



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

BÁRBARA MENDES BARACHO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E CITOTÓXICA DOS
EXTRATOS DA ESPONJA MARINHA *Ircinia* sp.**

FORTALEZA

2018

BÁRBARA MENDES BARACHO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E CITOTÓXICA DOS
EXTRATOS DA ESPONJA MARINHA *Ircinia* sp.**

**Monografia apresentada ao Departamento de
Engenharia de Pesca da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do Título de Engenheiro de Pesca.**

**Orientadora: Prof^a Dr^a Silvana Saker-
Sampaio**

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B178a Baracho, Bárbara Mendes.
Avaliação das Atividades Antioxidante in Vitro e Citotóxica dos Extratos da Esponja Marinha Ircinia sp. /
Bárbara Mendes Baracho. – 2018.
52 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências
Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Silvana Saker-Sampaio.

1. Porifera. 2. Compostos bioativos. 3. Artemia. I. Título.

CDD 639.2

BÁRBARA MENDES BARACHO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E CITOTÓXICA DOS
EXTRATOS DA ESPONJA MARINHA *Ircinia* sp.**

Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Engenheiro de Pesca.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Silvana Saker-Sampaio

Aprovada em: 26/ 06 / 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dr^ª Silvana Saker-Sampaio (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª Dr^ª Márcia Barbosa de Sousa
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Engenheira de Pesca Karolina Costa de Sousa, M.Sc.
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ao meu avô, José Ferreira de Abreu (*in
memoriam*)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que eu chegasse até aqui e colocado pessoas maravilhosas no meu caminho.

Aos meus pais, Rosineide Mendes Baracho e José Nelber Baracho de Abreu, e toda a minha família pelo amor, cuidado e apoio durante essa jornada.

Aos meus professores por todas as lições aprendidas para a vida profissional e pessoal.

Aos professores Rômulo Farias Carneiro, Alexandre Holanda Sampaio e Suzete Roberta da Silva pelo suporte que tornou esse trabalho possível.

Ao Laboratório de Produtos Naturais Marinhos (PROMAR) pelo espaço e equipamentos concedidos e também às pessoas que o tornam tão especial.

À melhor orientadora que eu poderia ter, Prof^ª Dr^ª Silvana Saker Sampaio, por quem tenho profunda admiração e carinho.

À banca examinadora, por ter aceitado o convite e pelas sugestões de grande valia, em especial à Karolina Costa de Sousa, pela amizade e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Reynaldo Amorim Marinho por ter me dado a oportunidade de fazer parte do Programa de Educação Tutorial (PET), onde ganhei além de ensinamentos, amigos e momentos incríveis.

Aos colegas e amigos feitos durante graduação e na Consultoria em Recursos Aquáticos (CORAQ) que me acompanharam e sempre torceram por mim.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que fomentou a pesquisa.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação.

“Fortis Fortuna Adiuvat.”

“A sorte favorece os bravos.” (Terêncio)

RESUMO

As esponjas são invertebrados bentônicos e filtradores, capazes de sintetizar diferentes metabólitos secundários com grande variabilidade química intraespecífica. Há um crescente interesse científico por esses animais, especialmente por causa de suas propriedades farmacológicas e da potencialidade de aplicação. Exemplares da esponja marinha *Ircinia* sp. foram coletados na Praia do Pacheco, Caucaia-CE em fevereiro de 2015. A biomassa lavada, liofilizada e triturada foi extraída em diclorometano (DCM) e etanol a 70% (EtOH 70%), com o objetivo de determinar a atividade antioxidante *in vitro* e a atividade citotóxica usando náuplios de *Artemia* sp. Separadamente, os extratos foram concentrados em rotavapor sob vácuo. Os extratos DCM e EtOH 70% foram solubilizados em dimetilsulfóxido a 5% (DMSO 5%) e metanol a 50% (MeOH 50%) para preparar a concentração de 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a partir da qual foram procedidas diluições sucessivas, as quais foram usadas na determinação da atividade antioxidante *in vitro* pela capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), poder de quelação de íons ferrosos (FIC), poder de redução de íons férricos (FRAP) e atividade inibitória do branqueamento do β -caroteno (BCB). A atividade citotóxica foi testada nos dois extratos frente a náuplios de *Artemia* sp. nas mesmas diluições supracitadas. Os resultados de DPPH (%) variaram de $27,98 \pm 1,75$ a $40,31 \pm 1,66$ (DCM) e de $23,40 \pm 2,94$ a $31,60 \pm 0,56$ (EtOH 70%). O FIC do extrato DCM ficou entre 10,13% e 40,15%, enquanto o do EtOH 70% variou de 17,73% a 28,30%. Os valores de FRAP mais elevados, $0,164 \pm 0,010$ (DCM) e $0,287 \pm 0,002$ (EtOH 70%), foram observados na maior concentração testada. A atividade inibitória do BCB do extrato DCM atingiu 67,88% e do EtOH 70%, aproximadamente 66%. Na atividade citotóxica o CL_{50} do extrato DCM, após 24 h de exposição, foi $232,74 \mu\text{g mL}^{-1}$ e após 48 h foi $21,56 \mu\text{g mL}^{-1}$. O CL_{50} do extrato EtOH 70% após 24 h de exposição foi $406,98 \mu\text{g mL}^{-1}$; com 48 h de exposição, a mortalidade foi superior a 50% na concentração mais baixa. A atividade antioxidante encontrada nos extratos DCM e EtOH 70% da *Ircinia* sp. foi compatível com as informações disponíveis na literatura. No ensaio de letalidade contra náuplios de *Artemia* sp., a maior toxicidade foi observada nas concentrações mais elevadas e no tempo de exposição mais prolongado. Com base nos resultados, compostos com potencial farmacológico podem ser isolados da esponja marinha *Ircinia* sp. e mais estudos são necessários para avaliar o potencial dos compostos bioativos da espécie, bem como sua aplicabilidade.

Palavras-chave: Porifera. Compostos bioativos. *Artemia*.

ABSTRACT

Sponges are filter-feeding benthic invertebrates, capable of synthesizing different secondary metabolites with high intraspecific chemical variability. There is a growing scientific interest in these animals, especially because of their pharmacological properties and application potentiality. Specimens of the marine sponge *Ircinia* sp. were collected at Praia do Pacheco, Caucaia-CE in February 2015. The washed, lyophilized and comminuted biomass was extracted in dichloromethane (DCM) and 70% ethanol (70% EtOH), in order to determine the antioxidant activity *in vitro* and cytotoxic activity using nauplii of *Artemia* sp. Separately, the extracts were rotary evaporated under vacuum. The DCM and 70% EtOH extracts were solubilized in 5% dimethylsulfoxide (5% DMSO) and 50% methanol (50% MeOH) to prepare the concentration 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, from which successive dilutions were carried out. They were used in the determination of *in vitro* antioxidant activity by DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) radical scavenging activity, ferrous ion chelating (FIC) assay, ferric reducing antioxidant power (FRAP), and β -carotene bleaching inhibiting activity (BCB). The cytotoxic activity was tested in the two extracts against nauplii of *Artemia* sp. at the same dilutions as above. The results of DPPH (%) ranged from 27.98 ± 1.75 to 40.31 ± 1.66 (DCM) and from 23.40 ± 2.94 to 31.60 ± 0.56 (70% EtOH). The FIC of the DCM extract was between 10.13% and 40.15%, while that of the 70% EtOH ranged from 17.73% to 28.30%. The highest FRAP values, 0.164 ± 0.010 (DCM) and 0.287 ± 0.002 (EtOH 70%), were observed at the highest concentration tested. The BCB inhibitory activity of the DCM extract reached 67.88%, and approximately 66% for the 70% EtOH. In the cytotoxic activity the LC_{50} of the DCM extract after 24 hour-exposure was $232.74 \mu\text{g mL}^{-1}$, and after 48 h it was $21.56 \mu\text{g mL}^{-1}$. LC_{50} of the 70% EtOH extract after 24 hour-exposure was $406.98 \mu\text{g mL}^{-1}$. Mortality was greater than 50% at the lowest concentration tested after 48 hour-exposure. The antioxidant activity found in both DCM and 70% EtOH extracts of *Ircinia* sp. was compatible with the information available in the literature. *Artemia* sp. nauplii lethality assay showed that highest toxicity was observed at the highest concentrations and the longest exposure time. Based on the results, compounds with pharmacological potential can be isolated from the marine sponge *Ircinia* sp., and further studies are needed to evaluate the potential of the bioactive compounds of the species as well as their applicability.

Key words: Porifera. Bioactive compounds. *Artemia*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema estrutural das esponjas.....	15
Figura 2 –	Reprodução sexuada (A) e reprodução assexuada por brotamento lateral (B), por regeneração (C) e por formação de gêmulas (D).....	16
Figura 3 –	Exemplar da esponja <i>Ircinia</i> sp. coletada na Praia do Pacheco, Caucaia-CE em fevereiro de 2015.....	23
Figura 4 –	Esquema do ensaio de letalidade contra náuplios de <i>Artemia</i> sp.....	29

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH.....	25
Quadro 2 – Determinação do poder de quelação de íons ferrosos (FIC).....	26
Quadro 3 – Capacidade de sequestro do radical DPPH de extratos de esponjas marinhas.....	33

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Capacidade de sequestro do radical DPPH do controle positivo, *L*-ácido ascórbico (A5960 Sigma) e dos extratos diclorometano (DCM) e etanol a 70% (EtOH 70%) da esponja *Ircinia* sp., nas concentrações de 7,8125 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 31
- Gráfico 2 – Poder de quelação de íons ferrosos (FIC) do controle positivo, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, Vetec) e dos extratos diclorometano (DCM) e etanol a 70% (EtOH 70%) da esponja *Ircinia* sp., nas concentrações de 7,8125 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 35
- Gráfico 3 – Poder de redução de íons férricos (FRAP) do controle positivo, butil-hidroxianisol (BHA, B1253 Sigma) e dos extratos diclorometano (DCM) e etanol a 70% (EtOH 70%) da esponja *Ircinia* sp., nas concentrações de 7,8125 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 37
- Gráfico 4 – Atividade inibitória do branqueamento do β -caroteno (BCB) do controle positivo, butil-hidroxianisol (BHA, B1253 Sigma) e dos extratos diclorometano (DCM) e etanol a 70% (EtOH 70%) da esponja *Ircinia* sp., nas concentrações de 7,8125 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 39
- Gráfico 5 – Letalidade de náuplios de *Artemia* sp. frente ao extrato diclorometano (DCM) da esponja *Ircinia* sp., nas concentrações de 7,8125 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, após exposição de 24 h e 48 h..... 42
- Gráfico 6 – Letalidade de náuplios de *Artemia* sp. frente ao extrato etanol a 70% (EtOH 70%) da esponja *Ircinia* sp., nas concentrações de 7,8125 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, após exposição de 24 h e 48 h..... 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Capacidade de sequestro do radical DPPH (média ± desvio padrão, n = 5) do controle positivo, <i>L</i> -ácido ascórbico (A5960 Sigma) e dos extratos diclorometano (DCM) e etanol a 70% (EtOH 70%) da esponja <i>Ircinia</i> sp., nas concentrações de 7,8125 a 1.000 µg mL ⁻¹	31
Tabela 2 – Poder de quelação de íons ferrosos (média ± desvio padrão, n = 5) do controle positivo, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, Vetec) e dos extratos diclorometano (DCM) e etanol a 70% (EtOH 70%) da esponja <i>Ircinia</i> sp., nas concentrações de 7,8125 a 1.000 µg mL ⁻¹	34
Tabela 3 – Poder de redução de íons férricos (FRAP) (média ± desvio padrão, n = 5) do controle positivo, butil-hidroxianisol (BHA, B1253 Sigma) e dos extratos diclorometano (DCM) e etanol a 70% (EtOH 70%) da esponja <i>Ircinia</i> sp., nas concentrações de 7,8125 a 1.000 µg mL ⁻¹	36
Tabela 4 – Atividade inibitória do branqueamento do β-caroteno (BCB) (média ± desvio padrão, n = 5) do controle positivo, butil-hidroxianisol (BHA, B1253 Sigma) e dos extratos diclorometano (DCM) e etanol a 70% (EtOH 70%) da esponja <i>Ircinia</i> sp., nas concentrações de 7,8125 a 1.000 µg mL ⁻¹ .	39
Tabela 5 – Letalidade de náuplios de <i>Artemia</i> sp. frente ao extrato diclorometano (DCM) da esponja <i>Ircinia</i> sp., nas concentrações de 7,8125 a 500 µg mL ⁻¹ , após exposição de 24 h e 48 h.....	41
Tabela 6 – Letalidade de náuplios de <i>Artemia</i> sp. frente ao extrato etanol a 70% (EtOH 70%) da esponja <i>Ircinia</i> sp., nas concentrações de 7,8125 a 500 µg mL ⁻¹ , após exposição de 24 h e 48 h.....	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.1	Coleta do material e Preparação dos extratos.....	23
2.2	Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>.....	24
2.2.1	<i>Capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).....</i>	24
2.2.2	<i>Poder de quelação de íons ferrosos (FIC).....</i>	25
2.2.3	<i>Poder de redução de íons férricos (FRAP).....</i>	26
2.2.4	<i>Atividade inibitória do branqueamento do β-caroteno (BCB).....</i>	27
2.3	Ensaio de letalidade contra náuplios de <i>Artemia</i> sp.....	28
2.4	Análise estatística.....	29
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
3.1	Rendimentos dos extratos.....	30
3.2	Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>.....	30
3.2.1	<i>Capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).....</i>	30
3.2.2	<i>Poder de quelação de íons ferrosos (FIC).....</i>	34
3.2.3	<i>Poder de redução de íons férricos (FRAP).....</i>	36
3.2.4	<i>Atividade inibitória do branqueamento do β-caroteno (BCB).....</i>	38
3.3	Ensaio de letalidade contra náuplios de <i>Artemia</i> sp.....	41
4	CONCLUSÕES.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

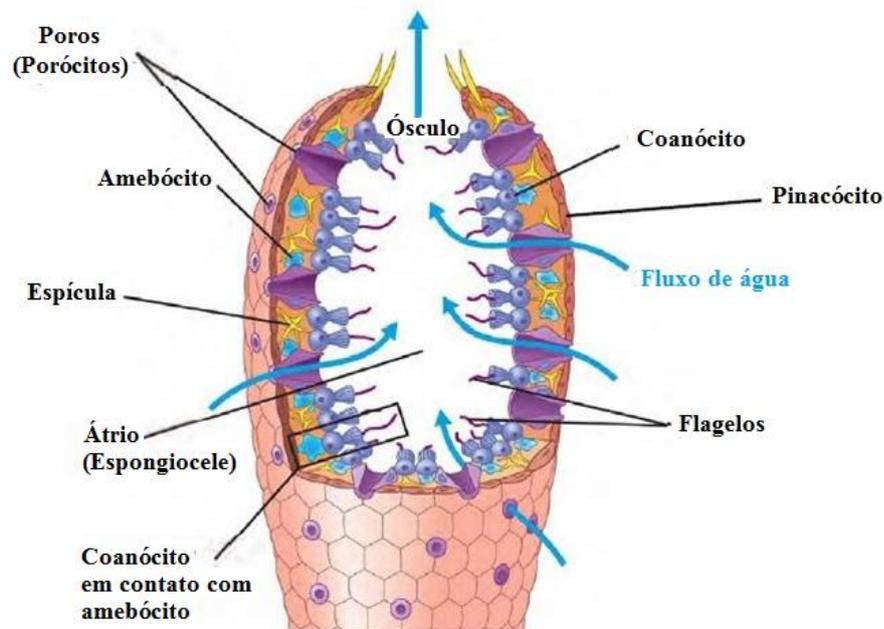
As esponjas são animais aquáticos, pertencentes ao Filo Porifera, encontradas em ambientes marinhos e dulcícolas de regiões tropicais, temperadas e até polares. Na fase adulta são organismos sésseis, que apresentam grande diversificação quanto à forma, cor e tamanho. Acredita-se que foram os primeiros animais a surgirem no Planeta, há mais de 550 milhões de anos, no período Pré-Cambriano (HENTSCHEL *et al.*, 2012; LIRA, 2013). Segundo o World Porifera Database (VAN SOEST *et al.*, 2018), até hoje já foram descritas 8.942 espécies de esponjas.

