frações de *S. schroederi* na produção de IL-10 em peritonite induzida por carragenina. O extrato MET não alterou a produção de IL-10 em relação a Cg, no entanto as frações HEX e CLR induziram aumento da expressão de IL-10, comparável com indometacina. A indometacina induziu aumento de 131% em relação à produção de Cg, e a melhor fração foi HEX com aumento de 80% em relação a Cg.

Figura 19 – Efeito do extrato MET e frações HEX e CLR de *S. schroederi* na dosagem de IL-10 induzida por carragenina na cavidade peritoneal. As amostras, tween ou indometacina foram administrados por v.o. e, após 1 hora, foram aplicados 300 µg de carragenina i.p. Em cada grupo n=5 e as barras representam a média + E.P.M. de picogramas de citocina/mL de fluido peritoneal. (*) p<0,05 indica diferença significativa quando comparado ao grupo carragenina e (#) p<0,05 indica valores estatisticamente equivalentes ao grupo carragenina (ANOVA, Teste de Bonferroni).



Não foram encontrados trabalhos na literatura dosando as mesmas citocinas, IL-1 β e IL-10, de extratos ou compostos de algas pelo modelo de peritonite induzida por carragenina. Castro *et al.* (2006) analisaram os efeitos da fração de açúcares ácidos de polissacarídeos da alga verde *Ulva rigida*, e a mesma fração dessulfatada, sobre cultura de células de exudado peritoneal de peixe, medindo, após 1 dia, a expressão de RNA mensageiro correspondente a IL-1 β . O polissacarídeo ácido resultou em significativo aumento da expressão de IL-1 β , e o polissacarídeo dessulfatado não afetou os níveis da citocina em relação ao controle. Bitencourt *et al.* (2011) analisaram extratos metanólico e aquoso de *Caulerpa mexicana* e concluíram que os extratos foram capazes de reduzir a produção de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-12 e TNF- α) em culturas de macrófagos peritoneais na presença de LPS.

O extrato MET e frações de *S. schroederi* parecem inibir tanto eventos vasculares quanto celulares no processo inflamatório. O mecanismo mais provável das amostras testadas para a inibição da inflamação está relacionado com os tipos

de mediadores liberados. Mastócitos são estimulados por IL-1 a liberar histamina, que resulta nos eventos vasculares (Feghali e Wright, 1997). Macrófagos teciduais estimulam a inflamação local pela liberação de citocinas inflamatórias primárias, IL-1 e TNF- α , que, por sua vez, ativam o endotélio do sítio inflamatório a produzir e expressar selectinas, ligantes de integrinas e quimiocinas, em conjunto, responsáveis pela migração e deslocamento para o sítio inflamatório (Ley *et al.*, 2007; Abbas, Lichtman e Pillai, 2008). Todas as amostras de *S. schroederi* diminuíram significativamente a produção da citocina primária IL-1 β , indicando que eles atuaram inibindo sua síntese pelas células residentes. Além disso, a citocina anti-inflamatória IL-10 teve seus níveis aumentados para as frações HEX e CLR. A fração mais ativa, de maneira geral, foi HEX, reduzindo IL-1 β de 1.116 (com carragenina, apenas) para 634 pg/mL, e aumentando a produção de IL-10 de 71 (com carragenina, apenas) para 128 pg/mL.

Diante dos resultados obtidos, notadamente para a fração HEX, sugerem-se estudos adicionais para esclarecer mais a fundo os mecanismos envolvidos e isolamento dos constituintes químicos ativos, no intuito de investigar possíveis aplicações farmacológicas e como antioxidante da alga parda *S. schroederi*.

5 CONCLUSÃO

Spatoglossum schroederi apresentou bom potencial antioxidante com elevada correlação com o teor de flavonoides totais, embora no ensaio de DPPH as frações tenham demonstrado atividade pró-oxidante em concentração superior a 1,5 mg/mL. Nas condições testadas não ocorreu atividade antibacteriana para nenhuma das bactérias analisadas. A alga mostrou, notadamente a fração hexânica, ótima atividade anti-inflamatória frente a modelos clássicos de inflamação aguda com redução de eventos vasculares e celulares, diminuição da citocina pró-inflamatória IL-1 β e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10, que podem ser justificados pelo elevado teor de flavonoides.

