



**MARINHA DO BRASIL**  
**INSTITUTO DE ESTUDOS DO MAR ALMIRANTE PAULO MOREIRA**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE**  
**PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA MARINHA**

ELLEN APARECIDA DE SOUZA OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE QUÍMICA E DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO  
DE ALGAS CALCÁRIAS GENICULADAS**

ARRAIAL DO CABO

2022

**ELLEN APARECIDA DE SOUZA OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE QUÍMICA E DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO  
DE ALGAS CALCÁRIAS GENICULADAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Marinha do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM)/Universidade Federal Fluminense (UFF) como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia Marinha.

Professores Orientadores:

Dra. Angélica Ribeiro Soares

Dr. Ricardo Coutinho

ARRAIAL DO CABO

2022

## FICHA CATALOGRÁFICA

O48a Oliveira, Ellen Aparecida de Souza  
Avaliação da diversidade química e do potencial biotecnológico de  
algas calcárias geniculadas / Ellen Aparecida de Souza de Oliveira. --  
Arraial do Cabo: Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira,  
2022.

69 f.

Orientador: Angélica Ribeiro Soares.

Coorientador: Ricardo Coutinho.

Tese (Doutorado) – Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo  
Moreira e Universidade Federal Fluminense - IEAPM/UFF, Programa  
Associado de Pós-Graduação em Biotecnologia Marinha, Arraial do  
Cabo, 2022.

1. Produtos naturais. 2. Algas calcárias geniculadas. 3. Composição  
química. 4. Atividade anti-incrustante 5. Atividade farmacológica.  
I. Soares, Angélica Ribeiro. II. Coutinho, Ricardo. III. Título.

CDD:660.6

**ELLEN APARECIDA DE SOUZA OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE QUÍMICA E DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO  
DE ALGAS CALCÁRIAS GENICULADAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM)/Universidade Federal Fluminense (UFF) como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia Marinha.

**COMISSÃO JULGADORA:**

---

**Dra. Angélica Ribeiro Soares**

Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM)  
**Professora Orientadora – Presidente da Banca Examinadora**



**Dr. Ricardo Coutinho (Professor Orientador)**

Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM)



**Dra. Giselle Pinto de Faria Lopes**

Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM)



**Dra. Daniela Bueno Sudatti**

Universidade Federal Fluminense (UFF)



**Dra. Izabel Christina N. de Palmer Paixão**

Universidade Federal Fluminense (UFF)



**Dra. Michelle Frazão Muzitano**

Universidade Federal do Rio de Janeiro (*campus* Macaé)



**Dra. Nathália P. Nocchi Carneiro**

Universidad de La Laguna, Tenerife, Espanha



## **AGRADECIMENTOS**

Este ciclo foi muito desafiador e de muito aprendizado. Consegui chegar até aqui, porque ao longo desta trajetória eu tive ajuda de muitas pessoas queridas e sou grata, de todo o meu coração, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desta pesquisa.

Primeiramente, gostaria de agradecer às forças divinas e superiores que me permitiram ter força, sabedoria, coragem, equilíbrio e proteção para concluir mais uma etapa importante da vida.

A minha família querida e maravilhosa, em especial a minha mãe amiga. Minha base, meu porto seguro, minha fonte de inspiração, força, sabedoria, coragem, determinação, respeito e amor. Obrigada por todo apoio, sorrisos, abraços e muitos momentos de acolhimento e alegria. Amo vocês!

Ao meu amor amigo (Zé Bola). Compartilhar a vida com você é incrível. Obrigada por todo apoio, amor, incentivo e acolhimento nos momentos de caos. Obrigada por acreditar em mim, quando eu mesma não acreditava. Obrigada por me fazer entender a importância de se comemorar cada pequena vitória. Amo você!

A minha querida orientadora, Angélica Soares, agradeço a oportunidade de conhecer ainda mais sobre este universo fantástico dos produtos naturais marinhos. Obrigada por me permitir fazer parte deste grupo tão maravilhoso e querido como o GPNOA. Obrigada pela confiança, apoio, carinho, ensinamentos, incentivo e risadas. Serei eternamente grata.

Ao meu querido orientador, Ricardo Coutinho, pelas oportunidades (desde 2013), apoio, incentivo, carinho, ensinamentos e por me permitir fazer parte deste grupo tão maravilhoso e querido como o BIOTECMAR. Serei eternamente grata.

As minhas queridas amigas e companheiras de laboratório: Kiani, Camila Reveles, Isabel, Sara, Laura, Ana Polycarpa, Gleice, Marcelle, Keila, Géssica, Nilce. Obrigada por cada palavra de incentivo, choros e desesperos compartilhados, ajuda na bancada e risadas. Em especial, a Juliana Araújo e Carolina Rosas, por toda ajuda do início ao fim desta caminhada, sempre de forma paciente e respeitosa. Sou muito grata por todo ensinamento na bancada, no tratamento e interpretações dos resultados, pelo incentivo, apoio e carinho.

Ao querido Roberto pela paciência, disponibilidade e atenção. Sua ajuda foi essencial.

A querida amiga Priscila Araújo, por todo apoio emocional e científico. Ter você por perto, mesmo longe, foi essencial. Obrigada por tanto carinho e apoio.

As queridas professoras Michelle Frazão e Thatiana, e também a querida Camila pela colaboração nos experimentos biológicos (realizados na UENF), ensinamentos e discussões. Ao querido professor Shaft pela confiança, paciência, disponibilidade, ensinamentos, atenção e colaboração. Agradeço a oportunidade de aprender mais sobre a cromatografia contracorrente.

Aos queridos amigos Luciana Altvater e Alexandre Kassuga pelo apoio nas análises estatísticas e carinho.

Ao querido Frederico Tâmega pela identificação das algas, discussões e carinho.

Aos queridos Nathália Nocchi e Heitor pelo apoio nas análises estatísticas e químicas.

A querida Dra Maria Helena por ter permitido o uso do Laboratório de Biofilme para a realização dos experimentos com bactérias marinhas.

As queridas Beatriz e Glauce por todo apoio burocrático, incentivo e carinho.

A todos os amigos do BIOTECMAR, do GPNOA e externos pelo incentivo, carinho e apoio.

Aos queridos professores da banca de qualificação (Daniela Sudatti, Giselle Faria e Shaft Corrêa) pelas contribuições excelentes, comunicação respeitosa e incentivadora.

Aos queridos profissionais da limpeza e do alojamento do NUPEM, especialmente dona Lena, por todo carinho, sorrisos e atenção.

A querida Lanna por me receber em sua casa e ser tão gentil e acolhedora.

A todos os queridos marinheiros envolvidos no transporte e coleta das amostras.

A Pós-Graduação de Biotecnologia pelo ensino de qualidade e a todos os envolvidos neste programa. Aos colegas da Pós por todo apoio, ajuda e carinho, em especial ao querido João.

Ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e a Universidade Federal do Rio de Janeiro (*campus* Macaé) pela infraestrutura para realização e desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço à arte do crochê, as mandalas, a magia das plantas e do mar.

A CAPES pelo auxílio financeiro para a realização desta pesquisa.

Por fim, agradeço a banca que se dispôs a avaliar esta pesquisa e contribuir para a finalização deste ciclo. Gratidão!

## RESUMO

As algas calcárias geniculadas (Corallinales, Rhodophyta) produzem metabólitos secundários pertencentes a diferentes classes químicas, tais como ácidos graxos, esteróis, taninos, flavonóides, alcalóides, saponinas, hidrocarbonetos e carotenóides, por exemplo. Eles são responsáveis por diversas atividades biológicas, tais como antioxidante, antifúngica, antibacteriana, antitumoral, bioestimulante e anti-incrustante. O capítulo 1 analisou a diversidade química intra/interespecífica e o potencial anti-incrustante dos extratos de quatro espécies de algas calcárias geniculadas (*Amphiroa beauvoisii*, *Jania crassa*, *Cheilosporum sagittatum* e *Arthrocardia flabellata*) coletadas em diferentes áreas de Arraial do Cabo/RJ frente a cinco cepas de bactérias marinhas incrustantes e ao mexilhão *Perna perna*. Os resultados obtidos mostraram variabilidade química intra/interespecífica entre as amostras de algas, mesmo sendo coletadas em áreas próximas e com condições oceanográficas semelhantes. Em relação à atividade anti-incrustante, todos os extratos apresentaram atividade contra as bactérias marinhas, sendo o extrato de *C. sagittatum*, seguido do extrato de *A. beauvoisii* (AbSCC) os mais promissores. Frente ao mexilhão *P. perna*, o extrato de *C. sagittatum* (CsSI) também foi o mais ativo, apresentando 100% de inibição de bisco. O capítulo 2 avaliou o potencial antimicobacteriano (cepa hipervirulenta Mtb M299 e Mtb laboratorial H37Rv), anti-inflamatório (TNF- $\alpha$  e NO) e citotóxico dos extratos brutos e frações das espécies já mencionadas. Quanto à atividade antimicobacteriana, os extratos de *A. flabellata* (MIC<sub>50</sub> de 4,6  $\pm$  1,3  $\mu$ g/mL) e *J. crassa* coletada na Prainha (MIC<sub>50</sub> 12,6  $\pm$  1,4  $\mu$ g/mL) foram os mais ativos. Em relação à capacidade inibitória de TNF- $\alpha$  e NO, os extratos mais ativos foram *A. beauvoisii* coletado no costão do Saco do Cherne (IC<sub>50</sub> 25,2  $\pm$  1,5) e *C. sagittatum* (IC<sub>50</sub> 6,7  $\pm$  1,3  $\mu$ g/mL). Quanto à toxicidade, os extratos não apresentaram efeito tóxico, exceto *C. sagittatum*. Levando em consideração todas as atividades envolvidas, as frações FJC1, FJC2 e FJC3 de *J. crassa* coletada na Prainha e as frações FAF2, FAF3 e FAF4 de *A. flabellata* foram as mais ativas. A fração mais purificada (F29-40), obtida através da cromatografia contracorrente, contendo o ácido palmítico como a substância mais abundante, também foi testada frente aos modelos selecionados e apresentou atividade inibitória contra as duas cepas de micobactérias e capacidade inibitória de NO e TNF- $\alpha$ . Ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos, hidrocarbonetos, álcool graxo, esterol e benzenóide foram algumas das classes químicas encontradas nos extratos e frações testados. Os resultados obtidos para os extratos e frações das espécies *J. crassa*, *A. beauvoisii*, *C. sagittatum* e *A. flabellata* coletadas em Arraial do Cabo são inéditos quanto à composição química, a variabilidade química intra/interespecífica e atividade frente aos modelos testados, contribuindo com mais informações sobre as substâncias químicas produzidas por este grupo de macroalgas e evidenciando o seu potencial biotecnológico, as quais poderão ser alvo de estudos futuros na obtenção de novas substâncias bioativas.

**Palavras-chave:** produtos naturais, algas calcárias geniculadas, composição química, atividade anti-incrustante, atividade farmacológica.

## ABSTRACT

The geniculate calcareous algae (Corallinales, Rhodophyta) produce secondary metabolites from several chemical classes, such as fatty acids, sterols, tannins, flavonoids, alkaloids, saponins, hydrocarbons, and carotenoids. They are responsible for a variety of bioactivity such as antioxidant, antifungal, antibacterial, anticancer, biostimulant, anti-inflammatory, and antifouling. The Chapter 1 investigated the intra/interspecific chemical diversity and antifouling potential of crude extracts of four species of geniculate calcareous algae (*Arthrocardia flabellata*, *Cheilosporum sagittatum*, *Amphiroa beauvoisii*, *Jania crassa*) against five strains of marine fouling bacteria and the mussel *Perna perna*. The results revealed inter/intraspecific chemical variability among samples of geniculate calcareous algae collected in nearby areas and under similar oceanographic conditions. All extracts were active against marine bacteria, with *C. sagittatum* - CsSI and *A. beauvoisii* - AbSCC extracts being the most promising. In addition to the mussel *P. perna*, the extract of *C. sagittatum* (CsSI) was the most active, with a 100% inhibition of biofilms. In Chapter 2, crude extracts and fractions of the aforementioned species were tested for antimycobacterial (hypervirulent strain Mtb M299 and Mtb laboratory H37Rv), anti-inflammatory (TNF- $\alpha$  and NO), and cytotoxicity. The extracts of *A. flabellata* (MIC<sub>50</sub> de  $4.6 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$ ) e *J. crassa* collected in Prainha (MIC<sub>50</sub>  $12.6 \pm 1.4 \mu\text{g/mL}$ ) were the most active in terms of antimycobacterial activity. In terms of TNF- and NO inhibitory capacity, the most active extracts were *A. beauvoisii* collected on the coast of Saco do Cherne (IC<sub>50</sub>  $25.2 \pm 1.5$ ) and *C. sagittatum* (IC<sub>50</sub>  $6.7 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$ ). Except for *C. sagittatum*, none of the extracts exhibited toxic effects. When all activities were considered, the fractions FJC1, FJC2, and FJC3 of *J. crassa* collected in Prainha, as well as the fractions FAF2, FAF3, and FAF4 of *A. flabellata*, were the most active. The most purified fraction (F29-40), obtained by countercurrent chromatography and containing palmitic acid as the most abundant substance, was also tested against the selected models and demonstrated inhibitory activity against both mycobacteria strains as well as NO and TNF-inhibitory capacity. Fatty acids, fatty acid esters, hydrocarbons, fatty alcohol, sterol, and benzenoid were among the chemical classes discovered in the extracts and fractions examined. The results obtained for extracts and fractions of the species *J. crassa*, *A. beauvoisii*, *C. sagittatum*, and *A. flabellata* collected in Arraial do Cabo are unprecedented in terms of chemical composition, intra-interspecific chemical variability, and activity against the tested models, providing more information about the chemical substances produced by this group of macroalgae and demonstrating their biotechnological potential, which may be the subject of future studies in the search for new bioactive substances.

**Keywords:** natural products, geniculate calcareous algae, chemical composition, antifouling activity, pharmacological activity.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Banco de algas na Baía do Arraial do Cabo. Fonte: Tâmega *et al.* 2017.....23
- Figura 2:** Exemplos de algas calcárias não geniculadas. A: *Titanoderma tessellatum*; B: *Titanderma pustulatum*; C: *Porolithon onkodes*; D: *Neogoniolithon fosliei*. Fonte: Littler & Littler, 2013. ....24
- Figura 3:** Exemplos de algas calcárias geniculadas. A: *Amphiroa foliacea*; B: *Jania rubens*; C: *Corallina bertero*; D: *Amphiroa ephedraea*. Fonte: Littler & Littler, 2013.....24
- Figura 4:** Produção científica mundial no período de 1991 a 2022 sobre a composição química e o potencial biotecnológico de algas calcárias geniculadas dos gêneros *Jania*, *Amphiroa*, *Cheilosporum* e *Arthrocardia*. Fonte: Scopus e Web of science, junho/2022.....25
- Figura 5:** Principais países que publicaram sobre produtos naturais e potencial biotecnológico de algas calcárias geniculadas no período de 1991 a 2022. Fonte: Scopus e Web of science, junho/2022. ....26
- Figura 6:** Substâncias isoladas da espécie *Amphiroa crassa*. Fonte: Stout *et al.* 2010 30
- Figura 7:** Representação do processo de bioincrustação. (Adaptado Martín-Rodríguez *et al.* 2015). ....43
- Figura 8:** Localização geográfica das áreas de coleta das algas calcárias geniculadas em diferentes áreas (em vermelho) de Arraial do Cabo/RJ: Fenda de Nossa Senhora, Prainha, Praia do Forno, Saco do Cherne (costão e banco de algas), Praia dos Anjos, Saco dos ingleses e Ponta da Cabeça.....46
- Figura 9:** Espécies de algas calcárias coletadas em diferentes áreas de Arraial do Cabo/RJ. A: *Jania crassa*; B: *Amphiroa beauvoisii*; C: *Cheilosporum Sagittatum*; D: *Arthrocardia flabellata*. Fonte: Algaebase. ....47
- Figura 10:** Etapas empregadas no processo de extração das algas calcária geniculadas. ....49
- Figura 11:** Cromatogramas dos extratos da espécie *A. beauvoisii* obtidos por CG-EM. AbFNS (*A. beauvoisii* - Fenda de Nossa Senhora); AbP (*A. beauvoisii* - Prainha); AbPF (*A. beauvoisii* - Praia do Forno); AbSCB (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne banco);

AbSCC (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne costão). Os números indicam as substâncias mais abundantes (área relativa  $\geq 2\%$ ).....55

**Figura 12:** Cromatogramas dos extratos das macroalgas calcárias *J. crassa*, *C. sagittatum* e *A. flabellata*. JcPA (*J. crassa* - Praia dos Anjos); JcP (*J. crassa* - Prainha); CsSI (*C. sagittatum* - Saco dos Ingleses) e AfPC (*A. flabellata* - Ponta da Cabeça). Os números indicam as substâncias mais abundantes (área relativa  $\geq 2\%$ ).....56

**Figura 13:** Rede molecular obtida na plataforma GNPS dos extratos das algas calcárias geniculadas. AbFNS (*A. beauvoisii* - Fenda de Nossa Senhora); AbP (*A. beauvoisii* - Prainha); AbPF (*A. beauvoisii* - Praia do Forno); AbSCB (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne banco); AbSCC (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne costão); JcPA (*J. crassa* - Praia dos Anjos); JcP (*J. crassa* - Prainha); CsSI (*C. sagittatum* - Saco dos Ingleses) e AfPC (*A. flabellata* - Ponta da Cabeça).....58

**Figura 14:** A. Inter-relação dos perfis químicos de diferentes algas calcárias geniculadas obtidos por CG-EM através da ACP (CP1 = 65% e CP2 = 11%). Símbolos diferentes representam cada espécie avaliada neste estudo. B. Peso do sinal do cromatograma na variação de CP1 pelo tempo de retenção. AbFNS (*A. beauvoisii* - Fenda de Nossa Senhora); AbP (*A. beauvoisii* - Prainha); AbPF (*A. beauvoisii* - Praia do Forno); AbSCB (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne banco); AbSCC (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne costão); JcPA (*J. crassa* - Praia dos Anjos); JcP (*J. crassa* - Prainha); CsSI (*C. sagittatum* - Saco dos Ingleses) e AfPC (*A. flabellata* - Ponta da Cabeça).....59

**Figura 15:** A. Inter-relação dos perfis químicos de diferentes algas calcárias geniculadas obtidos por CG-EM através da ACP (CP1 = 65% e CP2 = 11%). Símbolos diferentes representam cada espécie avaliada neste estudo. B. Peso do sinal do cromatograma na variação de CP2 pelo tempo de retenção. AbFNS (*A. beauvoisii* - Fenda de Nossa Senhora); AbP (*A. beauvoisii* - Prainha); AbPF (*A. beauvoisii* - Praia do Forno); AbSCB (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne banco); AbSCC (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne costão); JcPA (*J. crassa* - Praia dos Anjos); JcP (*J. crassa* - Prainha); CsSI (*C. sagittatum* - Saco dos Ingleses) e AfPC (*A. flabellata* - Ponta da Cabeça).....60

**Figura 16:** Efeito dos extratos das algas calcárias no crescimento bacteriano após 24 h. **A:** *Pseudoalteromonas elyakovii*; **B:** *Pseudomonas fluorescens*; **C:** *Polaribacter*

*irgensii*; **D:** *Shewanella putrefaciens*; **E:** *Vibrio aestuarianus*. ANOVA seguida do teste de Tukey. As letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. AbFNS (*A. beauvoisii* - Fenda de Nossa Senhora); AbP (*A. beauvoisii* - Prainha); AbPF (*A. beauvoisii* - Praia do Forno); AbSCB (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne banco); AbSCC (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne costão); JcPA (*J. crassa* - Praia dos Anjos); JcP (*J. crassa* - Prainha); CsSI (*C. sagittatum* - Saco dos Ingleses) e AfPC (*A. flabellata* - Ponta da Cabeça) e C<sup>+</sup> (controle positivo – estreptomicina). .....62

**Figura 17:** Efeito dos extratos das algas calcárias na produção de bissos (A) e mortalidade (B) pelo mexilhão *P. perna*. Média e desvio padrão em porcentagem da produção de bissos após 24 h. B: Média e desvio padrão em porcentagem da mortalidade de indivíduos após 24 h. ANOVA seguida do teste de Tukey. As letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. AbFNS (*A. beauvoisii* - Fenda de Nossa Senhora); AbP (*A. beauvoisii* - Prainha); AbPF (*A. beauvoisii* - Praia do Forno); AbSCB (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne banco); AbSCC (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne costão); JcPA (*J. crassa* - Praia dos Anjos); JcP (*J. crassa* - Prainha); CsSI (*C. sagittatum* - Saco dos Ingleses) e AfPC (*A. flabellata* - Ponta da Cabeça) e C (controle - água do mar) .....63

**Figura 18:** Taxa de incidência global de casos de tuberculose (TB) em 2020. Número de casos estimados por 100.000 habitantes/ano (WHO, 2021). .....79

**Figura 19:** Representação da resposta imune à infecção por *M. tuberculosis*. Fonte: Delogu *et al.* 2013. ....80

**Figura 20:** Estruturas químicas dos principais medicamentos usados no tratamento da tuberculose.....81

**Figura 21:** Localização geográfica das áreas de coleta das algas calcárias geniculadas em diferentes áreas (em vermelho) de Arraial do Cabo/RJ: Fenda de Nossa Senhora, Prainha, Praia do Forno, Saco do Cherne (costão e banco de algas), Praia dos Anjos, Saco dos ingleses e Ponta da Cabeça.....83

**Figura 22:** Espécies de algas calcárias coletadas em diferentes áreas de Arraial do Cabo/RJ. **A:** *Jania crassa*; **B:** *Amphiroa beauvoisii*; **C:** *Cheilosporum Sagittatum*; **D:** *Arthrocardia flabellata*. Fonte: Algaebase. ....84

<b>Figura 23:</b> Etapas empregadas no processo de extração das algas calcária geniculadas. ....	86
<b>Figura 24:</b> Esquema do fracionamento dos extratos brutos mais ativos através da cromatografia líquida a vácuo com diferentes sistemas solventes orgânicos. ....	90
<b>Figura 25:</b> Efeito dos extratos das algas calcárias geniculadas no crescimento de cepas micobacterianas em diferentes concentrações (0,8; 4; 20 e 100 µg/mL). <b>(A)</b> cepa laboratorial - Mtb H37Rv <b>(B)</b> cepa hipervirulenta - Mtb M299. O antibiótico rifampicina (controle positivo - C+) foi usado nas concentrações de 0,0032; 0,016; 0,08 e 1 µg/mL para a cepa laboratorial - Mtb H37Rv e de 0,008; 0,04; 0,2 e 10 µg/mL para a cepa hipervirulenta – Mtb M299. *Concentrações mais ativas significativamente (controle e tratamento). AbFNS ( <i>A. beauvoisii</i> - Fenda de Nossa Senhora); AbP ( <i>A. beauvoisii</i> - Prainha); AbPF ( <i>A. beauvoisii</i> - Praia do Forno); AbSCB ( <i>A. beauvoisii</i> - Saco do Cherne banco); AbSCC ( <i>A. beauvoisii</i> - Saco do Cherne costão); JcPA ( <i>J. crassa</i> - Praia dos Anjos); JcP ( <i>J. crassa</i> - Prainha); CsSI ( <i>C. sagittatum</i> - Saco dos Ingleses) e AfPC ( <i>A. flabellata</i> - Ponta da Cabeça). Os valores são representados pela média e desvio padrão. As barras representam às concentrações testadas (controle e tratamento) em ordem crescente. Adaptado Santo, 2021. ....	96
<b>Figura 26:</b> Efeito dos extratos algas calcárias geniculadas na produção de mediadores inflamatórios em diferentes concentrações (0,8; 4; 20 e 100 µg/mL). <b>(A)</b> NO <b>(B)</b> e TNF-α. Os controles positivos (C+) foram os fármacos L-NMMA e ibuprofeno (nas mesmas concentrações dos extratos) para o NO e o TNF-α, respectivamente. *Concentrações mais ativas significativamente (controle e tratamento). AbFNS ( <i>A. beauvoisii</i> - Fenda de Nossa Senhora); AbP ( <i>A. beauvoisii</i> - Prainha); AbPF ( <i>A. beauvoisii</i> - Praia do Forno); AbSCB ( <i>A. beauvoisii</i> - Saco do Cherne banco); AbSCC ( <i>A. beauvoisii</i> - Saco do Cherne costão); JcPA ( <i>J. crassa</i> - Praia dos Anjos); JcP ( <i>J. crassa</i> - Prainha); CsSI ( <i>C. sagittatum</i> - Saco dos Ingleses) e AfPC ( <i>A. flabellata</i> - Ponta da Cabeça). Os valores são representados pela média e desvio padrão. As barras representam às concentrações testadas (controle e tratamento) em ordem crescente. Adaptado Santo, 2021. ....	98

**Figura 27:** Atividade citotóxica dos extratos algas calcárias geniculadas contra macrófagos murinos em diferentes concentrações (0,8; 4; 20 e 100 µg/mL). A cultura de macrófagos estimulados e tratados com 1% de Triton X- 100 foi usado como controle positivo (C+). \*Concentrações mais ativas significativamente (controle e tratamento). AbFNS (*A. beauvoisii* - Fenda de Nossa Senhora); AbP (*A. beauvoisii* - Prainha); AbPF (*A. beauvoisii* - Praia do Forno); AbSCB (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne banco); AbSCC (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne costão); JcPA (*J. crassa* - Praia dos Anjos); JcP (*J. crassa* - Prainha); CsSI (*C. sagittatum* - Saco dos Ingleses) e AfPC (*A. flabellata* - Ponta da Cabeça). Os valores são representados pela média e desvio padrão. As barras representam às concentrações testadas (controle e tratamento) em ordem crescente. Adaptado Santos, 2021. ....99

**Figura 28:** Efeito das frações (coluna) no crescimento da cepa laboratorial (Mtb H37Rv) em diferentes concentrações (0,8; 4; 20 e 100 µg/mL). O antibiótico rifampicina (C+) foi usado nas concentrações de 0,0032; 0,016; 0,08 e 1 µg/mL. \*Concentrações mais ativas significativamente (controle e tratamento). (A) FAB1:FAB6 - *A. beauvoisii*; FCS1:FCS6 - *C. sagittatum*; (B) FJC1:FJC6 - *J. crassa* e FAF1:FAF6 - *A. flabellata*. Os valores são representados pela média e desvio padrão. As barras representam às concentrações testadas (controle e tratamento) em ordem crescente. Adaptado Santo, 2021. ....102

**Figura 29:** Efeito das frações (coluna) no crescimento da cepa hipervirulenta (Mtb M299) em diferentes concentrações (0,8; 4; 20 e 100 µg/mL). O antibiótico rifampicina (C+) foi usado nas concentrações de 0,008; 0,04; 0,2 e 10 µg/mL. \*Concentrações mais ativas significativamente (controle e tratamento). (A) FAB1:FAB6 - *A. beauvoisii*; FCS1:FCS6 - *C. sagittatum*; (B) FJC1:FJC6 - *J. crassa* e FAF1:FAF6 - *A. flabellata*. Os valores são representados pela média e desvio padrão. As barras representam às concentrações testadas (controle e tratamento) em ordem crescente. Adaptado Santo, 2021. ....103

**Figura 30:** Efeito das frações (coluna) das algas calcárias geniculadas na produção do mediador inflamatório (NO) em diferentes concentrações (0,8; 4; 20 e 100 µg/mL). O fármaco L-NMMA (controle positivo - C+) foi usado nas mesmas concentrações das

frações. \*Concentrações mais ativas significativamente (controle e tratamento). (A) FAB1:FAB6 - *A. beauvoisii*; FCS1:FCS6 - *C. sagittatum*; (B) FJC1:FJC6 – *J. crassa*; FAF1:FAF6 - *A. flabellata*. Os valores são representados pela média e desvio padrão. As barras representam às concentrações testadas (controle e tratamento) em ordem crescente. Adaptado Santo, 2021. .... 106

**Figura 31:** Efeito das frações (coluna) das macroalgas calcárias na produção do mediador inflamatório (TNF- $\alpha$ ) em diferentes concentrações (0,8; 4; 20 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ). O fármaco ibuprofeno (controle positivo - C+) foi usado nas mesmas concentrações das frações. \*Concentrações mais ativas significativamente (controle e tratamento). (A) FAB1:FAB6 - *A. beauvoisii*; FCS1:FCS6 - *C. sagittatum*; (B) FJC1:FJC6 – *J. crassa*; FAF1:FAF6 - *A. flabellata*. Os valores são representados pela média e desvio padrão. As barras representam às concentrações testadas (controle e tratamento) em ordem crescente. Adaptado Santo, 2021. .... 107

**Figura 32:** Atividade citotóxica das frações (coluna) das macroalgas calcárias contra macrófagos murinos em diferentes concentrações (0,8; 4; 20 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ). A cultura de macrófagos estimulados e tratados com 1% de Triton X- 100 foi usado como controle positivo (C+). \*Concentrações mais ativas significativamente (controle e tratamento). (A) FAB1:FAB6 - *A. beauvoisii*; FCS1:FCS6 - *C. sagittatum*; (B) FJC1:FJC6 – *J. crassa*; FAF1:FAF6 - *A. flabellata*. Os valores são representados pela média e desvio padrão. As barras representam às concentrações testadas (controle e tratamento) em ordem crescente. Adaptado Santo, 2021. .... 108