O Filo Porifera abriga três classes principais: Calcarea, Desmospogiae e Hexactinellida. A primeira classe é formada por esponjas que possuem o esqueleto composto por espículas de carbonato de cálcio e, geralmente, habitam águas rasas. A segunda é composta por espécies portadoras de espículas de sílica e abriga a maior parte das esponjas encontradas atualmente (cerca de 85%), incluindo o gênero *Ircinia* sp., estudado neste trabalho. A terceira classe é constituída de esponjas que possuem esqueleto singular com uma estrutura semelhante a uma rede, apresentando espículas silicosas, sendo geralmente encontradas em águas profundas e frias (MIRANDA, 2010; SILVA, 2013; WORHEIDE *et al.*, 2012).

As esponjas são seres multicelulares simples que não possuem tecido verdadeiro e nem sistema nervoso. Suas células são totipotentes, ou seja, possuem capacidade de se especializar em qualquer tipo de célula. O corpo desses animais é composto por um esqueleto de espículas, que pode ter composição inorgânica de sílica ou calcário, ou orgânica constituída de espongina, que é uma rede de fibras proteicas que serve como defesa física, sendo também utilizada como ferramenta para a identificação das espécies. O corpo é coberto por poros, justificando o nome do Filo, originado do latim, em que *porus* significa poro e *ferre*, possuir. Os poros são chamados de porócitos e são formados por uma célula que se estende do exterior do animal até a cavidade central, também chamada de átrio ou espongiocele. O interior das esponjas é recoberto por células flageladas, denominadas coanócitos, responsáveis por produzir a movimentação e a filtração da água, além da captura de partículas alimentares e materiais dissolvidos na água, como plâncton, detritos e partículas de matéria orgânica (> 0,1 µm), de maneira seletiva e extremamente eficiente, os quais são digeridas intracelularmente. A maioria se alimenta por filtração e apenas cerca de 90 espécies, encontradas em áreas profundas dos oceanos, são carnívoras (MAHDIAN *et al.*, 2015; McMURRAY *et al.*, 2016; URABAYASHI, 2015). Após o processo de filtração da água, ela é expelida para o exterior da esponja através do ósculo. Na camada externa encontram-se os pinacócitos, que são as células que compõem a

pinacoderme, cuja função consiste em fixar a esponja ao substrato. Imediatamente abaixo dessa camada, há uma matriz proteica gelatinosa composta por células ameboides (amebócitos) e material esquelético (FIGURA 1). Como não possuem tecido verdadeiro, não possuem órgãos e seus processos metabólicos de respiração e de excreção são realizados por difusão (HENTSCHEL *et al.*, 2012; LESSER; SLATTERY, 2013; McMURRAY *et al.*, 2016; MIRANDA, 2010; SILVA, 2013; URABAYASHI, 2015).

Figura 1 – Esquema estrutural das esponjas.

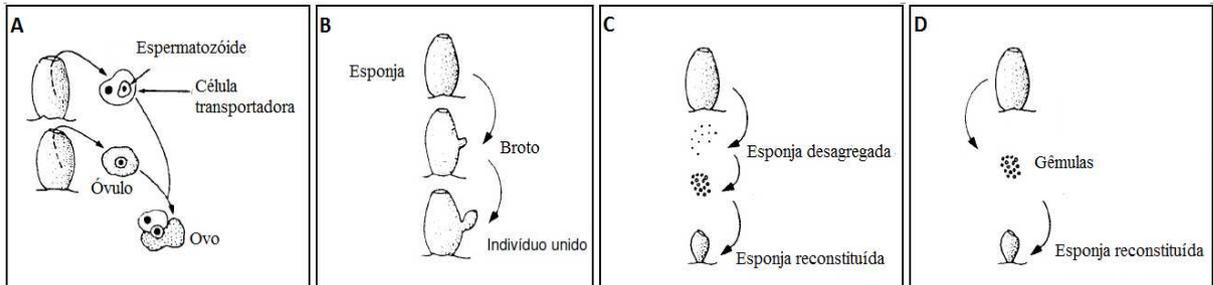


Fonte: URABAYASHI (2015)

Os poríferos podem se reproduzir de maneira sexuada e assexuada. Na forma sexuada, as esponjas são hermafroditas e liberam gametas formados a partir de coanócitos modificados que, em seguida, se transformam em larvas livre-natantes, ou seja, de natação livre. Este estágio do ciclo de vida das esponjas dura apenas algumas horas e tem influência sobre sua distribuição no ambiente, podendo ser afetada por fatores como temperatura, salinidade, luz, gravidade e turbulência da água. A reprodução assexuada, por sua vez, ocorre por brotamento lateral, por regeneração ou por formação de gêmulas. No brotamento lateral, o broto é formado a partir dos amebócitos, que podem se desprender do corpo da esponja para originar um novo indivíduo ou podem continuar presos a ela e originar colônias. No processo de regeneração, fragmentos do corpo do animal podem originar novos indivíduos a partir da reorganização celular. A reprodução assexuada por formação de gêmulas, que são estruturas de resistência formadas por células cercadas por um rígido envoltório, ocorre apenas em espécies

dulcícolas (FIGURA 2) (MANCONI; PRONZATO, 2016; MIRANDA, 2010; MOSTARDEIRO, 2008; SILVA, 2013).

Figura 2 – Reprodução sexuada (A) e reprodução assexuada por brotamento lateral (B), por regeneração (C) e por formação de gêmulas (D).



Fonte: GOOGLE IMAGENS (2016) – MODIFICADA. Disponível em: <http://1.bp.blogspot.com/-pogwPfQ7vSQ/UF-uGJnjO4I/AAAAAAAAADPo/4booDgpuq_A/s1600/Sem+t%C3%ADtulo22.jpg> Acesso em: 6 jun. 2018.

Incapazes de se locomover e empreender fuga a qualquer sinal de perigo, os organismos marinhos sésseis, como as esponjas, desenvolveram estratégias de defesa química que além de desempenharem funções ecológicas e fisiológicas específicas, garantindo sua sobrevivência e perpetuação ao longo do tempo, também exercem múltiplas atividades biológicas. Esses mecanismos de defesa são responsáveis pela liberação de substâncias na água as quais podem agir de maneiras distintas, seja para competir com outros organismos por espaço, seja para evitar a predação, seja para se defender contra organismos patogênicos presentes no meio (FELÍCIO; OLIVEIRA; DEBONSI, 2012; PERDICARIS; VLACHOGIANNI; VALAVANIDIS, 2013; SELVIN; LIPTON, 2004; SILVA, 2013; URABAYASHI, 2015).

As esponjas fazem parte da comunidade bentônica e são muito importantes do ponto de vista ecológico, principalmente em zonas de recifes de corais, servindo de abrigo para pequenos peixes e invertebrados, como equinodermos e camarões, e sendo utilizadas como alimento de predadores móveis, como peixes, tartarugas e estrelas-do-mar. Além disso, devido a relação das esponjas com micro-organismos que vivem associados a elas, contribuem tanto para manter a produtividade primária como a produtividade de comunidades bentônicas (LESSER; SLATTERY, 2013).

Compostos bioativos de origem marinha atraíram a atenção dos cientistas por causa do trabalho de Bergmann e Feeney (1951), que tratou do isolamento de dois nucleosídeos da esponja marinha *Cryptotethya crypta* coletada na costa da Flórida. Um deles foi identificado

como uma pentofuranosiltimina, a espongotimidina, e o outro como uma pentosilmetilaminooxipurina, a espongosina. As estruturas desses nucleosídeos incomuns foram usadas para o desenvolvimento de importantes drogas antivirais, como o vidarabina ou 9- β -D-arabinofuranosiladenina (ara-A) (PROKSCH; EDRADA; EBEL, 2002), um nucleosídeo arabinosil de origem marinha, que inibe a síntese do DNA viral.

Como os sistemas biológicos são capazes de reconhecer as bases nucleosídicas após modificações da porção açúcar, substituições de pentoses por entidades químicas acíclicas ou com moléculas de açúcar levaram ao desenvolvimento da droga azidotimidina (zidovudina). Exemplos de nucleosídeos arabinosil semissintéticos modificados com uso clínico são aciclovir, azidotimidina, ara-A e o citarabina, também conhecido como citosina arabinosídeo (ara-C), que foi o primeiro agente anticâncer derivado de organismos marinhos (PROKSCH; EDRADA; EBEL, 2002). De acordo com a revisão de Anjum *et al.* (2016), atualmente o ara-C é usado no tratamento de linfoma e leucemia, e a gencitabina, um análogo de nucleosídeo (2', 2'-difluorodesoxicidina), tem atividade antineoplásica contra câncer de pulmão, pâncreas, mama e bexiga.

Muitos organismos marinhos têm sido investigados por serem fontes de metabólitos como compostos nitrogenados e fenólicos, terpenoides, polissacarídeos, aminoácidos, ácidos graxos insaturados, carotenos, tocoferol, os quais apresentam diversas atividades biológicas, por exemplo, antiviral, antibacteriana, antifúngica, antimalária, anticolinesterase, anti-inflamatória, antioxidante, antibiótica, antileishmânia, anticancerígena, citotóxica (ANJUM *et al.*, 2016; BIANCO *et al.*, 2015; EL-HADY *et al.*, 2017; GRANATO *et al.*, 2005; HAGIWARA *et al.*, 2015; KARYAWATI *et al.*, 2015; MÁRQUEZ; MARTÍNEZ, 2007; MEHBUB *et al.*, 2014; SUGAPPRIYA; SUDARSANAM, 2016; TAHERI; JALALINEZHAD, 2015).

Os invertebrados marinhos são fonte de medicamentos antimicrobianos potenciais. Estudos de mecanismos antimicrobianos e compostos de invertebrados marinhos podem fornecer informações valiosas para novas descobertas de antibióticos e dar novos conhecimentos sobre compostos bioativos (DHINAKARAN; LIPTON, 2012).

A biossíntese de diferentes metabólitos secundários com grande variabilidade química intraespecífica concorre para o crescente interesse pelas esponjas (GRIBBLE, 2015), especialmente por causa de suas propriedades farmacológicas e da potencialidade de aplicação (MAHDIAN *et al.*, 2015). Márquez e Martínez (2007) afirmaram que as esponjas do gênero *Ircinia* são fontes de várias classes de metabólitos, alguns dos quais com atividades biológicas interessantes, como furanosesterterpenos, hidroquinonas polipreniladas, macrolídeos, terpenoides contendo enxofre e esteróis. Por exemplo, a esponja do Caribe colombiano, *I.*

campana, contém uma complexa mistura de epidioxiesteróis com atividade antiparasitária, os quais são produtos da foto-oxidação dos esteróis $\Delta_{5,7}$ naturalmente presentes. Para Arunachalam e Appadorai (2013), as esponjas são animais que vivem associados a diversos organismos, razão pela qual alguns autores avaliam o potencial biológico de sua microbiota.

O mesilato de eribulina (eribulina), comercialmente denominado Halaven®, produzido pela Eisai Inc., Woodcliff Lake, Nova Jérsei, EUA, é um análogo sintético do produto natural halicondrina B, isolado da esponja marinha *Halichondria okadai*. Os resultados positivos dos estudos clínicos contribuíram para que seu uso no tratamento de pacientes com câncer, fosse aprovado em 2010 pelo órgão americano *Food and Drugs Administration* (FDA), e em 2011, na Europa e Japão (DYBDAL-HARGREAVES; RISINGER; MOOBERRY, 2015). Os ensaios clínicos continuam e havendo possibilidade de utilização desse medicamento não apenas em pacientes com câncer de mama metastático, mas também em outros tipos de câncer como de ovário, próstata e pulmão, devido a menor e menos frequente neurotoxicidade da eribulina, além de aumentar a sobrevida dos pacientes que a utilizaram (BEESOO *et al.*, 2014; GUERRA, 2015).

Granato *et al.* (2005) isolaram serotonina de *Cliona delitrix*, destacando que este foi o primeiro relato feito na literatura. Embora o extrato metanólico de *C. delitrix* tenha apresentado atividade antimetabólica contra linhagens de células MCF-7 (câncer de mama), os autores preferiram aprofundar as investigações para verificar se a atividade observada se deve ou não à presença da serotonina.

Kossuga *et al.* (2007) isolaram diferentes compostos a partir de esponjas: o alcaloide guanidínico isoptilocaulina de *Monanchora aff. arbuscula*, com atividade citotóxica e potente atividade antibacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis*; um esterol trissulfatado das espécies *Petromica ciocalyptoides* e *Topsentia ophiraphidites*, com atividade inibidora contra uma transferase isolada de *Leishmania tarentolae*; e cinco derivados de dibromotirosina de *Aplysina* sp., uma fonte de substâncias bromadas derivadas da tirosina. Granato *et al.* (2005) também relataram o isolamento de dois compostos aromáticos biogeneticamente derivados da dibromotirosina da esponja *Verongula gigantea*.

A fração lipídica do extrato da esponja *Cliona tenuis* (Clionidae), constituído de ésteres metílicos, glicerídeos, glicolipídios, fosfolipídios e ácidos graxos livres, exibiu atividade anti-incrustante (CASTELLANOS; DUQUE, 2008). De acordo com Selvin e Lipton (2004), a esponja *Dendrilla nigra* exibiu potente atividade nos ensaios antibacteriano, citotóxico contra *Artemia*, larvicida, anti-incrustação e ictiotóxico. A esponja *Axinella donnani* foi menos ativa no ensaio de citotoxicidade contra *Artemia*. Os metabólitos secundários de *Clathria*

gorgonoides foram altamente citotóxicos, embora tenham exibido pouca atividade nos demais bioensaios.