Dessa forma, *S. schroederi*, mais notadamente a fração hexânica, apresenta potencial uso farmacológico e como antioxidante. No entanto, novos estudos devem ser realizados para esclarecer com maior profundidade os mecanismos envolvidos, e novos esforços devem ser feitos para isolar suas moléculas bioativas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- AHER, V. D.; WAHI, A.; PAWDEY, A. M.; SONAWANE, A. Antioxidants as immunomodulator: an expanding research avenue. **Int. J. Curr. Pharm. Res.**, v. 3, n. 1, p. 8-10, 2011.
- AIRANTHI, M. K. W. A.; HOSOKAWA, M.; MIYASHITA, K. Comparative antioxidant activity of edible Japanese brown seaweeds. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. C104- C111, 2011.
- ALLER, M. A.; ARIAS, J. L.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response: an efficient way of life. **Med. Sci. Monit.**, v. 12, n. 10, p. RA225-234, 2006.
- ANANTHI, S.; RAGHAVENDRAN, H. R. B.; SUNIL, A. G.; GAYATHRI, V.; RAMAKRISHNAN, G.; VASANTHI, H. R. *In vitro* antioxidant and *in vivo* anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 187-192, 2010.
- ANDRADE, S. F.; CARDOSO, L. G. V.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 464-471, 2007.
- ARA, J.; SULTANA, V.; QASIM, R.; EHTESHAMUL-HAQUE, S.; AHMAD, V. U. Biological activity of *Spatoglossum asperum*: A brown alga. **Phytother. Res.**, v.19, p. 618-623, 2005.
- ARAÚJO, P. M.; OLIVEIRA, G. B.; CÓRDULA, C. R.; LEITE, E. L.; CARVALHO JR., L. B.; SILVA, M. P. C. Sulfated fucan as support for antibiotic immobilization. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 3, p. 301-305, 2004.
- ARAÚJO, I. W. F.; VANDERLEI, E. S. O.; RODRIGUES, J. A. G.; COURA, C. O.; QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. P.; QUEIROZ, I. N. L.; JORGE, R. J. B.; BEZERRA, M. M.; SILVA, A. A. R.; CHAVES, H. V.; MONTEIRO, H. S. A.; PAULA, R. C. M.; BENEVIDES, N. M. B. Effects of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1207-1215, 2011.
- ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. Antibiotic-resistant bugs in the 21st Century – A clinical super-challenge. **N. Engl. J. Med.**, v. 360, n. 5, p. 439- 443, 2009.
- BARBOSA, A. L. R.; PINHEIRO, C. A.; OLIVEIRA, G. J.; MORAES, M. O.; RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; SOUZA, M. H. L. P. Tumor bearing decreases systemic acute inflammation in rats – role of mast cell degranulation. **Inflamm. Res.**, v. 58, p. 235-240, 2009.

BITENCOURT, F. S.; FIGUEIREDO, J. G.; MOTA, M. R. L.; BEZERRA, C. C. R.; SILVESTRE, P. P.; VALE, M. R.; NASCIMENTO, K. S.; SAMPAIO, A. H.; NAGANO, C. S.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W. R. L.; CAVADA, B. S.; ASSREUY, A. M. S.; ALENCAR, N. M. N. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 377, p.139-148, 2008.

BITENCOURT, M. A. O.; DANTAS, G. R.; LIRA, D. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MIRANDA, G. E. C.; SANTOS, B. V. O.; SOUTO, J. T. Aqueous and methanolic extracts of *Caulerpa mexicana* suppress cell migration and ear edema induced by inflammatory agents. **Mar. Drugs**, v. 9, p. 1332-1345, 2011.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 618-622, 1982.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Plantas Med.**, v. 70, p. 93-103, 2004.