**Figura 33:** Cromatogramas das frações (FJC1, FJC2, FJC3) da macroalga calcária *J. crassa* obtidos por CG-EM ..... 111

**Figura 34:** Cromatogramas das frações (FAF2, FAF3, FAF4) da macroalga calcária *A. flabellata* obtidos por CG-EM ..... 112

**Figura 35:** Rede molecular obtida na plataforma GNPS das frações (coluna) mais ativas contra os modelos testados. FJC1:FJC3 – *J. crassa*; FAF2:FAF4 - *A. flabellata*. 115

**Figura 36:** Cromatogramas das frações mais purificadas (F26-28, F29-33 e F46-53) da macroalga calcária *J. crassa* obtidos por CG-EM. \* Indica a substância majoritária. 116

**Figura 37:** Cromatogramas das frações mais purificada (F22-28, F23-28 e F29-40) da macroalga calcária *A. flabellata* obtidos por CG-EM. \* Indica a substância majoritária.117

**Figura 38:** Cromatogramas das frações mais purificada (F49, F49.2, F50-54 e F50-54.2) da macroalga calcária *A. flabellata* obtidos por CG-EM. \* Indica a substância majoritária.....118

**Figura 39:** Efeito da fração F29-40 de *A. flabellata* no crescimento de cepas micobacterianas em diferentes concentrações (0,8; 4; 20 e 100 µg/mL). (A) cepa laboratorial - Mtb H37Rv (B) cepa hipervirulenta - Mtb M299. O antibiótico rifampicina (controle positivo - C+) foi usado nas concentrações de 0,0032; 0,016; 0,08 e 1 µg/mL para a cepa laboratorial - Mtb H37Rv e de 0,008; 0,04; 0,2 e 10 µg/mL para a cepa hipervirulenta – Mtb M299. \*Concentrações mais ativas significativamente (controle e tratamento). Os valores são representados pela média e desvio padrão. As barras representam às concentrações testadas (controle e tratamento) em ordem crescente.120

**Figura 40:** Efeito da fração F29-40 de *A. flabellata* na produção de mediadores inflamatórios em diferentes concentrações (0,8; 4; 20 e 100 µg/mL). (A) NO (B) e TNF-α. Os controles positivos (C+) foram os fármacos L-NMMA e ibuprofeno (nas mesmas concentrações dos extratos) para o NO e o TNF-α, respectivamente. \*Concentrações mais ativas significativamente (controle e tratamento). Os valores são representados pela média e desvio padrão. As barras representam às concentrações testadas (controle e tratamento) em ordem crescente. ....122

**Figura 41:** Atividade citotóxica da fração F29-40 de *A. flabellata* contra macrófagos murinos em diferentes concentrações (0,8; 4; 20 e 100 µg/mL). A cultura de macrófagos estimulados e tratados com 1% de Triton X- 100 foi usado como controle positivo (C+). \*Concentrações mais ativas significativamente (controle e tratamento). Os valores são representados pela média e desvio padrão. As barras representam às concentrações testadas (controle e tratamento) em ordem crescente.....123

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Substâncias isoladas e atividade biológica de macroalgas do gênero <i>Jania</i> .	28
<b>Tabela 2:</b> Espécies de macroalgas calcárias geniculadas amostradas e os seus locais de coleta.....	48
<b>Tabela 3:</b> Concentração natural dos extratos de algas calcárias geniculadas aplicada no ensaio de atividade anti-incrustante com as bactérias marinhas. ....	51
<b>Tabela 4:</b> Concentração natural dos extratos das algas calcárias geniculadas aplicada no ensaio de atividade anti-incrustate com o mexilhão <i>P. perna</i> .....	52
<b>Tabela 5:</b> Rendimentos dos extratos obtidos através da relação entre o peso seco da alga (g) e o peso do extrato bruto (g). ....	54
<b>Tabela 6:</b> Substâncias dos extratos das algas calcárias geniculadas, detectadas pelo CG-EM com área $\geq 1\%$ e identificadas pela biblioteca NIST ( $\geq 85\%$ ) e plataforma GNPS (cosseno $\geq 0,7$ ). X: substâncias identificadas por ambos os bancos (NIST e GNPS); Y: substâncias identificadas somente no banco NIST; X': substâncias não identificadas (NI). ....	57
<b>Tabela 7:</b> ANOVA da Inibição do crescimento bacteriano após 24 horas de exposição aos extratos das algas calcárias geniculadas. ....	61
<b>Tabela 8:</b> ANOVA da produção de bissos e mortalidade pelo mexilhão <i>Perna perna</i> após 24 horas de exposição aos extratos das algas calcárias geniculadas.....	63
<b>Tabela 9:</b> Espécies de macroalgas calcárias geniculadas amostradas e os seus locais de coleta.....	84
<b>Tabela 10:</b> Testes com o sistema bifásico de solventes HEMWat.....	92
<b>Tabela 11:</b> Sistemas selecionados para realizar o fracionamento após o ajuste.....	92
<b>Tabela 12:</b> ANOVA da atividade antimicobacteriana dos extratos das algas calcárias geniculadas. ....	95
<b>Tabela 13:</b> Concentração inibitória mínima (MIC <sub>50</sub> ) dos extratos das algas calcárias geniculadas contra cepa laboratorial – Mtb H37Rv e cepa hipervirulenta – Mtb M299. .	97
<b>Tabela 14:</b> ANOVA da atividade anti-inflamatória dos extratos das algas calcárias geniculadas. ....	97

<b>Tabela 15:</b> ANOVA da atividade citotóxica dos extratos das algas calcárias geniculadas. ....	99
<b>Tabela 16:</b> Concentração inibitória (IC <sub>50</sub> ) e concentração de citotoxicidade (CC <sub>50</sub> ) dos extratos das algas calcárias geniculadas. ....	100
<b>Tabela 17:</b> ANOVA da atividade antimicobacteriana das frações (coluna) das algas calcárias geniculadas. ....	101
<b>Tabela 18:</b> Concentração inibitória mínima (MIC <sub>90</sub> ) das frações (coluna) contra a cepa laboratorial – Mtb H37Rv e a cepa hipervirulenta – Mtb M299. ....	104
<b>Tabela 19:</b> ANOVA da atividade anti-inflamatória das frações (coluna) das algas calcárias geniculadas. ....	105
<b>Tabela 20:</b> ANOVA da atividade citotóxica dos extratos das algas calcárias geniculadas. ....	107
<b>Tabela 21:</b> Concentração inibitória (IC <sub>50</sub> ) e concentração de citotoxicidade (CC <sub>50</sub> ) das frações (coluna) das algas coralinas geniculadas. ....	109
<b>Tabela 22:</b> Substâncias identificadas nas frações ativas analisadas por CG-EM com área ≥1% e identificadas pela biblioteca NIST (≥ 85%) e plataforma GNPS (cosseno ≥ 0,7). X: substâncias identificadas por ambos os bancos (NIST e GNPS); Y: substâncias identificadas somente no banco NIST; X': substâncias não identificadas (NI). ....	113
<b>Tabela 23:</b> ANOVA da atividade antimicobacteriana fração 29-40 de <i>A. flabellata</i> . ....	119
<b>Tabela 24:</b> Concentração inibitória mínima (MIC <sub>50</sub> ) da fração F29-40 de <i>A. flabellata</i> contra cepa laboratorial – Mtb H37Rv e cepa hipervirulenta – Mtb M299. ....	120
<b>Tabela 25:</b> ANOVA da atividade anti-inflamatória da fração 29-40 de <i>A. flabellata</i> .....	121
<b>Tabela 26:</b> Atividade anti-inflamatória e citotóxica fração mais purificada (F29-40). O valor de IC <sub>50</sub> ≤ 45 µg/mL e CC <sub>50</sub> > 70 µg/mL apresentam atividade. ....	123

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt - Acetato de etila

ACN: Acetonitrila

ACP - Análise de componentes principais

ADC - Complexo de albumina dextrose catalase

ANOVA - Análise de variância

ATCC - American Type Culture Collection

CaCO<sub>3</sub> - Carbonato de cálcio

CCD - Cromatografia de camada delgada

CCC - Contracorrente

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono

CFU - Colony-forming unit

COVID-19 - Coronavirus disease 2019

COWtool - Correlation Warping Algorithm

cdf - Computable document format

CC - Concentração de citotoxicidade

DMEM-F12 - *Dulbecco's Eagle* modificado F-12

DMF - Dimetilformamida

DMSO - Dimetilsulfóxido

GC-EM - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

GNPS - Global Natural Product Social Molecular Networking

HEMWat - Hexano/acetato de etila/metanol/água

Hex: Hexano

HCl - Ácido clorídrico

HPLC - High performance liquid chromatography

H<sub>2</sub>O: Água

IC - Concentração inibitória

K<sub>d</sub> – Coeficiente de distribuição

LNMMMA - Acetato de NG-metil-L-arginina

LPS - lipopolissacarídeo

MeOH - Metanol

MIC - Concentração mínima inibitória

Mtb H37Rv - *Mycobacterium tuberculosis* - cepa laboratorial

Mtb M299 - *Mycobacterium tuberculosis* - cepa hipervirulenta

MTT: 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-defeniltetrazol

NIST - National Institute of Standards and Technology

NO - óxido nítrico

PTFE – Politetrafluoretileno

Sf - Retenção da fase estacionária

SFB - Soro fetal bovino

TB - Tuberculose

TBT - Tributilestanho

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa

WHO - World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	22
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	32
<b>OBJETIVOS</b> .....	39
Objetivo Geral .....	39
Objetivos específicos .....	39
<b>HIPÓTESES</b> .....	40
<b>CAPÍTULO 1: DIVERSIDADE QUÍMICA E ATIVIDADE ANTI-INCRUSTANTE DOS PRODUTOS NATURAIS DE ALGAS CALCÁRIAS GENICULADAS</b> .....	41
<b>RESUMO</b> .....	41
<b>ABSTRACT</b> .....	42
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	43
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	45
2.1 Coleta do material biológico .....	45
2.2 Preparação dos extratos .....	48
2.3 Perfis químicos dos extratos .....	49
2.4 Atividade antibacteriana .....	51
2.5 Atividade anti-incrustante contra o mexilhão <i>Perna perna</i> .....	52
2.6 Análises estatísticas .....	53
<b>3. RESULTADOS</b> .....	53
3.1 Rendimento dos extratos brutos.....	53
3.2 Perfil químico dos extratos .....	54
3.3 Análise de componente principal (ACP).....	59
3.4 Atividade antibacteriana .....	60
3.5 Atividade anti-incrustante contra o mexilhão <i>Perna perna</i> .....	62

<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	64
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70
<b>CAPÍTULO 2: POTENCIAL ANTIMICOBACTERIANO, ANTI-INFLAMATÓRIO E CITOTÓXICO DE PRODUTOS NATURAIS DE ALGAS CALCÁRIAS GENICULADAS</b>	76
<b>RESUMO</b> .....	76
<b>ABSTRACT</b> .....	77
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	78
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	82
2.1 Coleta do material biológico .....	82
2.2 Preparação dos extratos .....	85
2.3 Atividade antimicobacteriana, anti-inflamatória e citotóxica .....	86
2.3.1 Cultura e atividade antimicobacteriana.....	86
2.3.2 Cultura de macrófagos e atividade anti-inflamatória .....	87
2.3.3 Citotoxicidade em macrófagos .....	89
2.4 Fracionamento dos extratos brutos .....	89
2.5 Perfil químico das frações (coluna) mais ativas .....	90
2.6 Cromatografia Contracorrente (CCC) .....	91
2.6.1 Teste do sistema de solventes .....	91
2.6.2 Fracionamento por Contracorrente (CCC) .....	93
2.7 Análises estatísticas .....	94
<b>3. RESULTADOS</b> .....	94
3.1 Atividade dos extratos brutos quanto a inibição de cepas micobacterianas.....	94
3.2 Atividade dos extratos brutos quanto a inibição de mediadores inflamatórios (NO e TNF- $\alpha$ ) e citotoxicidade .....	97
3.3 Avaliação das frações (coluna) de macroalgas calcárias quanto à atividade antimicobacteriana .....	100

3.4 Avaliação das frações (coluna) de macroalgas calcárias quanto às atividades anti-inflamatória e citotoxicidade .....	105
3.5 Análise das Frações (coluna) mais ativas por CG-EM .....	110
3.6 Análise por CG-EM das frações purificadas na cromatografia contracorrente .....	116
3.7 Avaliação da fração (F29-40) de <i>Arthrocardia flabellata</i> quanto à atividade antimicobiana .....	119
3.8 Avaliação da fração (F29-40) de <i>Arthrocardia flabellata</i> quanto às atividades anti-inflamatória e citotoxicidade .....	121
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>124</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>130</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>132</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

No ambiente marinho, as macroalgas são expostas a diferentes tipos de interações ecológicas, tais como competição, predação, parasitismo e epifitismo (Whal, 1989; Andras *et al.* 2012; Ank *et al.* 2013; Da Gama *et al.* 2014; Vieira, 2016). Muitas espécies são capazes de produzir uma variedade de substâncias bioativas que funcionam como uma excelente estratégia de defesa química e adaptação a estressores ambientais (Teixeira, 2013; Thirumurugan *et al.* 2018; Cotas *et al.* 2020; Mannino & Micheli, 2020), aumentando as chances de sobrevivência e colonização no ambiente marinho.

Estas substâncias são conhecidas como metabólitos secundários, também chamados de metabólitos especiais ou produtos naturais. São substâncias químicas que não estão diretamente ligadas aos processos celulares básicos dos organismos, como respiração, fotossíntese, crescimento e reprodução, por exemplo, (Maschek & Baker, 2008, Thirumurugan *et al.* 2018). No entanto, a ausência destes metabólitos pode comprometer a sobrevivência dos organismos (Tiwari & Rana, 2015). Vale ressaltar que, a produção desses metabólitos pode variar devido à influência de diversos fatores, tais como temperatura, salinidade, luz (Stengel *et al.* 2011; Sudatti *et al.* 2011; Cotas *et al.* 2020), localização geográfica (Plouguerné *et al.* 2010a, Stengel *et al.* 2011), sazonalidade (Stengel *et al.* 2011; El Maghraby & Fakhry, 2015, Mansur *et al.* 2020), disponibilidade de nutrientes e exposição a diferentes interações ecológicas (Stengel *et al.* 2011). A produção destas substâncias, importante para os estudos na área da ecologia química, despertou o interesse de diversos pesquisadores na aplicação em diversas outras áreas, tais como farmacologia, cosmética, alimentícia e biotecnologia (Da Gama *et al.* 2014; Kasanah *et al.* 2015; Cotas *et al.* 2020; Silva *et al.* 2020).

Dentro do grupo das macroalgas marinhas, chama-se a atenção para as algas calcárias coralinas (Corallinales, Rhodophyta). Elas apresentam ampla distribuição no globo, são capazes de formar os chamados bancos de algas em fundos de enseadas (**Figura 1**) (Tâmega *et al.* 2017) e colonizar ambientes com diferentes condições de

luz, temperatura e hidrodinamismo. São encontradas desde regiões tropicas às polares, podendo atingir zonas entremarés até profundidades maiores que 200 metros (Littler & Littler, 1985; Harvey *et al.* 2005; Nelson 2009; McCoy *et al.* 2015).

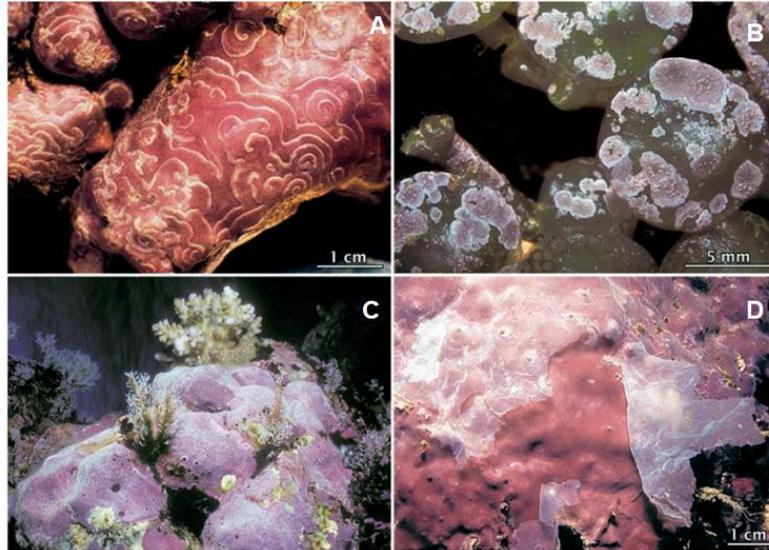


**Figura 1:** Banco de algas na Baía do Arraial do Cabo. Fonte: Tâmega *et al.* 2017.

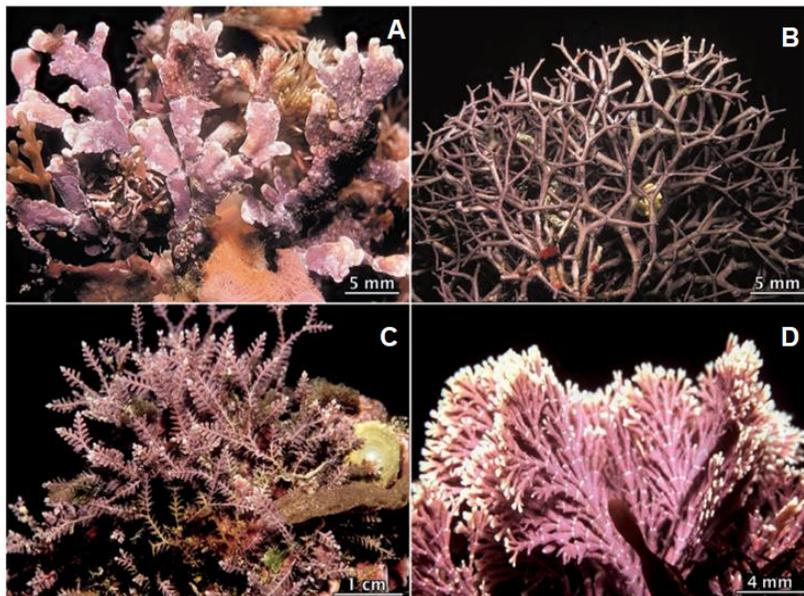
Este grupo de algas vermelhas é diferenciado das demais pela presença de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) nas paredes celulares, sob a forma de calcita (Dias, 2000; McCoy *et al.* 2015). Elas são componentes importantes das comunidades marinhas, fornecendo abrigo, induzindo o assentamento de larvas de diferentes invertebrados e são importantes nos estudos sobre mudanças climáticas. Além disso, contribuem com a produção de sedimentos ricos em carbonatos e um dos mais importantes grupos construtores de recifes biogênicos (Nelson, 2009; Littler & Littler, 2011; Cornwall *et al.* 2013; Fisher & Martone, 2014; McCoy & Kamenos 2015, McCoy *et al.* 2016).

Morfologicamente, as algas calcárias corálicas são separadas em dois grupos: o primeiro grupo é formado por algas não geniculadas ou crustosas (**Figura 2**), desprovidas de ramos e inteiramente calcificadas; e o segundo grupo é formado pelas calcárias geniculadas (**Figura 3**), com ramos verticais flexíveis, apresentando segmentos calcificados (genículos) e não calcificados (intergenículos) (Harvey & Woelkerling, 2007; Littler & Littler, 2013). A morfologia das algas calcárias geniculadas

proporciona diferentes estratégias de sobrevivência, visto que, permite o crescimento bidimensional das mesmas e isso promove o recebimento de mais luz e nutrientes. Além disso, apresentam maior taxa de crescimento e reprodução em comparação as algas crustosas (Littler & Littler, 2013).

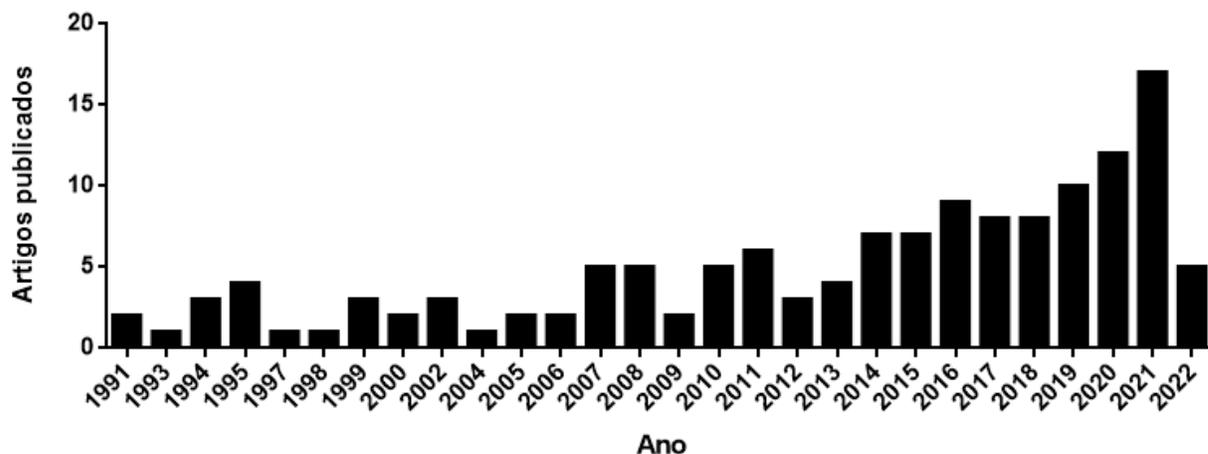


**Figura 2:** Exemplos de algas calcárias não geniculadas. A: *Titanoderma tessellatum*; B: *Titanoderma pustulatum*; C: *Porolithon onkodes*; D: *Neogoniolithon fosliei*. Fonte: Littler & Littler, 2013.



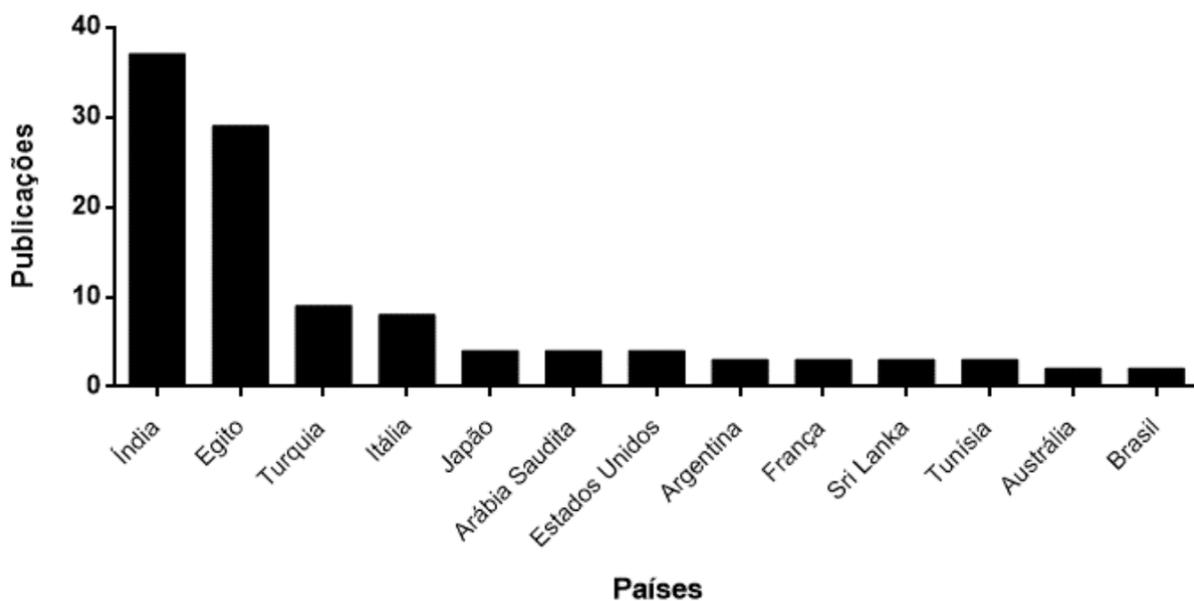
**Figura 3:** Exemplos de algas calcárias geniculadas. A: *Amphiroa foliacea*; B: *Jania rubens*; C: *Corallina bertero*; D: *Amphiroa ephedraea*. Fonte: Littler & Littler, 2013.

Ao longo dos últimos 30 anos o interesse (a nível mundial) sobre a composição química e o potencial biotecnológico das algas calcárias geniculadas foi crescente. Estudos sobre os gêneros *Jania*, *Amphiroa*, *Cheilosporum* e *Arthrocardia* (alvos do presente estudo) aumentaram principalmente no ano de 2021 (**Figura 4**).



**Figura 4:** Produção científica mundial no período de 1991 a 2022 sobre a composição química e o potencial biotecnológico de algas calcárias geniculadas dos gêneros *Jania*, *Amphiroa*, *Cheilosporum* e *Arthrocardia*. Fonte: Scopus e Web of science, junho/2022.

A **Figura 5** apresenta os principais países que publicaram (nos últimos 30 anos) de acordo com os gêneros já mencionados e o potencial biotecnológico dos mesmos, sendo a Índia, seguido do Egito os dois países com maior número de publicações. Em relação ao Brasil, poucos estudos foram realizados sobre produtos naturais e o potencial biotecnológico de algas calcárias geniculadas, ficando na 13ª posição em relação à produção científica.



**Figura 5:** Principais países que publicaram sobre produtos naturais e potencial biotecnológico de algas calcárias geniculadas no período de 1991 a 2022. Fonte: Scopus e Web of science, junho/2022.

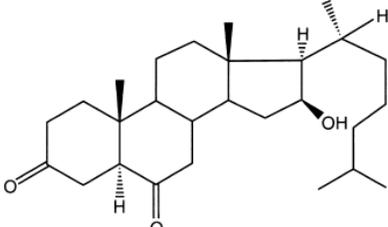
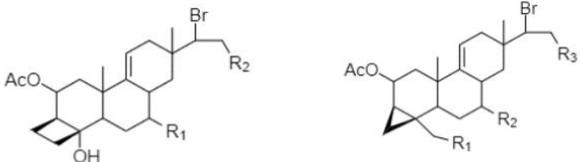
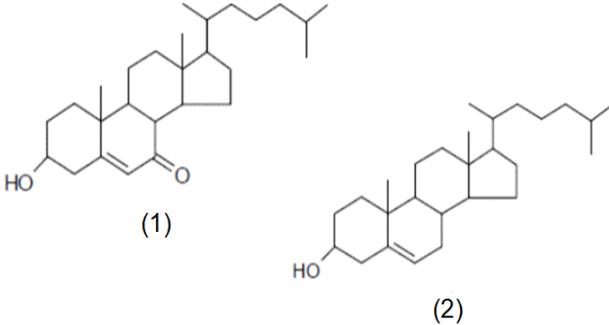
Estudos com extratos do gênero *Jania* revelaram a presença de diferentes classes químicas, tais como, ácidos graxos (Ahmed *et al.* 2011; Chakraborty *et al.* 2016; Caf *et al.* 2019; Cikos *et al.* 2021), esteróis (Ahmed *et al.* 2011; El-Ansary & Hamouda, 2014; Saleh & Mariri, 2017; Caf *et al.* 2019; Elangovan & Anantharaman, 2019; El-Nuby *et al.* 2021), taninos, flavonóides, alcalóides (El-Ansary & Hamouda 2014; Saleh & Mariri, 2017; Akbary *et al.* 2020; Premarathna *et al.* 2020; El Shafay *et al.* 2021; El-Nuby *et al.* 2021), saponinas (Saleh & Mariri, 2017; El Shafay *et al.* 2021), terpenos (Akbary *et al.* 2020; Elangovan & Anantharaman, 2019; Premarathna *et al.* 2020; El-Nuby *et al.* 2021), hidrocarbonetos (Ahmed *et al.* 2011; Cikos *et al.* 2021) e carotenóides (Palermo *et al.* 1991; Esteban *et al.* 2008; Cikos *et al.* 2021).

Quanto ao potencial biotecnológico, foram encontrados estudos com extratos do gênero *Jania* para diferentes atividades, tais como antitumoral (El-Masry *et al.* 1995; Stirk *et al.* 2003; Unissa *et al.* 2017; Premarathna *et al.* 2020; El Shafay *et al.* 2022), antidiabética e anti-inflamatória (El Shafay *et al.* 2022); antioxidante (Devi *et al.* 2008; Ahmed *et al.* 2011; Chakraborty *et al.* 2016; Dixit & Reddy, 2017; Pinteus *et al.* 2017; Chakraborty & Raola, 2018; Essa *et al.* 2018; Akbary *et al.* 2020; El-Sheekh *et al.*

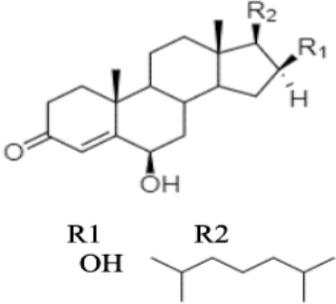
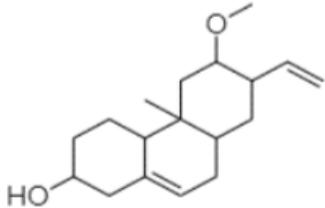
2021; El Shafay *et al.* 2022), antibacteriana (Saleh & Mariri, 2017; Sasikala & Geetha, 2017; Chenniappan *et al.* 2021, El-Zamkan *et al.* 2021), antinematocida (El-Nuby *et al.* 2021); antiprotozoária (El-Ansary & Hamouda, 2014), antifúngica (Awad, 2004; Saleh & Mariri, 2017; Raj *et al.* 2019; Righini *et al.* 2021), antiviral (Soares *et al.* 2012) antigenotóxica (Alarif *et al.* 2012), larvicida (Bibi *et al.* 2020) e anti-incrustante (Medeiros *et al.* 2007; Kantida *et al.* 2012).