Resultados promissores contra patogenias que acometem o sistema nervoso humano foram revelados recentemente. Schroif-Grégoire *et al.* (2015) isolaram da esponja *Agelas cf. mauritiana* um composto imidazólico, a debromoqueramadina, que é um análogo brominado da queramadina. A queramadina é um antagonista de receptores serotoninérgicos, os quais são importantes no tratamento das síndromes depressivas, transtornos de ansiedade e alguns tipos de transtorno de personalidade.

Antioxidantes são substâncias que em baixas concentrações são capazes de prevenir ou controlar processos oxidativos de um determinado substrato. Têm papel importante na conservação de alimentos, pois retardam ou previnem sua deterioração e também são promotores de saúde evitando a iniciação e propagação de doenças no corpo. Podem ser encontrados em plantas, algas, animais e micro-organismos, mas também podem ser sintetizados quimicamente (SHAHIDI; ZHONG, 2015; SUCUPIRA *et al.*, 2012).

Existem diversos métodos para avaliar a capacidade antioxidante de substâncias. Os ensaios possuem diferentes mecanismos de ação, portanto, devem ser escolhidos com base em suas vantagens e limitações de acordo com o objetivo do antioxidante. O que é preconizado de acordo com a literatura é que se utilize mais de um ensaio para mensurar a capacidade antioxidante de um composto, pois não há uma técnica capaz de determinar por completo a capacidade antioxidante de uma amostra (SHAHIDI; ZHONG, 2015; SUCUPIRA *et al.*, 2012).

O sequestro do radical DPPH é um método amplamente utilizado na busca de antioxidantes naturais devido a sua estabilidade, rapidez e praticidade. É baseado na mudança da absorvância do radical ao reagir com um antioxidante que age como sequestrador de radicais livres ou doador de hidrogênio (ANTOLOVICH *et al.*, 2001; MOLYNEUX, 2004; PYRZYNSKA; PEKAL, 2013; WANG *et al.*, 2009).

A capacidade de quelar metais é um dos mecanismos de ação antioxidante mais importantes devido aos íons ferrosos agirem como pró-oxidantes em consequência da habilidade de transferir elétrons. Esse método é baseado na formação de um complexo de Fe^{2+} e ferrozina que é desfeito na presença de compostos antioxidantes (ADJIMANI; ASARE, 2015; ANTOLOVICH *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010).

O ensaio de redução de íons férricos foi inicialmente usado como um método *in vivo* utilizando plasma e tripiridiltriazina (TPTZ) como ligante de ferro, no entanto, foi modificado para testes em outros substratos como alimentos, extratos de plantas, sucos, entre outros. É um método simples e rápido e diferente de outras metodologias, o aumento da

absorbância indica maior intensidade da atividade antioxidante (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2012; ANTOLOVICH *et al.*, 2001; SHAHIDI; ZHONG, 2015).

O branqueamento do β -caroteno, baseado na co-oxidação dos substratos β -caroteno e ácido linoleico, é considerado um método rápido, simples, sensível, mas não específico, pois sofre interferência de oxidantes como o oxigênio ou outras substâncias redutoras. Apesar disso, é amplamente utilizado e como não é necessário utilizar temperaturas elevadas nesse ensaio, ele é capaz de avaliar a atividade antioxidante em compostos termossensíveis. A descoloração ocorre em consequência dos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico atacarem as duplas ligações do β -caroteno resultando na perda do cromóforo. Caso a amostra contenha compostos antioxidantes, o ácido linoleico é protegido, evitando a formação de radicais (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; SUCUPIRA *et al.*, 2012).

Na revisão de Sucupira *et al.* (2012), outras metodologias para a determinação da atividade antioxidante foram apresentadas. Dentre elas, alguns exemplos serão mencionados aqui. A determinação da captura de radicais livres por espectrometria de ressonância de spin de elétrons, o radical livre é acoplado a um composto nitroso formando um complexo estável que é detectável pela técnica, que é recente, porém pouco utilizada devido ao alto custo de instrumentação. A determinação da oxidação de moléculas, utilizando algum substrato lipídico, como o ácido linoleico, que avalia sua oxidação pela adição de íons metálicos (Cu^+ e Fe^{2+}) ou pelo calor, causando a formação de compostos como o malonaldeído, medido pela técnica TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). O método do radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), baseado na habilidade do antioxidante capturar o radical ABTS, causando uma queda na absorbância do radical e, conseqüentemente, permitindo analisar compostos lipofílicos e hidrofílicos. No método ORAC (capacidade de absorção de radicais de oxigênio), os radicais provocam a diminuição da fluorescência de proteínas. Na presença de antioxidantes, ocorre a doação de átomos de hidrogênio, e a fluorescência é mantida.

Leirós *et al.* (2015) provaram que quatro metabólitos derivados da esponja *Spongionella* sp. possuem importante atividade antioxidante nos neurônios primários, por reduzirem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e conservarem a função mitocondrial, resultados considerados muito promissores considerando as investigações sobre o desenvolvimento de drogas para o tratamento do mal de Alzheimer.

Cheng *et al.* (2016) isolaram uma nova quinolona clorinada, angelolina A, de actinobactérias *Streptomyces* sp. SB345, cultivadas a partir da esponja *Agelas oroides* do Mar

Mediterrâneo. O composto exibiu potencial antioxidante, sendo capaz de reduzir danos genômicos induzidos pelo indutor de estresse oxidativo 4-nitroquinolina-1-óxido, que é carcinogênico e mutagênico. Além disso, a angelolina A inibiu a formação e o crescimento da bactéria *Chlamydia trachomatis* de maneira dose-dependente com CL₅₀ de 9,54 ± 0,36 µM. Interessantemente, os dados experimentais mostraram que a atividade anticlamídia da agelolina A parece estar relacionada com seu potencial antioxidante. Tais resultados demonstram que a actinomicetos associados às esponjas marinhas são fontes ricas de produtos naturais com novas atividades farmacológicas e relevância quanto à descoberta de drogas.

Estudos realizados por Zhang *et al.* (2003) revelaram que mais de 10% das espécies de esponjas marinhas investigadas exibiram atividade citotóxica sugerindo a produção de compostos com potencial de aplicação como drogas citotóxicas. A produção de compostos citotóxicos pelas esponjas deve estar associada com uma estratégia de impedir o crescimento de competidores por espaço e por outros recursos do seu habitat (RIVERA; UY, 2012).

Uma fração citotóxica isolada de *Topsentia ophiraphidites* mostrou efeito antiproliferativo frente a duas linhagens de células, uma de ovário de hamster e outra de tumor Jurkat de um adolescente com leucemia, mas nenhum efeito genotóxico do tipo crônico ou, quando registrado, apenas leve (BLANDÓN *et al.*, 2013).

Eltamany *et al.* (2015) isolaram e identificaram ceramidas da esponja do Mar Vermelho, *Sphaciospongia vagabunda*, com atividade contra linhagens de células cancerígenas de fígado e de mama, comparável àquela do padrão doxorrubicina, que é uma droga amplamente usada em quimioterapia de tumores malignos.

Mahdian *et al.* (2015) determinaram atividade citotóxica em extratos das esponjas marinhas do Golfo Pérsico, *Ircinia echinata* e *Dysidea avara*, contra linhagens de células cancerígenas (HeLa e PC12). Entretanto, nas frações isoladas por cromatografia líquida de alta eficiência, o crescimento celular não foi significativamente inibido.

Selvin e Lipton (2004) encontraram metabólitos secundários de três espécies de esponjas, *Dendrilla nigra*, *Axinella donnani* e *Clathria gorgonoides*, com atividades antibacteriana, citotóxica contra náuplios de *Artemia*, larvicida frente às larvas de mosquito *Culex* sp., anti-incrustante e antipredação, em diferentes graus.

Carballo *et al.* (2002) consideram o ensaio de mortalidade de náuplios de *Artemia*, amplamente aceito, como indicativo para a potencial citotoxicidade *in vitro* e atividade farmacológica em produtos naturais marinhos. Na verdade, esse ensaio de letalidade contra náuplios de *Artemia* é considerado uma das ferramentas mais úteis para a avaliação preliminar

da biotoxicidade e do bioensaio com atividade citotóxica contra alguns tumores sólidos que acometem seres humanos.

Artemia sp., pertencente ao Filo Arthropoda, é um microcrustáceo de água salgada com comprimento médio de 10 µm. É um modelo biológico bastante utilizado em ensaios de toxicidade de produtos naturais inclusive de esponjas marinhas por ser prático e barato, além de ser considerada uma triagem preliminar que indica propriedades farmacológicas como antitumorais e anticancerígenas (ABATZOPOULOS *et al.*, 2013; GELANI; UY, 2016; UTAMI; WAHYUDI; BATUBARA, 2014).

O ensaio avalia o grau de dano que um organismo sofre após um determinado período de exposição, podendo ser classificado como teste de toxicidade aguda ou de toxicidade crônica. No teste de toxicidade aguda são quantificadas as concentrações letais de um determinado composto ou substância e calcula-se a concentração letal que leva à morte de 50% dos indivíduos (CL₅₀), após 24 h ou 48 h de exposição. No teste da toxicidade crônica, por sua vez, estima-se a concentração mais efetiva da substância que provoca efeitos em 50% da população testada, após um período de tempo superior a 48 h (BUSTOS-OBREGON; VARGAS, 2010).

O litoral brasileiro com cerca de 8.500 km de extensão possui grande biodiversidade e, conseqüentemente, enorme potencial de compostos naturais biologicamente ativos. Relativamente poucos organismos marinhos foram investigados quanto às suas propriedades químicas e farmacológicas (ANDRADE, 2014; BIANCO *et al.* 2015; BRASIL, 2010; MEDEIROS *et al.*, 2014).

Apesar do grande interesse científico pelas esponjas, o número de trabalhos com espécies da costa brasileira, principalmente da região Nordeste, é relativamente pequeno, razão pela qual a esponja marinha *Ircinia* sp., coletada na Praia do Pacheco, litoral do Ceará, foi usada neste trabalho com o objetivo de determinar a atividade antioxidante *in vitro* e a atividade citotóxica usando náuplios de *Artemia* sp.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do material e Preparação dos extratos

Exemplares da esponja *Ircinia* sp. foram coletados na Praia do Pacheco, Caucaia-CE em fevereiro de 2015, Licença do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade SISBIO Nº 33.913, durante a maré baixa e transportados em sacos plásticos contendo água do mar para o Laboratório de Produtos Naturais Marinhos (PROMAR), do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará. A identificação taxonômica até gênero foi feita com base em Hadju, Peixinho e Fernandez (2011) (FIGURA 3).

Figura 3 – Exemplar da esponja *Ircinia* sp. coletada na Praia do Pacheco, Caucaia-CE em fevereiro de 2015.



Classificação Taxonômica

Reino: Animalia
 Filo: Porifera
 Classe: Desmospongiae
 Ordem: Dictyoceratida
 Família: Irciniidae
 Gênero: *Ircinia*
 Espécie: *Ircinia* sp.

Fonte: AUTORA (2018)

Em laboratório, as esponjas foram lavadas com água destilada para retirada de impurezas, congeladas a -24°C , liofilizadas e, posteriormente, trituradas em triturador doméstico (Cadence, MDR 301), obtendo-se uma massa de 175 g.

O material triturado foi suspenso em diclorometano (DCM), na proporção de 1:10 (p/v), permanecendo nessa condição por 48 h. Após este tempo, a suspensão foi filtrada através de algodão, e o precipitado submetido a mais quatro extrações. Em seguida, o mesmo processo foi repetido, mas dessa vez usando etanol a 70% (EtOH 70%) como solvente de extração.

Separadamente, os extratos DCM e EtOH 70% foram concentrados em rotavapor sob vácuo e transferidos para frascos previamente pesados. O resíduo de DCM foi evaporado em placa aquecedora, enquanto o EtOH 70% foi liofilizado. Depois de secos, os frascos foram novamente pesados e a diferença de peso correspondeu a massa de cada extrato, que foi usada para o cálculo do rendimento, considerando 100% a massa de inicial de 175 g.

Os extratos DCM e EtOH 70% da esponja *Ircinia* sp. (20 mg) foram solubilizados em 1 mL de dimetilsulfóxido a 5% (DMSO 5%) e 19 mL de metanol a 50% (MeOH 50%), separadamente, resultando na concentração 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a partir da qual foram procedidas diluições sucessivas, obtendo-se as concentrações 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 e 7,8125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, utilizadas para a determinação da atividade antioxidante *in vitro* por quatro metodologias diferentes.

Para a determinação da atividade citotóxica, foram pesados 8 mg dos extratos DCM e EtOH 70%, separadamente, e dissolvidos em 0,4 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% e 7,6 mL de água do mar, obtendo-se uma solução estoque (8 mL) na concentração de 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Da mesma forma, a partir da concentração de 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram feitas as diluições com água do mar para 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625 e 7,8125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, as quais foram utilizadas para a realização do teste, em triplicata. Uma solução contendo apenas DMSO a 5% e água do mar, também foi preparada e funcionou com controle do teste.

2.2 Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

2.2.1 Capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

A molécula de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) é considerada um radical livre estável, considerando o aspecto de deslocamento do elétron de reposição sobre ela como um todo, de modo que a molécula não sofre dimerização, que seria o caso com a maioria dos outros radicais livres. O deslocamento do elétron de reposição também confere um aumento da intensa cor violeta do DPPH, cuja banda de absorção está centrada em aproximadamente 520 nm. Quando a solução de DPPH é misturada a um substrato capaz de doar um átomo de hidrogênio, ou seja, um composto antioxidante, ocorre aumento da forma reduzida, difenil-picril-hidrazina (DPPH₂), acompanhado de perda da coloração violeta e aparecimento de um amarelo claro devido à presença do grupo picril residual no meio reacional (MOLYNEUX, 2004; SUGAPPRIYA; SUDARSANAM, 2016).

A capacidade de sequestro do radical DPPH, baseada no método original de Blois (1958), foi determinada de acordo com Alam, Bristi e Rafiquzzaman (2013), com algumas modificações, sendo preparados tubos denominados amostra (extratos da esponja *Ircinia* sp. nas concentrações 7,8125 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), branco da amostra e controle da amostra (QUADRO 1).

Quadro 1 - Determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH.

Tubos	Volume (mL)		
	Extrato	Solução metanólica de DPPH (75 µM)	Metanol
Amostra	0,5	2,5	-
Branco da amostra	0,5	-	2,5
Controle da amostra	-	2,5	0,5

O *L*-ácido ascórbico (A5960, Sigma), nas mesmas concentrações dos extratos, foi utilizado como controle positivo, sendo tratado da mesma forma dos extratos.