CARDOZO, K. H. M.; GUARATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R.; TONON, A. P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A. O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 146, p. 60-78, 2007.

CASTRO, R.; PIAZZON, M.C.; ZARRA, I.; LEIRO, J.; NOYA, M.; LAMAS, J. Stimulation of turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh polysaccharides. **Aquaculture**, v. 254, p. 9-20, 2006.

CHANDINI, S. K.; GANESAN, P.; BHASKAR, N. *In vitro* antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. **Food Chemistry**, v. 107, p. 707-713, 2008.

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

CHIHEB, I.; RIADI, H.; MARTINEZ-LOPEZ, J.; SEGLAR, J. F. D.; VIDAL, J. A. G.; BOUZIANE, H.; KADIRI, M. Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 7, p. 1258-1262, 2009.

CHIU, Y. J.; HUANG, T. H.; CHIU, C. S.; LU, T. C.; CHEN, Y. W.; PENG, W. H.; CHEN, C. Y. Analgesic and antiinflammatory activities of the aqueous extract from *Plectranthusamboinicus* (Lour.) Spreng. Both *in vitro* and *in vivo*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Article ID 508137, 11 p., 2012.

CHO, M. L.; KANG, I. J.; WON, M. H.; LEE, H. S.; YOU, S. G. The antioxidant properties of ethanol extracts and their solvent-partitioned fractions from various green seaweeds. **J. Med. Food**, v. 13, n. 5, p. 1232-1239, 2010.

CHUN, O. K.; KIM, D. O.; SMITH, N.; SCHROEDER, D.; HAN, J. T.; LEE, C. Y. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. **J. Sci. Food Agric.**, v. 85, p.1715-1724, 2005.

COSTA, L. S.; FIDELIS, G. P.; CORDEIRO, S. L.; OLIVEIRA, R. M.; SABRY, D. A.; CÂMARA, R. B. G.; NOBRE, L. T. D. B.; COSTA, M. S. S. P.; ALMEIDA-LIMA, J.; FARIAS, E. H. C.; LEITE, E. L.; ROCHA, H. A. O. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, p. 21-28, 2010.

COURA, C. O.; ARAÚJO, I. W. F.; VANDERLEI, E. S. O.; RODRIGUES, J. A. G.; QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. P.; QUEIROZ, I. N. L.; MENEZES, D. B.; BEZERRA, M. M.; SILVA, A. A. R.; CHAVES, H. V.; JORGE, R. J. B.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of sulphated polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, p. 335-341, 2012.

COX, S.; ABU-GHANNAM, N.; GUPTA, S. An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. **International Food Research Journal**, v. 17, p. 205-220, 2010.

D'ORAZIO, N.; GAMMONE, M. A.; GEMELLO, E.; GIROLAMO, M.; CUSENZA, S.; RICCIONI, G. Marine bioactives: Pharmacological properties and potential applications against inflammatory diseases. **Mar. Drugs**, v. 10, p. 812-833, 2012.

DAR, A.; BAIG, H. S.; SAIFULLAH, S. M.; AHMAD, V. U.; YASMEEN, S.; NIZAMUDDIN, M. Effect of seasonal variation on the anti-inflammatory activity of *Sargassum wightii* growing on the N. Arabian Sea coast of Pakistan. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 351, p. 1-9, 2007.

DAVIES, J. Microbes have the last word. **EMBO reports**, v. 8, n. 7, p. 616-621, 2007.

DEMIREL, Z.; YILMAZ-KOZ, F. F.; KARABAY-YAVASOGLU, U. N.; OZDEMIR, G.; SUKATAR, A. Antimicrobial and antioxidant activity of brown algae from the Aegean Sea. **J. Serb. Chem. Soc.**, v. 74, n.6, p. 619-628, 2009.

DEVASAGAYAM, T. P. A.; TILAK, J. C.; BOLOOR, K. K.; SANE, K. S.; GHASKADBI, S. S.; LELE, R. D. Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. **JAPI**, v. 52, p. 794-804, 2004.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3720-3732, 2011.