A **Tabela 1** mostra substâncias isoladas, identificadas e as atividades biológicas para o gênero *Jania*.

**Tabela 1:** Substâncias isoladas e atividade biológica de macroalgas do gênero *Jania*.

Espécies	Substâncias isoladas	Estrutura química	Atividade	Referência																									
<i>Jania rubens</i>	16β-hidroxi-5α -colestano-3,6-diona		Antitumoral	Ktari <i>et al</i> 2000																									
<i>Jania rubens</i>	(1) isoparguerol (2) isoparguerol-16-acetato (3) isoparguerol-7,16-diacetato (4) parguerol-16-acetato (5) parguerol-7,16-diacetato (6) deoxiparguerol (7) deoxiparguerol-7-acetato	 <table border="0" data-bbox="951 829 1499 943"> <tr> <td>R1</td> <td>R2</td> <td>R1</td> <td>R2</td> <td>R3</td> </tr> <tr> <td>(1) OH</td> <td>OH</td> <td>(4) OH</td> <td>OH</td> <td>OAc</td> </tr> <tr> <td>(2) OH</td> <td>OAc</td> <td>(5) OH</td> <td>OAc</td> <td>OAc</td> </tr> <tr> <td>(3) OAc</td> <td>OAc</td> <td>(6) H</td> <td>OH</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>(7) H</td> <td>OAc</td> <td>OH</td> </tr> </table>	R1	R2	R1	R2	R3	(1) OH	OH	(4) OH	OH	OAc	(2) OH	OAc	(5) OH	OAc	OAc	(3) OAc	OAc	(6) H	OH	OH			(7) H	OAc	OH	Anti-helmíntica Antitumoral	Awad 2004
R1	R2	R1	R2	R3																									
(1) OH	OH	(4) OH	OH	OAc																									
(2) OH	OAc	(5) OH	OAc	OAc																									
(3) OAc	OAc	(6) H	OH	OH																									
		(7) H	OAc	OH																									
<i>Jania rubens</i>	(1) 7-oxo-colest-5(6)-en-3-ol (2) colesterol		Antitumoral e Antioxidante	Ahmed <i>et al</i> 2011																									

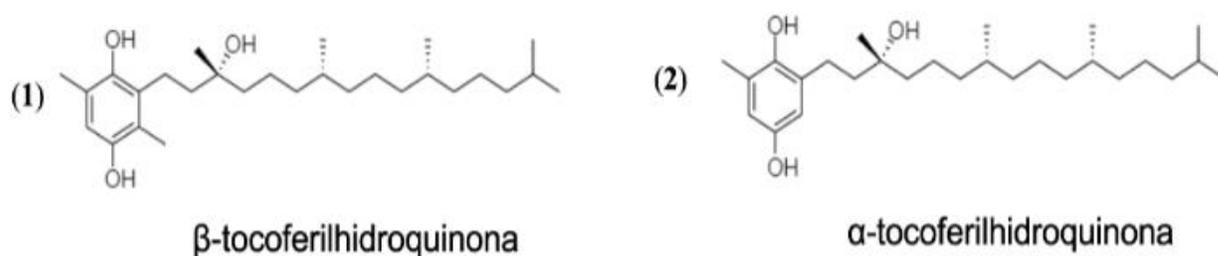
**Tabela 1:** Substâncias isoladas e atividade biológica de macroalgas do gênero *Jania*.

Espécies	Substâncias isoladas	Estrutura química	Atividade	Referência
<i>Jania adhaerens</i>	6 $\beta$ ,16 $\beta$ -di-hidroxicoleste-4-en-3-ona		Antigenotóxica	Alarif <i>et al</i> 2012
<i>Jania rubens</i>	6 $\alpha$ -metoxi-4 $\beta$ -metil-7 $\beta$ -vinil-1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,8,8a,9-dodecahidro-2 $\beta$ -fenantrenol		Antioxidante	Chakraborty & Raola 2018

Estudos com extratos do gênero *Amphiroa* também revelaram a presença de diferentes substâncias químicas, tais como, ácidos graxos (Venkatesalu *et al.* 2012; Cikoš *et al.* 2021; Mofeed *et al.* 2021), esteróis, taninos, flavonóides e terpenos (Antonisamy & Raj 2016; Mahomoodally *et al.* 2020; El-Nuby *et al.* 2021), alcalóides, saponinas (Antonisamy & Raj 2016; El-Nuby *et al.* 2021), hidrocarbonetos e carotenóides (Cikos *et al.* 2021).

Em relação ao potencial biotecnológico, foram encontrados estudos com extratos do gênero *Amphiroa* para diferentes atividades, tais como antitumoral (Stirk *et al.* 2003); antibacteriana (Vlachos *et al.* 1997; Stirk *et al.* 2003; Stirk *et al.* 2007; Boonchum *et al.* 2011a; Mofeed *et al.* 2021), antiviral (Mofeed *et al.* 2021); antibiofilme (Deepa *et al.* 2014), antifúngica (Vlachos *et al.* 1997; Bhosale *et al.* 1999; Boonchum *et al.* 2011a), antinematocida (El-Nuby *et al.* 2021); antioxidante (Khan *et al.* 2010; Boonchum *et al.* 2011b; Mahomoodally *et al.* 2020; Cikoš *et al.* 2021), imunomoduladora (Talluri *et al.* 2017).

Quanto ao isolamento de substâncias para o gênero *Amphiroa*, somente um estudo realizado por Stout *et al.* (2010), isolou dois meroditerpenos:  $\beta$ -tocoferilhidroquinona (1) e  $\alpha$ -tocoferilhidroquinona (2) da espécie *Amphiroa crassa* (Figura 6).



**Figura 6:** Substâncias isoladas da espécie *Amphiroa crassa*. Fonte: Stout *et al.* 2010

Estudos sobre composição química e o potencial biotecnológico dos gêneros *Cheilosporum* e *Arthrocardia* são mais escassos em comparação aos demais. Para

gênero *Cheilosporum* somente um estudo foi encontrado sobre a produção de ácidos graxos (Venkatesalu *et al.* 2012). Além disso, estudos prévios também revelaram algumas atividades biológicas para os extratos deste gênero, tais como antitumoral (Stirk *et al.* 2003); antibacteriana (Vlachos *et al.* 1997; Stirk *et al.* 2003), antifúngica (Vlachos *et al.* 1997) e antiviral (Premarathna *et al.* 1994). Quanto ao gênero *Arthrocardia*, estudos mostraram atividade antitumoral (Stirk *et al.* 2003); antibacteriana (Vlachos *et al.* 1997; Stirk *et al.* 2003) e antifúngica (Vlachos *et al.* 1997), entretanto nenhuma substância foi caracterizada para o gênero em questão.

A área marinha de Arraial do Cabo abriga uma grande diversidade de macroalgas, incluindo as algas calcárias geniculadas com grande representatividade de espécies nos costões rochosos e formando bancos de algas em fundos de enseadas (Tâmega *et al.* 2017; Yoneshigue-Valentin *et al.* 2020). No entanto, estudos sobre a composição química e o potencial biotecnológico deste grupo de macroalgas são escassos nesta região e na costa brasileira de forma geral. Tendo em vista a diversidade de substâncias químicas produzidas e o potencial biotecnológico deste grupo, o objetivo geral do presente estudo foi avaliar a diversidade química intra/interespecífica e o potencial biotecnológico de quatro espécies de algas calcárias geniculadas (*Amphiroa beauvoisii* J.V.Lamouroux 1816, *Jania crassa* J.V.Lamouroux 1821, *Cheilosporum sagittatum* (J.V.Lamouroux) Areschoug 185 e *Arthrocardia flabellata* (Kützinger) Manza 1940) coletadas em diferentes áreas de Arraial do Cabo/RJ.

O estudo foi dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo analisou a diversidade química intra/interespecífica e o potencial anti-incrustante dos extratos das algas calcárias geniculadas. O segundo capítulo avaliou o potencial antimicrobiano, anti-inflamatório e citotóxico dos extratos e frações das algas trabalhadas. A parte química descrita neste capítulo foi desenvolvida no Laboratório Integrado de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ - campus Macaé (NUPEM)) e a parte biológica foi realizada em colaboração com o Laboratório de Biologia do Reconhecer, no Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).

## REFERÊNCIAS

AHMED, H. H. *et al.* Antitumour and antioxidant activity of some red sea seaweeds in ehrlich ascites carcinoma in vivo. **Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 66, p. 367 - 76, 2011.

AKBARY, P.; ADESHINA, I.; JAHANBAKHSHIC, A. Growth performance, digestive enzymes, antioxidant activity and immune responses of *Litopenaeus vannamei* fed with *Jania adhaerens* J.V. supplemented diet against *Photobacterium damsela* infection. **Animal Feed Science and Technology**, v. 270, p. 114 - 696, 2020.

ALARIF, W. M. *et al.* Antigenotoxic ketosteroid from the red algae *Jania adhaerens*. **Natural Product Research**, v. 26, p. 785 - 791, 2012.

ANDRAS, T. D. *et al.* Seaweed allelopathy against coral: surface distribution of a seaweed secondary metabolite by imaging mass spectrometry. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, p. 1203 -1214, 2012.

ANK, G. *et al.* Polyphenols from *Styopodium zonale* (phaeophyceae): intrapopulational variation, induction by simulated herbivory, and epibiosis effects. **Aquatic Botany**, v. 111, p. 125 - 129, 2013.

ANTONISAMY, J. M.; RAJ, E. D. S. UV-VIS and HPLC studies on *Amphiroa anceps* (Lamarck) Decaisne. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, p. S907 - S913, 2016.

AWAD, N. E. Bioactive brominated diterpenes from the marine red alga *Jania rubens* (L.) Lamx. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 275 - 279, 2004.

BIBI, R. *et al.* Toxic assessment, growth disrupting and neurotoxic effects of red seaweeds' botanicals against the dengue vector mosquito *Aedes aegypti* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 195, p. 110451, 2020.

BOONCHUM, W. *et al.* Antimicrobial and anti-inflammatory properties of various seaweeds from the gulf of Thailand. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 13, p. 100 - 104, 2011a.

BOONCHUM, W. Antioxidant activity of some seaweed from the gulf of Thailand. **international journal of agriculture and biology**, v.13, p. 95 - 99, 2011b.

BHOSALE, S. H. *et al.* Antifungal activity of some marine organisms from India, against food spoilage *Aspergillus* strains. **Mycopathologia**, v. 147, p. 133 - 138, 1999.

CAF, E. *et al.* Fatty acid and lipophilic vitamin composition of seaweeds from Antalya and Canakkale (Turkey). **Grasas y aceites**, v. 70, p. 1 - 7, 2019.

CIKOS, A. *et al.* Bioprospecting of coralline red alga *Amphiroa rigida* J. V. Lamouroux: volatiles, fatty acids and pigments. **Molecules**, 26, p. 1 - 21, 2021.

CORNWALL, C. E. *et al.* Concentration boundary layers around complex assemblages of macroalgae: implications for the effects of ocean acidification on understory coralline algae. **Limnology and Oceanography (L&O)**, v. 58, p. 121 - 130, 2013.

COTAS, J. *et al.* A comprehensive review of the nutraceutical and therapeutic applications of red seaweeds (Rhodophyta). **Life**, v. 10, p. 1 - 23, 2020.

CHAKRABORTY, K. *et al.* Changes in the quality of refined fish oil in an accelerated storage study. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 25, p. 1155 - 1170, 2016.

CHAKRABORTY, K.; RAOLA, V. K. In vitro bioactive analysis and antioxidant activity of two species of seaweeds from the Gulf of Mannar. **Natural product research**, v. 32, p. 2729 - 2734, 2018.

CHENNIAPPAN, S. *et al.* Antibacterial activity of *Jania rubens* from Gulf of Mannar, south coast of India. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 12, p. 451-458, 2021.

DA GAMA, B. A. P. *et al.* The antifouling defence mechanisms of marine macroalgae. In J-P. Jacquot, & P. Gadal (Serial Eds.) & N. Bourgougnon (Serial Vol. Ed.) **Advances in Botanical Research**, v. 71, p. 413 - 440, 2014.

DEEPA, S. *et al.* Antifouling potential of selected macroalgae from the Gulf of Mannar, India. **International Journal of Bioassays**, v. 3, p. 3479 - 3487, 2014.

DEVI, K. P. *et al.* Bioprotective properties of seaweeds: In vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity against food borne bacteria in relation to polyphenolic content. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 8, p. 1 -11, 2008.

DIXIT, D.; REDDY, C. R. K. Non-targeted secondary metabolite profile study for deciphering the cosmeceutical potential of red marine macro alga *Jania rubens* - an LCMS based approach. **Cosmetics**, v. 4, p. 1 - 17, 2017.

ELANGOVAN, M.; ANANTHARAMAN, P. Nutritional composition and phytochemistry profile of seaweeds collected from Rameshwaram coast. **International Journal of Scientific & Technology Research**, v. 8, p. 3137 - 3140, 2019.

EL - ANSARYA, M. S. M.; HAMOUDA, R. A. Biocontrol of root-knot nematode infected banana plants by some marine algae. **Russian Journal of Marine Biology**, v. 40, p. 140 -146, 2014.

EL-MAGHRABY, D. M.; FAKHRY, E. M. Lipid content and fatty acid composition of Mediterranean macro-algae as dynamic factors for biodiesel production. **Oceanologia**, v. 57, p. 86 - 92, 2015.

EL-MASRY, M. H. *et al.* Marine algae that display anti-tumorigenic activity against *Agrobacterium tumefaciens*. **FEMS Microbiology Letter**, v. 128, p. 151 - 156, 1995.

EL-NUBY, A. S. M. *et al.* In vitro evaluation of the toxicity of different extracts of some marine algae against root - knot nematode (*Meloidogyne incognita*). **Pakistan Journal of Phytopathology**, v. 33, p. 55 - 66, 2021.

EL SHAFAY, S. *et al.* Antioxidant, antidiabetic, anti-inflammatory and anticancer potential of some seaweed extracts. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 1 - 12, 2022.

EL-ZAMKAN, M. A. *et al.* Control of virulent listeria monocytogenes originating from dairy products and cattle environment using marine algal extracts, silver nanoparticles thereof, and quaternary disinfectants. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 2721 - 2739, 2021.

EI-SHEEKH, M. M. *et al.* Comparative assessment of antioxidant activity and biochemical composition of four seaweeds, rocky Bay of Abu Qir in Alexandria, Egypt. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 29 - 40, 2021.

ESSA, H. *et al.* Towards optimizing the conventional and ultrasonic - assisted extraction of sulfated polysaccharides from marine algae. **Materials Science and Engineering**, v. 464, p. 1 - 11, 2018.

ESTEBAN, R. *et al.* Carotenoid composition in rhodophyta: insights into xanthophyll regulation in *Corallina elongata*. **European Journal of Phycology**, v. 44, p. 221 - 230, 2009.

FISHER, K.; MARTONE, P. T. Field study of growth and calcification rates of three species of articulated coralline algae in British Columbia, Canada. **Biology Bulletin**, v. 226, p.121 - 130, 2014.

HARVEY, A. S. Coralline algae of central New Zeland: an identification guide to common "crustose" species. **NIWA Information series**, v. 57, p. 145, 2005.

HARVEY, A. S.; WOELKERLING, W. J. Guía para la identificación de rodolitos de algas rojas coralinas no geniculadas (Corallinales, Rhodophyta). **Ciencias Marinas**, v. 33, p. 411 - 426, 2007.

KANTIDA, S. R. *et al.* Influence of bioactive compounds from seaweeds and its biocidal and corrosion inhibitory effect on mild steel. **Research Journal of Environmental Toxicology**, v. 6, p. 101 - 109, 2012.

KASANAHA, N. *et al.* Antibacterial compounds from red seaweeds (Rhodophyta). **Indonesian Journal of Chemistry**, v. 15, p. 201 - 209, 2015.

KHAN, S. B. *et al.* Protective effect of *Amphiroa dilatata* on ROS induced oxidative damage and MMP expressions in HT1080 cells. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, p. 191 - 198, 2010.

KTARI, L. *et al.* 16 -hydroxy-5 -cholestane-3,6-dione, a novel cytotoxic oxysterol from the red alga *Jania rubens*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, p. 2563 - 2565, 2000.

LITTLER, M. M.; LITTLER, D. S. Deepest known plant life discovered on an uncharted seamount. **Science**, v. 227, p. 57 - 59, 1985.

LITTLER, M. M.; LITTLER, D. S. The Nature of crustose coralline algae and their interactions on reefs. In: **Research and Discoveries: The Revolution of Science through Scuba**. Smithsonian Institution Scholarly Press, p. 199 - 212, 2013.

MAHOMOODALLY, M. F. *ET AL.* In Vitro enzyme inhibitory properties, secondary metabolite profiles and multivariate analysis of five seaweeds. **Marine Drugs**, v. 18, p. 1 - 16, 2020.

MANNINO, A. M.; MICHELI, C. Ecological function of phenolic compounds from mediterranean fucoid algae and seagrasses: an overview on the genus *Cystoseira* sensu lato and *Posidonia oceanica* (L.) Delile. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 8, p. 2 -19, 2020.

MANSUR, A. A. The cytotoxic activity of extracts of the brown alga *Cystoseira tamariscifolia* (Hudson) Papenfuss, against cancer cell lines changes seasonally. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, p. 2419 - 2429, 2020.

MASCHEK, J. A.; BAKER, B. J. The Chemistry of algal secondary metabolism. Capítulo I. In: **Algal Chemical Ecology**, p. 1 - 311, 2008.

MEDEIROS, H. E. *et al.* Antifungal activity of seaweed extracts from Guarujá, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 55, p. 257-264, 2007.

MOFEED, J. *et al.* Antimicrobial activities of three seaweeds extract against some human viral and bacterial pathogens. **BIOCELL**, v. 46, p. 247 - 261, 2022.

MCCOY, S. J.; KAMENOS, N. A. Coralline algae (Rhodophyta) in a changing world: integrating ecological, physiological, and geochemical responses to global change. **Journal of Phycology**, v. 51, p. 6 - 24, 2015.

MCCOY, S. J. *et al.* Diurnal and tidal patterns of carbon uptake and calcification in geniculate inter-tidal coralline algae. **Marine Ecology**, v. 37, p. 553 - 564, 2016.

NELSON, W. A. Calcified macroalgae – critical to coastal ecosystems and vulnerable to change: a review. **Marine and Freshwater Research**, v. 60, p. 787 - 801, 2009.

PALERMO, J. A. *et al.* Carotenoids from three red algae of the corallinaceae. **Phytochemistry**, v. 30, p. 2983 - 2986, 1991.

PINTEUS, S. *et al.* Cytoprotective effect of seaweeds with high antioxidant activity from the Peniche coast (Portugal). **Food Chemistry**, v. 218, p. 591 - 599, 2017.

PLOUGUERNÉ, E. *et al.* Antifouling activity as a function of population variation in *Sargassum vulgare* from the littoral of Rio de Janeiro. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, p. 717 - 724, 2010a.

PREMANATHAN, M. *et al.* Antiviral activity of marine and coastal plants from India. **International journal of pharmacognosy**, v. 32, n. 4, p. 330 - 336, 1994.

PREMARATHNA, A. D. *et al.* Preliminary screening of the aqueous extracts of twenty-three different seaweed species in Sri Lanka with in-vitro and in-vivo assays. **Heliyon**, v. 6, p. 1 - 16, 2020.

RAJ, T. S. *et al.* Efficacy of seaweed extract against downy mildew of grapes caused by *Plasmopara viticola*. **Plant Archives**, v. 19, p. 2877 - 2882, 2019.

RIGHINI, H. *et al.* Tomato seed biopriming with water extracts from *Anabaena minutissima*, *Ecklonia maxima* and *Jania adhaerens* as a new agro-ecological option against *Rhizoctonia solani*. **Scientia Horticulturae**, v. 281, p. 1 - 11, 2021.

SALEH, B.; AL-MARIRI, A. Antimicrobial activity of the marine algal extracts against selected pathogens. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 19, p. 1067 - 1077, 2017.

SILVA, A. *et al.* Macroalgae as a source of valuable antimicrobial compounds: extraction and applications. **Antibiotics**, v. 9, p. 1 - 41, 2020.

SOARES, A. R. *et al.* Antiviral activity of extracts from brazilian seaweeds against herpes simplex virus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 714 -723, 2012.

SUDATTI, D. B. *et al.* Effects of abiotic factors on growth and chemical defenses in cultivated clones of *Laurencia dendroidea* J. Agardh (Ceramilales, Rhodophyta). **Marine Biology**, v. 158, p.1439 - 1446, 2011.

STENGEL, D. B.; CONNAN, S.; POPPER, Z. A. Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 483 - 501, 2011.

STIRK, W. A. *et al.* Potential medicinal value of some South African seaweeds. **South African journal of botany**, v. 69, p. 462 - 468, 2003.

STIRK, W. A. *et al.* Seasonal variation in antifungal, antibacterial and acetylcholinesterase activity in seven South African seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, p. 271 - 276, 2007.

STOUT, E. Paige *et al.* Unusual antimalarial meroditerpenes from tropical red macroalgae. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 20, p. 5662 - 5665, 2010.

TÂMÉGA, F. T. S. *et al.* A unique free-living geniculate coralline algal bed formation. **Marine Biodiversity**, v. 47, p. 373 - 374, 2017.

TALLURI, V. P. *et al.* Identification of seaweeds from North Visakhapatnam sea coast exhibiting immunomodulatory activity using Balb/c models. **Regenerative Engineering and Translational Medicine**, v. 3, p. 70 -74, 2017.

TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinhas bentônicas. **Revista Virtual de Química**, v. 5, p. 343 - 362, 2013.

TIWARI, R.; RANA, C. S. Plant secondary metabolites: a review. **International Journal of Engineering Research and General Science**, v. 3, p. 661 - 670, 2015.

THIRUMURUGAN, D. *et al.* **An introductory chapter: secondary metabolites**. In: Vijayakumar R, Raja SSS, editors. *Secondary Metabolites sources and Applications*, London, UK. IntechOpen Limited, p. 1 - 21, 2018.

UNISSA, R. *et al.* Evaluation of the in vitro cytotoxic activity of *Jania rubens* against jurkat and molt-4 human cancer cell lines. **Tropical Journal of Natural Product Research**, v. 1, p. 199 - 202, 2017.

VLACHOS, V. *et al.* Antimicrobial activity of extracts from selected southern African marine macroalgae. **South Journal of Science**, v. 93, p. 328 - 332, 1997.

VENKATESALU, V. *et al.* Seasonal variation on fatty acid composition of some marine macro algae from Gulf of Mannar marine biosphere reserve, Southeast cost of India. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**, v. 41, p. 442 - 450.

VIEIRA, C. *et al.* Allelopathic interactions between the brown algal genus *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae) and scleractinian corals. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1 - 11, 2016.

WAHL, M. Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. **Marine Ecology Progress Series**, v. 58, p. 175 - 189, 1989.

YONESHIGUE-VALENTIM, Y. *et al.* **Macroalgas (Rhodophyta, Chlorophyta e Ochorophyta)**. In: Biodiversidade Marinha dos Costões Rochosos de Arraial do Cabo: Histórico, Ecologia e Conservação. Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira, p. 407, 2020.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Avaliar a diversidade química intra/interespecífica e o potencial biotecnológico de quatro espécies de algas calcárias geniculadas (*Amphiroa beauvoisii*, *Jania crassa*, *Cheilosporum sagittatum*, *Arthrocardia flabellata*) coletadas em diferentes áreas de Arraial do Cabo/RJ.

### **Objetivos específicos**

- Analisar e comparar o perfil químico intra/interespecífico dos extratos das algas calcárias geniculadas;
- Avaliar a atividade anti-incrustante dos extratos das algas calcárias frente a espécies de bactérias marinhas e ao mexilhão *Perna perna*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e a citotoxicidade dos extratos das algas calcárias.
- Fracionar os extratos que apresentaram maior potencial e avaliar a atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e a citotoxicidade.
- Identificar as substâncias majoritárias dos extratos e das frações que apresentaram resultados promissores frente aos modelos testados.

## HIPÓTESES

- Os perfis químicos das algas calcárias geniculadas apresentam variabilidade intra/interespecífica;
- Os extratos das algas calcárias geniculadas apresentam atividade anti-incrustante frente às espécies de bactérias marinhas testadas e ao mexilhão *Perna perna*;
- Os extratos e frações das algas calcárias geniculadas apresentam atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e baixa citotoxicidade.

## CAPÍTULO 1: DIVERSIDADE QUÍMICA E ATIVIDADE ANTI-INCRUSTANTE DOS PRODUTOS NATURAIS DE ALGAS CALCÁRIAS GENICULADAS

### RESUMO

As algas calcárias geniculadas (Corallinales, Rhodophyta) estão distribuídas mundialmente e são produtoras de uma variedade de metabólitos secundários, responsáveis por diversos papéis biológicos, incluindo atividade anti-incrustante. A bioincrustação marinha é o processo de colonização e crescimento de muitos organismos em estruturas submersas. Este processo causa sérios problemas a indústria marítima e uma alternativa promissora para minimizar esta problemática é o desenvolvimento de tintas à base de produtos naturais de algas marinhas. O objetivo deste estudo foi analisar a diversidade química intra/intrerespecífica de quatro espécies de algas calcárias geniculadas (*Amphiroa beauvoisii*, *Jania crassa*, *Cheilosporum sagittatum* e *Arthrocardia flabellata*), coletadas em diferentes áreas de Arraial do Cabo/RJ, através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-EM), análise de componentes principais (ACP) e análise metabolômica utilizando a plataforma do GNPS. Além disso, o potencial anti-incrustante dos extratos (na concentração natural) frente a cinco cepas de bactérias marinhas incrustantes (*Pseudoalteromonas elyakovii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Polaribacter irgensii*, *Shewanella putrefaciens* e *Vibrio aestuarianus*) e o mexilhão *Perna perna* foi analisado. Os resultados obtidos mostraram variabilidade química inter/intraespecífica entre as amostras de algas calcárias geniculadas, mesmo sendo coletadas em áreas próximas e com condições oceanográficas semelhantes. As substâncias mais abundantes encontradas em todas as amostras foram o ácido palmítico e o esteróide (3 $\beta$ ) colest-5-en-3-ol. Quanto à atividade anti-incrustante, todos os extratos apresentaram atividade contra as bactérias marinhas, sendo o extrato de *C. sagittatum* (CsSI), seguido do extrato de *Amphiroa beauvoisii* (AbSCC) os mais promissores. Frente ao mexilhão *P. perna*, o extrato de *C. sagittatum* (CsSI) foi o mais ativo, inibindo 100% da produção de bisco. Quanto à toxicidade, a maioria dos extratos não apresentou toxicidade, exceto o extrato de *J. crassa* da Prainha (JcP) que exibiu 20% de mortalidade. Este estudo foi o primeiro a analisar a composição química e o potencial anti-incrustante das espécies *A. beauvoisii*, *J. crassa*, *C. sagittatum* e *A. flabellata*, indicando as mais promissoras, as quais poderão ser alvo de estudos futuros na obtenção de substâncias bioativas com aplicações na indústria naval contra a bioincrustação marinha.

**Palavras-chave:** algas coralinas, extrato bruto; composição química, metabolômica, análise multivariada, bioincrustação.