Todos os tubos (amostra, branco da amostra, controle da amostra e controle positivo) foram incubados no escuro à temperatura ambiente por 30 min. Após esse tempo, as absorvâncias foram lidas em leitora de microplacas (Biochrom Asys UVM 340) a 517 nm.

A capacidade de sequestro do radical de DPPH foi calculada de acordo com a Equação 1 e expressa em porcentagem.

$$\text{Capacidade de sequestro do radical DPPH (\%)} = \frac{[\text{Abs}_{\text{controle}} - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}})]}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \times 100\% \quad (1)$$

2.2.2 Poder de quelação de íons ferrosos (FIC)

A metodologia utilizada para determinar o poder de quelação de íons ferrosos (FIC) foi descrita por Wang, Jónsdóttir e Ólafsdóttir (2009). A ferrozina pode, quantitativamente, formar complexos com íons ferrosos, produzindo uma coloração rosa. Entretanto, na presença de agentes quelantes nas amostras (extratos), a formação do complexo é interrompida, levando à redução na intensidade dessa coloração (ADJIMANI; ASARE, 2015).

Foram preparados os tubos denominados amostra (extratos da esponja *Ircinia* sp. nas concentrações 7,8125 a 1.000 µg mL⁻¹), branco da amostra e controle da amostra (QUADRO 2).

O sal dissódico etilenodiamino tetra-acético (EDTA - C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈.2 H₂O - Vetec), nas mesmas concentrações dos extratos, foi utilizado como controle positivo, sendo tratado da mesma forma dos extratos.

Quadro 2 - Determinação do poder de quelatação de íons ferrosos (FIC).

Tubos	Volume (mL)			
	Extrato	Água destilada	Cloreto ferroso (2 mM)	Ferrozina (5 mM)
Amostra	1	1,35	0,05	0,1
Branco da amostra	1	1,45	0,05	-
Controle da amostra	-	2,35	0,05	0,1

Todos os tubos (amostra, branco da amostra, controle da amostra e controle positivo) foram incubados à temperatura ambiente por 10 min. Decorrido esse tempo, as absorbâncias foram medidas em 562 nm em leitora de microplacas (Biochrom Asys UVM 340).

A inibição da formação do complexo ferrozina-Fe²⁺, referida como poder de quelatação de íons ferrosos (FIC), foi calculada de acordo com a Equação 2 e expressa em porcentagem.

$$\text{Poder de quelatação de íons ferrosos (\%)} = \frac{[\text{Abs}_{\text{controle}} - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}})]}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \times 100\% \quad (2)$$

2.2.3 Poder de redução de íons férricos (FRAP)

O poder de redução de íons férricos (FRAP), determinado pelo método descrito por Ganesan, Kumar e Bhaskar (2008), baseia-se na capacidade dos componentes antioxidantes presentes nas amostras (extratos) de reduzir íons férricos (Fe³⁺) a íons ferrosos (Fe²⁺), numa reação colorimétrica redox-ligada que envolve a transferência de elétrons. Caso essa redução ocorra, pode-se observar uma mudança na coloração de verde para azul da Prússia, a qual é medida no comprimento de onda de 700 nm (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; BERKER *et al.*, 2007; CHEW *et al.*, 2008).

Em tubos de ensaio foram adicionados 1 mL dos extratos da esponja *Ircinia* sp., nas concentrações 7,8125 a 1.000 µg mL⁻¹, 2,5 mL de tampão fosfato a 0,2 M (pH 6,6) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio a 1%. Os tubos foram colocados em banho-maria a 50°C por 20 min. Findo este tempo, eles foram rapidamente resfriados em banho de gelo à temperatura ambiente e, em seguida, foram adicionados 2,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% para parar a reação. Após vigorosa agitação, uma alíquota de 2,5 mL da camada superior dessa mistura foi retirada e adicionados 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto de ferro III a 0,1%, para

completar um volume final de 5,5 mL. A absorvância foi medida em leitora de microplacas (BiochromAsys UVM 340) a 700 nm, tendo em vista a formação do complexo férrico-ferrocianeto de potássio azul da Prússia, após 10 min de incubação à temperatura ambiente. O butil-hidroxianisol (BHA - B1253, Sigma), nas mesmas concentrações dos extratos, foi utilizado como controle positivo, sendo tratado da mesma forma dos extratos.

Maiores absorvâncias indicaram maior poder de redução de íons férricos (FRAP) e, conseqüentemente, maior atividade antioxidante dos extratos DCM e EtOH 70% nas diferentes concentrações.

2.2.4 Atividade inibitória do branqueamento do β -caroteno (BCB)

A atividade antioxidante foi determinada pela oxidação do sistema β -caroteno e ácido linoleico, de acordo com Dhongade e Chandewar (2013), com algumas adaptações. O método se baseia na oxidação do ácido linoleico, um ácido graxo insaturado, pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pela água oxigenada. Os radicais livres formados dão início à oxidação do β -caroteno, levando-o a perder seu cromóforo e, conseqüentemente, sua coloração laranja original, com diminuição da absorvância. As substâncias antioxidantes presentes nas amostras (extratos) podem reagir e neutralizar os radicais livres, impedindo ou reduzindo a extensão da descoloração, a qual é acompanhada por espectrofotometria no visível (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; CHEW *et al.*, 2008).

Inicialmente, uma solução de β -caroteno (C9750, Sigma) em clorofórmio (1 mg mL⁻¹) foi transferida para um balão de fundo redondo, contendo 40 mg de ácido linoleico e 400 mg de Tween 40, um polisorbato emulsificante. Em seguida, o clorofórmio foi evaporado sob vácuo a 40°C em evaporador rotativo. Ao resíduo semi-sólido foram adicionados 100 mL de água Milli-Q saturada de oxigênio. Após 1 min de vigorosa agitação, uma emulsão estável foi formada e dela retirou-se uma alíquota de 3 mL que foi transferida para tubos de ensaio, seguida da adição de 1 mL dos extratos DCM e EtOH 70% da esponja *Ircinia* sp. nas concentrações 7,8125 a 1.000 μ g mL⁻¹. A absorvância no tempo zero (absorvância inicial) foi medida em leitora de microplacas (Biochrom Asys UVM 340) a 470 nm. A seguir, os tubos denominados amostra foram incubados em banho-maria a 50°C por 3 h e suas absorvâncias lidas novamente no mesmo comprimento de onda (absorvância final). O controle da amostra foi preparado substituindo-se o volume do extrato por igual volume do solvente. O butil-hidroxianisol (BHA

- B1253, Sigma), nas mesmas concentrações dos extratos, foi utilizado como controle positivo, sendo tratado da mesma forma dos extratos.

A atividade antioxidante medida pela capacidade do extrato de impedir ou reduzir a descoloração (oxidação) do β -caroteno (BCB) foi calculada pela Equação 3 e expressa em porcentagem.

$$\text{BCB (\%)} = \left(\frac{\text{Abs}_{\text{final}}}{\text{Abs}_{\text{inicial}}} \right) \times 100\% \quad (3)$$

2.3 Ensaio de letalidade contra náuplios de *Artemia* sp.

O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia de Veiga e Vital (2002). Uma porção de 300 mg de cistos de artêmia, obtidos comercialmente, foi pesada e transferida para um becker contendo 300 mL de água do mar (1 g L^{-1}), permanecendo sob iluminação e aeração constantes à temperatura ambiente. Nessas condições os náuplios eclodiram e, após 48 h, atingiram a fase II de desenvolvimento, caracterizada pelo início da alimentação, os quais foram usados no ensaio de letalidade.

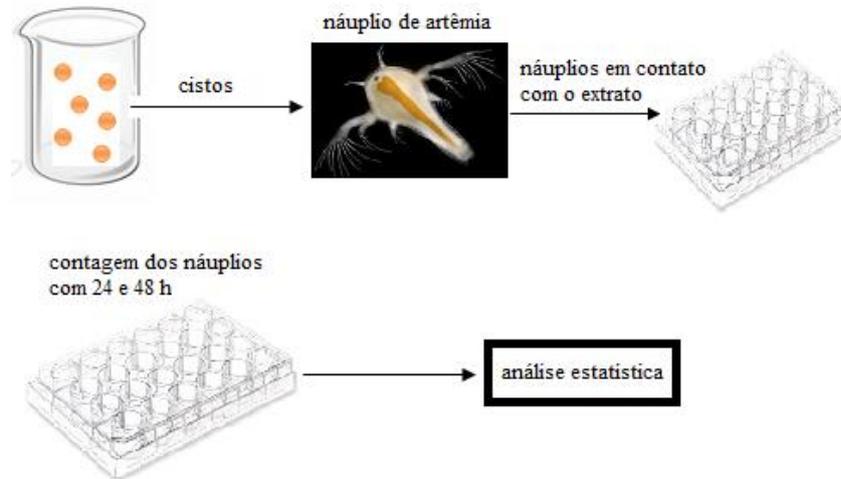
Em placas estéreis de acrílico com 24 poços, foram colocados aproximadamente 10 náuplios de artêmia em cada poço contendo 2,5 mL dos extratos DCM e EtOH 70%, solubilizados em MeOH 50% e DMSO 5%, nas concentrações 7,8125 a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. O controle do teste consistiu na adição da solução contendo apenas DMSO 5% e água do mar (2,5 mL) e náuplios (aproximadamente 10 indivíduos). As placas foram mantidas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, na ausência de luz.

Após 24 h foi feita a primeira contagem do número de náuplios mortos com auxílio de uma lupa. A segunda contagem dos indivíduos mortos ocorreu após 48 h.

Os ensaios foram realizados em triplicata. Para validade do ensaio, admitiu-se mortalidade máxima de 10% no controle do teste.

O esquema do ensaio de letalidade contra náuplios de *Artemia* sp. está apresentado (FIGURA 4).

Figura 4 – Esquema do ensaio de letalidade contra náuplios de *Artemia* sp.



Fonte: AUTORA (2018)

2.4 Análise estatística

Os resultados da atividade antioxidante dos extratos DCM e EtOH 70% da esponja marinha *Ircinia* sp. foram expressos em média \pm desvio padrão.

As atividades antioxidantes dos extratos da esponja *Ircinia* sp., obtidos em DCM e EtOH 70%, pelas quatro metodologias descritas anteriormente foram submetidas, separadamente, à análise de variância unifatorial, complementada pelo teste de Tukey, quando necessário, para comparação das concentrações dos extratos (7,8125 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O teste *t* de Student não-pareado unilateral também foi aplicado para comparação dos dois extratos na mesma concentração.

A existência de correlação de Pearson entre concentração do controle positivo e atividade antioxidante foi avaliada e, no caso de resultado estatisticamente significativo, a regressão linear foi estabelecida.

Para todos os testes estatísticos, os pressupostos de normalidade e homocedasticidade foram obedecidos, e todas as análises foram feitas considerando um nível de significância de 5%.

As contagens do número de náuplios mortos no teste de letalidade foram realizadas para determinação da concentração letal que leva à morte de 50% dos indivíduos (CL_{50}).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Rendimentos dos extratos

Após os procedimentos de extração, concentração em rotavapor, evaporação em placa aquecedora e liofilização (apenas para o extrato EtOH 70%), as massas resultantes foram 9,61 g para o extrato DCM e 10,77 g para o EtOH 70%, correspondendo a rendimentos de 5,5% e 6,2%, respectivamente, considerando-se como 100% a massa de 175 g.

O resultado encontrado neste trabalho foi inferior aos reportados por Hagiwara *et al.* (2015) e por Karyawati *et al.* (2015), para extratos metanólicos, cujos rendimentos foram de 9% com a esponja *Clathria basilana* e de 23% com *Dactylospongia* sp., respectivamente.

O rendimento de extração pode variar bastante, considerando que ele é dependente de todas as condições estabelecidas para o processo, por exemplo, solvente, tempo, temperatura, aplicação ou não de agitação, proporção massa:volume, dentre outros.

3.2 Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

3.2.1 Capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

Os resultados da capacidade de sequestro do radical DPPH dos extratos DCM e EtOH 70% da esponja *Ircinia* sp. estão acompanhados daqueles obtidos para o controle positivo (ácido ascórbico) (TABELA 1, GRÁFICO 1). Os resultados de DPPH (%) variaram de $27,98 \pm 1,75$ a $40,31 \pm 1,66$ (extrato DCM) e de $23,40 \pm 2,94$ a $31,60 \pm 0,56$ (extrato EtOH 70%), ambos testados nas concentrações de 7,81 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para extrair compostos com capacidade de sequestro do radical DPPH, o DCM foi mais eficiente do que o EtOH 70% em todas as concentrações testadas ($p < 0,05$).

A capacidade de sequestro do radical DPPH dos extratos da esponja *Ircinia* sp. e do ácido ascórbico foi comparada. Os extratos (DCM e EtOH 70%) apresentaram capacidade de sequestro do radical DPPH significativa com o aumento da concentração no intervalo de 7,8125 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Com o ácido ascórbico, controle positivo, a capacidade de sequestro do radical DPPH também foi significativa na faixa de 7,8125 a 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($y = 25,311 + 2,137 x, n = 3, r = 0,9998$), porque a partir de 62,5 até 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$,

esse efeito foi essencialmente 100% (GRÁFICO 1), indicando que não havia mais radical livre para ser sequestrado no meio reacional.

Tabela 1 - Capacidade de sequestro do radical DPPH (média \pm desvio padrão, n = 5) do controle positivo, *L*-ácido ascórbico (A5960 Sigma) e dos extratos diclorometano (DCM) e etanol a 70% (EtOH 70%) da esponja *Ircinia* sp., nas concentrações de 7,8125 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

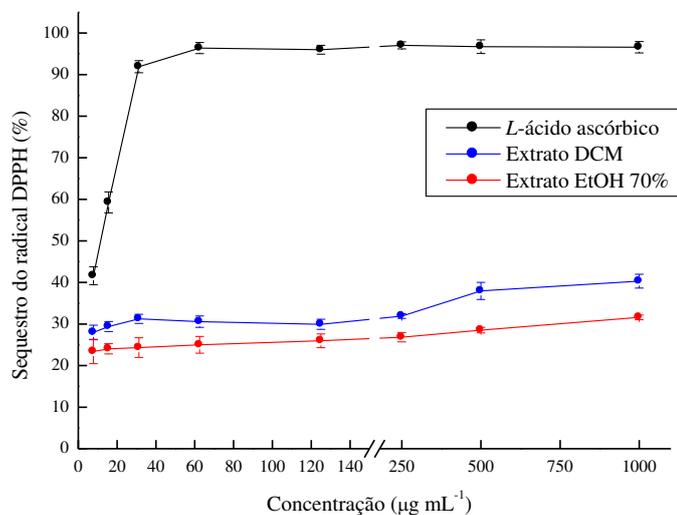
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Capacidade de sequestro do radical DPPH (%)		
	Ácido ascórbico	Extrato DCM	Extrato EtOH 70%
7,8125	41,63 \pm 2,15 ^a	27,98 \pm 1,75 ^{aA}	23,40 \pm 2,94 ^{abB}
15,625	59,26 \pm 2,52 ^b	29,40 \pm 1,21 ^{aA}	24,04 \pm 1,24 ^{abB}
31,25	91,91 \pm 1,46 ^c	31,25 \pm 1,10 ^{ba}	24,33 \pm 2,38 ^{abB}
62,5	96,38 \pm 1,34 ^d	30,57 \pm 1,37 ^{ba}	24,99 \pm 2,01 ^{abB}
125	95,98 \pm 1,07 ^d	29,93 \pm 1,21 ^{abA}	25,97 \pm 1,66 ^{abcB}
250	97,04 \pm 0,83 ^d	31,92 \pm 0,56 ^{ba}	26,83 \pm 1,14 ^{bcB}
500	96,72 \pm 1,65 ^d	37,96 \pm 2,06 ^{ca}	28,54 \pm 0,67 ^{cb}
1.000	96,59 \pm 1,37 ^d	40,31 \pm 1,66 ^{da}	31,60 \pm 0,56 ^{dB}

ANOVA e teste de Tukey na coluna - Letras minúsculas iguais ($p > 0,05$) e letras minúsculas diferentes ($p < 0,05$).