DOMINGOS, T. F. S.; ORTIZ-RAMÍREZ, F. A.; VILLAÇA, R. C.; CAVALCANTI, D. N.; SANCHEZ, E. F.; TEIXEIRA, V. L.; FULY, A. L. Inhibitory effect of a Brazilian

marine brown alga *Spatoglossum schröderion* biological activities of *Lachesis muta* snake venom. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 4, p. 741-747, 2012.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, v. 82, p. 47-95, 2002.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1317-1327, 2003.

FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Frontiers in Bioscience**, v. 2, p. 12-26, 1997.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FREILE-PELEGRÍN, Y.; MORALES, J. L. Antibacterial activity in marine algae from the coast of Yucatan, Mexico. **Botanica Marina**, v. 47, p. 140-146, 2004.

GANESAN, P.; KUMAR, C. S.; BHASKAR, N. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2717-2723, 2008.

GUPTA, S.; ABU-GHANNAM, N. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. **Trends in Food Science & Technology**, v.22, p. 315-326, 2011.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Fd. Chem. Toxic.**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: A personal view. **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

HELLIO, C.; BREMER, G.; PONS, A. M.; LE GAL, Y.; BOURGOUGNON, N. Inhibition of the development of microorganisms (bacteria and fungi) by extracts of marine algae from Brittany, France. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 54, p. 543-549, 2000.

HODGSON, L. M. Antimicrobial and antineoplastic activity in some South Florida seaweeds. **Botanica Marina**, v. 27, n. 8, p. 387-390, 1984.

HONG, D. D.; HIEN, H. M.; ANH, H. T. L. Studies on the analgesic and anti-inflammatory activities of *Sargassum swartzii* (Turner) C. Agardh (Phaeophyta) and *Ulva reticulata* Forsskal (Chlorophyta) in experiment animal models. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 12, p. 2308-2314, 2011.

KELMAN, D.; POSNER, E. K.; McDERMID, K. J.; TABANDERA, N. K.; WRIGHT, P. R.; WRIGHT, A. D. Antioxidant activity of Hawaiian marine algae. **Mar. Drugs**, v. 10, p. 403-416, 2012.

KHAN, M. N. A.; CHOI, J. S.; LEE, M. C.; KIM, E.; NAM, T. J.; FUJII, H.; HONG, Y. K. Anti-inflammatory activities of methanol extracts from various seaweed species. **Journal of Environmental Biology**, v. 29, n. 4, p. 465-469, 2008.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 44, p. 239-267, 2004.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, p. 598-625, 2005.

KUMARAN, A.; KARUNAKARAN, R. J. *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. **LWT**, v. 40, p. 344-352, 2007.

LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **Int. J. Exp. Path.**, v. 88, p. 85-94, 2007.

LEES, P.; LANDONI, M. F.; GIRAUDEL, J.; TOUTAIN, P. L. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. **J. vet. Pharmacol. Therap.**, v. 27, p. 479-490, 2004.

LEITE, E. L.; MEDEIROS, M. G. L.; ROCHA, H. A. O.; FARIAS, G. G. M.; SILVA, L. F.; CHAVANTE, S. F.; ABREU, L. D.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B. Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schroederi*. **Plant Science**, v. 132, p. 215-228, 1998.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews – Immunology**, v. 7, p. 678-689, 2007.

LIM, S. N.; CHEUNG, P. C. K.; OOI, V. E. C.; ANG, P. O. Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 3862-3866, 2002.

LIMA, P. C. W. C.; TORRES, V. M.; RODRIGUES, J. A. G.; SOUSA, J. J.; LOBO, W. R. Efeito dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi* em juvenis de *Litopenaeus vannamei*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 1, p. 79-85, 2009.

LIMA-FILHO, J. V. M.; CARVALHO, A. F. F. U.; FREITAS, S. M.; MELO, V. M. M. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern Brazilian coast. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 311-313, 2002.