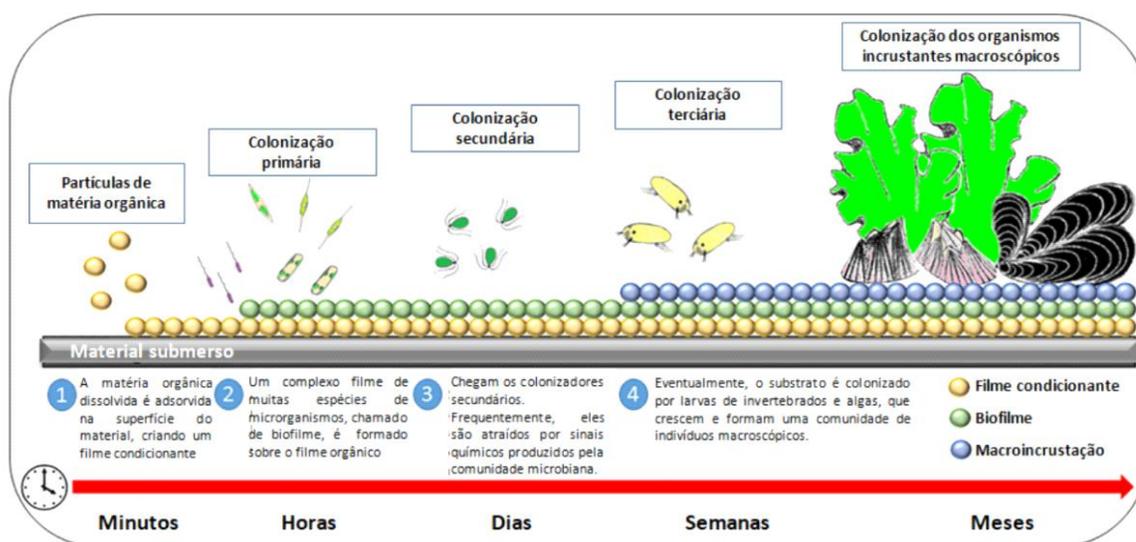
## ABSTRACT

The geniculate calcareous algae (Corallinales, Rhodophyta) are found all over the world and produce a variety of secondary metabolites that serve a variety of biological functions, including antifouling activity. Marine biofouling is the process by which many organisms colonize and grow in submerged structures. This process causes serious issues for the maritime industry, and one promising solution is the development of paints based on natural marine algae products. The goal of this study was to analyze the intra/intraspecific chemical diversity of four geniculate calcareous algae species (*Amphiroa beauvoisii*, *Jania crassa*, *Arthrocardia flabellata*, and *Cheilosporum sagittatum*) collected in different areas of Arraial do Cabo/RJ using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), principal component analysis (PCA), and metabolomics using the GNPS platform. Furthermore, the antifouling potential of extracts (at natural concentrations) was investigated against five strains of marine fouling bacteria (*Pseudoalteromonas elyakovii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Polaribacter irgensii*, *Shewanella putrefaciens* and *Vibrio aestuarianus*) and the mussel *Perna perna*. The results revealed inter/intraspecific chemical variability among samples of geniculate calcareous algae collected in nearby areas and under similar oceanographic conditions. Palmitic acid and the steroid (3 $\beta$ ) cholest-5-en-3-ol were the most abundant substances found in all samples. In terms of antifouling activity, all extracts demonstrated activity against marine bacteria, with *C. sagittatum* (CsSI) and *A. beauvoisii* (AbSCC) extracts being the most promising. In addition to the mussel *P. perna*, the extract of *C. sagittatum* (CsSI) was the most active, with a 100% inhibition of biofilms. This was the first study to examine the chemical composition and anti-incrustant potential of the species *A. beauvoisii*, *J. crassa*, *C. sagittatum*, and *A. flabellata*, identifying the most promising, which could be the subject of future studies on the extraction of bioactive substances with applications in the maritime industry against marine biofouling.

**Keywords:** coralline algae, crude extract, chemical composition, metabolomics, multivariate analysis, biofouling.

## 1. INTRODUÇÃO

A bioincrustação marinha é o processo de colonização e crescimento de organismos sésseis em superfícies submersas, tais como cascos de navios, plataformas, tubulações e bóias. Após a adsorção de partículas orgânicas (**Figura 7**), ocorre a formação do biofilme bacteriano primário, que facilita a proliferação de outros micro-organismos. Posteriormente, ocorre a colonização e crescimento de macro-organismos tais como mexilhões, macroalgas, cirripédios e briozoários (Whal, 1989; Martín-Rodríguez *et al.* 2015). Esse processo causa sérios impactos a indústria naval em todo o mundo, afetando a eficiência do transporte devido a rugosidade na superfície, corrosão (Ferreira *et al.* 2020; Ali *et al.* 2020), custos mais elevados de manutenção (Cao *et al.* 2010), aumento do consumo de combustível e introdução de espécies exóticas/invasoras (Davidson *et al.* 2016; Vimala, 2016; Ali *et al.* 2020).



**Figura 7:** Representação do processo de bioincrustação. (Adaptado Martín-Rodríguez *et al.* 2015).

O uso de biocidas contendo arsênio, mercúrio, chumbo e tributilestanho (TBT) foi a principal estratégia adotada para minimizar os impactos da bioincrustação na indústria naval ao longo dos anos, matando ou inibindo a colonização de organismos

incrustantes. No entanto, estes biocidas apresentaram alto nível de contaminação ambiental e riscos aos organismos marinhos (Silva *et al.* 2018; Ali *et al.* 2020; Han *et al.* 2021). Após o banimento do TBT em 2008, devido a sua alta toxicidade, outros biocidas com formulações menos tóxicas foram usados no controle da bioincrustação, tais como Diuron, Irgarol 1051, Sea-Nine 211, Clorotalonil, Diclofluanida, Tiram, Zinco Piritiona, Cobre Piritiona, Ziram. No entanto, estudos com estas substâncias sozinhas ou misturadas relataram efeitos negativos a diversos organismos marinhos (Castro *et al.* 2011; Wang *et al.* 2011; Batista-Andrade *et al.* 2018).

A crescente preocupação com os impactos aos ecossistemas marinhos, aumentou a busca por alternativas menos impactantes e eficazes. Uma destas alternativas para prevenir/minimizar a bioincrustação é a prospecção de substâncias bioativas (com baixa ou nenhuma toxicidade) provenientes de macroalgas marinhas, visto que, muitas espécies produzem uma diversidade de substâncias bioativas capazes de prevenir o crescimento de organismos epibiontes no ambiente natural. As macroalgas são uma fonte rica de produtos naturais marinhos, e, portanto, alvos de estudos biotecnológicos (Da Gama *et al.* 2014; Othmani *et al.* 2015; Qian *et al.* 2015; Carvalho *et al.* 2016; Sánchez-Lozano *et al.* 2019).

As macroalgas marinhas, dentre elas as pertencentes ao filo Rhodophyta, são produtoras de uma diversidade de substâncias bioativas, conhecidas como metabólitos secundários ou produtos naturais, com propriedades anti-incrustante (Da Gama *et al.* 2014; Saha *et al.* 2018; Carroll *et al.* 2019). Dentro deste grupo, estão incluídas as algas calcárias geniculadas (Corallinales, Rhodophyta), com ampla distribuição global (Littler & Littler, 1985; Harvey *et al.* 2005) e diferenciadas das demais algas vermelhas, pela presença de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) nas paredes celulares, sob a forma de calcita (Dias, 2000). Elas são produtoras de uma variedade de substâncias químicas, tais como ácidos graxos (Caf *et al.* 2019; Cikos *et al.* 2021), esteróis (Caf *et al.* 2019; El-Ansary & Hamouda 2014), taninos, flavonóides, alcalóides (Akbar *et al.* 2020; Premarathna *et al.* 2020), saponinas (Elangovan & Anantharaman, 2019; Premarathna *et al.* 2020), terpenos (Elangovan & Anantharaman, 2019; Akbar *et al.* 2020; Premarathna *et al.* 2020), hidrocarbonetos (Ahmed *et al.* 2011; Cikos *et al.* 2021) e

carotenóides (Esteban *et al.* 2008; Cikos *et al.* 2021), responsáveis por diferentes atividades biológicas (Dixit & Reddy, 2017; Essa *et al.* 2018; Righini *et al.* 2021; Raj *et al.* 2019; Cikoš *et al.* 2021; Mofeed *et al.* 2021), incluindo atividade anti-incrustante.

Estudos realizados com algas calcárias geniculadas apresentaram resultados promissores frente a diferentes modelos de organismos incrustantes, tais como mexilhões (Medeiros *et al.* 2007), bactérias (Kantida *et al.* 2012) e diatomáceas (Deepa *et al.* 2014). É importante ressaltar que, a produção dessas substâncias bioativas pode variar, devido a influência de diversos fatores (bióticos e abióticos), Plouguerné *et al.* 2010a; Sudatti *et al.* 2011; Stengel *et al.* 2013; Machado *et al.* 2014; El Maghraby & Fakhry, 2015; Sudatti *et al.* 2016; Mannino & Micheli, 2020; Mansur *et al.* 2020).

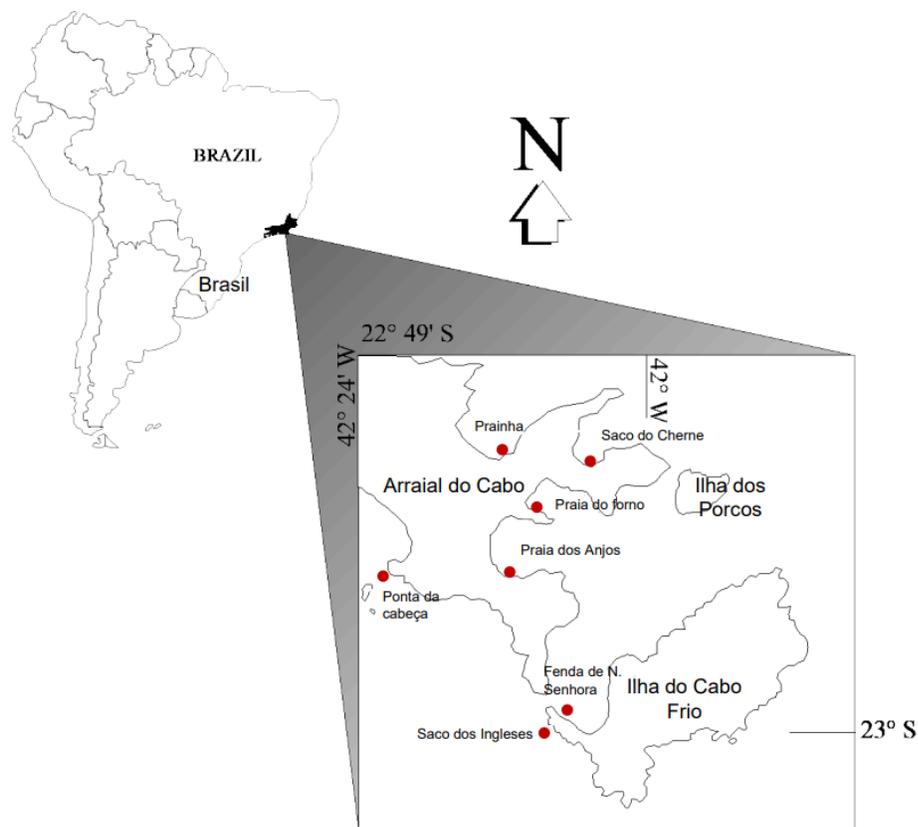
Apesar de ser um grupo abundante e com ampla distribuição, poucos estudos são direcionados ao conhecimento da sua composição química e aplicação biotecnológica das algas calcárias geniculadas. Nesse sentido, dada a importância das substâncias bioativas produzidas por este grupo e a escassez de estudos realizados na costa brasileira, o presente estudo teve como objetivo analisar a diversidade química intra/interespecífica e o potencial anti-incrustante dos extratos brutos de quatro espécies de algas calcárias geniculadas (*Amphiroa beauvoisii*, *Jania crassa*, *Cheilosporum sagittatum* e *Arthrocardia flabellata*) coletadas em diferentes áreas de Arraial do Cabo/RJ.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta do material biológico**

As macroalgas foram coletadas manualmente, com auxílio de uma espátula, nas regiões entremarés e infralitoral (mergulho autônomo), no verão de 2018 (janeiro a março). As amostras foram coletadas em áreas distintas de Arraial do Cabo/RJ (**Figura 8**), sendo elas: Fenda de Nossa Senhora, Prainha, Praia do Forno, Saco do Cherne (costão e banco de algas), Praia dos Anjos, Saco dos ingleses e Ponta da

Cabeça. Saco dos ingleses e Ponta da Cabeça são áreas de ressurgência, fenômeno oceanográfico caracterizado pelo afloramento de águas profundas, frias e ricas em nutrientes que se deslocam para a superfície. Este fenômeno é sazonal, ocorrendo com mais intensidade no período da primavera e verão, principalmente devido ao aumento da intensidade do vento nordeste (Calado *et al.* 2020). As demais amostras foram coletadas em áreas que não recebem influência direta deste fenômeno. As amostras foram colocadas em sacos herméticos e transportadas para o laboratório do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM), em caixa térmica. Posteriormente, foram lavadas em água do mar para eliminação de areia e organismos associados, congeladas e liofilizadas. Vale ressaltar que, para cada área foi selecionado um único local de raspagem do material biológico.



**Figura 8:** Localização geográfica das áreas de coleta das algas calcárias geniculadas em diferentes áreas (em vermelho) de Arraial do Cabo/RJ: Fenda de Nossa Senhora, Prainha, Praia do Forno, Saco do Cherne (costão e banco de algas), Praia dos Anjos, Saco dos Ingleses e Ponta da Cabeça

Nove amostras foram coletadas, sendo cinco da espécie *Amphiroa beauvoisii*, duas da espécie *Jania crassa*, uma da espécie *Cheilosporum sagittatum* e uma da espécie *Arthrocardia flabellata* (**Figura 9**). A identificação foi realizada pelo pesquisador Dr. Frederico Tapajós de Souza Tâmega de acordo com as características morfológicas e todo o material botânico foi depositado na coleção científica do IEAPM (**Tabela 2**).



**Figura 9:** Espécies de algas calcárias coletadas em diferentes áreas de Arraial do Cabo/RJ. A: *Jania crassa*; B: *Amphiroa beauvoisii*; C: *Cheilosporum Sagittatum*; D: *Arthrocardia flabellata*. Fonte: Algaebase.

**Tabela 2:** Espécies de macroalgas calcárias geniculadas amostradas e os seus locais de coleta.

Espécies	Código	Local de coleta	Peso úmido (g)	Coordenadas	Nº do tomo na coleção científica
<i>Amphiroa beauvoisii</i> J.V.Lamouroux 1816	AbFNS	Fenda de Nossa Senhora	400,00	22°57'39.4"S, 42°01'12.0"W	3372
<i>Amphiroa beauvoisii</i> J.V.Lamouroux 1816	AbP	Prainha	474,40	22°58'06.1"S, 42°00'54.2"W	3373
<i>Amphiroa beauvoisii</i> J.V.Lamouroux 1816	AbPF	Praia do Forno	184,95	22°59'58.9"S, 42°00'40.2"W	3374
<i>Amphiroa beauvoisii</i> J.V.Lamouroux 1816	AbSCB	Saco do Cherne (banco)	192,24	22°57'37.1"S, 42°00'25.5"W	3375
<i>Amphiroa beauvoisii</i> J.V.Lamouroux 1816	AbSCC	Saco do Cherne (costão)	265,53	22°57'37.1"S, 42°00'25.5"W	3376
<i>Cheilosporum sagittatum</i> (J.V.Lamouroux) Areschoug 1852	CsSI	Saco dos Ingleses	207,48	23°00'01.1"S, 42°00'46.8"W	3377
<i>Jania crassa</i> J.V.Lamouroux 1821	JcPA	Praia dos Anjos	213,37	22°58'43.9"S, 42°01'06.5"W	3378
<i>Jania crassa</i> J.V.Lamouroux 1821	JcP	Prainha	309,11	22°57'39.4"S, 42°01'12.0"W	3379
<i>Arthrocardia flabellata</i> (Kützinger) Manza 1940	AfPC	Ponta da cabeça	117,45	22°58'36.1"S, 42°02'06.9"W	3380

## 2.2 Preparação dos extratos

As algas liofilizadas foram extraídas numa mistura de metanol: acetato de etila (MeOH: AcOEt 1:1 v/v) em três intervalos (2h, overnight, 2h), na proporção de 3,5 mL de solução para 1g de peso seco da amostra, e sonificadas por 30 minutos a cada intervalo. Posteriormente os extratos foram filtrados e secos com o auxílio de um evaporador rotatório sob pressão reduzida. A **Figura 10** representa as etapas empregadas no processo de extração realizado para todas as amostras coletadas. Após o processo de extração, o rendimento (%) foi obtido através da razão da massa de extrato bruto pela massa de alga liofilizada.

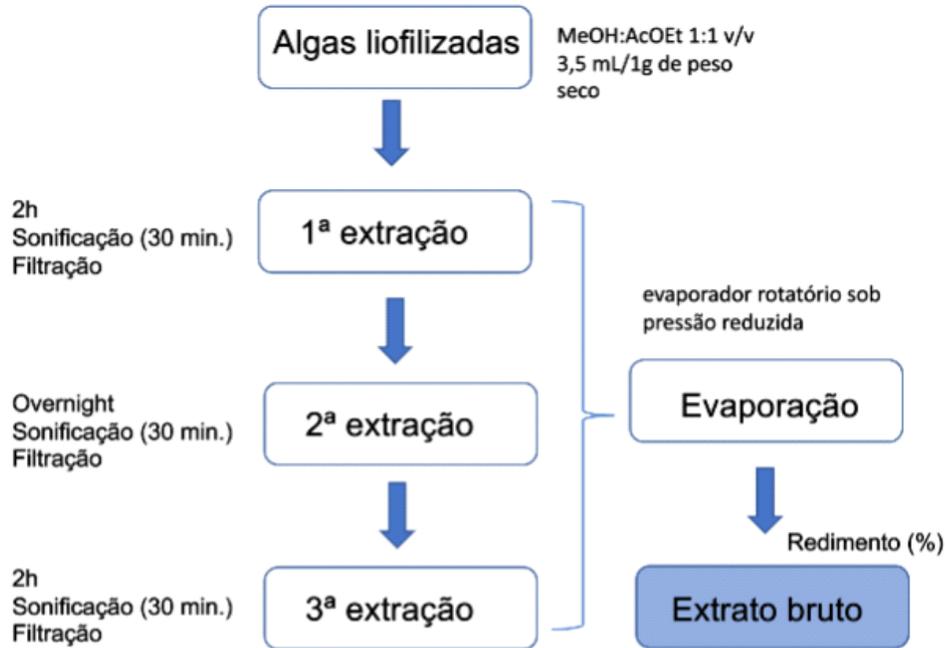
$$\% R = \frac{m(Eb)}{m(AI)} \times 100$$

Em que,

% R = percentual de rendimento

m(Eb) = massa de extrato bruto

m(AI) = massa de alga liofilizada



**Figura 10:** Etapas empregadas no processo de extração das algas calcária geniculadas.

### 2.3 Perfis químicos dos extratos

Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-EM) para avaliar a diversidade química das macroalgas calcárias. Antes das análises, os extratos foram diluídos em diclorometano (HPLC, Tedia) e filtrados em filtros de PTFE de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore, EUA) para remover qualquer constituinte insolúvel. Posteriormente, o solvente foi evaporado, as amostras foram liofilizadas e o material restante foi ressuscendido em acetato de etila (grau HPLC, Tedia) na concentração de 1mg/mL. A análise no GC-EM foi realizada em equipamento

Shimadzu CG-2010 acoplado ao espectrômetro de massas QP-2010 ultra, composto por auto injetor AOC-20i e uma coluna capilar de sílica fundida Rtx-1MS 30 m x  $\Phi$ int 0,25 mm da Restek Corporation (EUA). O método utilizado teve fluxo de injeção de 1,20 mL/min no modo split, com razão de 1/5. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste; a temperatura do injetor foi de 280 °C e a coluna foi aquecida a 150 °C por 3 minutos, seguido de rampa até 300 °C (taxa de 6 °C/min) e ao final permanecendo a 300 °C por 5 minutos, totalizando 33 minutos de análise. O detector de massas foi utilizado no modo de impacto de elétrons (70 eV), com interface a 300 °C e a fonte de íons a 200 °C. Devido à complexidade das amostras, as substâncias foram identificadas através da comparação dos seus espectros de massa com os dados disponíveis na biblioteca NIST 11, levando em consideração a similaridade  $\geq 85\%$  e área relativa  $\geq 1\%$ . As substâncias mais abundantes (área relativa  $\geq 2\%$ ) de cada extrato bruto foram representadas nos seus respectivos cromatogramas.

Os cromatogramas obtidos através do CG-EM foram convertidos em formato cdf (Computable Document Format) e inseridos na plataforma do GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) criando uma rede molecular, através da similaridade dos espectros de cada substância. Além disso, uma tabela de metadados foi criada para auxiliar na identificação das substâncias presentes em cada extrato bruto e fazer a comparação entre eles. Os resultados foram processados no programa Cytoscape, permitindo identificar similaridades de classes químicas entre as substâncias das algas calcárias estudadas. Devido à complexidade das amostras, alguns parâmetros foram levados em considerações na identificação, como valor de cosseno  $\geq 0,7$ . Os dados obtidos nesta plataforma foram comparados a biblioteca NIST 11, através dos espectros de massa e do tempo de retenção para obtenção de um resultado mais robusto.

## 2.4 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana de todos os extratos foi realizada em placas de Petri (n = 5) através da difusão em disco em meio de cultura marinho sólido (marine broth + ágar) contra cepas de bactérias envolvidas no processo de incrustação marinha (Carvalho *et al.* 2016). O ensaio de difusão em disco, na densidade óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub> de 1.5 - 1.8) foi realizado com quatro cepas de bactérias marinhas Gram-negativas (*Vibrio aestuarianus*, *Pseudoalteromonas elyakovii*, *Polaribacter irgensii*, and *Pseudomonas fluorescens*) e uma cepa de bactéria marinha Gram-positiva (*Shewanella putrefaciens*), que foram doadas pelo laboratório de Biofilme do IEAPM. Os extratos foram solubilizados em acetato de etila e metanol (1:1 v/v) e aplicados em discos estéreis (5 mm de diâmetro) feitos de papel filtro (Whatman nº. 1) na concentração natural (**Tabela 3**). Discos com o antibiótico estreptomicina (Sigma-Aldrich) foram usados como controle positivo na concentração de 10 mg/g. Após a secagem de todos os filtros (controle e tratamentos), o experimento foi realizado. Após 24 h de incubação a 30 °C, as placas foram fotografadas e o diâmetro (mm) do halo de inibição ao redor dos discos foi medido com o auxílio do programa image-J.

**Tabela 3:** Concentração natural dos extratos de algas calcárias geniculadas aplicada no ensaio de atividade anti-incrustante com as bactérias marinhas.

Amostras	Concentração natural (mg/g)
AbFNS	38
AbP	31
AbPF	39
AbSCB	21
AbSCC	28
JcP	37
JcPA	24
CsSI	26
AfPC	21

AbFNS (*A. beauvoisii* - Fenda de Nossa Senhora); AbP (*A. beauvoisii* - Prainha); AbPF (*A. beauvoisii* - Praia do Forno); AbSCB (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne banco); AbSCC (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne costão); JcPA (*J. crassa* - Praia dos Anjos); JcP (*J. crassa* - Prainha); CsSI (*C. sagittatum* - Saco dos Ingleses) e AfPC (*A. flabellata* - Ponta da Cabeça).

## 2.5 Atividade anti-incrustante contra o mexilhão *Perna perna*

O ensaio da atividade anti-incrustante contra o mexilhão *P. perna* foi adaptado segundo o método descrito por da Gama *et al.* (2003). Juvenis foram coletados na área costeira da Ponta da Cabeça (Praia Grande), Arraial do Cabo - RJ em agosto de 2019. Os indivíduos foram separados cuidadosamente e limpos. A seleção dos indivíduos levou em consideração o comprimento da concha entre 1,6 - 2,0 cm, além da exposição ativa dos pés e rastejamento dos mesmos. Os extratos foram solubilizados em acetato de etila e metanol (1:1 v/v) na concentração natural (**Tabela 4**) e incorporados à discos de papel filtro (5 cm). Após a secagem dos filtros, os mesmos foram colocados no fundo de placas de petri de vidro (60 x 15 mm). Discos embebidos somente em água do mar foram usados como controle. Cada placa foi preenchida com 12 ml de água do mar e três indivíduos. Foi utilizado um total de 10 réplicas para cada tratamento e controle. Após 24 horas de experimento, avaliou-se o número de bisco fixados pelos mexilhões em cada condição experimental. Ao término dos ensaios, os mexilhões foram acondicionados em recipientes plásticos com água do mar filtrada, na temperatura de 22 °C, salinidade (35) e aeração constante por 24h. Após este período foi levado em consideração à resposta ao toque, perda tecidual e valva aberta para mensurar o efeito tóxico dos extratos.

**Tabela 4:** Concentração natural dos extratos das algas calcárias geniculadas aplicada no ensaio de atividade anti-incrustante com o mexilhão *P. perna*.

Amostras	Concentração natural (mg/g)
AbFNS	38
AbP	31
AbPF	39
AbSCB	21
AbSCC	28
JcP	37
JcPA	24
CsSI	26
AfPC	21

AbFNS (*A. beauvoisii* - Fenda de Nossa Senhora); AbP (*A. beauvoisii* - Prainha); AbPF (*A. beauvoisii* - Praia do Forno); AbSCB (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne banco); AbSCC (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne costão); JcPA (*J. crassa* - Praia dos Anjos); JcP (*J. crassa* - Prainha); CsSI (*C. sagittatum* - Saco dos Ingleses) e AfPC (*A. flabellata* - Ponta da Cabeça).

## 2.6 Análises estatísticas

A variabilidade química dos perfis obtidos por CG-EM foi avaliada por meio da Análise de Componentes Principais (ACP). O software COWtool (Correlation Warping Algorithm) foi usado para realizar a correção da linha de base, do alinhamento de cada cromatograma e também para corrigir o tempo de retenção dos picos, conforme descrito por Nielsen *et al.* (1998). O cromatograma de *J. crassa* (JcP) foi usado como referência, por apresentar o maior número de picos. A matriz com todos os cromatogramas alinhados e normalizados foi submetida à ACP usando a linguagem e ambiente Rstudio (<http://www.R-project.org>) com o pacote instalado “ChemometricsWithR” (Wehrens 2011).

O resultado da atividade anti-incrustante contra as bactérias marinhas foi expresso em milímetros (mm), enquanto que para o mexilhão *P. perna* foram expressos em porcentagem. As premissas de normalidade e a homogeneidade foram verificadas através dos testes de Shapiro-Wilk e Cochran C, respectivamente, com nível de confiança de 95%. Valores de  $p < 0,05$ , obtidos através da ANOVA unifatorial, foram considerados significativos. O teste *a posteriori* de Tukey foi empregado para comparar as diferenças entre controle e tratamentos.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Rendimento dos extratos brutos

Os rendimentos dos extratos brutos variaram entre 2,10% e 3,94% (**Tabela 5**). *A. beauvoisii* coletada na Praia do Forno (AbPF) apresentou maior rendimento (3,94%) em relação a todas as amostras coletadas. O menor rendimento (2,10%) foi obtido para *A. beauvoisii* coletado no Saco do Cherne (AbSCB) e *A. flabellata* coletado na Ponta da Cabeça (AfPC).

**Tabela 5:** Rendimentos dos extratos obtidos através da relação entre o peso seco da alga (g) e o peso do extrato bruto (g).

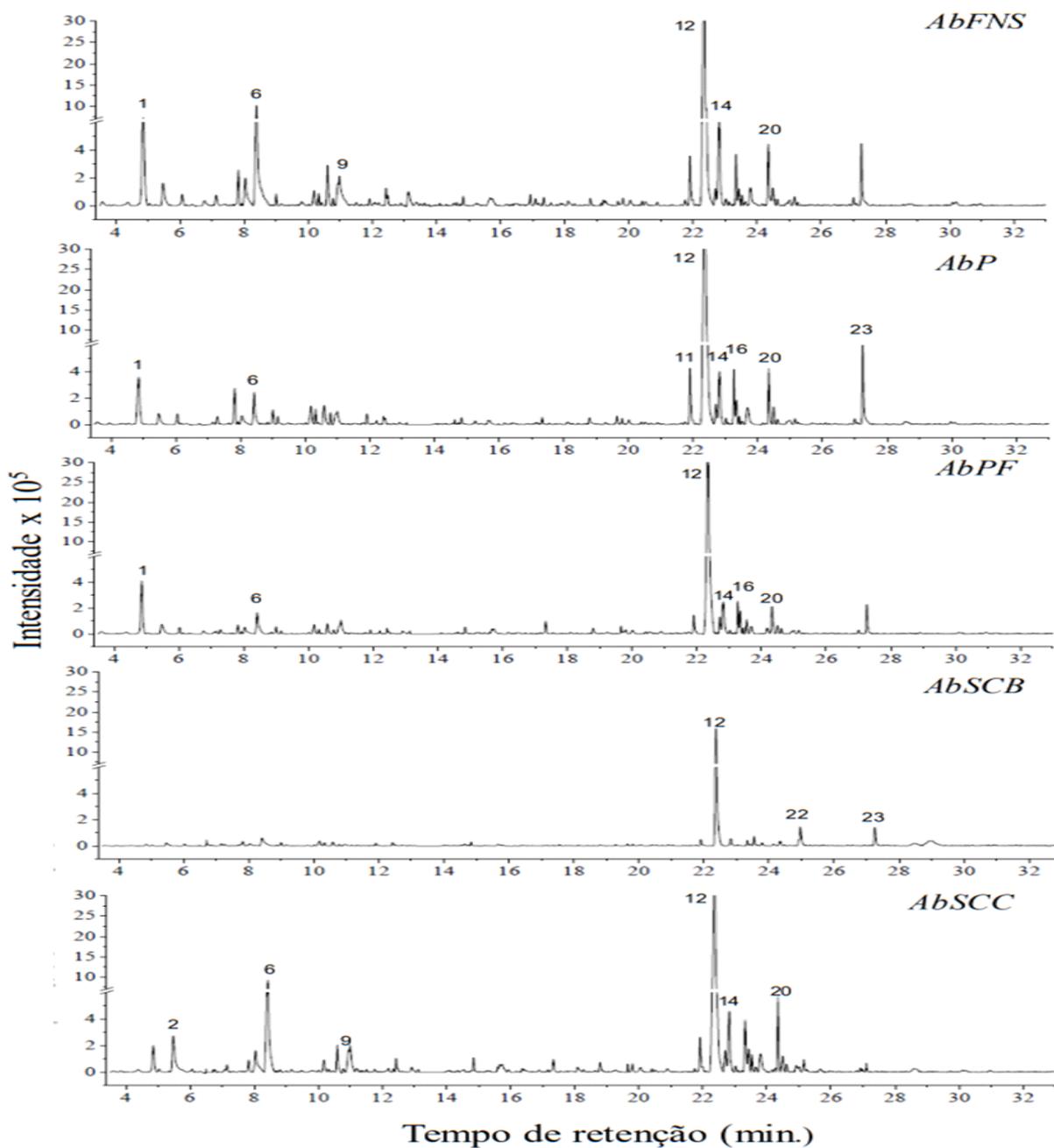
Amostras	Peso seco algal (g)	Peso do extrato bruto (g)	Rendimento (%)
AbFNS	122,57	4,60	3,74
AbP	155,48	4,80	3,09
AbPF	68,51	2,70	3,94
AbSCB	100,43	2,11	2,10
AbSCC	90,39	2,56	2,83
JcP	111,98	4,10	3,67
JcPA	97,5	2,34	2,40
CsSI	90,11	2,38	2,64
AfPC	80,02	1,68	2,10

AbFNS (*A. beauvoisii* - Fenda de Nossa Senhora); AbP (*A. beauvoisii* - Prainha); AbPF (*A. beauvoisii* - Praia do Forno); AbSCB (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne banco); AbSCC (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne costão); JcP (*J. crassa* - Praia dos Anjos); JcPA (*J. crassa* - Prainha); CsSI (*C. sagittatum* - Saco dos Ingleses) e AfPC (*A. flabellata* - Ponta da Cabeça).