Teste *t* não-pareado unilateral na linha, entre os dois extratos - Letras maiúsculas iguais ($p > 0,05$) e letras maiúsculas diferentes ($p < 0,05$).

Fonte: AUTORA (2018)

Gráfico 1 – Capacidade de sequestro do radical DPPH do controle positivo, *L*-ácido ascórbico (A5960 Sigma), e dos extratos diclorometano (DCM) e etanol a 70% (EtOH 70%) da esponja *Ircinia* sp., nas concentrações de 7,8125 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Fonte: AUTORA (2018)

A capacidade de sequestrar o radical DPPH dos extratos foi menos da metade daquela observada com o ácido ascórbico em todas as concentrações testadas. O efeito máximo do extrato DCM, alcançado na concentração de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, não diferiu significativamente ($p = 0,2940$) daquele observado quando a reação foi feita com o controle positivo (ácido ascórbico) na menor concentração ($7,8125 \mu\text{g mL}^{-1}$). O extrato EtOH 70% apresentou efeito menos pronunciado, tendo em vista que na maior concentração ($1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$), ele foi estatisticamente menor ($p < 0,0001$) do que àquele registrado com o ácido ascórbico na menor concentração ($7,8125 \mu\text{g mL}^{-1}$).

A atividade antioxidante determinada em diversos materiais biológicos pelo método do sequestro do DPPH é um clássico da literatura. Os resultados encontrados no presente trabalho foram comparados com os publicados em artigos científicos. Alguns deles foram superiores, outros semelhantes ou até inferiores aos obtidos com os extratos DCM e EtOH 70% de *Ircinia* sp., mas, similarmente, quando a atividade dos extratos foi comparada àquela do controle positivo, este último sempre exibiu efeito mais pronunciado quanto ao sequestro do radical DPPH. A variação na atividade de diferentes extratos pode estar associada a fatores intrínsecos ao material estudado, como espécie, fase do ciclo de vida, condições do ambiente em que vive, assim como ao método de extração, incluindo solventes e condições utilizados.

Bianco *et al.* (2015) estudaram onze espécies de esponjas quanto à atividade antioxidante pelo método do DPPH. O extrato de *Ircinia* sp. apresentou CL_{50} igual a $83 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto nas outras esponjas o CL_{50} foi superior a $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Aktas *et al.* (2013) analisaram vinte espécies de esponjas de seis localidades do Mar Mediterrâneo. As espécies do gênero *Ircinia*, coletadas em Kemer e Hatay, apresentaram DPPH entre 2,1 e 21,8%. As atividades antioxidantes nas demais espécies ficaram no intervalo de 1,5 a 91,8%.

Arunachalam e Appadorai (2013) isolaram a bactéria *Virgibacillus* sp. da esponja *Callyspongia diffusa* e verificaram que os metabólitos bacterianos apresentaram capacidade de sequestro dos radicais DPPH livres com dose-dependência. Na concentração de $1.600 \mu\text{g mL}^{-1}$, essa atividade foi de 39,61%, mas naquela de $2.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, a atividade aumentou para 46,56%. O CL_{50} dos metabólitos bacterianos produzidos foi de $857,49 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Assim como Aktas *et al.* (2013) e Arunachalam e Appadorai (2013), Seradj *et al.* (2012) e Shaaban *et al.* (2012) também verificaram a existência de dose-dependência nessa atividade, ou seja, a capacidade de sequestro do radical DPPH cresce conforme aumenta a concentração dos extratos.

Os metabólitos fenólicos presentes em esponjas marinhas têm sido relatados como possuidores de atividade antioxidante (UTKINA *et al.*, 2004). De acordo com Blois (1958), compostos antioxidantes como cisteína, glutatona, ácido ascórbico, tocoferol e compostos aromáticos polihidroxi, por exemplo, hidroquinona, pirogallol, ácido gálico, reduzem e descoloram o radical DPPH devido à capacidade deles de doar hidrogênio.

O Quadro 3 apresenta alguns resultados citados na literatura para extratos de esponjas marinhas.

Quadro 3 – Capacidade de sequestro do radical DPPH de extratos de esponjas marinhas.

Esponjas	Concentração do extrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Solvente(s) de extração	Atividade (%)	Referências
<i>Ircinia sp.</i>	7,8125 – 1.000	DCM EtOH 70%	27,98 – 40,31 23,40 – 31,60	Presente trabalho
<i>Ircinia fasciculata</i> <i>I. pinulosa</i> <i>Agelas oroides</i> <i>Dysidea avara</i> <i>Axinella cannabina</i> <i>A. damicornis</i> <i>A. verrucosa</i>	50 – 800	MeOH	2,1 – 21,8 2,6 – 14,2 1,5 – 73,8 3,3 – 91,8 1,3 – 46,9 4,1 – 70,9 9,0 – 83,9	AKTAS <i>et al.</i> (2013)
<i>Clathria basilana</i>	250 – 1.000	MeOH Hx	27,76 – 88,21 6,48 – 28,29	KARYAWATI <i>et al.</i> (2015)
<i>Spongia officinalis</i> var. <i>ceylonensis</i> <i>Sigmatocia carnososa</i>	62,5 – 1.000	MeOH	~5 – 55 ~40 – 90	KRISHNAN; KEERTHI (2016)
<i>Callyspongia sp.</i> <i>Pseudosaberites clavatus</i>	62,5 – 500	MeOH	~20 – 95 ~40 – 95	SERADJ <i>et al.</i> (2012)
<i>Smenospongia</i> <i>Callyspongia</i> <i>Niphates</i> <i>Stylissa</i>	10 – 1.000	DCM-MeOH	10,85 – 30,64 47,70 – 72,19 26,31 – 40,17 16,39 – 38,48	SHAABAN <i>et al.</i> (2012)
<i>Geodia perarmata</i>	-	H ₂ O MeOH	48,59 \pm 0,1 8,82 \pm 0,1	TAHERI; JALALINEZHAD (2015)

- Não informada.

3.2.2 Poder de quelação de íons ferrosos (FIC)

Os resultados do poder de quelação de íons ferrosos (FIC) dos extratos DCM e EtOH 70% da esponja *Ircinia* sp. estão apresentados na Tabela 2, acompanhados daquele obtido para o controle positivo (ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA).

Com o aumento das concentrações de 7,8125 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, observou-se que o poder de quelação de íons ferrosos dos extratos DCM ($p < 0,001$) e EtOH 70% ($p < 0,001$) aumentou significativamente. O mesmo foi observado para o EDTA, mas apenas na faixa de 7,8125 a 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($y = 38,343 + 0,982 x, n = 4, r = 0,9419$). Depois de 125 até 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a formação do complexo ferrozina- Fe^{2+} foi quase completamente inibida (GRÁFICO 2).

O extrato DCM apresentou atividade entre 10,13% e 40,15%, enquanto a do EtOH 70% variou de 17,73% a 28,30%, sendo que, nas duas maiores concentrações testadas, o extrato DCM foi significativamente mais eficiente ($p < 0,05$) do que o EtOH 70% para extrair compostos com poder de quelação de íons ferrosos.

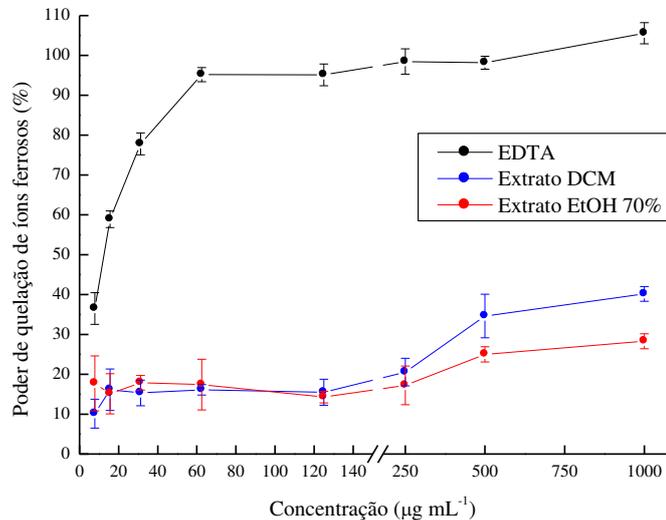
Tabela 2 – Poder de quelação de íons ferrosos (média \pm desvio padrão, $n = 5$) do controle positivo, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, Vetec) e dos extratos diclorometano (DCM) e etanol a 70% (EtOH 70%) da esponja *Ircinia* sp., nas concentrações de 7,8125 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	FIC (%)		
	EDTA	Extrato DCM	Extrato EtOH 70%
7,8125	36,51 \pm 3,96 ^a	10,13 \pm 3,61 ^{aA}	17,73 \pm 6,90 ^{abB}
15,625	58,91 \pm 2,10 ^b	16,15 \pm 5,20 ^{bcA}	15,13 \pm 5,04 ^{abB}
31,25	77,81 \pm 2,74 ^c	15,33 \pm 3,20 ^{ba}	17,89 \pm 1,83 ^{abA}
62,5	95,19 \pm 1,77 ^d	16,12 \pm 1,31 ^{ba}	17,42 \pm 6,35 ^{cdB}
125	95,13 \pm 2,73 ^d	15,51 \pm 3,25 ^{ba}	14,28 \pm 1,46 ^{aA}
250	98,46 \pm 3,17 ^d	20,56 \pm 3,45 ^{cdA}	17,23 \pm 4,84 ^{bcA}
500	98,16 \pm 1,63 ^d	34,63 \pm 5,46 ^{eA}	25,01 \pm 1,91 ^{dB}
1.000	105,57 \pm 2,65 ^e	40,15 \pm 1,85 ^{eA}	28,30 \pm 1,88 ^{eB}

ANOVA e teste de Tukey na coluna - Letras minúsculas iguais ($p > 0,05$) e letras minúsculas diferentes ($p < 0,05$).
 Teste *t* não-pareado unilateral na linha, entre os dois extratos - Letras maiúsculas iguais ($p > 0,05$) e letras maiúsculas diferentes ($p < 0,05$).

Fonte: AUTORA (2018)

Gráfico 2 – Poder de quelação de íons ferrosos (FIC) do controle positivo, ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA, Vetec) e dos extratos diclorometano (DCM) e etanol a 70% (EtOH 70%) da esponja *Ircinia* sp., nas concentrações de 7,8125 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Fonte: AUTORA (2018)

Comparativamente à atividade do controle positivo, os extratos DCM e EtOH 70% da esponja *Ircinia* sp. apresentaram comportamento muito diferente, considerando que a partir da concentração 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o poder de quelar íons ferrosos do EDTA foi essencialmente 100%.

As atividades do extrato DCM nas concentrações maiores (500 e 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) não diferiram estatisticamente daquela obtida pelo EDTA na concentração de 7,8125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($p > 0,05$). Entretanto, a atividade do extrato EtOH 70% na maior concentração testada foi significativamente menor do que a do EDTA na menor concentração ($p = 0,0006$).

Taheri e Jalalinezhad (2015) determinaram FIC nos extratos aquoso e metanólico da esponja marinha *Geodia perarmata*, tendo encontrado 84,35% \pm 0,25% de atividade no primeiro e 39,39% \pm 0,01%, no segundo. Tais resultados foram, respectivamente superior e similar aos observados no presente trabalho, embora os autores não tenham mencionado a concentração dos extratos usados por eles.

Arunachalam e Appadorai (2013) isolaram a bactéria *Virgibacillus* sp. da esponja *Callyspongia diffusa* e verificaram que a atividade de quelação de metais dos metabólitos bacterianos foi muito pequena (0,87 \pm 0,07 mg EDTA/g extrato), quando comparada com o valor de 11,2 \pm 0,5 mg EDTA/g extrato, encontrado para o ácido ascórbico usado como referência.

3.2.3 Poder de redução de íons férricos (FRAP)

Os resultados do poder de redução de íons férricos (FRAP) dos extratos DCM e EtOH 70% da esponja *Ircinia* sp. estão acompanhados daqueles obtidos para o controle positivo (BHA) (TABELA 3, GRÁFICO 3).

Tabela 3 – Poder de redução de íons férricos (FRAP) (média \pm desvio padrão, $n = 5$) do controle positivo, butil-hidroxianisol (BHA, B1253 Sigma) e dos extratos diclorometano (DCM) e etanol a 70% (EtOH 70%) da esponja *Ircinia* sp., nas concentrações de 7,8125 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	FRAP (Abs _{700 nm})		
	BHA	Extrato DCM	Extrato EtOH 70%
7,8125	0,156 \pm 0,012 ^a	0,110 \pm 0,006 ^{abA}	0,243 \pm 0,014 ^{bB}
15,625	0,155 \pm 0,005 ^a	0,100 \pm 0,002 ^{aA}	0,221 \pm 0,009 ^{aB}
31,25	0,199 \pm 0,008 ^a	0,103 \pm 0,005 ^{abA}	0,221 \pm 0,008 ^{aB}
62,5	0,276 \pm 0,003 ^b	0,110 \pm 0,010 ^{abA}	0,240 \pm 0,016 ^{abB}
125	0,420 \pm 0,006 ^c	0,115 \pm 0,004 ^{bA}	0,241 \pm 0,010 ^{abB}
250	0,633 \pm 0,032 ^d	0,115 \pm 0,003 ^{bA}	0,231 \pm 0,007 ^{abB}
500	1,097 \pm 0,046 ^e	0,133 \pm 0,006 ^{cA}	0,261 \pm 0,012 ^{bB}
1.000	2,401 \pm 0,036 ^f	0,164 \pm 0,010 ^{dA}	0,287 \pm 0,002 ^{cB}

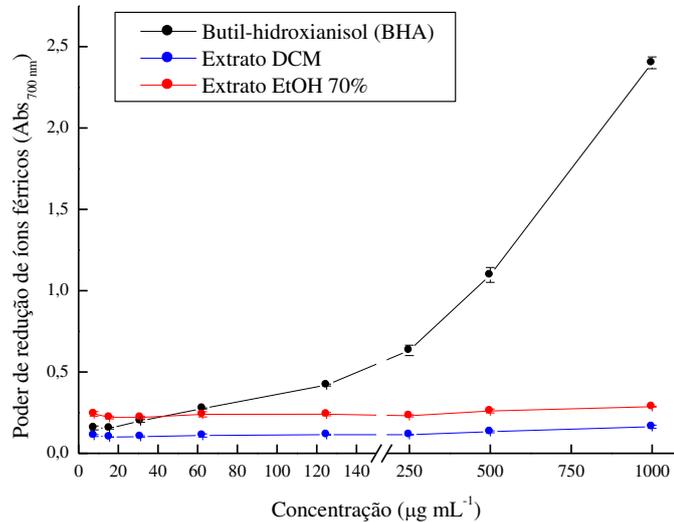
ANOVA e teste de Tukey na coluna - Letras minúsculas iguais ($p > 0,05$) e letras minúsculas diferentes ($p < 0,05$). Teste t não-pareado unilateral na linha, entre os dois extratos - Letras maiúsculas iguais ($p > 0,05$) e letras maiúsculas diferentes ($p < 0,05$).