LÓPEZ, A.; RICO, M.; RIVERO, A.; TANGIL, M. S. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1104-1109, 2011.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Bol. Cent. Biol. Reprod.**, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MARQUES, C. T.; AZEVEDO, T. C. G.; NASCIMENTO, M. S.; MEDEIROS, V. P.; ALVES, L. G.; BENEVIDES, N. M. B.; ROCHA, H. A. O.; LEITE, E. L. Sulfated fucans extracted from algae *Padina gymnospora* have anti-inflammatory effect. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 115-122, 2012.

MATANJUN, P.; MOHAMED, S.; MUSTAPHA, N. M.; MUHAMMAD, K.; MING, C. H. Antioxidant activities and phenolics content of eight species of seaweeds from north Borneo. **J. Appl. Phycol.**, v. 20, p. 367-373, 2008.

MAYER, A. M. S.; LEHMANN, V. K. B. Marine pharmacology in 1998: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, anthelmintic, antiplatelet, antiprotozoal, and antiviral activities; with actions on the cardiovascular, endocrine, immune, and nervous systems; and other miscellaneous mechanisms of action. **The Pharmacologist**, v. 42, n. 2, p. 62-69, 2000.

MAYER, A. M. S.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. **Mar. Biotechnol.**, v. 6, p. 37-52, 2004.

MAYER, A. M. S.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2001–2002: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 140, p. 265-286, 2005.

MAYER, A. M. S.; RODRÍGUEZ, A. D.; BERLINCK, R. G. S.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2003–4: Marine compounds with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 145, p. 553-581, 2007.

MAYER, A. M. S.; RODRÍGUEZ, A. D.; BERLINCK, R. G. S.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2005–6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, p. 283-308, 2009.

MAYER, A. M. S.; RODRÍGUEZ, A. D.; BERLINCK, R. G. S.; FUSETANI, N. Marine pharmacology in 2007–8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other

miscellaneous mechanisms of action. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 153, p. 191-222, 2011.

MEENAKSHI, S.; GNANAMBIGAI, D. M.; MOZHI, S. T.; ARUMUGAM, M.; BALASUBRAMANIAN, T. Total flavanoid and *in vitro* antioxidant activity of two seaweeds of Rameshwaram Coast. **Global Journal of Pharmacology**, v. 3, n. 2, p. 59-62, 2009.

MHADHEBI, L.; DELLAI, A.; CLARY-LAROCHE, A.; SAID, R. B.; ROBERT, J.; BOURAOUI, A. Anti-inflammatory and antiproliferative activities of organic fractions from the mediterranean brown seaweed, *Cystoseira compressa*. **Drug Development Research**, v. 73, p. 82-89, 2012.

MOREIRA, D. D. O.; MORAIS, V.; VIEIRA-DA-MOTTA, O.; CAMPOS-FARINHA, A. E. C.; TONHASCA JR., A. Ants as carriers of antibiotic-resistant bacteria in hospitals. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 6, p. 999-1006, 2005.

MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.; HOORN, D. E. C.; BOELEN, P. G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 74, p. 418-425, 2001.

OSMAN, M. E. H.; ABUSHADY, A. M.; ELSHOBARY, M. E. *In vitro* screening of antimicrobial activity of extracts of some *macroalgae* collected from Abu-Qir bay Alexandria, Egypt. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 12, p. 7203-7208, 2010.

PAULA, J. C.; VALLIM, M. A.; TEIXEIRA, V. L. What are and where are the bioactive terpenoids metabolites from Dictyotaceae (Phaeophyceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 2, p. 216-228, 2011.

PEREIRA, F. J.; MARTINS, F. T.; CORRÊA, R. S.; MOREIRA, M. E. C.; COSTA, A. M. D. D.; SANTOS, M. H.; POLO, M.; BARBOSA, L. C. A. Isolamento, composição química e atividade anti-inflamatória do óleo essencial do pericarpo de *Copaifera langsdorffii* Desf. de acordo com hidrodestilações sucessivas. **Lat. Am. J. Pharm.**, v.27, n.3, p. 369-374, 2008.