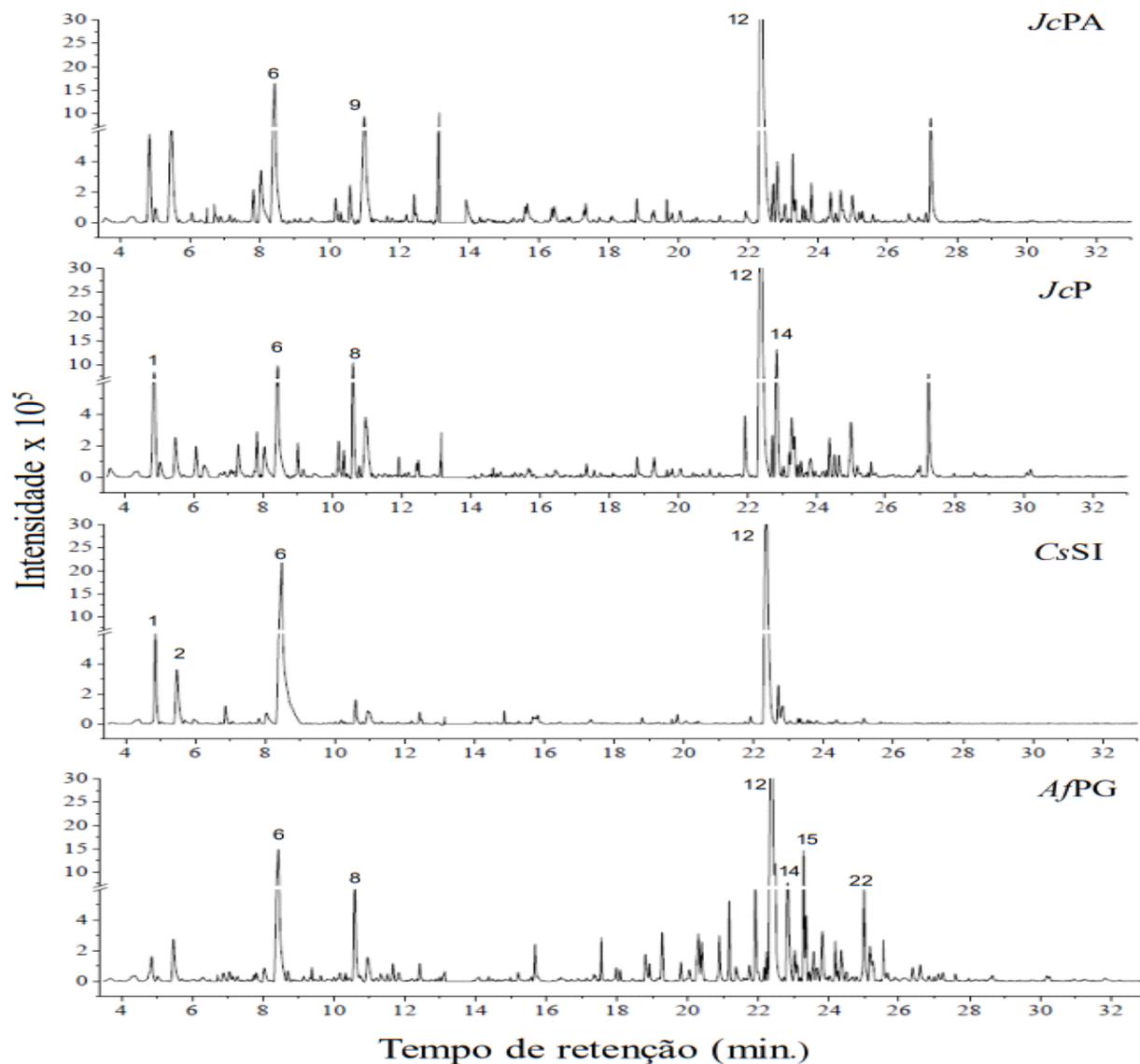
### 3.2 Perfil químico dos extratos

Com a finalidade de verificar a diversidade química e sugerir as substâncias possivelmente responsáveis pelas atividades encontradas, o perfil químico de todos os extratos foi analisado por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), gerando os cromatogramas apresentados nas **Figuras 11 e 12**. A partir destes resultados foi possível verificar as classes químicas produzidas por este grupo de macroalgas e a variabilidade química intra-interespecífica, tanto a nível qualitativo quanto quantitativo. Os extratos mais complexos foram *J. crassa* (JcP) e *A. flabellata* (AfPG), enquanto que os menos complexos foram *A. beauvoisii* (AbSCB) e *C. sagittatum* (CsSI).

As substâncias com área relativa  $\geq 2\%$  (de cada extrato) foram evidenciadas nos seus respectivos cromatogramas (**Figuras 11 e 12**). No extrato de *C. sagittatum* (CsSI), o ácido palmítico (**6**) foi a substância mais abundante, apresentando 31,35 % de área. Já o esteróide ( $3\beta$ ) colest-5-en-3-ol (**12**) foi a substância mais abundante identificada nas amostras de *A. flabellata* (AfPC – 19,49%), nas duas amostras de *J. crassa* (JcP – 16,62%) e (JcPA - 4,36%), e em todas as amostras de *A. beauvoisii* - AbFNS (21,70%), AbP (37,11%), AbPF (39,07%), AbSCB (35,84%) e AbSCC (28,20%).



**Figura 11:** Cromatogramas dos extratos da espécie *A. beauvoisii* obtidos por CG-EM. AbFNS (*A. beauvoisii* - Fenda de Nossa Senhora); AbP (*A. beauvoisii* - Prainha); AbPF (*A. beauvoisii* - Praia do Forno); AbSCB (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne banco); AbSCC (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne costão). Os números indicam as substâncias mais abundantes (área relativa  $\geq 2\%$ ).



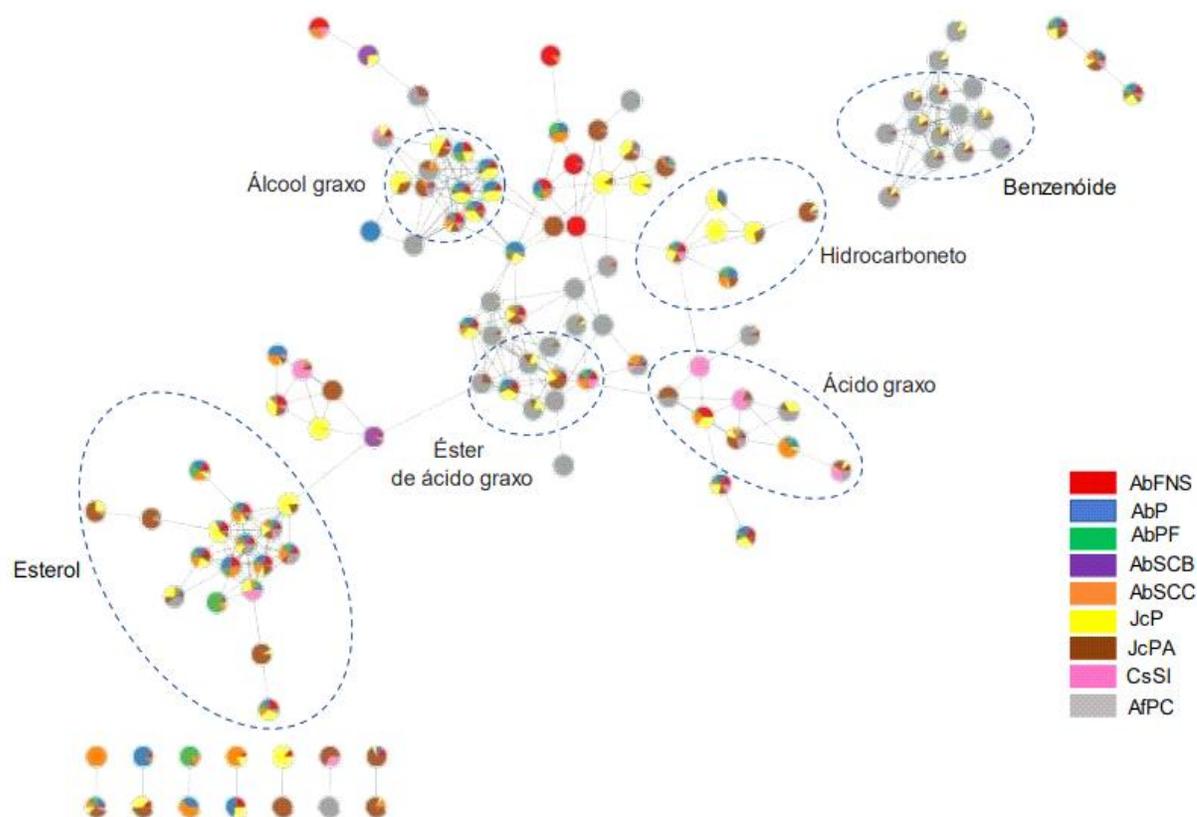
**Figura 12:** Cromatogramas dos extratos das macroalgas calcárias *J. crassa*, *C. sagittatum* e *A. flabellata*. JcPA (*J. crassa* - Praia dos Anjos); JcP (*J. crassa* - Prainha); CsSI (*C. sagittatum* - Saco dos Ingleses) e AfPG (*A. flabellata* - Ponta da Cabeça). Os números indicam as substâncias mais abundantes (área relativa  $\geq 2\%$ ).

A **Tabela 6** apresenta o total de vinte e três substâncias observadas com área  $\geq 1\%$  nos extratos, sendo que 17 destas substâncias foram identificadas pelos bancos de dados (GNPS e/ou NIST), levando em consideração os parâmetros de cada um deles.

**Tabela 6:** Substâncias dos extratos das algas calcárias geniculadas, detectadas pelo CG-EM com área ≥1% e identificadas pela biblioteca NIST (≥ 85%) e plataforma GNPS (cosseno ≥ 0,7). X: substâncias identificadas por ambos os bancos (NIST e GNPS); Y: substâncias identificadas somente no banco NIST; X': substâncias não identificadas (NI).

Pico	tR (min)	Componentes fitoquímicos	Fórmula molecular	NIST	GNPS	Área relativa (%)									
						JcP	JcPA	AbFNS	AbP	AbPF	ASCB	ASCC	CsSI	AfPC	
1	4,86	Heptadecano	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	X	X	2,36	1,05	4,45	3,58	5,38	0,3	1,41	4,61	0,76	
2	5,47	Ácido tetradecanóico	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	X	X	0,79	1,6	1,13	0,82	0,99	0,55	2,17	3,21	1,41	
3	6,91	Ácido pentadecanóico	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Y	-	0,33	0,07	0,6	-	0,43	-	-	1,2	0,39	
4	7,82	Éster metílico do ácido hexadecanóico	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	X	X	0,58	0,23	0,9	1,5	0,52	0,69	0,39	0,17	0,15	
5	8,04	Ácido palmitoléico	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	X	X	0,87	1,09	1,84	0,47	0,48	0,43	1,87	0,89	0,63	
6	8,43	Ácido palmítico	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	X	X	3,25	4,36	7,93	2,2	2,13	1,9	8,05	31,35	9,03	
7	10,20	(Z,Z)-9,12-Octadecadien-1-ol	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	X	X	0,5	0,21	0,44	0,94	0,77	1,08	0,52	0,13	0,33	
8	10,59	Fitol	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	Y	-	2	0,53	1,22	1,02	0,8	0,69	1,02	0,91	2	
9	11,00	Ácido oleico	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	X	X	1,59	5,14	2,28	1,78	1,94	-	2,54	1,02	1,41	
10	21,18	(Z)-7-Hexadecenal	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O	X	X	0,04	0,04	-	-	-	-	-	-	1,33	
11	21,91	(3β) colest-5,22-dien-3-ol	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O	X	X	0,69	0,09	1,26	2,22	1,24	0,88	1,13	0,23	1,66	
12	22,36	(3β) colest-5-en-3-ol	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O	X	X	16,62	12,63	21,7	37,1 1	39,07	35,84	28,2	27,53	19, 49	
13	22,70	Desmosterol	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O	X	X	0,37	0,41	0,81	0,75	1	-	0,51	1,56	0,05	
14	22,82	(3β, 5α)-ergosta-7-en-3-ol	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O	X	X	3,15	0,52	4,24	3,08	2,97	1,76	3,51	1,22	3,08	
15	23,27	Anidrido oleico	C <sub>36</sub> H <sub>66</sub> O <sub>3</sub>	X	X	0,92	0,45	0,16	0,03	0,13	-	0,12	0,32	3,86	
16	23,34	Estigmasterol	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	X	X	0,56	0,18	1,57	2,25	2,13	0,83	1,78	0,26	1,37	
17	23,44	NI	-	X'	X'	0,31	0,02	0,73	1,29	1,68	0,3	1,08	0,09	0,58	
18	23,66	NI	-	X'	X'	0,12	-	0,22	-	1,14	0,06	-	0,16	1,27	
19	23,81	NI	-	X'	X'	0,54	0,32	0,9	1,02	0,76	0,66	0,94	0,22	1,61	
20	24,35	Sitosterol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	X	X	0,59	0,28	2,04	2,53	2,03	0,99	3,14	0,06	1,06	
21	24,51	NI	-	X'	X'	0,47	0,12	0,74	0,95	0,82	0,31	1,26	0,12	0,55	
22	25,15	NI	-	X'	X'	1,03	0,39	-	0,25	0,34	4,31	-	-	2	
23	27,25	NI	-	X'	X'	1,47	1,14	1,65	3,52	1,75	2,56	0,27	0,04	0,18	

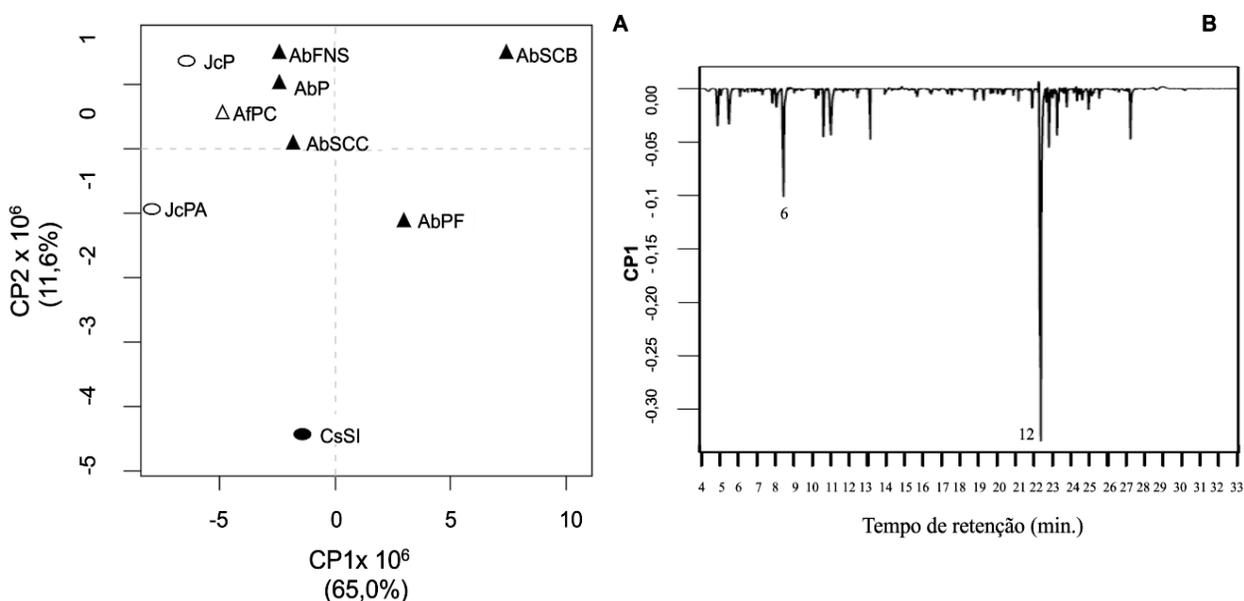
A rede molecular criada no GNPS a partir dos resultados obtidos no CG-EM, evidenciou o agrupamento de algumas substâncias pertencentes a mesma classe química, tais como ácido graxo, hidrocarboneto, estero, éster de ácido graxo, álcool graxo e benzenóides (**Figura 13**). Além disso, também foi possível verificar visualmente a variabilidade química intra-interespecífica dos extratos das algas calcárias tanto a nível qualitativo quanto quantitativo.



**Figura 13:** Rede molecular obtida na plataforma GNPS dos extratos das algas calcárias geniculadas. AbFNS (*A. beauvoisii* - Fenda de Nossa Senhora); AbP (*A. beauvoisii* - Prainha); AbPF (*A. beauvoisii* - Praia do Forno); AbSCB (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne banco); AbSCC (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne costão); JcPA (*J. crassa* - Praia dos Anjos); JcP (*J. crassa* - Prainha); CsSI (*C. sagittatum* - Saco dos Ingleses) e AfPC (*A. flabellata* - Ponta da Cabeça).

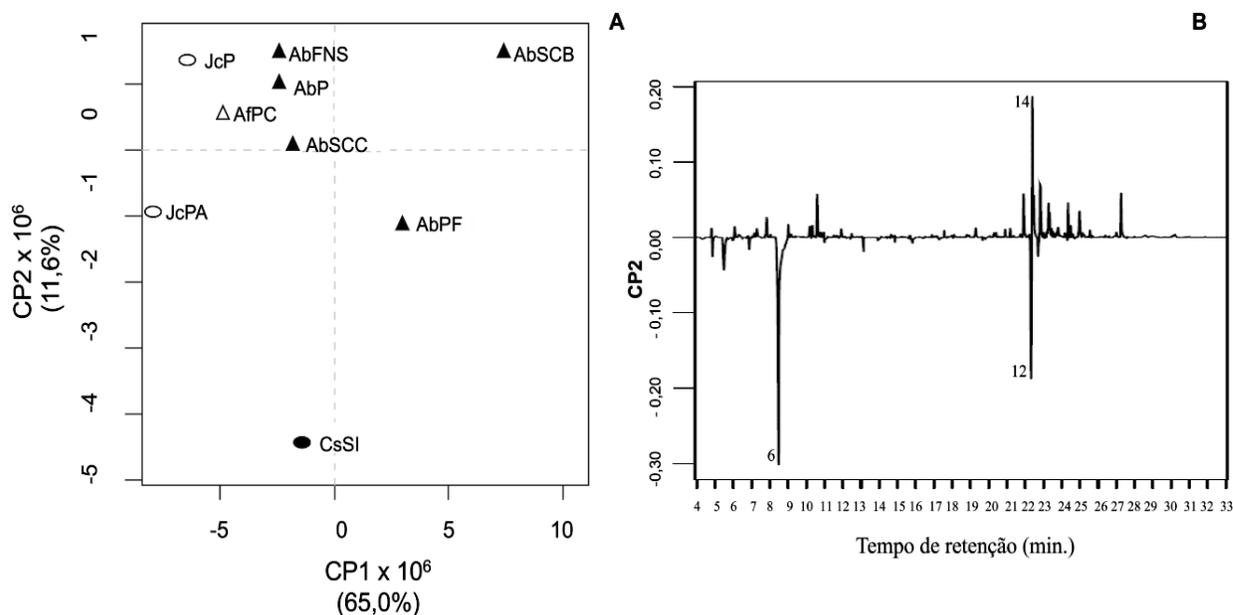
### 3.3 Análise de componente principal (ACP)

No gráfico de escores da ACP (**Figura 14A e 15A**) foi possível verificar duas componentes principais que explicaram 76,6% (CP1 = 65,0% e CP2 = 11,6%) da variação cromatográfica total. Na CP1 (**Figura 14A**) o ácido palmítico (**6**) e o (3 $\beta$ ) colest-5-en-3-ol (**12**) foram as principais substâncias responsáveis por esta distribuição (**Figura 14B**). Foi possível verificar que os extratos de *A. beauvoisii* (AbFNS, AbP e AbSCC), *J. crassa* (JcP e JcPA), *A. flabellata* (AfPC) e *C. sagittatum* (CsSI) apresentaram maior abundância do ácido palmítico (**6**). Em contrapartida, os extratos de *A. beauvoisii* (AbPF e AbSCB) apresentaram maior abundância do (3 $\beta$ ) colest-5-en-3-ol (**12**), evidenciando a variabilidade química intraespecífica em relação aos extratos de *A. beauvoisii*.



**Figura 14:** A. Inter-relação dos perfis químicos de diferentes algas calcárias geniculadas obtidos por CG-EM através da ACP (CP1 = 65% e CP2 = 11%). Símbolos diferentes representam cada espécie avaliada neste estudo. B. Peso do sinal do cromatograma na variação de CP1 pelo tempo de retenção. AbFNS (*A. beauvoisii* - Fenda de Nossa Senhora); AbP (*A. beauvoisii* - Prainha); AbPF (*A. beauvoisii* - Praia do Forno); AbSCB (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne banco); AbSCC (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne costão); JcPA (*J. crassa* - Praia dos Anjos); JcP (*J. crassa* - Prainha); CsSI (*C. sagittatum* - Saco dos Ingleses) e AfPC (*A. flabellata* - Ponta da Cabeça).

Já na CP2 (**Figura 15A**), além das duas substâncias já citadas na CP1 (ácido palmítico (**6**) e (3 $\beta$ ) colest-5-en-3-ol (**12**)), o esteroil (3 $\beta$ , 5 $\alpha$ )-ergosta-7-en-3-ol (**14**) também foi importante na distribuição das amostras nesta componente (**Figura 15B**), no qual, os extratos de *A. beauvoisii* (AbPF), *J. crassa* (JcPA) e *C. sagittatum* (CsSI) apresentaram menor abundância desta substância em comparação aos demais extratos, evidenciando a variabilidade química inter/intraespecífica.



**Figura 15:** **A.** Inter-relação dos perfis químicos de diferentes algas calcárias geniculadas obtidos por CG-EM através da ACP (CP1 = 65% e CP2 = 11%). Símbolos diferentes representam cada espécie avaliada neste estudo. **B.** Peso do sinal do cromatograma na variação de CP2 pelo tempo de retenção. AbFNS (*A. beauvoisii* - Fenda de Nossa Senhora); AbP (*A. beauvoisii* - Prainha); AbPF (*A. beauvoisii* - Praia do Forno); AbSCB (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne banco); AbSCC (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne costão); JcPA (*J. crassa* - Praia dos Anjos); JcP (*J. crassa* - Prainha); CsSI (*C. sagittatum* - Saco dos Ingleses) e AfPC (*A. flabellata* - Ponta da Cabeça).

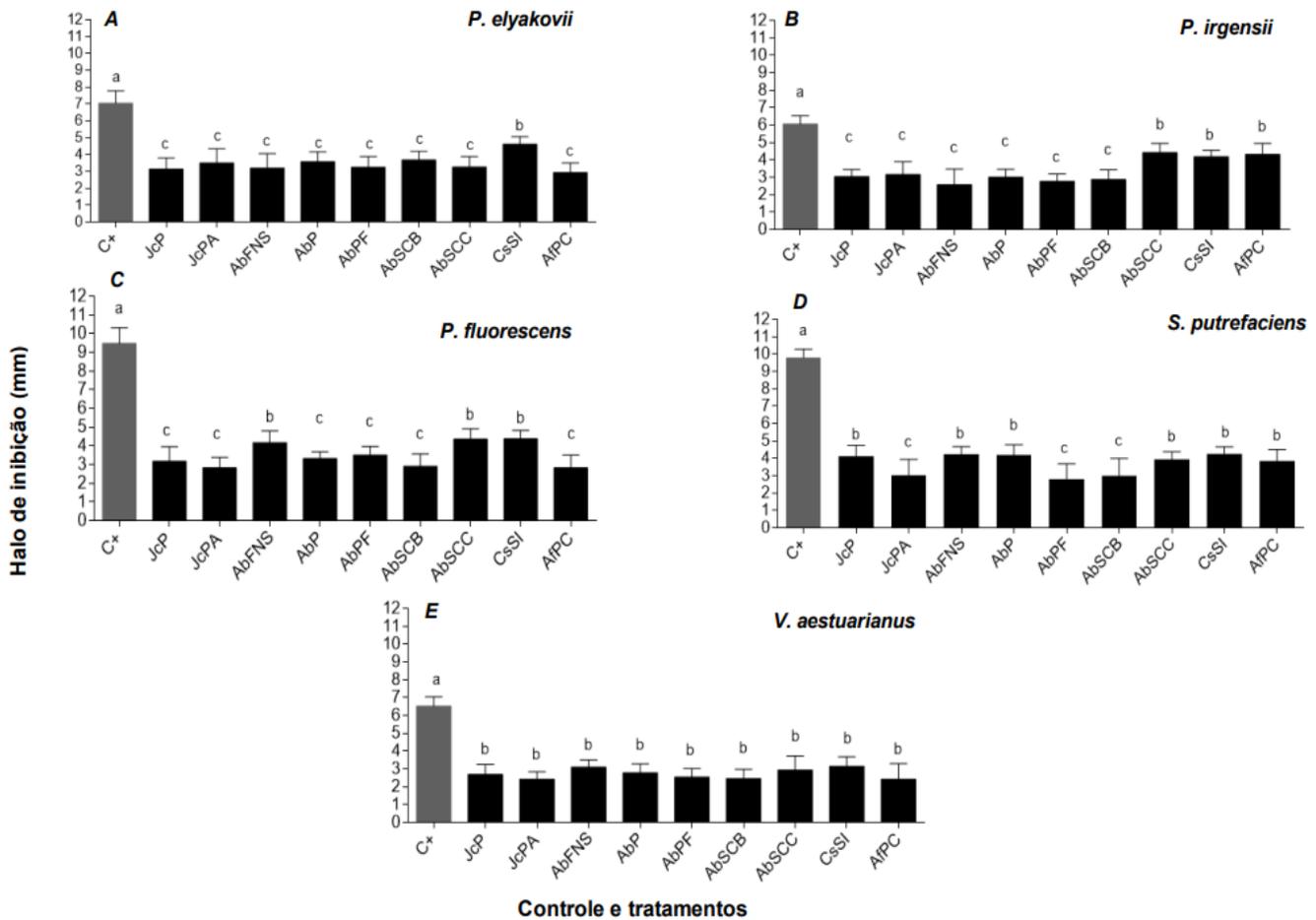
### 3.4 Atividade antibacteriana

Na atividade contra as cepas bacterianas foi possível verificar diferenças significativas entre o controle e tratamentos (**Tabela 7**). O controle com o antibiótico estreptomicina apresentou maior atividade contra as bactérias marinhas em comparação aos tratamentos (**Figura 16**). Entre os tratamentos também foi possível observar a variação significativa na inibição das bactérias marinhas exceto contra a

bactéria *V. aestuarianus*. Dos nove extratos testados, o extrato de *C. sagittatum* (CsSI) foi o mais ativo contra a bactéria *P. elyakovii*, apresentado halo de inibição de 4,61 mm. Contra a bactéria *P. fluorescens*, os extratos mais ativos foram *C. sagittatum* (CsSI) e *A. beauvoisii* (AbSCC e AbFNS), com halo de inibição de 4,37 mm, 4,36mm e 4,16 mm, respectivamente. Quanto a atividade frente à bactéria *P. irgensii* os extratos mais ativos foram *A. beauvoisii* (AbSCC) - 4,41 mm, *A. flabellata* (AfPC) - 4,32 mm e *C. sagittatum* (CsSI) - 4,18 mm. Já em relação à atividade contra a bactéria *S. putrefaciens*, os extratos mais ativos foram, *C. sagittatum* (CsSI), *A. beauvoisii* (AbFNS, AbP e AbSCC), *J. crassa* (JcP) e *A. flabellata* (AfPC), apresentando halo de inibição de 4,26 mm, 4,24 mm, 4,20 mm, 3,93 mm e 3,84 mm, respectivamente.

**Tabela 7:** ANOVA da Inibição do crescimento bacteriano após 24 horas de exposição aos extratos das algas calcárias geniculadas.