Fonte: AUTORA (2018)

Neste ensaio, as maiores absorvâncias indicaram maior poder de redução de íons férricos (FRAP) e, conseqüentemente, maior atividade antioxidante dos extratos.

O FRAP do BHA foi significativo no intervalo de 7,8125 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($y = 0,1144 + 0,0022x, n = 8, r = 0,9971$), havendo claramente uma relação de dose-dependência entre o poder redutor e a concentração do controle positivo. Apesar da aparência não-linear entre poder redutor e concentração do controle positivo (GRÁFICO 3), devido ao corte no eixo, o modelo linear foi o que se ajustou melhor aos dados quando se procedeu ao ajustamento de curvas, feito no BioEstat 5.3 (AYRES *et al.*, s.d.), com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9942. Os outros modelos matemáticos testados, com seus respectivos R^2 , foram: exponencial (0,6862), logarítmico (0,8947) e geométrico (0,9372).

Gráfico 3 – Poder de redução de íons férricos (FRAP) do controle positivo, butil-hidroxianisol (BHA, B1253 Sigma) e dos extratos diclorometano (DCM) e etanol a 70% (EtOH 70%) da esponja *Ircinia* sp., nas concentrações de 7,8125 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Fonte: AUTORA (2018)

Aparentemente, os extratos DCM e EtOH 70% da esponja *Ircinia* sp. apresentaram poucos compostos com ação similar às redutonas, que são responsáveis por finalizar a reação em cadeia por serem capazes de doar elétrons e de reagir com os radicais livres, convertendo-os a produtos mais estáveis. Entretanto, o EtOH 70% foi significativamente mais eficiente do que o DCM com relação à extração desses compostos em todas as concentrações testadas ($p < 0,001$). Utilizando a equação supracitada, as atividades determinadas nos extratos DCM e EtOH 70% na concentração de 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ condizem com a do BHA com concentrações de 22,5 e 78,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

A relação de dose-dependência dos extratos DCM e EtOH 70% foi observada pelos aumentos das absorbâncias registradas entre as concentrações mais baixa e mais alta, que corresponderam a 64% e 29,8%, respectivamente (GRÁFICO 3).

A presença de antioxidantes no extrato acarreta a redução de Fe^{3+} para Fe^{2+} , sendo frequentemente usada como um indicador de atividade envolvendo a doação de elétrons, que é um importante mecanismo da ação antioxidante de compostos fenólicos (SOLTANI *et al.*, 2011). Geralmente as propriedades redutoras estão associadas com a presença de redutonas, cuja ação antioxidante está baseada na quebra da cadeia de radicais livres pela doação de um átomo de hidrogênio. As redutonas também reagem com certos precursores de peróxidos, prevenindo a formação de peróxidos (DUH, 1998).

Arunachalam e Appadorai (2013) encontraram moderada atividade antioxidante quanto ao FRAP atribuída aos metabólitos produzidos pela bactéria *Virgibacillus* sp. isolada da esponja *Callyspongia diffusa* de 208,76 mg/mmol Fe(II). Bianco *et al.* (2015) analisaram onze espécies de esponjas marinhas quanto à atividade antioxidante tendo encontrado FRAP, expresso em mg de equivalente ácido ascórbico (mg EAA)/g de extrato, igual a $9,0 \pm 0,9$ em *Desmapsamma anchorata* e $52,0 \pm 0,8$ em *Ircinia* sp.

O extrato DCM de *Ircinia* sp. ($0,164 \pm 0,010$), analisado neste trabalho, apresentou FRAP superior ao do extrato metanólico da esponja marinha *Geodia perarmata* ($0,140 \pm 0$) estudada por Taheri e Jalalinezhad (2015), que não informaram a concentração analisada. Entretanto, o extrato EtOH 70% de *Ircinia* sp. ($0,287 \pm 0,002$), também analisado neste trabalho, apresentou FRAP cerca de duas vezes menor do que o extrato aquoso de *G. perarmata* ($0,610 \pm 0,140$).

3.2.4 Atividade inibitória do branqueamento do β -caroteno (BCB)

Os resultados da atividade inibitória do branqueamento do β -caroteno (BCB) dos extratos DCM e EtOH 70% da esponja *Ircinia* sp. estão acompanhados daqueles obtidos para o controle positivo (BHA) (TABELA 4, GRÁFICO 4).

Neste ensaio, quanto maior a atividade antioxidante, maior é a capacidade do extrato de impedir ou reduzir a descoloração (oxidação) do β -caroteno.

Foi possível observar que o BHA impediu praticamente 100% da descoloração do β -caroteno a partir da concentração $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p > 0,05$), oferecendo proteção superior a 50% mesmo na concentração mais baixa ($7,8125 \mu\text{g mL}^{-1}$), havendo relação de dose-dependência (TABELA 4, GRÁFICO 4).

A atividade antioxidante, medida pela inibição do branqueamento do β -caroteno, observada no extrato DCM alcançou atividade significativamente mais elevada (67,88%) na concentração $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, quando comparada com as demais ($p < 0,05$). No extrato EtOH 70%, a proteção máxima de aproximadamente 66% foi registrada nas concentrações 250, 500 e $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p > 0,05$).

Na comparação dos solventes, EtOH 70% foi mais eficiente para extrair compostos capazes de proteger o β -caroteno da oxidação do que DCM ($p < 0,0001$), exceção feita às concentrações 250 e $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 4 – Atividade inibitória do branqueamento do β -caroteno (BCB) (média \pm desvio padrão, n = 5) do controle positivo, butil-hidroxianisol (BHA B1253, Sigma) e dos extratos diclorometano (DCM) e etanol a 70% (EtOH 70%) da esponja *Ircinia* sp., nas concentrações de 7,8125 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

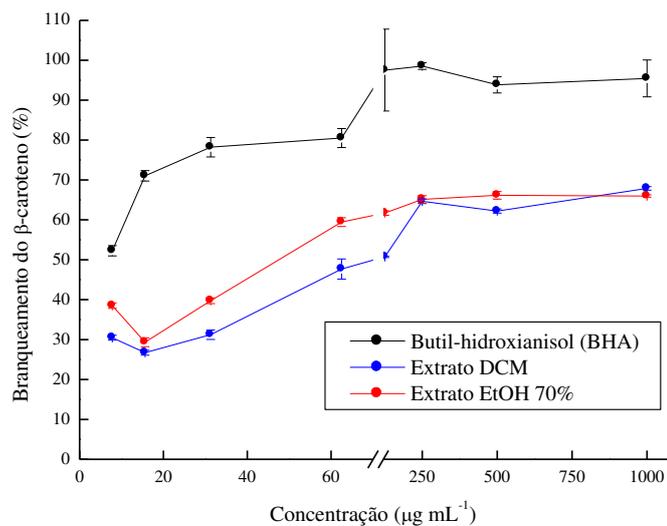
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	BCB (%)		
	BHA	Extrato DCM	Extrato EtOH 70%
7,8125	53,28 \pm 1,29 ^a	30,48 \pm 0,63 ^{bA}	38,52 \pm 0,67 ^{bB}
15,625	71,04 \pm 1,31 ^b	26,72 \pm 0,62 ^{aA}	29,35 \pm 1,12 ^{aB}
31,25	78,21 \pm 2,45 ^{bc}	31,24 \pm 1,18 ^{bA}	39,74 \pm 0,71 ^{bB}
62,5	80,51 \pm 2,37 ^c	47,69 \pm 2,51 ^{cA}	59,46 \pm 1,10 ^{cB}
125	97,54 \pm 10,27 ^d	50,76 \pm 0,19 ^{dA}	61,72 \pm 0,55 ^{dB}
250	98,55 \pm 0,84 ^d	64,66 \pm 0,57 ^{fA}	65,13 \pm 0,95 ^{eA}
500	93,85 \pm 2,02 ^d	62,22 \pm 0,52 ^{eA}	66,15 \pm 0,93 ^{eB}
1.000	95,46 \pm 4,62 ^d	67,88 \pm 0,44 ^{gA}	65,98 \pm 0,30 ^{eB}

ANOVA e teste de Tukey na coluna - Letras minúsculas iguais ($p > 0,05$) e letras minúsculas diferentes ($p < 0,05$).

Teste t não-pareado unilateral na linha, entre os dois extratos - Letras maiúsculas iguais ($p > 0,05$) e letras maiúsculas diferentes ($p < 0,05$).

Fonte: AUTORA (2018)

Gráfico 4 – Atividade inibitória do branqueamento do β -caroteno (BCB) do controle positivo, butil-hidroxianisol (BHA, B1253 Sigma), e dos extratos diclorometano (DCM) e etanol a 70% (EtOH 70%) da esponja *Ircinia* sp., nas concentrações de 7,8125 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



Fonte: AUTORA (2018)

A capacidade antioxidante total das esponjas *Aaptos suberitoides*, *Dactylospongia elegans*, *Stylissa massa*, *Haliclona* sp. e KL-05, analisadas por Rivera e Uy (2012), foi dependente da concentração dos extratos. Das cinco espécies estudadas, o extrato hexânico de *D. elegans* e o extrato acetato de etila de *A. suberitoides*, ambos na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, apresentaram as maiores atividades antioxidantes. Embora o extrato hexânico de KL-05 tenha apresentado uma atividade considerável, aquele preparado com acetato de etila não exibiu atividade, indicando que os componentes antioxidativos de KL-05 são não-polares.

Além da avaliação da atividade antioxidante *in vitro* pela capacidade de sequestro do radical DPPH, que é amplamente utilizada, diversas outras metodologias com a mesma finalidade são encontradas na literatura.

Chairman, Aja e Alagumuthu (2012) usaram quatro metodologias: atividade de superóxido dismutase (SOD), atividade de glutatona reduzida, ensaio de catalase e ensaio de glutatona peroxidase e obtiveram resultados promissores nos extratos acetato de etila das esponjas *Rhabdastrella globostellata* e *Spirastrella inconstans* var. *moeandrin*.

Montaño-Castañeda e Santafé-Patiño (2011) testaram a atividade antioxidante de extratos de sete esponjas frente ao radical ABTS (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]). Dentre as esponjas estudadas, o extrato metanólico de *Ircinia felix*, na concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, apresentou um dos melhores resultados nos ensaios preliminares chegando a 60,8% de atividade.

Arunachalam e Appadorai (2013) isolaram a bactéria Gram positiva *Virgibacillus* sp. da esponja *Callyspongia diffusa* e determinaram a atividade antioxidante dos metabólitos bacterianos por seis metodologias, três semelhantes às usadas neste trabalho e três diferentes. Em todas elas, os maiores resultados foram encontrados na maior concentração testada ($2.000 \mu\text{g mL}^{-1}$). A capacidade de sequestro de radicais hidroxila (HRSA), a capacidade de sequestro do radical óxido nítrico (NO) e a capacidade de sequestro do radical superóxido foram, respectivamente, iguais a $60,77 \pm 0,71\%$, $21,83 \pm 1,03\%$ e $25,58 \pm 0,46\%$. Quanto ao CL_{50} , os valores foram $471,07 \pm 8,87 \mu\text{g mL}^{-1}$, $1.939,39 \pm 104,97 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $1.353,28 \pm 61,68 \mu\text{g mL}^{-1}$, seguindo a mesma ordem.

Embora a atividade antioxidante de experimentos *in vitro* seja apenas um indicativo de potenciais benefícios à saúde, esses resultados são importantes como um primeiro passo sobre o levantamento da atividade antioxidante de esponja *Ircinia* sp. Assim é possível afirmar que os extratos DCM e EtOH 70% podem ser usados como uma fonte acessível de antioxidantes naturais com consequente benefício a saúde.

3.3 Ensaio de letalidade contra náuplios de *Artemia* sp.

Os resultados do ensaio de letalidade, após 24 h e 48 h de exposição, contra náuplios do microcrustáceo *Artemia* sp. no estágio II de desenvolvimento frente ao extrato diclorometano (DCM) da esponja *Ircinia* sp., nas concentrações 7,8125 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e o percentual de mortos no controle do teste, igual a 9,68%, inferior ao preconizado de 10%, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Letalidade de náuplios de *Artemia* sp. frente ao extrato diclorometano (DCM) da esponja *Ircinia* sp., nas concentrações 7,8125 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, após exposição de 24 h e 48 h.

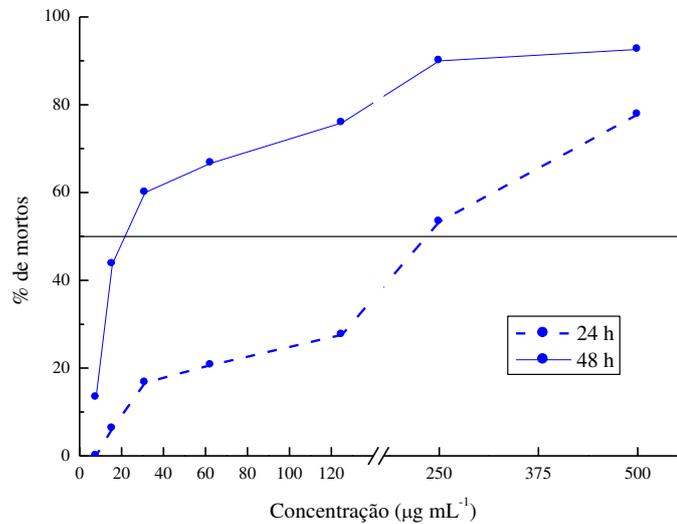
Concentração do extrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DCM					
	24 h			48 h		
	Nº total de indivíduos	Nº de indivíduos mortos	% de indivíduos mortos	Nº total de indivíduos	Nº de indivíduos mortos	% de indivíduos mortos
7,8125	30	0	0	30	4	13,33
15,625	32	2	6,25	32	14	43,75
31,25	30	5	16,67	30	18	60,00
62,5	29	6	20,69	30	20	66,67
125	29	8	27,59	29	22	75,86
250	30	16	53,33	30	27	90,00
500	27	21	77,78	27	25	92,59
Controle	31	3	9,68	31	3	9,68

Fonte: AUTORA (2018)

A concentração do extrato DCM da esponja *Ircinia* sp. capaz de matar 50% dos indivíduos (CL_{50}) após 24 h de exposição foi 232,74 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O CL_{50} do mesmo extrato depois de 48 h foi 21,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (GRÁFICO 5). Para o extrato DCM, o valor de CL_{50} obtido com 48 h de exposição foi quase onze vezes menor do que aquele registrado em 24 h.