PORFÍRIO, Z.; MELO-FILHO, G. C.; ALVINO, V.; LIMA, M. R. F.; SANT'ANA, A.E.G. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, frente a bactérias multirresistentes de origem hospitalar. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 3, p. 785-789, 2009.

QUEIROZ, K. C. S.; MEDEIROS, V. P.; QUEIROZ, L. S.; ABREU, L. R. D.; ROCHA, H. A. O.; FERREIRA, C. V.; JUCÁ, M. B.; AOYAMA, H.; LEITE, E. L. Inhibition of reverse transcriptase activity of HIV by polysaccharides of brown algae. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, p. 303-307, 2008.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; KUMAR, M. N. V. R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, p. 189–207, 2006.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

RAYMUNDO, M. S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 40, n. 4, p. 495-503, 2004.

RIETJENS, I. M. C.M.; BOERSMA, M. G.; HAAN, L.; SPENKELINK, B.; AWAD, H. M.; CNUBBEN, N. H. P.; ZANDEN, J. J.; WOUDE, H.; ALINK, G. M.; KOEMAN, J. H. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 11, p. 321-333, 2002.

RIZVI, M. A. Comparative antibacterial activities of seaweed extracts from Karachi Coast, Pakistan. **Pakistan Journal of Pharmacology**, v. 27, n. 2, p. 53-57, 2010.

ROCHA, H. A. O.; MORAES, F. A.; TRINDADE, E. S.; FRANCO, C. R. C.; TORQUATO, R. J. S.; VEIGA, S. S.; VALENTE, A. P.; MOURÃO, P. A. S.; LEITE, E. L.; NADER, H. B.; C. DIETRICH, P. Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schroederi*: An ideal antithrombotic agent? **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 50, p. 41278-41288, 2005.

RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI, E. S. O.; SILVA, L. M. C. M.; ARAÚJO, I. W. F.; QUEIROZ, I. N. L.; PAULA, G. A.; ABREU, T. M.; RIBEIRO, N. A.; BEZERRA, M. M.; CHAVES, H. V.; LIMA, V.; JORGE, R. J. B.; MONTEIRO, H. S. A.; LEITE, E. L.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Caulerpa cupressoides*. **Pharmacological Reports**, v. 64, p. 282-292, 2012.

SADATI, N.; KHANAVI, M.; MAHROKH, A.; NABAVI, S. M. B.; SOHRABIPOUR, J.; HADJIAKHOONDI, A. Comparison of antioxidant activity and total phenolic contents of some Persian Gulf marine algae. **Journal of Medicinal Plants**, v. 10, n. 37, p. 73-79, 2011.

SALVADOR, N.; GARRETA, A. G.; LAVELLI, L.; RIBERA, M. A. Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. **Scientia Marina**, v.71, n. 1, p. 101-113, 2007.

SANTOSO, J.; YOSHIE, Y.; SUZUKI, T. Polyphenolic compounds from seaweeds: distribution and their antioxidative effect. **Development in Food Science**, v. 42, p. 169-177, 2004.

SAURA-CALIXTO, F.; GOÑI, I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. **Food Chemistry**, v. 94, p. 442-447, 2006.

SHANMUGHAPRIYA, S.; MANILAL, A.; SUJITH, S.; SELVIN, J.; KIRAN, G. S.; NATARAJASEENIVASAN, K. Antimicrobial activity of seaweeds extracts against multiresistant pathogens. **Annals of Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 535-541, 2008.

SOUSA, A. A. S.; BENEVIDES, N. M. B.; PIRES, A. F.; FIÚZA, F. P.; QUEIROZ, M. G. R.; MORAIS, T. M. F.; PEREIRA, M. G.; ASSREUY, A. M. S. A report of a galactan from marine alga *Gelidium crinale* with in vivo anti-inflammatory and antinociceptive effects. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, p. 1-8, 2011.

SOUZA, G. E. P.; FERREIRA, S. H. Blockade antimacrophageserium of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Ag. Actions**, v. 17, p. 97-103, 1985.

SOUZA, G. E.; CUNHA, F. Q.; MELLO, R.; FERREIRA, S. H. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents Actions**, v. 24, p. 337-380, 1988.