Bactérias	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	F	p
<i>Pseudoalteromona elyakovii</i>	267,57	10	68,32	<0,001
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	512,17	10	150,94	<0,001
<i>Polaribacter irgensii</i>	226,66	10	77,52	<0,001
<i>Shewanella putrefaciens;</i>	531,92	10	128,62	<0,001
<i>Vibrio aestuarianus</i>	223,34	10	73,74	<0,001



**Figura 16:** Efeito dos extratos das algas calcárias no crescimento bacteriano após 24 h. **A:** *Pseudoalteromonas elyakovii*; **B:** *Pseudomonas fluorescens*; **C:** *Polaribacter irgensii*; **D:** *Shewanella putrefaciens*; **E:** *Vibrio aestuarianus*. ANOVA seguida do teste de Tukey. As letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. AbFNS (*A. beauvoisii* - Fenda de Nossa Senhora); AbP (*A. beauvoisii* - Prainha); AbPF (*A. beauvoisii* - Praia do Forno); AbSCB (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne banco); AbSCC (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne costão); JcPA (*J. crassa* - Praia dos Anjos); JcP (*J. crassa* - Prainha); CsSI (*C. sagittatum* - Saco dos Ingleses) e AfPC (*A. flabellata* - Ponta da Cabeça) e C<sup>+</sup> (controle positivo – estreptomicina).

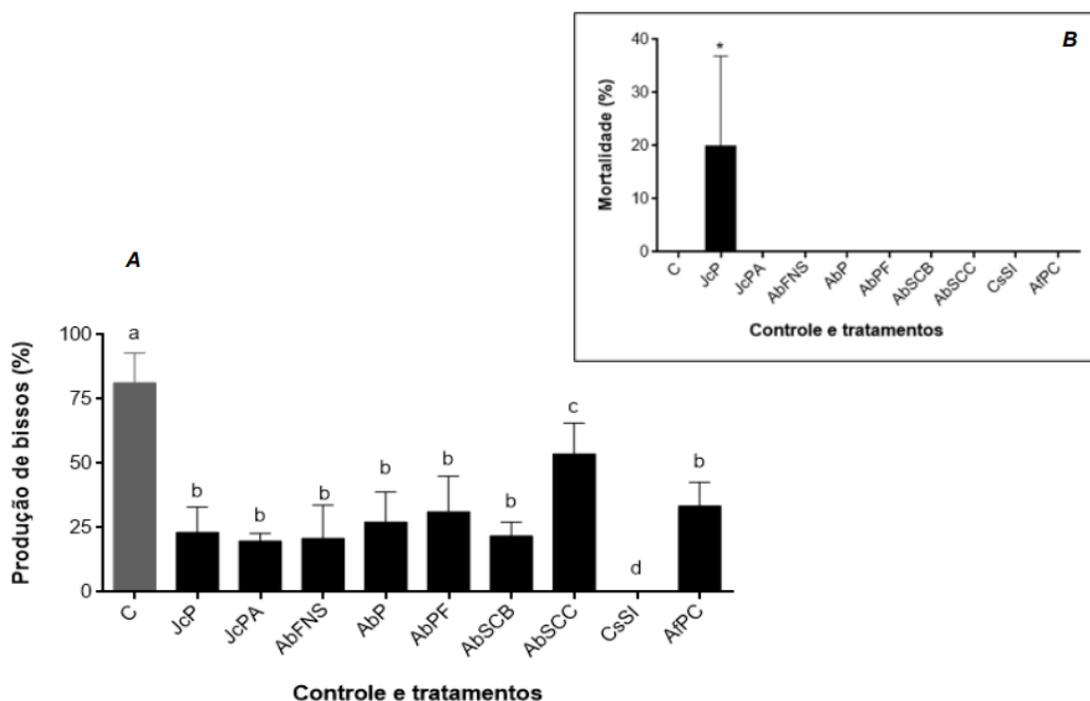
### 3.5 Atividade anti-incrustante contra o mexilhão *Perna perna*

Na atividade contra o mexilhão *P. perna* foi possível verificar diferenças significativas entre o controle e tratamentos (**Tabela 8**). Todos os extratos inibiram significativamente a produção de biscoitos do mexilhão *P. perna* em comparação ao controle com água do mar (**Figura 17A**). Dentre os tratamentos, também foi possível verificar diferenças significativas, no qual o extrato de *C. sagittatum* (CsSI) apresentou

maior atividade, com inibição de bisco de 100%. Já o extrato de *A. beauvoisii* coletado no costão do Saco do Cherne (AbSCC) foi o menos ativo contra o organismo alvo, apresentando inibição de 46,28%. Levando em consideração a toxicidade, os extratos não apresentaram efeito tóxico, exceto o extrato de *J. crassa* da Prainha (JcP) exibindo 20% de mortalidade (**Figura 17B**) frente ao organismo alvo.

**Tabela 8:** ANOVA da produção de bisco e mortalidade pelo mexilhão *Perna perna* após 24 horas de exposição aos extratos das algas calcárias geniculadas.

Mexilhão <i>P. perna</i>	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	F	p
Inibição de bisco	44036,21	9	49,36	<0,001
Mortalidade	3528,36	9	13,50	<0,001



**Figura 17:** Efeito dos extratos das algas calcárias na produção de bisco (A) e mortalidade (B) pelo mexilhão *P. perna*. Média e desvio padrão em porcentagem da produção de bisco após 24 h. B: Média e desvio padrão em porcentagem da mortalidade de indivíduos após 24 h. ANOVA seguida do teste de Tukey. As letras indicam diferenças significativas entre os tratamentos. AbFNS (*A. beauvoisii* - Fenda de Nossa Senhora); AbP (*A. beauvoisii* - Prainha); AbPF (*A. beauvoisii* - Praia do Forno); AbSCB (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne banco); AbSCC (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne costão); JcPA (*J. crassa* - Praia dos Anjos); JcP (*J. crassa* - Prainha); CsSI (*C. sagittatum* - Saco dos Ingleses) e AfPC (*A. flabellata* - Ponta da Cabeça) e C (controle - água do mar)

#### 4. DISCUSSÃO

O presente estudo revelou diferentes classes químicas nos extratos brutos das macroalgas calcárias coletadas em Arraial do Cabo/RJ, através da análise por CG-EM e a identificação pelos nos bancos de dados utilizados (NIST e GNPS), tais como ácidos graxos, hidrocarbonetos, esteróis, álcoois graxos e benzenóides. A análise por redes moleculares realizada na plataforma do GNPS foi uma ferramenta metabolômica importante para a organização, representação visual e identificação, permitindo observar o agrupamento de famílias de substâncias dentro da mesma classe química e contribuindo para a identificação de substâncias junto com a biblioteca NIST.

Os perfis químicos das macroalgas apresentaram variabilidade intra-/interespecífica (mesmo coletadas em áreas próximas e com condições oceanográficas semelhantes). Algumas substâncias foram identificadas em todas as amostras, com variações quantitativas, e outras substâncias foram detectadas em amostras específicas (variabilidade qualitativa). Através da análise de ACP foi possível verificar a correlação entre as amostras através de duas componentes principais (CP1 e CP2). A CP1 evidenciou a variabilidade química intraespecífica em relação aos extratos de *A. beauvoisii*, sendo o ácido palmítico e o esteroide (3 $\beta$ ) colest-5-en-3-ol as principais substâncias responsáveis por esta variabilidade. Já na CP2 foi possível verificar a tanto a variabilidade química interespecífica quanto intraespecífica (para *J. crassa* e *A. beauvoisii*), sendo o ácido palmítico e três esteróis - (3 $\beta$ ) colest-5-en-3-ol, (3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 22E) -ergosta-7,22-dien-3-ol e estigmasterol as principais substâncias responsáveis por esta variabilidade.

Dada a complexidade química dos extratos, a análise por ACP, método estatístico multivariado, foi utilizado como uma importante ferramenta quimiométrica aplicada neste estudo, uma vez que a combinação de métodos químicos analíticos, neste caso a análise por CG-EM, em conjunto com métodos estatísticos, ajudam no agrupamento dos resultados e na interpretação da relação entre as variáveis envolvidas (Cordella, 2012).

Diversos fatores, tais como temperatura, salinidade, luz (Stengel *et al* 2011; Sudatti *et al.* 2011; Cotas *et al* 2020), localização (Plouguerné *et al.* 2010a, Stengel *et al* 2011), sazonalidade (Stengel *et al* 2011; El Maghraby & Fakhry, 2015, Mansur *et al.* 2020), disponibilidade de nutrientes e exposição a diferentes interações ecológicas (Stengel *et al* 2011) podem contribuir para esta variabilidade observada na composição química das amostras estudadas.

O esteróide (3 $\beta$ ) colest-5-en-3-ol foi a substância mais abundante identificada nos bancos de dados (GNPS e NIST) em quase todos os extratos, variando de 12,63% a 39,07%, exceto no extrato de *C. sagittatum* (CsSI). Ahmed *et al.* (2011) relataram o esteróide (3 $\beta$ ) colest-5-en-3-ol como o mais abundante no extrato metanólico de *J. rubens* (24,25%). Este esteróide também foi reportado por Mofeed *et al.* (2021) nos extratos de clorofórmio: metanol (2:1 v/v) de *Amphiroa anceps*, no entanto, não foi uma das substâncias majoritárias, como relatado no presente estudo, apresentando apenas 2% de área. Quanto aos gêneros *Arthrocardia* e *Cheilosporum*, nenhum registro desta substância foi encontrado. Os esteróides são metabólitos secundários essenciais à estrutura celular de diversos organismos e associados a diferentes atividades biológicas, tais como atividade antioxidante, antiviral e antitumoral, por exemplo (Alassali *et al.* 2016, Thirumurugan *et al.* 2018; Fagundes & Wagner, 2021).

O extrato de *C. sagittatum* (CsSI) revelou o ácido palmítico como a substância mais abundante (31,35%). O ácido palmítico também foi identificado como majoritário nos estudos prévios com algas calcárias geniculadas. Venkatesalu *et al.* (2012) analisaram a composição de ácidos graxos, levando em consideração diferentes períodos de coletada (verão, primavera, monção e pós monção). No entanto, ácido palmítico foi a substância mais abundante nas espécies *Cheilosporum spectabile* (11,72%), *Amphiroa foliace* (91,56%) e *Amphiro sp.* (92,92%) coletadas na primavera, no período de monção e pós monção, respectivamente. O ácido palmítico também foi identificado como a substância mais abundante nas espécies *Amphiroa anceps* - 57,57% (Jayasreesn *et al.* 2013) e *Jania rubens* - 34,22% (Caf *et al.* 2019). Cikos *et al.* (2021) encontraram o ácido palmítico como a substância mais abundante na espécie

*Amphiroa rigida*. No presente estudo, esta substância foi encontrada em todos os extratos, porém no extrato de *C. sagittatum* (CsSI) apresentou maior abundância e isso pode estar relacionado a diversos fatores (abióticos e bióticos), mencionados anteriormente.

Quanto à atividade contra as cepas de bactérias marinhas, o extrato de *C. sagittatum* foi um dos mais promissores na inibição de quatro espécies de bactérias marinhas (*P. elyakovii*, *P. fluorescens*, *P. irgensii* e *S. putrefaciens*). Bactérias marinhas são frequentemente utilizadas nos ensaios para avaliar a atividade antibiofilme, visto que, a inibição de espécies específicas presentes pode afetar diretamente a colonização de macroorganismos incrustantes (Dobretsov *et al.* 2009; Da Gama, 2014). Deepa *et al.* (2014), também demonstrou a atividade inibitória do extrato metanólico de *Cheilosporum spectabile* contra duas espécies de diatomáceas (*Navicula subinflata* e *Nitzschia palea*). Estudos contra microorganismos patogênicos também foram encontrados para gênero *Cheilosporum*. No estudo realizado por Vlachos *et al.* (1997), o extrato de *C. sagittatum* inibiu o crescimento de quatro espécies de fungos e doze espécies de bactérias, sendo mais ativo contra as bactérias *Bacillus subtilis* EL39, *Micrococcus* sp. e *Staphylococcus aureus*. No estudo de Stirk *et al.* (2003) também foi possível verificar atividade do extrato etanólico do gênero *Cheilosporum* contra cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Estudos sobre o potencial biotecnológico deste gênero são mais escassos. Neste sentido, o presente estudo apresenta mais uma alternativa promissora de produtos naturais de macroalgas com potencial antibacteriano, voltado para a área de bioincrustação marinha.

Em relação aos extratos de *A. beauvoisii*, também foi possível verificar a atividade inibitória contra as cepas de bactérias marinhas, no qual a amostra coletada no costão do Saco do Cherne (AbSCC) apresentou resultados mais promissores em comparação aos demais extratos. Deepa *et al.* (2014) analisou o potencial inibitório de diferentes extratos (metanol, acetato de etila, butanol e água) de nove macroalgas marinhas, incluindo a espécie *Amphiroa anceps*, contra a bactéria marinha *Vibrio* sp. Dentre os extratos de *A. anceps*, o extrato etanólico foi o mais promissor. Estudos contra microorganismos patogênicos também foram encontrados para gênero

*Amphiroa*. Vlachos *et al.* (1997) apresentaram resultados da atividade dos extratos etanólicos de *Amphiroa ephedraea* contra quatro espécies de fungos e onze espécies de bactérias, sendo mais ativo na inibição da bactéria *Bacillus subtilis* EL39 (20-25mm). Em contrapartida, foi observado inatividade ou baixa inibição dos extratos de *Amphiroa beauvoisii*, *Amphiroa cryptarthrodia* e *Amphiroa rigida* frente a diferentes modelos biológicos (bactérias, vírus e fungos) no estudo realizado por Ballesteros *et al.* (1992). Já no estudo realizado por Mofeed *et al.* (2022), o extrato de *Amphiroa anceps* (MeOH:Hex 1:1), contendo o ácido 1,2-benzenodicarboxílico, éster diisooctil (30,4%) e o ácido pentadecanóico, 14-metil-, éster metílico (29,5%) como as substâncias mais abundantes, apresentou atividade antibacteriana contra *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia Coli*, e atividade antiviral contra rotavírus e vírus coxsackie B3. A atividade biológica está diretamente ligada a composição química da amostra, neste sentido, além dos fatores abióticos e bióticos, os solventes (ou misturas) utilizados no processo de extração também podem influenciar a composição química e conseqüentemente, a atividade desejada, como descreveu o estudo realizado El-Nuby *et al.* (2021) para espécie *Amphiroa sp.*

Quanto aos extratos de *J. crassa*, também foi possível verificar atividade inibitória contra as bactérias marinhas. Os resultados não apresentaram diferenças significativas entre as duas amostras (JcP e JcPA), exceto contra a bactéria *S. putrefaciens*, no qual a amostra coletada na prainha (JcP) foi a mais ativa. No estudo realizado por Kantida *et al.* (2012), o extrato etanólico de *Jania adhaerens*, também apresentou atividade contra quatro cepas de bactérias marinhas, incluindo o gênero *Pseudomonas*, no entanto, não foi um dos mais ativos, apresentando zona de inibição de 0,5mm. Estudos utilizando diferentes modelos de microorganismos patogênicos também foram encontrados para gênero *Jania*. Stirk *et al.* (2003) demonstraram a atividade contra diferentes cepas bacterianas para os extratos etanólicos *Jania sp.*, no entanto, também não foi um dos mais ativos. Já no estudo proposto por Sasikala & Geetha (2017), o extrato metanólico da espécie *Jania rubens* foi um dos mais promissores frente a diferentes cepas bacterianas, principalmente contra as bactérias *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pyogenes*. Quanto à espécie *J. crassa*, somente

o estudo realizado por Soares *et al.* (2012) foi encontrado, no qual, são apresentados os resultados inibitórios do extrato (diclorometano: metanol 1:1) contra dois tipos de vírus da Herpes.

No experimento realizado com o mexilhão *P. Perna*, todos os extratos brutos inibiram a produção de biscoitos, sendo os extratos de *C. sagittatum* (CsSI), *A. beauvoisii* (AbFNS e AbSCB) e *J. crassa* (JcP e JcPA) os mais ativos. O único extrato que apresentou toxicidade foi de *J. crassa* coletada na Prainha (JcP), exibindo 20% de mortalidade frente ao organismo alvo. Medeiros *et al.* (2007) também relataram o potencial anti-incrustante frente ao mexilhão *P. Perna* do extrato bruto de quatro espécies de macroalgas, incluindo *J. rubens*, que foi uma das espécies mais ativas contra o organismo alvo e não apresentou mortalidade, diferente do resultado apresentado no presente estudo. Estes organismos usam os fios biscoitos para se prenderem firmemente a várias estruturas submersas, como cascos de navios, por exemplo, causando sérios problemas econômicos para a indústria naval (Wang *et al.* 2017). Eles são considerados um excelente modelo de organismo incrustante para estudos de laboratório, pois apresenta uma resposta rápida e clara às substâncias bioativas testadas (Da Gama *et al.* 2003; Barbosa *et al.* 2007; Da Gama *et al.* 2008; Plouguerné *et al.* 2010a). O nosso estudo é o primeiro a relatar a atividade dos gêneros *Amphiroa*, *Cheilosporum* e *Arthrocardia* contra esta espécie de mexilhão.

O esteróide (3 $\beta$ ) colest-5-en-3-ol encontrado em abundância nos extratos das macroalgas calcárias, pode ser uma das substâncias associadas às atividades testadas no presente estudo, visto que, estudos prévios mostraram a relação dela com atividade antimicrobiana (Putra & Hadi, 2017; Bahrún *et al.* 2021; Pourakbar *et al.* 2021). O ácido palmítico também pode ser uma das substâncias bioativas, já que, estudos direcionados à atividade antibiofilme, mostraram o potencial desta substância contra bactérias marinhas, incluindo os gêneros *Vibrio* e *Pseudomonas* (Bazes *et al.* 2009; Bakar *et al.* 2017). Plouguerné *et al.* (2010b) também relataram atividade inibitória contra bactérias marinhas (*Shewanella putrefaciens* e *Polaribacter irgensii*), fungos e microalgas da fração contendo o ácido palmítico como a substância mais abundante.

Pesquisas sobre a diversidade química e potencial biotecnológico de algas calcárias geniculadas são escassas, principalmente para os gêneros *Cheilosporum* e *Arthrocardia*. Sendo assim, este estudo foi o primeiro a revelar informações sobre a composição química, a variabilidade química inter/intraespecífica e o potencial anti-incrustante dos extratos brutos de *A. beauvoisii*, *C. sagittatum*, *J. crassa* e *A. flabellata*, indicando as mais promissoras, as quais poderão ser alvo de estudos futuros na obtenção de substâncias bioativas para combater/minimizar a bioincrustação marinha.

## REFERÊNCIAS

AHMED, H. H. *et al.* Antitumour and antioxidant activity of some red sea seaweeds in Ehrlich ascites carcinoma in vivo. **Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 66, p. 367 - 76, 2011.

AKBARY, P.; ADESHINA, I.; JAHANBAKHSIC, A. Growth performance, digestive enzymes, antioxidant activity and immune responses of *Litopenaeus vannamei* fed with *Jania adhaerens* J.V. supplemented diet against *Photobacterium damsela* infection. **Animal Feed Science and Technology**, v. 270, p. 114 - 696, 2020.

ALASSALI, A. *et al.* Methods for upstream extraction and chemical characterization of secondary metabolites from algae biomass. **Advanced Techniques in Biology & Medicine**, v. 4, p. 1 - 16, 2016.

ALI, A. *et al.* An overview of controlled-biocide-release coating based on polymer resin for marine antifouling applications. **Journal of Polymer Research**, v. 27, p. 2-17, 2020.

BAHRUN, B. *et al.* In vitro and in silico analysis for antibacterial activities of various extracts of *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) from Selayar islands, Indonesia. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 64, p. 7203 - 7212, 2021.

BALLESTEROS, E. *et al.* Biological activity of extracts from some Mediterranean macrophytes. **Botanica Marina**, v. 35, p. 481 - 485, 1992.

BARBOSA, J. P. Natural products as antifoulants in the Brazilian brown alga *Dictyota pfaffii* (Phaeophyta, Dictyotales). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 549 - 553, 2007.

BATISTA-ANDRADE, J. A. *et al.* From TBT to booster biocides: Levels and impacts of antifouling along coastal areas of Panama. **Environmental Pollution**, v. 234, p. 243 - 252, 2018.

BAZES, A. *et al.* Investigation of the antifouling constituents from the brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, p. 395 - 403, 2008.

CAO, S. *et al.* Progress of marine biofouling and antifouling technologies. **Chinese Science Bulletin**, v. 56, p. 598-612, 2011.

CAF, E. *et al.* Fatty acid and lipophilic vitamin composition of seaweeds from Antalya and Canakkale (Turkey). **Grasas y aceites**, v. 70, p. 1 - 7, 2019.

CARVALHO, A. P. *et al.* Extracts of seaweeds as potential inhibitors of quorum sensing and bacterial growth. **Journal of Applied Phycology** v. 29, p. 789 - 797, 2016.

CASTRO, I. B. *et al.* Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático, **Química Nova**, v. 34, p. 1021 - 1031, 2011.

CARROL, A. R. *et al.* Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 36, p. 122 - 173, 2019.

CIKOS, A. *et al.* Bioprospecting of coralline red alga *Amphiroa rigida* J.V. Lamouroux: volatiles, fatty acids and pigments. **Molecules**, v. 26, p. 1 - 21, 2021.

CORDELLA, C. B. Y. PCA: **The basic building block of chemometrics**. **Analytical chemistry**, Dr. Ira S. Krull (Ed.), InTech, 2012.

COTAS, J. *et al.* A comprehensive review of the nutraceutical and therapeutic applications of red seaweeds (Rhodophyta). **Life**, v. 10, p. 1 - 23, 2020.

DA GAMA, B. A. P. *et al.* Is the mussel test a good indicator of antifouling activity? a comparison between laboratory and field assays. **Biofouling**, v. 19, p. 161 - 169, 2003.

DA GAMA, B. A. P. *et al.* Antifouling activity of natural products from Brazilian seaweeds. **Botanica Marina**, v. 51, p. 191 - 201, 2008.

DA GAMA, B. A. P. *et al.* The antifouling defence mechanisms of marine macroalgae. In J-P. Jacquot, & P. Gadal (Serial Eds.) & N. Bourgoignon (Serial Vol. Ed.) **Advances in Botanical Research**, v. 71, p. 413 - 440, 2014.

DAVIDSON, I. *et al.* Mini-review: assessing the drivers of ship biofouling management – aligning industry and biosecurity goals. **Biofouling**, v. 32, p. 411 - 428, 2016.

DEEPA, S. *et al.* Antifouling potential of selected macroalgae from the Gulf of Mannar, India. **International Journal of Bioassays**, v. 3, p. 3479 - 3487, 2014.

DIAS, G. T. M. Granulados bioclásticos - algas calcárias. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 18, p. 307 - 318, 2000.

DIXIT, D.; REDDY, C. R. K. Non-targeted secondary metabolite profile study for deciphering the cosmeceutical potential of red marine macro alga *Jania rubens* - an LCMS based approach. **Cosmetics**, v. 4, p. 1 - 17, 2017.

DOBRETISOV, S. *et al.* Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. **Biofouling**, v. 25, p. 413 - 427, 2009.

ELANGO VAN, M.; ANANTHARAMAN, P. Nutritional composition and phytochemistry profile of seaweeds collected from rameshwaram coast. **International Journal of Scientific & Technology Research**, v. 8, p. 3137 - 3140, 2019.

EL-MAGHRABY, D. M.; FAKHRY, E. M. Lipid content and fatty acid composition of Mediterranean macro-algae as dynamic factors for biodiesel production. **Oceanologia**, v. 57, p. 86 - 92, 2015.

EL-NUBY, A. S. M. *et al.* In vitro evaluation of the toxicity of different extracts of some marine algae against root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). **Pakistan Journal of Phytopathology**, v. 33, p. 55 - 66, 2021.

ESSA, H. *et al.* Towards optimizing the conventional and ultrasonic-assisted extraction of sulfated polysaccharides from marine algae. **Materials Science and Engineering**, v. 464, p. 1 - 11, 2018.

ESTEBAN, R. *et al.* Carotenoid composition in Rhodophyta: insights into xanthophyll regulation in *Corallina elongata*. **European Journal of Phycology**, v. 44, p. 221 - 230, 2009.

FAGUNDES, M. B.; WAGNER, R. **Sterols biosynthesis in algae**. In Biosynthesis; Zepka, L.Q., Do Nascimento, T.C., Jacob-Lopes, E., Eds.; IntechOpen: London, UK, p. 137 - 144, 2021.

FERREIRA, O. *et al.* Biofouling inhibition with grafted econea biocide: toward a nonreleasing eco-friendly multiresistant antifouling coating. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 8, p.12 - 17, 2020.

HAN, X. *et al.* Special issue on advanced corrosion-resistance materials and emerging applications. The progress on antifouling organic coating: From biocide to biomimetic surface. **Journal of Materials Science & Technology**, v. 61, p. 46-62, 2021.

HARVEY, A. S. **Coralline algae of central New Zealand: an identification guide to common "crustose" species**. NIWA Information series 57, v. 145, 2005.

JAYASREEN, N. B. *et al.* GC-MS, HPLC and AAS analysis of fatty acids, amino acids and minerals in red algae *Amphiroa anceps*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 187-190, 2013.

KANTIDA, S. R. *et al.* Influence of bioactive compounds from seaweeds and its biocidal and corrosion inhibitory effect on mild steel. **Research Journal of Environmental Toxicology**, v.6, p. 101 - 109, 2012.

LITTLER, M. M.; LITTLER, D. S. Deepest known plant life discovered on an uncharted seamount. **Science**, v. 227, p. 57 - 59, 1985.

MACHADO, F. L. S. *et al.* Chemical diversity and antileishmanial activity of crude extracts of *Laurencia* complex (Ceramilales, Rhodophyta) from Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p 635 - 643, 2014.

MANNINO, A. M.; MICHELI, C. Ecological function of phenolic compounds from mediterranean fucoid algae and seagrasses: an overview on the genus *Cystoseira* sensu lato and *Posidonia oceanica* (L.) Delile. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 8, p. 2 -19, 2020.

MANSUR, A. A. The cytotoxic activity of extracts of the brown alga *Cystoseira tamariscifolia* (Hudson) Papenfuss, against cancer cell lines changes seasonally. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, p. 2419 - 2429, 2020.

MARTÍN-RODRÍGUEZ A. J. *et al.* From broad-spectrum biocides to quorum sensing disruptors and mussel repellents: antifouling profile of alkyl triphenylphosphonium salts. **PLOS ONE**, v. 10, p. 1 - 30, 2015.

MEDEIROS, H. E.; DA GAMA, B. A. P.; GALLERANI, G. Antifouling activity of seaweed extracts from Guarujá, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 55, p. 257 - 264, 2007.

MOFEED, J. *et al.* Antimicrobial activities of three seaweeds extract against some human viral and bacterial pathogens. **BIOCELL**, v. 46, p. 247 - 261, 2022.

NIELSEN, N. P. V. *et al.* Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimized warping. **Journal of Chromatography A**, v. 805, p. 17 - 35, 1998.

OTHMANI, A. *et al.* Settlement inhibition of marine biofilm bacteria and barnacle larvae by compounds isolated from the Mediterranean brown alga *Taonia atomaria*. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, p. 1975 - 1986, 2015.

PUTRA, M. Y.; Hadi, T. A. Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antiplasmodial activities of three sponges from Buton islands, Indonesia. **Indonesian Journal of Marine Sciences**, v 22, p. 147 - 154, 2017.

POURAKBAR, L. *et al.* Antifungal activity of the extract of a macroalgae, *Gracilariopsis persica*, against four plant pathogenic fungi. **Plants**, v. 10, p. 1 - 13, 2021.

PLOUGUERNÉ, E. *et al.* Antifouling activity as a function of population variation in *Sargassum vulgare* from the littoral of Rio de Janeiro. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, p. 717 - 724, 2010a.

PLOUGUERNÉ, E. Anti-microfouling activity of lipidic metabolites from the invasive brown alga *Sargassum muticum* (yendo) fensholt. **Marine Biotechnology**, v.12, p. 52 - 61, 2010b.

PREMARATHNA, A. D. *et al.* Preliminary screening of the aqueous extracts of twenty-three different seaweed species in Sri Lanka with in-vitro and in-vivo assays. **Heliyon**, v. 6, p. 1 - 16, 2020.

QIAN P. *et al.* Mini-review: Marine natural products and their synthetic analogs as antifouling compounds: 2009 - 2014. **Biofouling**, v. 31, p. 101 - 122, 2015.

RAJ, T. S. *et al.* Efficacy of seaweed extract against downy mildew of grapes caused by *Plasmopara Viticola*. **Plant Archives**, v. 19, p. 2877 - 2882, 2019.

RIGHINI, H. *et al.* Tomato seed biopriming with water extracts from *Anabaena minutissima*, *Ecklonia maxima* and *Jania adhaerens* as a new agro-ecological option against *Rhizoctonia solani*. **Scientia Horticulturae**, v. 281, p. 1 - 11, 2021.

SAHA, M. *et al.* Minireview: algal natural compounds and extracts as antifoulants. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, p. 1859 - 1874, 2018.

SÁNCHEZ-LOZANO, I. *et al.* Biomimetic approaches for the development of new antifouling solutions: study of incorporation of macroalgae and sponge extracts for the development of new environmentally-friendly coatings. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 4863, 2019.

SASIKALA, C; GEETHA, R. D. Comparative study on antimicrobial activity of seaweeds. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 10, p. 384 - 386, 2017.