Em ambos os tempos de exposição testados, resultados previsíveis foram observados, com número maior de indivíduos mortos à medida que as concentrações aumentaram e com maior letalidade no tempo de exposição mais prolongado.

Gráfico 5 – Letalidade de náuplios de *Artemia* sp. frente ao extrato diclorometano (DCM) da esponja *Ircinia* sp., nas concentrações 7,8125 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, após exposição de 24 h e 48 h.



Fonte: AUTORA (2018)

Os resultados do ensaio de letalidade, após 24 h e 48 h de exposição, contra náuplios do microcrustáceo *Artemia* sp. no estágio II de desenvolvimento frente ao extrato etanol a 70% (EtOH 70%) da esponja *Ircinia* sp., nas concentrações 7,8125 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e o percentual de mortos no controle do teste, igual a 6,45%, valor que se encontra dentro do que é recomendado, estão apresentados na Tabela 6.

O CL_{50} do extrato EtOH 70% da esponja *Ircinia* sp. após 24 h de exposição foi 406,98 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Com 48 h de exposição, verificou-se mortalidade superior a 50% na concentração mais baixa de 7,8125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (GRÁFICO 6).

Com 24 h de exposição, observou-se maior toxicidade no extrato DCM, cuja concentração foi quase a metade daquela do extrato EtOH 70% para matar 50% dos indivíduos (TABELAS 5 e 6, GRÁFICOS 5 e 6).

Contrariamente, na exposição de 48 h, o extrato EtOH 70% mostrou-se altamente tóxico, considerando que na menor concentração (7,8125 $\mu\text{g mL}^{-1}$), o percentual de mortos foi 62,65%, não sendo possível determinar com precisão o CL_{50} .

O principal constituinte, o poliacetileno (3S,18S,4E,16E)-eicosa-1,19-diyne-3,18-diol-4,16-dieno, da fração solúvel em DCM do extrato metanólico da esponja da Indonésia, *Callyspongia pseudoreticulata* (Haplosclerida, Callyspongiidae) apresentou CL_{50} igual a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra náuplios de *Artemia salina* que os autores consideraram uma forte toxicidade (BRAEKMAN *et al.*, 2003). Comparativamente, a toxicidade da esponja *Ircinia* sp., obtida com

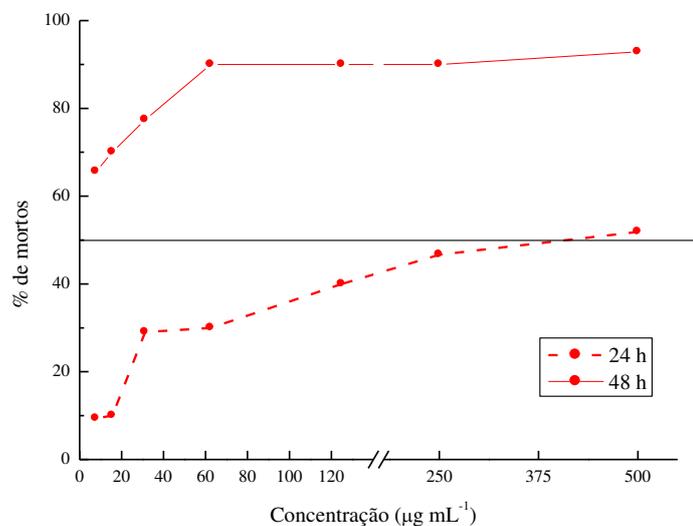
o extrato bruto, foi maior do que a do metabólito secundário isolado da espécie *C. pseudoreticulata*.

Tabela 6 – Letalidade de náuplios de *Artemia* sp. frente ao extrato etanol a 70% (EtOH 70%) da esponja *Ircinia* sp., nas concentrações 7,8125 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, após exposição de 24 h e 48 h.

Concentração do extrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	EtOH 70%					
	24 h			48 h		
	Nº total de indivíduos	Nº de indivíduos mortos	% de indivíduos mortos	Nº total de indivíduos	Nº de indivíduos mortos	% de indivíduos mortos
7,8125	32	3	9,38	32	27	65,62
15,625	30	3	10,00	30	19	70,00
31,25	31	9	29,03	31	24	77,42
62,5	30	9	30,00	30	27	90,00
125	30	12	40,00	30	27	90,00
250	30	14	46,67	30	27	90,00
500	27	14	51,85	28	26	92,86
Controle	31	2	6,45	31	2	6,45

Fonte: AUTORA (2018)

Gráfico 6 – Letalidade de náuplios de *Artemia* sp. frente ao extrato etanol a 70% (EtOH 70%) da esponja *Ircinia* sp., nas concentrações 7,8125 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, após exposição de 24 h e 48 h.



Fonte: AUTORA (2018)

Os extratos metanólicos da esponja *Sigmatocia pumila*, coletada na região sudeste da Índia, mostraram efeito citotóxico significativos de CL₅₀ contra *Artemia salina*. Após 24 h de exposição, os extratos nas concentrações 0,1%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8% e 1,0% provocaram mortalidades de 20%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, respectivamente. Isso significa dizer que o CL₅₀ foi obtido na concentração de 4.000 µg mL⁻¹ (DHINAKARAN; LIPTON, 2012), valor que indica baixa toxicidade em comparação aos extratos de *Ircinia* sp. avaliados neste trabalho.

Na literatura, valores de CL₅₀ inferiores a 1.000 µg mL⁻¹ podem ser considerados bioativos (MEYER *et al.*, 1982). Rivera e Uy (2012) avaliaram a atividade citotóxica em extratos obtidos em hexano, diclorometano e acetato de etila de cinco espécies de esponjas marinhas (*Aaptos suberitoides*, *Dactylospongia elegans*, *Stylissa massa*, *Haliclona* sp. e uma denominada KL-05), tendo sido observado que a maioria dos extratos apresentou CL₅₀ inferior a 1.000 µg mL⁻¹, semelhante ao encontrado no ensaio de toxicidade do presente trabalho.

Outros trabalhos como o de Abdillah *et al.* (2015) avaliaram a toxicidade de extratos EtOH 70% de sete esponjas marinhas (*Aaptos suberitoides*, *Callyspongia* sp., *Fascaplysinopsis reticulata*, *Xestospongia* sp., *Acanthella* sp., *Petrosia contignata* e *Xestospongia exigua*) e encontraram resultados de CL₅₀ variando de 61,28 a 574,58 µg mL⁻¹, considerados pelos autores como alta toxicidade. Tais concentrações permitem considerar os extratos DCM e EtOH 70% da *Ircinia* sp. com elevada toxicidade, tendo em vista que os CL₅₀ foram inferiores, oscilando de < 7,8125 a 406,98 µg mL⁻¹.

4 CONCLUSÕES

Os dois extratos, diclorometano (DCM) e etanol a 70% (EtOH 70%), da esponja marinha *Ircinia* sp, nas oito concentrações testadas (7,8125 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), apresentaram atividade antioxidante, determinada pelas quatro metodologias usadas. Todas as atividades dos extratos foram inferiores àquelas dos controles positivos.

O extrato DCM apresentou os maiores resultados de atividade de sequestro do radical DPPH, poder de quelação de íons ferrosos (FIC) e atividade inibitória do branqueamento do β -caroteno (BCB), enquanto o extrato EtOH 70%, o maior poder de redução de íons férricos (FRAP).

Os melhores resultados de atividade antioxidante foram obtidos pelo BCB, tendo em vista que, em ambos os extratos, os resultados foram mais próximos daqueles encontrados para o controle positivo (BHA).

As atividades antioxidantes dos extratos da *Ircinia* sp. se assemelharam às informações disponíveis na literatura.

No ensaio de letalidade contra náuplios de *Artemia* sp., maior toxicidade foi observada nas concentrações mais elevadas e no tempo de exposição mais prolongado.

Após 24 h de exposição, o CL_{50} do extrato DCM foi menor do que o do EtOH 70%, indicando que o primeiro foi mais tóxico.

Após 48 h de exposição, o CL_{50} do extrato EtOH 70% foi muito maior do que o do DCM, indicando maior toxicidade.

Com base nas atividades antioxidante e citotóxica, compostos com potencial farmacológico podem ser isolados da esponja marinha *Ircinia* sp. Mais estudos são necessários para avaliar o potencial dos compostos bioativos da espécie, bem como sua aplicabilidade.

O rendimento dos extratos DCM e EtOH 70% de *Ircinia* sp. foi 5,5% e 6,2%, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- ABATZOPOULOS, T. J.; BEARDMORE, J.; CLEGG, J. S.; SORGELOOS, P. (Eds.). (2013). *Artemia: Basic and Applied Biology* (Vol. 1). Springer Science & Business Media. Disponível em: <<http://www.springer.com/in/book/9781402007460>> Acesso em: 6 jun. 2018.
- ABDILLAH, S.; NURHAYATI, A. P. D.; NURHATIKA, S.; SETIAWAN, E.; HEFFEN, W. L. Cytotoxic and antioxidant activities of marine sponge diversity at Pecaron Bay Pasir Putih Situbondo East Java, Indonesia. **Journal of Pharmacy Research**, v. 6, p. 685-689, 2015.
- ADJIMANI, J. P.; ASARE, P. Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 721-728, 2015.
- AKTAS, N.; GENÇ, Y.; GOZCELIOGLU, B.; KONUKLUGIL, B.; HARPUR, U. S. Radical scavenging effect of different marine sponges from Mediterranean coasts. **Records of Natural Products**, v. 7, n. 2, p. 96-104, 2013.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143-152, Apr 2013.
- ANDRADE, T. J. A. S. **Investigação química e biológica dos metabólitos secundários derivados de macroalgas marinhas e micro-organismos associados**. 2014. 358 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/115984?show=full>> Acesso em: 6 jun. 2018.
- ANJUM, K.; ABBAS, S. Q.; SHAH, S. A. A.; AKHTER, N.; BATOOL, S.; HASSAN, S. S. Marine sponges as a drug treasure. Review. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 24, n. 4, p. 347-362, 2016.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, n. 1, p. 183-198, 2001.
- ARUNACHALAM, K.; APPADORAI, R. A. J. Antioxidant potential and biochemical evaluation of metabolites from the marine bacteria *Virgibacillus* sp. associated with the sponge *Callyspongia diffusa*. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 3, p. 47-51, Apr 2013.
- AYRES, M.; AYRES-JUNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. **Bioestat - versão 5.3**. Disponível em: <<http://www.mamiraua.org.br/pt-br/downloads/programas/bioestat-versao-53>> Acesso em: 6 jun. 2018.
- BESOO, R.; NEERGHEEN-BHUJUNA, V.; BHAGOOLI, R.; BAHORUN, T. Apoptosis inducing lead compounds isolated from marine organisms of potential relevance in cancer treatment. **Mutation Research**, v. 768, p. 84-97, 2014.
- BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I. **Journal of the Organic Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 981-987, 1951.

BERKER, K. I.; GUÇLU, K.; TOR, I.; APAK, R. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, *batho*-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. **Talanta**, v. 72, n. 3, p. 1157-1165, May 2007.

BIANCO, E. M.; KRUG, J. L.; ZIMATH, P. L.; KROGER, A.; PAGANELLI, C. J.; BOEDER, A. M.; SANTOS, L.; TENFEN, A.; RIBEIRO, S. M.; KUROSHIMA, K. N.; ALBERTON, M. D.; CORDOVA, C. M. M.; REBELO, R. A. Antimicrobial (including antimollicutes), antioxidant and anticholinesterase activities of Brazilian and Spanish marine organisms – evaluation of extracts and pure compounds. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 25, n. 6, p. 668-676, Nov/Dec 2015.

BLANDÓN, L. G.; MÁRQUEZ, D. F.; LÓPEZ, J. O.; MÁRQUEZ M. F. Evaluación biológica de una fracción de la esponja marina *Topsentia ophiraphidites* del Caribe colombiano. **Revista MVZ Córdoba**, v. 18, p. 3633-3641, 2013.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, Apr 1958.

BRASIL. Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Caracterização do Estado da Arte em Biotecnologia Marinha no Brasil** / Ministério da Saúde, Organização Pan-Americana da Saúde, Ministério da Ciência e Tecnologia. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 134 p.: il. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BUSTOS-OBREGON, E.; VARGAS, A. Chronic toxicity bioassay with populations of the crustacean *Artemia salina* exposed to the organophosphate diazinon. **Biological Research**, v. 43, n. 3, p. 357-362, 2010.

CARBALLO, J. L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z. L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M. D. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**, v. 2, 5 p., Sept 2002.

CASTELLANOS, L.; DUQUE, C. Composición química y actividad de la fracción lipídica de la esponja marina *Cliona tenuis* (Clionidae). **Revista Colombiana de Química**, v. 37, n. 3, p. 259-274, 2008.

CHAIRMAN, K; AJA, R. S.; ALAGUMUTHU, G. Cytotoxic and antioxidant activity of selected marine sponges. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, n. 3, p. 234-238, June 2012.

CHENG, C.; M.OTHMAN, E. M.; REIMER, A.; GRÜNE, M.; KOZJAK-VLOVIC, V.; STOPPER, H.; HENTSCHEL, U.; ABDELMOHSEN, U. R. Ageloline A, new antioxidant and antichlamydial quinolone from the marine sponge-derived bacterium *Streptomyces* sp. SBT345. **Tetrahedron Letters**, v., 57, n. 25, p. 2786-2789, June 2016.

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 – Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 1067-1072, July 2008.

DHINAKARAN, D. I.; LIPTON, A. P. Evaluation of bioactivity in marine sponge *Sigmatocia pumila* collected from the South Eastern region of India. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 2, n. 5, p. 651-656, 2012.

DHONGADE, H. J.; CHANDEWAR, A. V. An *in-vitro* investigation of the antioxidant activity of *Phyllanthus amarus*. **International Journal of Biomedical and Advance Research**, v. 4, n. 6, p. 435-439, 2013.

DUH, P. D. Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa* Linné): its scavenging effect on free-radical and active oxygen. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 4, p. 455-461, Apr 1998.