SOUZA, M. C. R.; MARQUES, C. T.; DORE, C. M. G.; SILVA, F. R. F.; ROCHA, H. A. O.; LEITE, E. L. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. **J. Appl. Phycol.**, v. 19, p. 153-160, 2007.

SPELLBERG, B.; GUIDOS, R.; GILBERT, D.; BRADLEY, J.; BOUCHER, H. W.; SCHELD, W. M.; BARTLETT, J. G.; EDWARDS JR., J. The epidemic of antibiotic-resistant infections: A call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p.155-164, 2008.

SUN, L.; ZHANG, J.; LU, X.; ZHANG, L.; ZHANG, Y. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2689-2696, 2011.

TAVARES-MURTA, B. M.; RESENDE, A. D.; CUNHA, F. Q.; MURTA, E. F. C. Local profile of cytokines and nitric oxide in patients with bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 138, p. 93-99, 2008.

TEIXEIRA, V. L.; ROCHA, F. D.; HOUGHTON, P. J.; KAPLAN, M. A. C.; PEREIRA, R. C. α -Amylase inhibitors from Brazilian seaweeds and their hypoglycemic potential. **Fitoterapia**, v. 78, p. 35-36, 2007.

TUTOUR, B.; BENSLIMANE, F.; GOULEAU, M. P.; GOUYGOU, J. P.; SAADAN, B.; QUEMENEUR, F. Antioxidant and pro oxidant activities of the brown algae, *Laminaria digitata*, *Himanthalia elongata*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus* and *Ascophyllum nodosum*. **Journal of Applied Phycology**, v.10, p.121-129, 1998.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOLA, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VANDERLEI, E. S. O.; ARAÚJO, I. W. F.; QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. P.; ELOY, Y. R. G.; RODRIGUES, J. A. G.; SILVA, A. A. R.; CHAVES, H. V.; JORGE, R. J. B.; MENEZES, D. B.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; BEZERRA, M. M.; BENEVIDES, N. M. B. The involvement of the HO-1 pathway in the anti-inflammatory action of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Inflamm. Res.**, v. 60, p. 1121-1130, 2011.

VIJAYABASKAR, P.; SHIYAMALA, V. Antibacterial activities of brown marine algae (*Sargassum wightii* and *Turbinaria ornata*) from the Gulf of Mannar Biosphere Reserve. **Advances in Biological Research**, v. 5, n. 2, p. 99-102, 2011.

VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature Review – Cancer**, v. 6, p. 24-37, 2006.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. **Food Chemistry**, v. 63, n. 3, p. 335-342, 1998.

WANG, B. G.; ZHANG, W. W.; DUAN, X. J.; LI, X. M. *In vitro* antioxidative activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga, *Rhodomelacon fervoides* (Rhodomelaceae). **Food Chemistry**, v. 113, p. 1101-1105, 2009.

WHO (OMS). World Health Report 2007: Global public health security in the 21st Century. Chapter 2: Threats to public health security. Acessado em 29/06/2012 <http://www.who.int/whr/2007/07_chap2_en.pdf>.

YEN, G. C.; CHEN, H. Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 27-32, 1995.

YOSHIE-STARK, Y.; HSIEH, Y. P.; SUZUKI, T. Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan. **J. Tokyo Univ. Fish.**, v. 89, p. 1-6, 2003.

ZAHRA, R.; MEHRNAZ, M.; FARZANEH, V.; KOHZAD, S. Antioxidant activity of extract from a brown alga, *Sargassum boveanum*. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 24, p. 2740-2745, 2007.

ZHENG, Y.; CHEN, Y. S.; LU, H. S. Screening for antibacterial and antifungal activities in some marine algae from the Fujian coast of China with three different solvents. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 19, n. 4, p. 327-331, 2001.

ZUBIA, M.; ROBLEDO, D.; FREILE-PELEGRIN, Y. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. **J. Appl. Phycol.**, v. 19, p. 449-458, 2007.