SILVA, E. R. *et al.* Eco-friendly non-biocide-release coatings for marine biofouling prevention. **Science of the Total Environment**, v. 650, p. 2499 - 2511, 2018.

SUDATTI, D. B. *et al.* Effects of abiotic factors on growth and chemical defenses in cultivated clones of *Laurencia dendroidea* J. Agardh (Ceramilales, Rhodophyta). **Marine Biology**, v. 158, p.1439 - 1446, 2011.

SUDATTI, D. B. *et al.* Diel variation of sesquiterpene elatol production: a chemical defense mechanism of the red seaweed *Laurencia dendroidea*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 64, p. 131 - 135, 2016.

STENGEL, D. B.; CONNAN, S.; POPPER, Z. A. Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. **Biotechnology Advances**, 29, p. 483 - 501, 2011.

STIRK, W. A. *et al.* Potential medicinal value of some South African seaweeds. **South African journal of botany**, v. 69, p. 462 - 468, 2003.

THIRUMURUGAN, D. *et al.* **An introductory chapter: secondary metabolites.** In: Vijayakumar R, Raja SSS, editors. Secondary Metabolites sources and Applications, London, UK. IntechOpen Limited, p. 1 - 21, 2018.

VLACHOS, V. *et al.* Antimicrobial activity of extracts from selected southern African marine macroalgae. **South Journal of Science**, v. 93, p. 328 - 332, 1997.

VENKATESALU, V. *et al.* Seasonal variation on fatty acid composition of some marine macro algae from Gulf of Mannar Marine Biosphere Reserve, Southeast cost of India. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**, v. 41, p. 442-450.

VIMALA, R. Marine organisms: A potential source of natural antifouling metabolites. **International Journal of ChemTech Research**, v. 9, p. 208 - 217, 2016.

WAHL, M. Marine epibiosis. Fouling and antifouling: some basic aspects. **Marine Ecology Progress Series**, v. 58, p. 175 -189, 1989.

WANG, H. *et al.* Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides using the stronglylocentrotus intermedius sea urchin embryo test. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, p. 692 - 703, 2011.

WEHRENS, R. **Chemometrics with R.** Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011.

## CAPÍTULO 2: POTENCIAL ANTIMICOBACTERIANO, ANTI-INFLAMATÓRIO E CITOTÓXICO DE PRODUTOS NATURAIS DE ALGAS CALCÁRIAS GENICULADAS

### RESUMO

As macroalgas marinhas são uma fonte rica de substâncias bioativas com diversas propriedades farmacológicas, incluindo neste grupo, as algas calcárias geniculadas. A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa e o principal agente etiológico em humanos é o bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Esta doença afeta principalmente os pulmões (tuberculose pulmonar), mas pode atingir outras áreas extrapulmonares. A emergência para encontrar novas alternativas de tratamento, principalmente contra cepas resistentes, se faz necessário, sendo uma delas o uso de produtos naturais provenientes de organismos marinhos. Neste sentido, o objeto do presente estudo foi avaliar o potencial antimicobacteriano, contra uma cepa laboratorial (Mtb H37Rv) e uma cepa hipervirulenta (Mtb M299); a capacidade de inibição dos mediadores inflamatórios (óxido nítrico - NO e fator de necrose tumoral alfa - TNF- $\alpha$ ) e a citotoxicidade contra células hospedeiras (macrófagos) dos extratos de quatro espécies de algas calcárias geniculadas (*Amphiroa beauvoisii*, *Jania crassa*, *Arthrocardia flabellata* e *Cheilosporum sagittatum*). Posteriormente, frações com diferentes polaridades e frações mais purificadas, obtidas através dos extratos mais ativos também foram testadas contra os mesmos modelos e analisadas através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-EM) e os resultados analisados através de uma abordagem metabolômica, utilizando a plataforma do GNPS para a identificação das substâncias presentes. Quanto à atividade contra as micobactérias laboratorial e hipervirulenta, os extratos de *A. flabellata* e *J. crassa* coletada na Prainha foram os mais ativos, respectivamente. Em relação à capacidade inibitória de TNF- $\alpha$  e NO, os extratos mais ativos foram *A. beauvoisii* coletado no costão do Saco do Cherne e *C. sagittatum*. Quanto à toxicidade, os extratos não apresentaram efeitos tóxicos contra os modelos testados, exceto o extrato de *C. sagittatum*, que apresentou alta atividade citotóxica. Levando em consideração todas as atividades envolvidas, as frações FJC1, FJC2 e FJC4 de *J. crassa* coletada na Prainha e as frações FAF2, FAF3 e FAF4 de *A. flabellata* foram consideradas as mais ativas, apresentando baixa toxicidade frente ao modelo testado. Ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos, hidrocarbonetos, álcool graxo, monoterpenóide, esterol e benzenóide foram às classes químicas encontradas nas frações mais ativas. A fração mais purificada (F29-40), obtida através da cromatografia contracorrente, contendo o ácido palmítico como a substância mais abundante, também foi testada frente aos modelos selecionados e apresentou atividade inibitória contra as duas cepas de micobactérias e capacidade inibitória de NO e TNF- $\alpha$ . Os resultados são inéditos para as espécies de algas calcárias geniculadas quanto às atividades propostas no presente estudo, evidenciando a importância deste grupo algas como mais uma fonte promissora na área farmacológica.

**Palavras-chave:** atividade farmacológica, algas coralinas, biotecnologia, metabólitos secundários, metabolômica.

## ABSTRACT

Marine macroalgae are a rich source of bioactive substances with diverse pharmacological properties, including geniculate calcareous algae in this group. Tuberculosis (TB) is an infectious disease and the main etiologic agent in humans is the bacillus *Mycobacterium tuberculosis*. This disease mainly affects the lungs (pulmonary tuberculosis), but it can affect other extrapulmonary areas. The emergency to find new treatment alternatives, especially against resistant strains, is necessary, one of them being the use of natural products from marine organisms. In this context, the goal of this study was to evaluate the antimycobacterial potential of extracts of four species of geniculate calcareous algae against a laboratory strain (Mtb H37Rv) and a hypervirulent strain (Mtb M299); the capacity to inhibit inflammatory mediators (nitric oxide - NO and tumor necrosis factor alpha - TNF- $\alpha$ ); and the cytotoxicity against host cells (macrophages) (*Amphiroa beauvoisii*, *Jania crassa*, *Arthrocardia flabellata* and *Cheilosporum sagittatum*). Following that, fractions with different polarities and purer fractions obtained from the most active extracts were tested against the same models and analyzed using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), with the results analyzed using a metabolomic approach, using the GNPS platform to identify the substances present. In terms of activity against laboratory and hypervirulent mycobacteria, extracts of *A. flabellata* and *J. crassa* collected in Prainha were the most active. In terms of TNF- $\alpha$  and NO inhibitory capacity, the most active extracts were *A. beauvoisii* collected on the coast of Saco do Cherne and *C. sagittatum*. None of the extracts exhibited toxic effects, except for *C. sagittatum*. Taking into account all of the activities, the fractions FJC1, FJC2, and FJC4 of *J. crassa* collected in Prainha, as well as the fractions FAF2, FAF3, and FAF4 of *A. flabellata*, were considered the most active, with low toxicity when compared to the tested model. The most active fractions contained fatty acids, fatty acid esters, hydrocarbons, fatty alcohol, monoterpene, sterol, and benzenoid. The most purified fraction (F29-40), obtained by countercurrent chromatography and containing palmitic acid as the most abundant substance, was also tested against the selected models and demonstrated inhibitory activity against both strains of mycobacteria, with, as well as NO and TNF- $\alpha$ . The study results are unprecedented for geniculate calcareous algae species in terms of the activities proposed in this study, highlighting the importance of this algae group as another promising source in the pharmacological area.

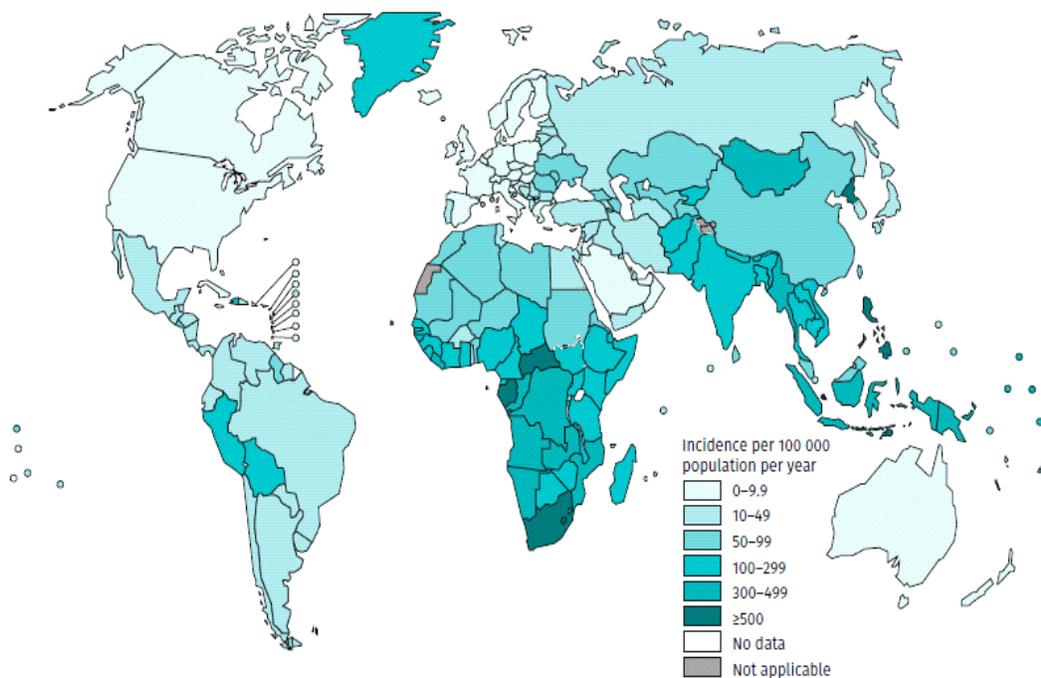
**Keywords:** pharmacological activity, coralline algae, biotechnology, secondary metabolites, metabolomics

## 1. INTRODUÇÃO

As macroalgas são produtoras de uma grande diversidade de substâncias bioativas com potencial farmacológico contra diversos modelos biológicos (Dmytryk *et al.* 2017; Bhowmick *et al.* 2020; Clementino *et al.* 2020).

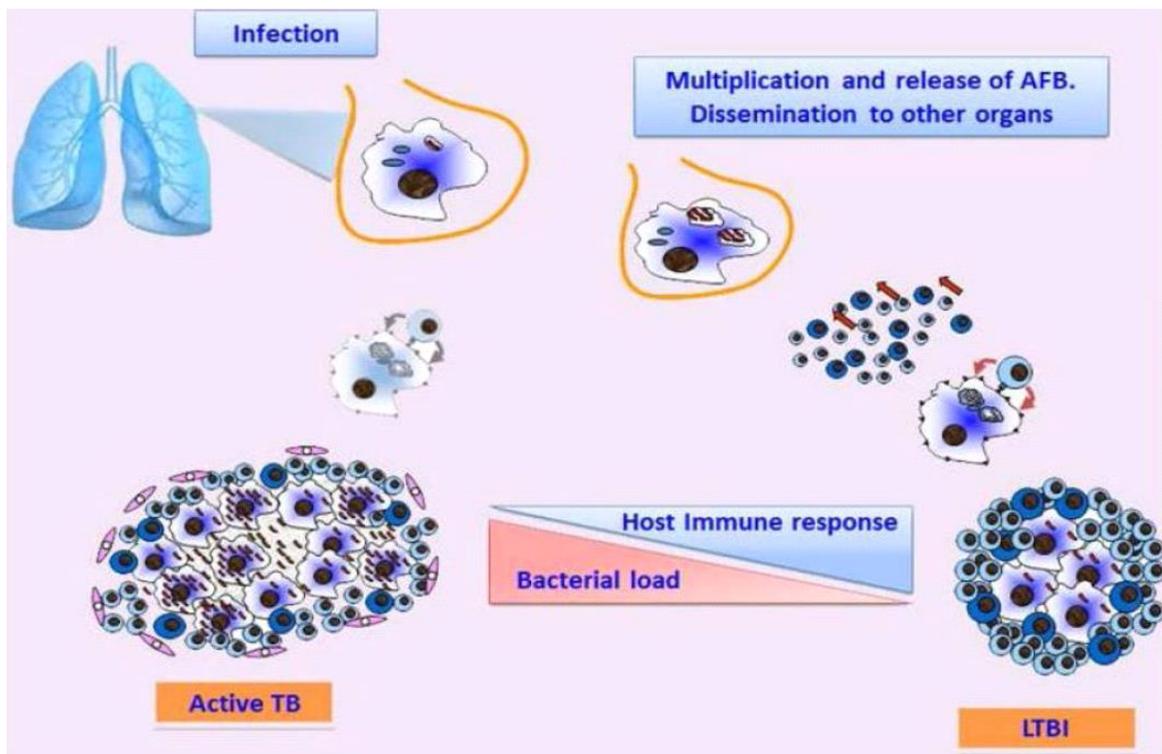
Dentro deste grupo de macroalgas, chama-se a atenção para as algas coralinas (Corallinales, Rhodophyta) geniculadas produtoras de uma grande variedade de substâncias químicas, tais como hidrocarbonetos (Ahmed *et al.* 2011; Cikos *et al.* 2021), carotenóides (Esteban *et al.* 2008; Cikos *et al.* 2021), terpenóides (Akbari *et al.* 2020; Elangovan & Anantharaman, 2019), ácidos graxos (Caf *et al.* 2019; Cikos *et al.* 2021), esteróis (El-Ansary & Hamouda, 2014; Caf *et al.* 2019), saponinas (Premarathna *et al.* 2020; Elangovan & Anantharaman, 2019), taninos, alcalóides, flavonóides (Akbari *et al.* 2020; Premarathna *et al.* 2020), esteróides (Elangovan & Anantharaman, 2019) e terpenos (Premarathna *et al.* 2020). Estas substâncias estão envolvidas em diversas atividades farmacológicas, tais como antitumoral (Harada & Kamei, 1997; Ahmed *et al.* 2011; Premarathna *et al.* 2020), anti-helmíntica (Awad, 2004), antifúngica (Bhosale *et al.* 1999; Raj *et al.* 2019) antioxidante (Chakraborty & Raola, 2018; Dixit & Reddy, 2017; Pinteus *et al.* 2017; Essa *et al.* 2018) antiviral (Premarathna *et al.* 1994; Mofeed *et al.* 2021) e antibacteriana (El-Zamkan *et al.* 2021; Mofeed *et al.* 2021), por exemplo.

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa e o principal agente etiológico de TB em humanos é o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Delogu *et al.* 2013; WHO, 2021). Esta doença afeta principalmente os pulmões (tuberculose pulmonar), cerca de 80% dos casos, mas pode atingir outras áreas extrapulmonares (TB pleural, TB ganglionar periférica, TB meningoencefálica, TB pericárdica e TB óssea) (Ankrah *et al.* 2018; Ministério da saúde, 2019). Antes da pandemia do coronavírus (COVID-19), a TB era a principal causa de mortes por um único agente infeccioso, que acometeu aproximadamente 10 milhões da população mundial em 2020 (WHO, 2021) (**Figura 18**). No Brasil, em 2019, foram diagnosticados 73.864 casos novos de TB, correspondendo a um coeficiente de incidência de 35 casos/100 mil habitantes (Ministério da saúde, 2020).



**Figura 18:** Taxa de incidência global de casos de tuberculose (TB) em 2020. Número de casos estimados por 100.000 habitantes/ano (WHO, 2021).

Os bacilos inalados através de gotículas de aerossóis se alojam nos alvéolos pulmonares e são rapidamente fagocitados por macrófagos alveolares, que são as principais células de defesa à resposta imune inata (**Figura 19**). Uma vez que os macrófagos conseguem entrar em ação, a replicação bacteriana pode ser controlada em cerca de 90-95% dos casos, podendo ser eliminadas pelas células do sistema imune ou entrar em estado de latência, no qual é estabelecido um equilíbrio dinâmico entre as bactérias e as células de defesa do hospedeiro. No entanto, quando ocorre a falha destas células na eliminação da bactéria, inicia-se o processo de multiplicação bacteriana, ocasionando dano tecidual e ocorrência ativa da doença. Além disso, pode ocorrer a disseminação para outros órgãos, promovendo infecções extrapulmonares (Delogu *et al.* 2013; Parbhoo *et al.* 2020).



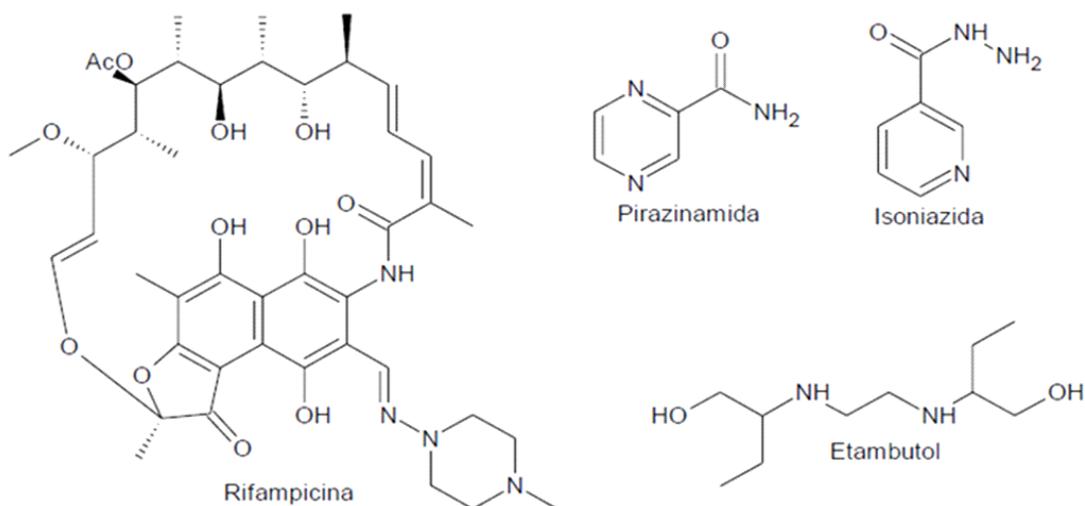
**Figura 19:** Representação da resposta imune à infecção por *M. tuberculosis*. Fonte: Delogu *et al.* 2013.

Os macrófagos alveolares são células de defesa que produzem os mediadores inflamatórios como o óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), por exemplo, que desempenham um papel muito importante na produção da reação inflamatória, processo essencial para combater uma variedade de estímulos e condições nocivas, como infecção e lesão tecidual. No entanto, cepas hipervirulentas podem induzir a produção excessiva destes mediadores, contribuindo para a gravidade da patologia (Delogu *et al.* 2013; Schorey & Schlesinger, 2016; Scriba *et al.* 2017; Ventura *et al.* 2015; Araújo *et al.* 2021).

Os principais desafios no controle e erradicação desta patologia é o aparecimento de cepas resistentes aos fármacos disponíveis no mercado, a alta prevalência de coinfeções/comorbidades, tais como pacientes coinfectados por HIV, imunossuprimidos, indivíduos desnutridos. Também inclui outros fatores como, aglomerações residenciais; consumo de drogas lícitas e baixa adesão terapêutica (Nava-Aguilera *et al.* 2009; Ankrah *et al.* 2018; WHO, 2021, Fonseca *et al.* 2015;

Nguyen, 2016; Matteelli *et al.* 2018). Além disso, no panorama atual, o sinergismo entre TB e COVID-19 diminui as chances de sobrevivências dos indivíduos contaminados (Crisan-Dabija *et al.* 2020; Sy *et al.* 2020).

Os medicamentos mais importantes usados no tratamento desta doença são rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (**Figura 20**), conhecidos como fármacos de primeira linha, apresentando um período mais curto de tratamento (Ministério da saúde, 2019; WHO, 2021). Já no tratamento contra cepas resistentes, que inclui o uso dos medicamentos de segunda linha tais como moxifloxacina, levofloxacina, amicacina, canamicina e capreomicina, é um tratamento mais longo do que a primeira escolha (Matteelli *et al.* 2018). Na terapia adjuvante direcionado ao hospedeiro, outros fármacos da classe dos corticosteroides (dexametasona, prednisolona, aspirina, ibuprofeno e Indometacina), por exemplo, também estão sendo utilizados, no tratamento de tuberculose pulmonar severa, sendo fundamental para prevenir ou desenfrear os danos provocados por esta patologia, visto que, possuem grande capacidade de inibir a produção de mediadores inflamatórios (Kadhiravan & Deepanjali, 2010; Schutz *et al.* 2018; Young *et al.* 2019).



**Figura 20:** Estruturas químicas dos principais medicamentos usados no tratamento da tuberculose.

Neste sentido, existe uma importante necessidade de explorar novas alternativas de tratamento e os produtos naturais provenientes de organismos marinhos é uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos fármacos, já que, várias espécies apresentam o potencial farmacológico (Dmytryk *et al.* 2017; Bhowmick *et al.* 2020; Clementino *et al.* 2020), incluindo a atividade antimicrobiana (Ventura *et al.* 2015; García-Davis *et al.* 2020).

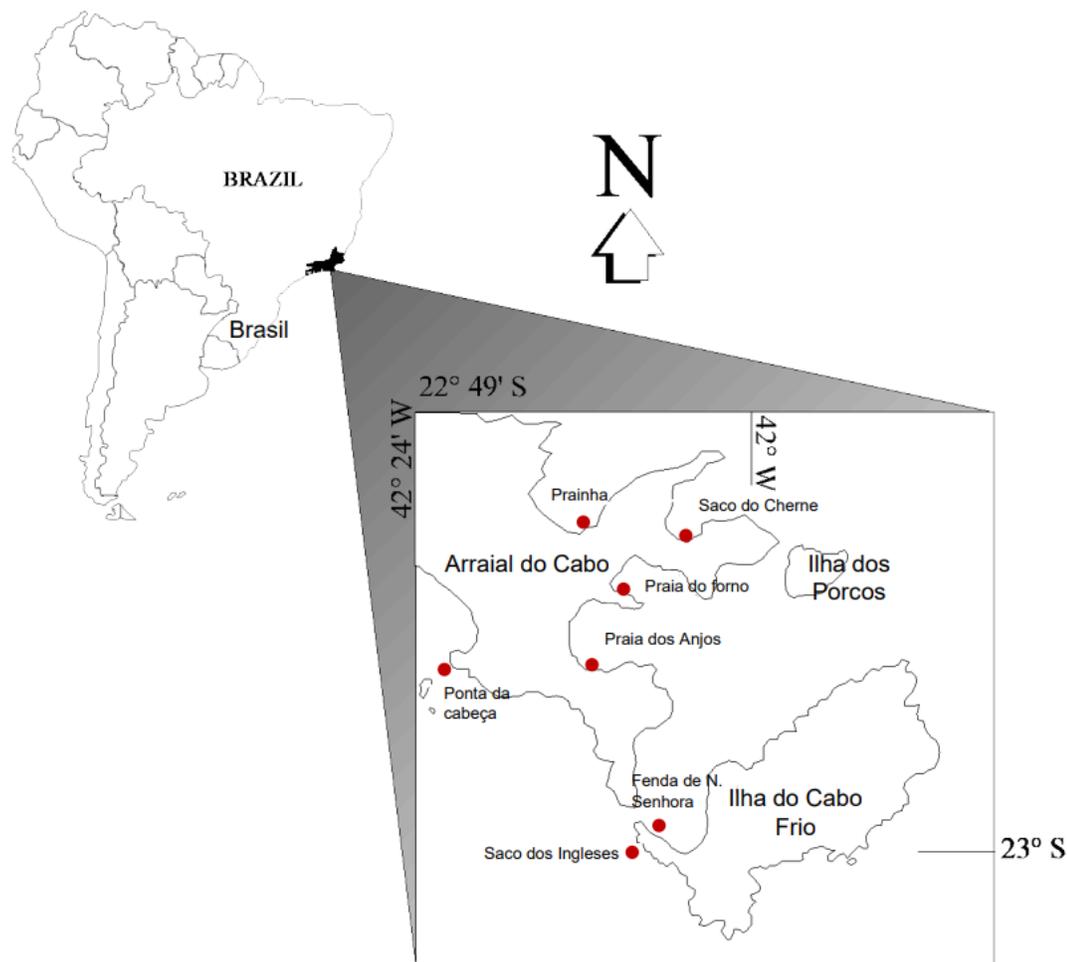
Tendo em vista o potencial farmacológico das macroalgas calcárias geniculadas e a escassez de estudos deste grupo na costa brasileira, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e a citotoxicidade dos extratos brutos e frações de quatro espécies (*Amphiroa beauvoisii*, *Jania crassa*, *Cheilosporum sagittatum*, *Arthrocardia flabellata*) coletadas em diferentes áreas de Arraial do Cabo/RJ.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta do material biológico**

As macroalgas foram coletadas manualmente, com auxílio de uma espátula, nas regiões entremarés e infralitoral (mergulho autônomo), no verão de 2018 (janeiro a março). As amostras foram coletadas em áreas distintas de Arraial do Cabo/RJ (**Figura 21**), sendo elas: Fenda de Nossa Senhora, Prainha, Praia do Forno, Saco do Cherno (costão e banco de algas), Praia dos Anjos, Saco dos ingleses e Ponta da Cabeça. Vale ressaltar que, para cada área foi selecionado um único local de raspagem do material biológico. Saco dos ingleses e Ponta da Cabeça são áreas de ressurgência, fenômeno oceanográfico caracterizado pelo afloramento de águas profundas, frias e ricas em nutrientes que se deslocam para a superfície. Este fenômeno é sazonal, ocorrendo com mais intensidade no período da primavera e verão, principalmente devido ao aumento da intensidade do vento nordeste (Calado *et al.* 2020). As demais amostras foram coletadas em áreas que não recebem influência direta deste fenômeno. As amostras foram colocadas em sacos herméticos e

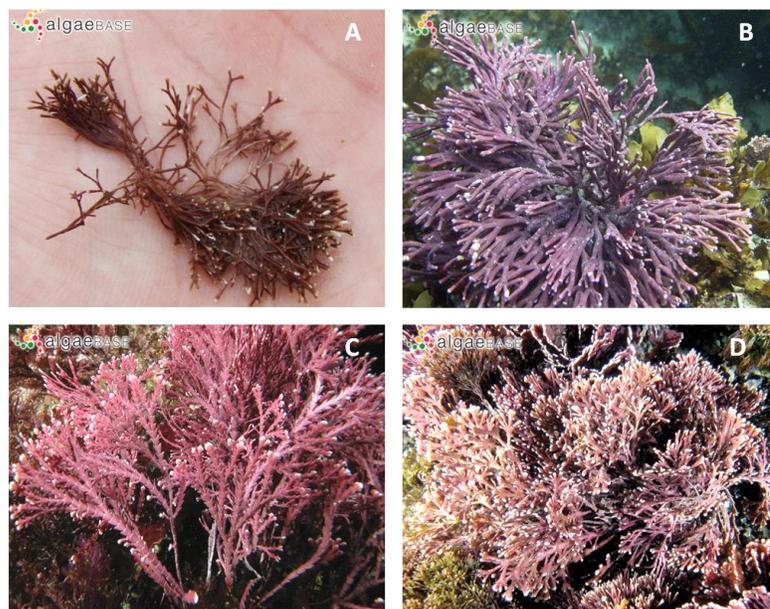
transportadas para o laboratório do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira (IEAPM), em caixa térmica. Posteriormente, foram lavadas em água do mar para eliminação de areia e organismos associados, congeladas e liofilizadas.



**Figura 21:** Localização geográfica das áreas de coleta das algas calcárias geniculadas em diferentes áreas (em vermelho) de Arraial do Cabo/RJ: Fenda de Nossa Senhora, Prainha, Praia do Forno, Saco do Cherne (costão e banco de algas), Praia dos Anjos, Saco dos Ingleses e Ponta da Cabeça.

Nove amostras foram coletadas, sendo cinco da espécie *Amphiroa beauvoisii*, duas da espécie *Jania crassa*, uma da espécie *Cheilosporum sagittatum* e uma da espécie *Arthrocardia flabellata* (**Figura 22**). A identificação foi realizada pelo pesquisador Dr. Frederico Tapajós de Souza Tâmega de acordo com as características

morfológicas e todo o material botânico foi depositado na coleção científica do IEAPM (Tabela 9).



**Figura 22:** Espécies de algas calcárias coletadas em diferentes áreas de Arraial do Cabo/RJ. **A:** *Jania crassa*; **B:** *Amphiroa beauvoisii*; **C:** *Cheilosporum Sagittatum*; **D:** *Arthrocardia flabellata*. Fonte: Algaebase.