DYBDAL-HARGREAVES, N. F.; RISINGER, A. L.; MOOBERRY, S. L. Eribulin mesylate: mechanism of action of a unique microtubule targeting agent. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 11, p. 2445-2452, 2015.

EL-HADY, F. K. A.; FAYAD, W.; IODICE, C.; EL-SHAHID, Z. A.; ABDEL-AZIZ, M. S.; CRUDELE, E.; TOMMONARO, G. Investigating on the correlation between some biological activities of marine sponge-associated bacteria extracts and isolated diketopiperazines. **Current Microbiology**, v. 74, p. 6-13, 2017.

ELTAMANY, E. E.; IBRAHIM, A. K.; RADWAN, M. M.; ELSOHLY, M. A.; HASSANEAN, H. A.; AHMED, S. A. Cytotoxic ceramides from the Red Sea sponge *Sphaciospongia vagabunda*. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 9, p. 3467-3473, Sept 2015.

FELÍCIO, R.; OLIVEIRA, A. L. L.; DEBONSI, H. M. Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 64, n. 3, p. 39-42, 2012.

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, n. 8, p. 2717-2723, May 2008.

GELANI, C. D.; UY, M. M. Cytotoxicity to *Artemia salina* L. of marine sponge extracts from Surigao del Norte, Philippines. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**, v. 5, n. 5, p. 14-18, 2016.

GRANATO, A. C.; OLIVEIRA, J. H. H. L.; SELEGHIM, M. H. R.; BERLINCK, R. G. S.; MACEDO, M. L.; FERREIRA, A. G.; ROCHA, R. M.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C. O.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C. Produtos naturais da ascídia *Botrylloides giganteum*, das esponjas *Verongula gigantea*, *Ircinia felix*, *Cliona delitrix* e do nudibrânquio *Tambja eliora*, da costa do Brasil. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 192-198, 2005.

GRIBBLE, G. W. Biological activity of recently discovered halogenated marine natural products. **Marine Drugs**, v. 13, n. 7, p. 4044-4136, July 2015.

GUERRA, D. F. A. **Novos quimioterápicos obtidos a partir de organismos marinhos**. 2015. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2015.

HADJU, E.; PEIXINHO, S.; FERNANDEZ, J. **Esponjas marinhas da Bahia: Guia de campo e laboratório**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2011.

HAGIWARA, K.; GARCIA HERNANDEZ, J. E.; HARPER, M. K.; CARROLL, A.; MOTTI, C. A.; AWAYA, J.; NGUYEN, H.-Y.; WRIGHT, A. D. Puupehenol, a potent antioxidant antimicrobial meroterpenoid from a Hawaiian deep-water *Dactylospongia* sp. sponge. **Journal of Natural Products**, v. 78, p. 325-329, 2015.

HENTSCHEL, U.; PIEL, J.; DEGNAN, S.M.; TAYLOR, M. W. Genomic insights into the marine sponge microbiome. **Nature**, v. 10, n. 9, p. 641-654, 2012.

KARYAWATI, A. T.; MANALU, W.; SUPARTO, I. H.; MAUBOY, R. S. Antioxidant and anticancer activity of the marine sponge *Clathria basilana*. **Journal of Natural Sciences Research**, v. 5, n. 23, p. 10-16, 2015.

KOSSUGA, M. H.; LIRA, S. P.; NASCIMENTO, A. M.; GAMBARDELLA, M. T. P.; BERLINCK, R. G. S.; TORRES, Y. R.; NASCIMENTO, G. G. F.; PIMENTA, E. F.; SILVA, M.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; TEMPONE, A. G.; MELLHEM, M. S. C.; SOUZA, A. O.; GALETTI, F. C. S.; SILVA, C. L.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C. O.; MORAES, M. O.; HADJU, E.; PEIXINHO, S.; ROCHA, R. M. Isolamento e atividades biológicas de produtos naturais das esponjas *Monanchora arbuscula*, *Aplysina* sp., *Petromica ciocalyptoides* e *Topsentia ophiraphidites*, da ascídia *Didemnum ligulum* e do octocoral *Carijoa riisei*. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1194-1202, 2007.

KRISHNAN, K. A. A.; KEERTHI, T. R. Analyses of methanol extracts of two marine sponges, *Spongia officinalis* var. *ceylonensis* and *Sigmatocia carnosa* from Southwest coast of India for their bioactivities. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 2, p. 722-734, 2016.

LEIRÓS, M.; ALONSO, E.; RATEB, M. E.; HOUSSEN, W. E.; EBEL, R.; JASPARS, M.; ALFONSO, A.; BOTANA, L. M. Gracilins: Spongionella-derived promising compounds for Alzheimer disease. **Neuropharmacology**, v. 93, p. 285-293, 2015.

LESSER, M. P.; SLATTERY, M. Ecology of Caribbean sponges: Are top-down or bottom-up processes more important? **Plos One**, v. 8, n. 11, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0079799>> Acesso em: 6 jun. 2018.

LIRA, D. P. **Constituintes químicos e atividade biológica dos organismos marinhos: *Caulerpa mexicana*, *Bryothamnion triquetrum*, *Hypnea musciformis* e *Ircinia felix***. 2013. 176 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013. Disponível em: <<http://tede.biblioteca.ufpb.br/bitstream/tede/6823/1/arquivototal.pdf>> Acesso em: 6 jun. 2018.

MAHDIAN, D.; IRANSHAHY, M.; SHAKERI, A.; HOSEINI, A.; YAVARI, H.; NAZEMI, M.; IRANSHAHI, M. Cytotoxicity evaluation of extracts and fractions of five marine sponges from the Persian Gulf and HPLC fingerprint analysis of cytotoxic extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 11, p. 896-901, 2015.

MANCONI, R.; PRONZATO, R. How to survive and persist in temporary freshwater? Adaptive traits of sponges (Porifera: Spongillida): A review. **Hydrobiologia**, v. 782, n. 1, p. 11-22, Nov 2016.

MÁRQUEZ, D. D.; MARTÍNEZ, A. M. Antileishmanial epidioxysterols from the Colombian marine sponge *Ircinia campana* are oxidation products from naturally occurring $\Delta^{5,7}$ sterols. **Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica**, Medellín, v. 14, n. 1, p. 61-66, 2007.

McMURRAY, S. E.; JOHNSON, Z. I.; HUNT, D. E.; PAWLIK, J. R.; FINELLI, C. M. Selective feeding by the giant barrel sponge enhances foraging efficiency. **Limnology and Oceanography**, v. 61, n. 4, p. 1271-1286, 2016.

MEDEIROS, M. L. S.; RABELO, E. F.; OLORIS, S. C. S.; SILVA, M. D. C. Atividade anticâncer in vitro de *Tedania ignis* (Porifera: Demospongiae) em células PC-3. **Revista Conhecimento Online**, ano 6, v. 2, set 2014. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/305682520_Atividade_Anticancer_in_vitro_de_Tedania_ignis_Porifera_Demospongiae_em_Celulas_PC-3> Acesso em: 6 jun. 2018.

MEHBUB, M. F.; LEI, J.; FRANCO, C.; ZHANG, W. Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: Trends and opportunities for discovery of bioactives. Review. **Marine Drugs**, v. 12, p. 4539-4577, 2014.

MEYER, B. N.; FERRIGHI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MIRANDA, V. R. **Análise comparativa do conteúdo dos filos Porifera e Cnidaria em livros didáticos do ensino médio utilizados no município de Seropédica – RJ**. 2010. 30 f. Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas) - Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/280555687_Vinicius_da_Rocha_Miranda_-_2010_-_ANALISE_COMPARATIVA_DO_CONTEUDO_DOS_FILOS_PORIFERA_E_CNIDARIA_EM_LIVROS_DIDATICOS_DO_ENSINO_MEDIO_UTI> Acesso em: 6 jun. 2018.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Hat Yai, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MONTAÑO-CASTAÑEDA, M. C.; SANTAFÉ-PATIÑO, G. G. Evaluación de la actividad antioxidante de esponjas marinas del Caribe colombiano. **Actualidades Biológicas**, v. 33, n. 95, p. 173-181, Julio-Diciembre 2011.

MOSTARDEIRO, C. C. **Diversidade e dinâmica de comunidades de esponjas (Porifera, Demospongiae) em sistemas de arroz irrigado na planície costeira do Rio Grande do Sul**. 2008. 36 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2008. Disponível em: <<http://www.repositorio.jesuita.org.br/bitstream/handle/UNISINOS/2298/diversidade%20e%20dinamica.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> Acesso em: 6 jun. 2018.

PERDICARIS, S.; VLACHOGIANNI T.; VALAVANIDIS, A. Bioactive natural substances from marine sponges: New developments and prospects for future pharmaceuticals. **Natural Products Chemistry & Research**, v. 1, n. 3, 8 p, 2013. Disponível em:

<<https://www.omicsonline.org/open-access/bioactive-natural-substances-from-marine-sponges-new-developments-and-prospects-for-future-pharmaceuticals-2329-6836.1000114.php?aid=19535>> Acesso em: 6 jun. 2018.

PROKSCH, P.; EDRADA, R. A.; EBEL, R. Drugs from the seas – current status and microbiological implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, v. 2-3, p. 125-134, 2002.

PYRZYNSKA, K.; PEKAL, A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. **Analytical Methods**, v. 5, p. 4288-4295, 2013.

RIVERA, A. P.; UY, M. M. *In vitro* antioxidant and cytotoxic activities of some marine sponges collected off Misamis Oriental Coast, Philippines. **E-Journal of Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 354-358, 2012.

SCHROIF-GRÉGOIRE, C.; APPENZELLER, J.; DEBITUS, C.; ZARARUCHA, A.; AL-MOURABIT, A. Debromokeramidine from the marine sponge *Agelas cf. mauritiana*: isolation and short regioselective and flexible synthesis. **Tetrahedron**, v. 71, v. 22, p. 3609-3613, 2015.

SELVIN, J.; LIPTON, A. P. Biopotentials of secondary metabolites isolated from marine sponges. **Hydrobiologia**, v. 513, n. 1-3, p. 231-238, 2004.

SERADJ, H.; MOEIN, M.; ESKANDARI, M.; MAAREF, F. Antioxidant activity of six marine sponges collected from the Persian Gulf. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 4, p. 249-255, 2012.

SHAABAN, M.; ABD-ALLA, H. I.; HASSAN, A. Z.; ALY, H. F.; GHANI, M. A. Chemical characterization, antioxidant and inhibitory effects of some marine sponges against carbohydrate metabolizing enzymes. **Organic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, n. 30, 12 p., 2012.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, Part B, p. 757-781, Oct 2015.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SILVA, R. B. **Prospecção química de esponjas marinhas e bioensaios relacionados às atividades anticâncer *in vitro* e de defesa em modelo *zebrafish***. 2013. 233 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013. Disponível em:

<<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/143868/000907856.pdf?sequence=1>> Acesso em: 6 jun. 2018.

SOLTANI, S.; SAADATMAND, S.; KHAVARINEJAD, R.; NEJADSATTARI, T. Antioxidant and bacterial activities of *Cladophora glomerata* (L.) Kutz. in Caspian Sea Coast, Iran. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 39, p. 7684-7689, July 2011.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

SUGAPPRIYA, M.; SUDARSANAM, D. Free radical screening activity of marine sponge *Aurora globostellata*. **Asian Journal of Pharmaceutical Clinical and Research**, v. 9, n. 4, p. 210-212, 2016.

TAHERI, A.; JALALINEZHAD, S. Antioxidative and cytotoxic effect of marine sponge (*Geodia perarmata*) extracts against breast and colorectal cancer cells. *In*: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ADVANCES IN ENVIRONMENT, AGRICULTURE & MEDICAL SCIENCES (ICAEAM'15), 2., 2015, Antalya. **Proceedings...** Antalya, 2015. p. 54-57. Disponível em: <<http://iaast.org/upload/7491A0615046.pdf>> Acesso em: 6 jun. 2018.

URABAYASHI, M. S. **Prospecção de moléculas bioativas em esponjas marinhas da espécie *Amphimedon viridis*: Estudos celulares e moleculares**. 2015. 68 f. Tese (Doutorado em Ciências – Biologia Celular e Tecidual), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42134/tde-24082015-185603/pt-br.php>> Acesso em: 6 jun. 2018.

UTAMI, A. W.; WAHYUDI, A. T.; BATUBARA, I. Toxicity, anticancer and antioxidant activity of extracts from marine bacteria associated with sponge *Jaspis* sp. **International Journal of Pharmacology and Biological Sciences**, v. 5, n. 4, p. 917-923, 2014.

VAN SOEST, R. W. M.; BOURY-ESNAULT, N.; HOOPER, J. N. A.; RÜTZLER, K.; DE VOOGD, N. J.; ALVAREZ, B.; HAJDU, E.; PISERA, A. B.; MANCONI, R.; SCHONBERG, C.; KLAUTAU, M.; PICTON, B.; KELLY, M.; VACELET, J.; DOHRMANN, M.; DÍAZ, M. -C.; CÁRDENAS, P.; CARBALLO, J. L.; RÍOS, P.; DOWNEY, R. World Porifera Database. Disponível em: <<http://www.marinespecies.org/porifera>> Acesso em: 6 jun. 2018.

UTKINA, N. K.; MAKARCHENBO, A. E.; SLACHDOKOVA, D. V.; VIROVAYA, M. V. Antioxidant activity of phenolic metabolites from marine sponges. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 40, n. 4, p. 373-377, 2004.

VEIGA, L. F.; VITAL, N. A. A. Testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp. *In*: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. **Métodos de ecotoxicologia marinha: Aplicações no Brasil**. São Paulo: Artes Gráficas e Indústria Ltda. p. 111-122, 2002. 262 p.

WANG, T.; JÓNSDÓTTIR, R.; ÓLAFSDÓTTIR, G. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 240-248, Sept 2009.

- WANG, T.; LIU, H.; ZHAO, J.; GAO, H.; ZHOU, L.; LIU, Z.; CHEN, Y.; SUI, P. Antimicrobial and antioxidant activities of the root bark essential oil of *Periploca sepium* and its main component 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyde. **Molecules**, v. 15, n. 8, p. 5807-5817, 2010.
- WORHEIDE, G.; DOHRMANN, M.; ERPENBECK, D.; LARROUX, C.; MALDONADO, M.; VOIGT, O.; BORCHIellini, C.; LAVORV, D. V. Deep phylogeny and evolution of sponges (Phylum Porifera). *In*: BECERRO, M. A.; URIZ, M. J.; MALDONADO, M.; TURON X. (eds.), **Advances in Marine Biology**, v. 61, p. 1-78, 2012.
- ZHANG, W.; ZHANG, X.; CAO, X.; XU, J.; ZHAO, Q.; YU, X.; JIN, M.; DENG, M. Optimizing the formation of *in vitro* sponge primmorphs from the Chinese sponge *Stylorella agminata* (Ridley). **Journal of Biotechnology**, v. 100, p. 161-168, 2003.