**Tabela 9:** Espécies de macroalgas calcárias geniculadas amostradas e os seus locais de coleta.

Espécies	Código	Local de coleta	Peso úmido (g)	Coordenadas	Nº do tomo na coleção científica
<i>Amphiroa beauvoisii</i> J.V.Lamouroux 1816	AbFNS	Fenda de Nossa Senhora	400,00	22°57'39.4"S, 42°01'12.0"W	3372
<i>Amphiroa beauvoisii</i> J.V.Lamouroux 1816	AbP	Prainha	474,40	22°58'06.1"S, 42°00'54.2"W	3373
<i>Amphiroa beauvoisii</i> J.V.Lamouroux 1816	AbPF	Praia do Forno	184,95	22°59'58.9"S, 42°00'40.2"W	3374
<i>Amphiroa beauvoisii</i> J.V.Lamouroux 1816	AbSCB	Saco do Cherne (banco)	192,24	22°57'37.1"S, 42°00'25.5"W	3375
<i>Amphiroa beauvoisii</i> J.V.Lamouroux 1816	AbSCC	Saco do Cherne (costão)	265,53	22°57'37.1"S, 42°00'25.5"W	3376
<i>Cheilosporum sagittatum</i> (J.V.Lamouroux) Areschoug 1852	CsSI	Saco dos Ingleses	207,48	23°00'01.1"S, 42°00'46.8"W	3377
<i>Jania crassa</i> J.V.Lamouroux 1821	JcPA	Praia dos Anjos	213,37	22°58'43.9"S, 42°01'06.5"W	3378
<i>Jania crassa</i> J.V.Lamouroux 1821	JcP	Prainha	309,11	22°57'39.4"S, 42°01'12.0"W	3379
<i>Arthrocardia flabellata</i> (Kützinger) Manza 1940	AfPC	Ponta da cabeça	117,45	22°58'36.1"S, 42°02'06.9"W	3380

## 2.2 Preparação dos extratos

As algas liofilizadas foram extraídas numa mistura de metanol: acetato de etila (MeOH: AcOEt 1:1 v/v) em três intervalos (2h, overnight, 2h), na proporção de 3,5 mL de solução para 1g de peso seco da amostra, e sonificadas por 30 minutos a cada intervalo. Posteriormente os extratos foram filtrados e secos com o auxílio de um evaporador rotatório sob pressão reduzida. A **Figura 23** representa as etapas empregadas no processo de extração realizado para todas as amostras coletadas. Após o processo de extração, o rendimento (%) foi obtido através da razão da massa de extrato bruto pela massa de alga liofilizada.

$$\% R = \frac{m(\text{Eb})}{m(\text{Al})} \times 100$$

Em que,

% R = percentual de rendimento

m(Eb) = massa de extrato bruto

m(Al) = massa de alga liofilizada

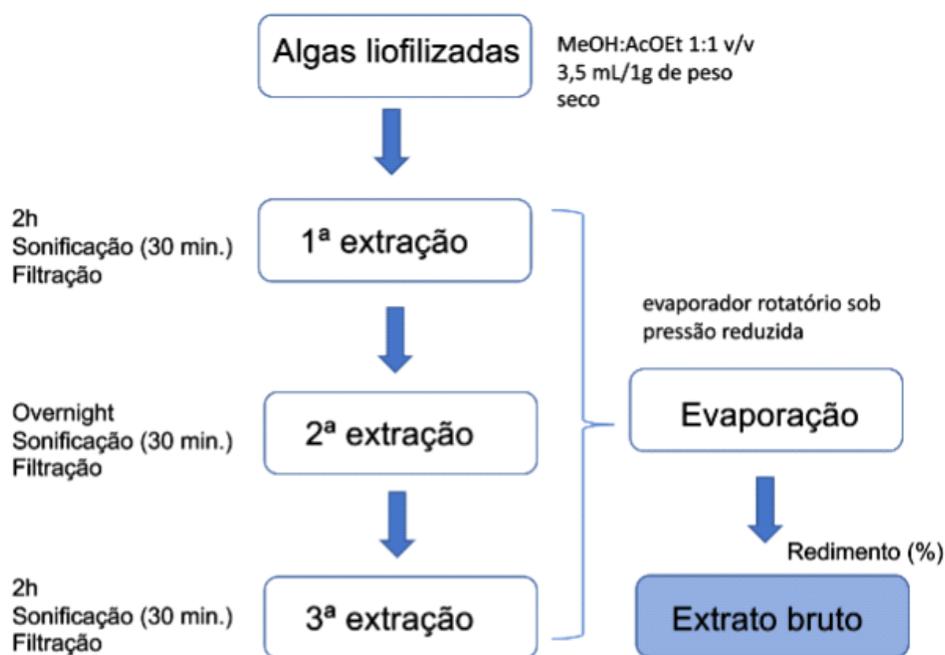


Figura 23: Etapas empregadas no processo de extração das algas calcária geniculadas.

## 2.3 Atividade antimicrobacteriana, anti-inflamatória e citotóxica

### 2.3.1 Cultura e atividade antimicrobacteriana

Duas cepas de micobactérias foram usadas neste estudo: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) - cepa de laboratório de baixa virulência e *M. tuberculosis* M299 - altamente virulenta (isolada de paciente em Moçambique). As cepas foram cultivadas em meio 7H9 Middlebrook 7H9 suplementado com 0,05% de Tween 80 e ADC a 10% (complexo de albumina dextrose catalase - Difco Laboratories), incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 7 dias.

Na fase de crescimento logarítmico, a suspensão bacteriana foi aplicada em placas de 96 poços (1 × 10<sup>6</sup> CFU/poço) contendo os extratos brutos em quatro concentrações (0,8, 4,0, 20, 100 µg/mL), que foram diluídos previamente no solvente dimetilsulfóxido (DMSO). O fármaco rifampicina (Sigma Aldrich, 95% de pureza) foi

utilizado como controle positivo nas concentrações de 0,0032; 0,016; 0,08 e 1 µg/mL no ensaio com a *M. tuberculosis* H37Rv. Já no ensaio com a *M. tuberculosis* M299, o controle positivo foi utilizado nas concentrações de 0,008; 0,04; 0,2 e 10 µg/mL. As placas foram incubadas por 5 dias a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, posteriormente, 10 µL do sal de tetrazol (MTT: 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-defeniltetrazol, Sigma Aldrich, em 5 mg/mL de PBS estéril) foi adicionado. O método colorimétrico de MTT avalia a funcionalidade mitocondrial das células, utilizando o sal de tetrazol (3-(4,5dimetiltiazol-2-il) -2,5- difenil tetrazol), que uma vez metabolizado pelas enzimas desidrogenases mitocondriais das células viáveis é convertido num cristal de formazan (Mosmann, 1983). Após 3 horas de incubação, as células foram lisadas utilizando 100 µL de tampão de lise (20% v/v SDS/ 50% dimetilformamida – DMF - em água destilada, pH 4.7). A placa foi incubada por uma noite e a leitura foi feita por espectrofotometria em 570 nm. Foram duas réplicas por tratamento e o teste foi realizado em duplicata, de onde calculou-se a média e o desvio padrão.

### **2.3.2 Cultura de macrófagos e atividade anti-inflamatória**

As células de macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 obtidos da American Type Culture Collection (ATCC) foram cultivadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em meio de cultura *Dulbecco's Eagle* modificado F-12 (DMEM-F12) (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (5 x 10<sup>4</sup> células/poço) e incubadas por 24h na presença de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C, para adesão dos macrófagos e estabilidade da cultura. Após este período, o sobrenadante da cultura, foi removido cuidadosamente (para retirada de células não aderentes). Parte do sobrenadante (já tratado com os extratos nas concentrações de 0,8, 4,0, 20, 100 µg/mL) foi coletado para avaliar a capacidade de inibição dos mediadores inflamatórios: NO e TNF-α.

### Quantificação do Óxido Nítrico (NO)

Para a avaliação da inibição do mediador inflamatório NO, foi realizada a quantificação indireta, medindo-se a concentração de nitrito no sobrenadante. Uma alíquota de 50 µL do sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados e tratados foi transferida para uma nova microplaca de 96 poços à qual foram adicionados 50 µL de reagente de Griess (p-aminobenzenosulfonamida 1% + diidrocloreto de naftiletilenodiamino 0,1% em 5% de ácido fosfórico, Sigma Aldrich) (Griess, 1939). Após 10 minutos, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro de placa. O fármaco padrão, LNMMA (acetato de NG-metil-L-arginina, Sigma Aldrich), foi utilizado nas mesmas concentrações dos tratamentos (0,8, 4,0, 20, 100 µg/mL), para fins de comparação de potencial de atividade inibitória da produção de NO. Este fármaco é conhecido pela capacidade de inibir a enzima iNOS (responsável pela produção de NO).

### Quantificação do fator de necrose tumoral (TNF-α)

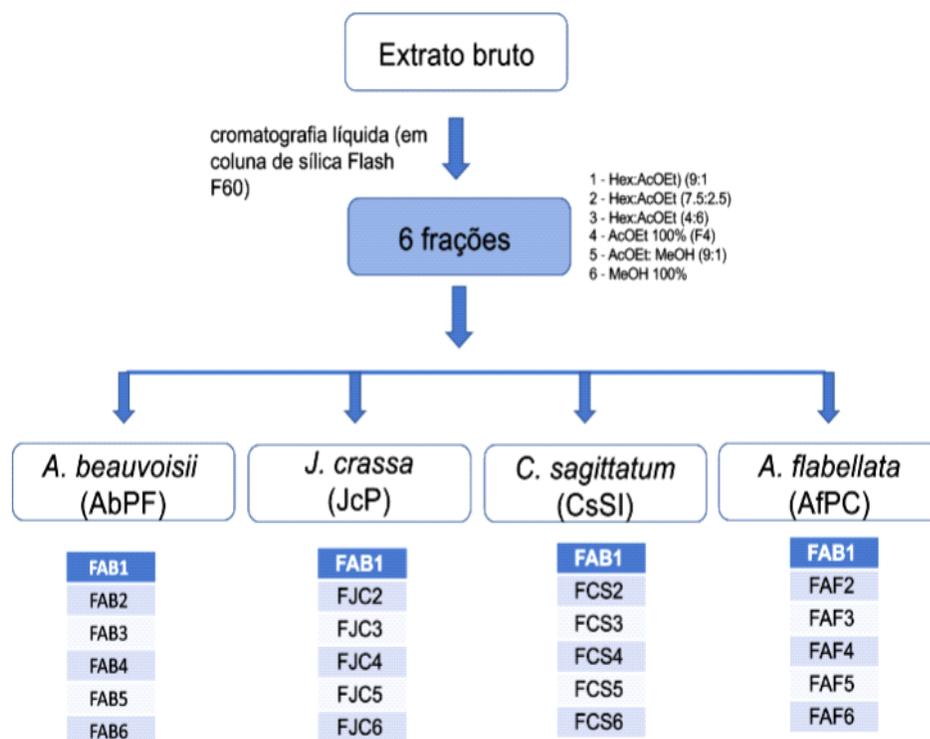
Fibroblastos murinos L929 foram utilizados para quantificação indireta da inibição da produção de TNF-α. As células L929 ( $2,5 \times 10^5$  células/mL) foram plaqueadas em placa de 96 poços com DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h. Posteriormente, o sobrenadante da cultura foi removido e foram adicionados 50 µL do sobrenadante celular proveniente do cultivo de macrófagos (estimulados e tratados com os extratos) e 50 µL do meio de cultivo DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB e actinomicina D (2 µg/mL) foram acrescentados a cada poço. Após o período de incubação de 24h, o método de MTT foi empregado (MOSMANN, 1983). A concentração de TNF-α no sobrenadante foi mensurada em pg/mL. O ibuprofeno foi utilizado como controle positivo da inibição de TNF-α nas mesmas concentrações dos tratamentos (0,8, 4,0, 20, 100 µg/mL).

### 2.3.3 Citotoxicidade em macrófagos

As células de macrófagos aderentes diluídas previamente em meio DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB contendo lipopolissacarídeo na concentração de 1µg/mL (LPS, *Escherichia coli* 055: B5; Sigma-Aldrich, USA) foram tratadas com os extratos nas concentrações de 0,8; 4; 20 e 100 µg/mL. Para a avaliação da citotoxicidade celular na cultura de macrófagos tratada com os extratos brutos, foram acrescentados 10 µL de MTT (5 mg/mL, Sigma Aldrich) em cada poço. Após 3 h de incubação a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> na ausência de luz, visualizou-se a formação dos cristais de formazan. O sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram solubilizados em isopropanol adicionado de ácido clorídrico (HCl) (4mM). A leitura foi realizada no espectrofotômetro de placa a 570nm (Dinatech MR5000) (Mosmann,1983) e os valores obtidos foram convertidos em percentual de citotoxicidade.

### 2.4 Fracionamento dos extratos brutos

O fracionamento foi guiado através dos resultados obtidos com os extratos brutos mais ativos das macroalgas coralinas. Os extratos brutos de *A. beauvoisii* (AbPF), *J. crassa* (JcP), *C. sagittatum* (CsSI) e *A. flabellata* (AfPC) foram submetidos a cromatografia líquida em coluna (sílica Flash F60 - *Silicycle*), com auxílio da bomba a vácuo e diferentes sistemas solventes orgânicos (**Figura 24**). Seis frações foram obtidas para cada amostra selecionada. Posteriormente, as frações foram testadas para avaliar as atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e citotóxica, utilizando os métodos já descritos no presente capítulo (**2.3**).



**Figura 24:** Esquema do fracionamento dos extratos brutos mais ativos através da cromatografia líquida a vácuo com diferentes sistemas solventes orgânicos.

## 2.5 Perfil químico das frações (coluna) mais ativas

As frações de *J. crassa* (FJC1, FJC2 e FJC3) e *A. flabellata* (FAF2, FAF3 e FAF4) foram as mais ativas em comparação as demais, e, portanto, foram analisadas através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Os perfis químicos foram obtidos através da análise realizada em equipamento Shimadzu CG-2010 acoplado ao espectrômetro de massas QP-2010 ultra, composto por auto injetor AOC-20i e uma coluna capilar de sílica fundida Rtx-1MS 30m x  $\Phi_{int}$  0,25mm da Restek Corporation (EUA). O método utilizado teve fluxo de injeção de 1,20 mL/min no modo *split*, com razão de 1/5. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste; a temperatura do injetor foi de 280 °C e a coluna foi aquecida a 150 °C por 3 minutos, seguido de rampa até 300 °C (taxa de 6°C/min) e ao final permanecendo a 300 °C por 5 minutos, totalizando 33 minutos de análise. O detector de massas foi utilizado no

modo de impacto de elétrons (70eV), com interface a 300 °C e a fonte de íons a 200 °C. Devido à complexidade das amostras, as substâncias das frações mais ativas foram identificadas através da comparação dos seus espectros de massa com os disponíveis na biblioteca NIST11, levando em consideração a similaridade  $\geq 85\%$  e área  $\geq 1\%$ .

Os cromatogramas obtidos através do CG-EM foram convertidos em formato cdf (Computable Document Format) e inseridos na plataforma do GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) criando uma rede molecular, através da similaridade dos espectros de cada substância. Além disso, uma tabela de metadados (com frações ativas e não ativas) foi criada para conseguir identificar as classes químicas e também as substâncias presentes nas frações mais ativas. Os resultados foram processados no programa Cytoscape, permitindo identificar similaridades químicas entre as substâncias das algas calcárias estudadas. Devido à complexidade das amostras, alguns parâmetros foram levados em considerações, como valor de cosseno  $\geq 0,7$ . Os dados obtidos nesta plataforma foram comparados a biblioteca NIST11, através dos espectros de massa e do tempo de retenção para obtenção de um resultado mais robusto.

## **2.6 Cromatografia Contracorrente (CCC)**

As frações de *J. crassa* (JcP) e *A. flabellata* (AfPC) obtidas na cromatografia líquida de coluna foram as mais promissoras frente aos modelos testados, no entanto, não foi possível obter massa suficiente para realização da cromatografia contracorrente. Desta forma, os extratos brutos das mesmas foram utilizados para obtenção de frações purificadas.

### **2.6.1 Teste do sistema de solventes**

A composição bifásica de solventes HEMWat (hexano/acetato de etila/metanol/água) (**Tabela 10**) foi utilizada como base para escolher os melhores

sistemas para o isolamento das substâncias. Uma pequena quantidade de extrato (2mg) foi utilizada nos testes de partição em tubos de ensaio. Os tubos foram agitados e a separação entre as fases foi observada em cada teste, levando em consideração o tempo <30s e a não formação de emulsão. Alíquotas equivalentes de cada fase (superior e inferior) foram analisadas separadamente em placas de cromatografia de camada delgada (CCD).

**Tabela 10:** Testes com o sistema bifásico de solventes HEMWat.

Número	Hex	AcOet	MeOH	H <sub>2</sub> O
-7	9	1	9	1
-5	7	3	7	3
-3	6	4	6	4
-2	7	3	5	5
-1	6	4	5	5
0	5	5	5	5
+1	4	6	4	6
+2	3	7	5	5
+3	4	6	4	6
+6	2	8	2	8
+7	1	9	1	9

Hex: hexano; AcOet: acetato de etila; MeOH: metanol; H<sub>2</sub>O: água

Alguns ajustes foram necessários, com a finalidade de obter melhores resultados, e dois sistemas foram utilizados para realizar o fracionamento (**Tabela 11**), levando em consideração a distribuição semelhante da substância alvo entre as duas fases (superior e inferior), apresentando  $K_d = 1$ .

**Tabela 11:** Sistemas selecionados para realizar o fracionamento após o ajuste.

Sistema 1	Hex	AcOet	MeOH	H <sub>2</sub> O
	6	3	6	4
Sistema 2	Hex	AcOet	ACN	
	1	0,1	1	

Hex: hexano; AcOet: acetato de etila; MeOH: metanol; H<sub>2</sub>O: água; ACN: acetonitrila

## 2.6.2 Fracionamento por Contracorrente (CCC)

O primeiro sistema foi utilizado para fazer uma partição mais específica das frações polares e frações apolares e o segundo sistema foi utilizado nas frações apolares (mais ativas contra os modelos testados) para obtenção de frações mais purificadas (**Tabela 11**). A mesma metodologia foi utilizada nos dois sistemas escolhidos. A mistura de solventes foi equilibrada, inicialmente em um funil de separação à temperatura ambiente, separadas (fase superior e fase inferior) e sonificadas em Ultra Cleaner 800A (Unique®, São Paulo, Brasil) por 10 minutos. A coluna foi preenchida com a fase estacionária (fase superior) em uma taxa de fluxo de 5 mL/min sem rotação. A rotação foi ligada na velocidade de 850 rpm, e a fase móvel (fase inferior) foi bombeada a uma taxa de fluxo de 2 mL/min. A retenção da fase estacionária (Sf) foi determinada medindo o volume de deslocamento da fase estacionária até alcançar o equilíbrio hidrodinâmico no equipamento, posteriormente, este volume foi subtraído do volume total da coluna e calculou-se a porcentagem de fase estacionária que permaneceu dentro da coluna (>80%). Cerca de 500mg de extrato bruto foi solubilizado em 9 mL do sistema de solvente escolhido e injetado no equipamento numa eluição de fase reversa (cabeça-cauda). Noventa frações foram obtidas em cada CCC e analisadas inicialmente em placas de CCD com o propósito de reunir aquelas com perfis semelhantes. Repetições da CCC foram realizadas com a finalidade de obter mais massa das frações purificadas, e posteriormente, foram analisadas no CG-EM.

A análise foi realizada em equipamento Shimadzu CG-2010 acoplado ao espectrômetro de massas QP-2010 ultra, composto por auto injetor AOC-20i e uma coluna capilar de sílica fundida Rtx-1MS 30m x  $\Phi$ int 0,25mm da Restek Corporation (EUA). O método utilizado teve fluxo de injeção de 1,20 mL/min no modo splitless,. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste; a temperatura do injetor foi de 260 °C e a coluna foi aquecida a 60 °C por 3 minutos, seguido de rampa de temperatura até 290 °C (taxa de 5°C/min) e ao final permanecendo a 290°C por 15 minutos totalizando 75 minutos de análise. O detector de massas foi utilizado no modo de impacto de elétrons

(70eV), com interface a 280°C e a fonte de íons a 260 °C. O detector de massas permitiu a identificação das substâncias majoritárias de cada fração mais purificada através da similaridade às registradas no banco de dados do aparelho mediante similaridade  $\geq 85\%$  biblioteca NIST 11.

## 2.7 Análises estatísticas

Os resultados das atividades antimicobacteriana, citotóxica e anti-inflamatória foram expressos em porcentagem. As premissas de normalidade e a homogeneidade foram verificadas através dos testes de Shapiro-Wilk e Cochran C, respectivamente, com nível de confiança de 95%. Valores de  $p < 0,05$ , obtidos através da ANOVA unifatorial, foram considerados significativos. O teste *a posteriori* de Tukey foi empregado para comparar as diferenças entre os controles e tratamentos.

Valores de  $IC_{50}$ ,  $MIC_{50}$  e  $CC_{50}$  foram obtidos através de regressão não-linear das curvas de concentração-resposta, usando GraphPad Prism 6. Para os extratos mais ativos, os seguintes critérios foram levados em consideração:  $IC_{50} \leq 45 \mu\text{g/mL}$ ;  $CC_{50} > 70 \mu\text{g/mL}$  e  $MIC_{50} \leq 40 \mu\text{g/mL}$ .

Valores de  $MIC_{50}$  (ou  $MIC_{90}$ ),  $IC_{50}$  e  $CC_{50}$  foram obtidos através de regressão não-linear das curvas de concentração-resposta (GraphPad Prism 6) para as atividades antimicobacteriana, anti-inflamatória e citotóxica, respectivamente. Para os tratamentos mais ativos, os seguintes critérios foram levados em consideração:  $MIC_{50}$  (ou  $MIC_{90}$ )  $\leq 40 \mu\text{g/mL}$ ,  $IC_{50} \leq 45 \mu\text{g/mL}$ ;  $CC_{50} > 70 \mu\text{g/mL}$ , de acordo com o Instituto de padrões clínicos e laboratoriais.

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Atividade dos extratos quanto a inibição de cepas micobacterianas

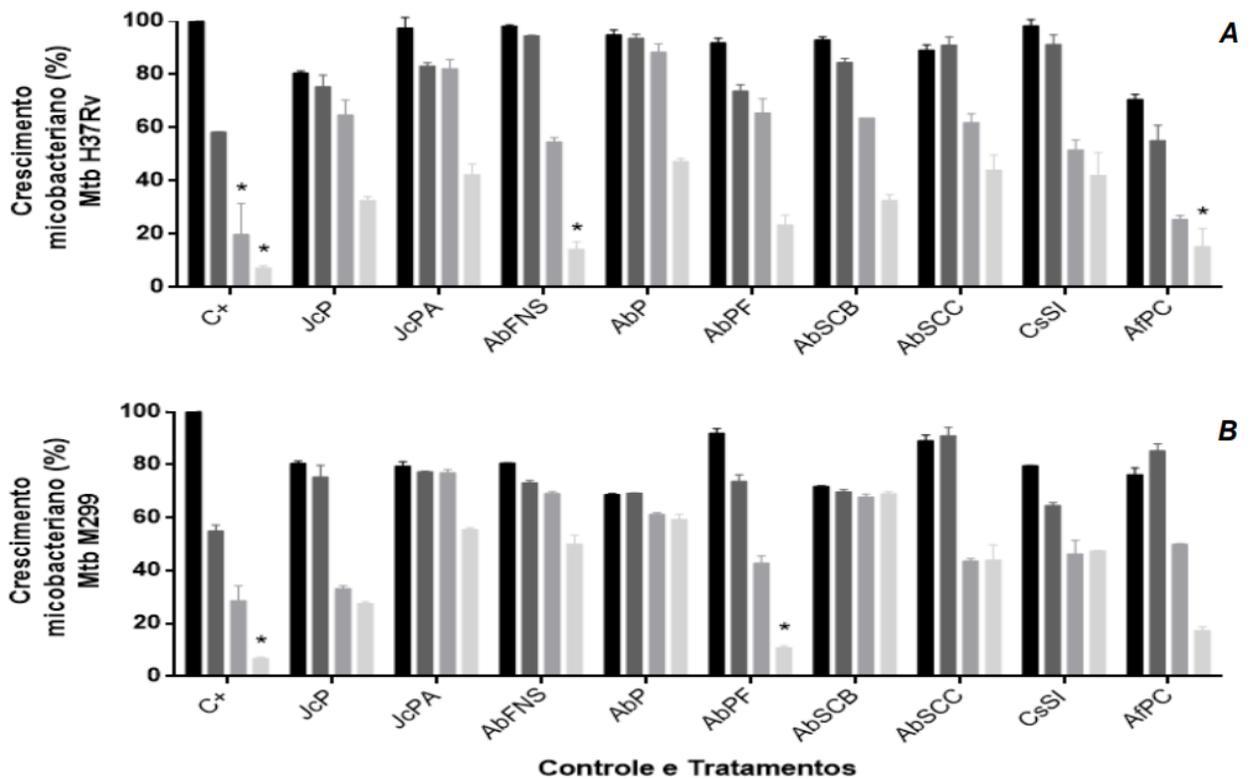
Quando levamos em consideração a concentração mínima inibitória ( $MIC_{50}$ ), dentre os nove extratos testados, seis apresentaram atividade micobacteriana contra a cepa Mtb H37RV e, cinco contra a cepa hipervirulenta Mtb H37R. Diferenças

significativas foram observadas mediante a comparação entre as diferentes concentrações do controle e tratamentos (**Tabela 12**).

**Tabela 12:** ANOVA da atividade antimicobacteriana dos extratos das algas calcárias geniculadas.

Micobactérias	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	F	p
Mtb H37RV	61176,2	39	108,10	<0,001
Mtb M299	39853,6	39	212,50	<0,001

As concentrações mais ativas do antibiótico rifampicina contra a cepa Mtb H37RV foram 0,08 e 1 µg/mL e contra a cepa Mtb M299 foi a concentração de 10 µg/mL. Já os extratos mais ativos contra a micobactéria Mtb H37RV foram *A. beauvoisii* (AbFNS) e *A. flabellata* (AfPC) na concentração de 100 µg/mL (**Figura 25A**). Contra a cepa Mtb M299, o extrato mais ativo foi *A. beauvoisii* (AbPF) na maior concentração testada (100 µg/mL) (**Figura 25B**).



**Figura 25:** Efeito dos extratos das algas calcárias geniculadas no crescimento de cepas micobacterianas em diferentes concentrações (0,8; 4; 20 e 100 µg/mL). **(A)** cepa laboratorial - Mtb H37Rv **(B)** cepa hipervirulenta - Mtb M299. O antibiótico rifampicina (controle positivo - C+) foi usado nas concentrações de 0,0032; 0,016; 0,08 e 1 µg/mL para a cepa laboratorial - Mtb H37Rv e de 0,008; 0,04; 0,2 e 10 µg/mL para a cepa hipervirulenta – Mtb M299. \*Concentrações mais ativas significativamente (controle e tratamento). AbFNS (*A. beauvoisii* - Fenda de Nossa Senhora); AbP (*A. beauvoisii* - Prainha); AbPF (*A. beauvoisii* - Praia do Forno); AbSCB (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne banco); AbSCC (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne costão); JcPA (*J. crassa* - Praia dos Anjos); JcP (*J. crassa* - Prainha); CsSI (*C. sagittatum* - Saco dos Ingleses) e AfPC (*A. flabellata* - Ponta da Cabeça). Os valores são representados pela média e desvio padrão. As barras representam às concentrações testadas (controle e tratamento) em ordem crescente. Adaptado Santo, 2021.

Os extratos mais ativos foram aqueles que apresentaram o valor de  $MIC_{50} \leq 40$  µg/mL (**Tabela 13**). Dentre todos os extratos testados, somente os extratos de *A. beauvoisii* (AbP e AbSCC) e *J. crassa* (JcPA) não foram considerados ativos contra a cepa laboratorial - MtbH37Rv, sendo o extrato de *A. flabellata* (AfPC) o mais ativo ( $MIC_{50}$  de  $4,6 \pm 1,3$  µg/mL). Em relação à cepa hipervirulenta – Mtb M299, os extratos de *A. beauvoisii* (AbFNS, AbP, AbSCB) e *J. crassa* (JcPA) não apresentaram atividade, já o extrato mais ativo foi de *J. crassa* - JcP ( $MIC_{50}$   $12,6 \pm 1,4$  µg/mL).

**Tabela 13:** Concentração inibitória mínima (MIC<sub>50</sub>) dos extratos das algas calcárias geniculadas contra cepa laboratorial – Mtb H37Rv e cepa hipervirulenta – Mtb M299.

Extratos brutos	MIC <sub>50</sub> (µg/mL)	
	Mtb H37Rv	Mtb M299
AbFNS	24,7 ± 1,1	63,3 ± 1,5
AbP	98,6 ± 1,1	≥ 100
AbPF	29,1 ± 1,2	15,0 ± 1,5
AbSCB	38,0 ± 1,1	≥ 100
AbSCC	51,2 ± 1,2	39,3 ± 1,2
CsSI	37,2 ± 1,3	25,3 ± 1,6
JcPA	73,5 ± 1,2	95,3 ± 1,4
JcP	34,4 ± 1,3	12,6 ± 1,4
AfPC	4,6 ± 1,3	19,2 ± 1,3
Rifampicina	0,11 ± 0,2	1,1 ± 0,1

AbFNS (*A. beauvoisii* - Fenda de Nossa Senhora); AbP (*A. beauvoisii* - Prainha); AbPF (*A. beauvoisii* - Praia do Forno); AbSCB (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne banco); AbSCC (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne costão); JcPA (*J. crassa* - Praia dos Anjos); JcP (*J. crassa* - Prainha); CsSI (*C. sagittatum* - Saco dos Ingleses) e AfPC (*A. flabellata* - Ponta da Cabeça). Adaptado Santo, 2021.

### 3.2 Atividade dos extratos quanto a inibição de mediadores inflamatórios (NO e TNF-α) e citotoxicidade

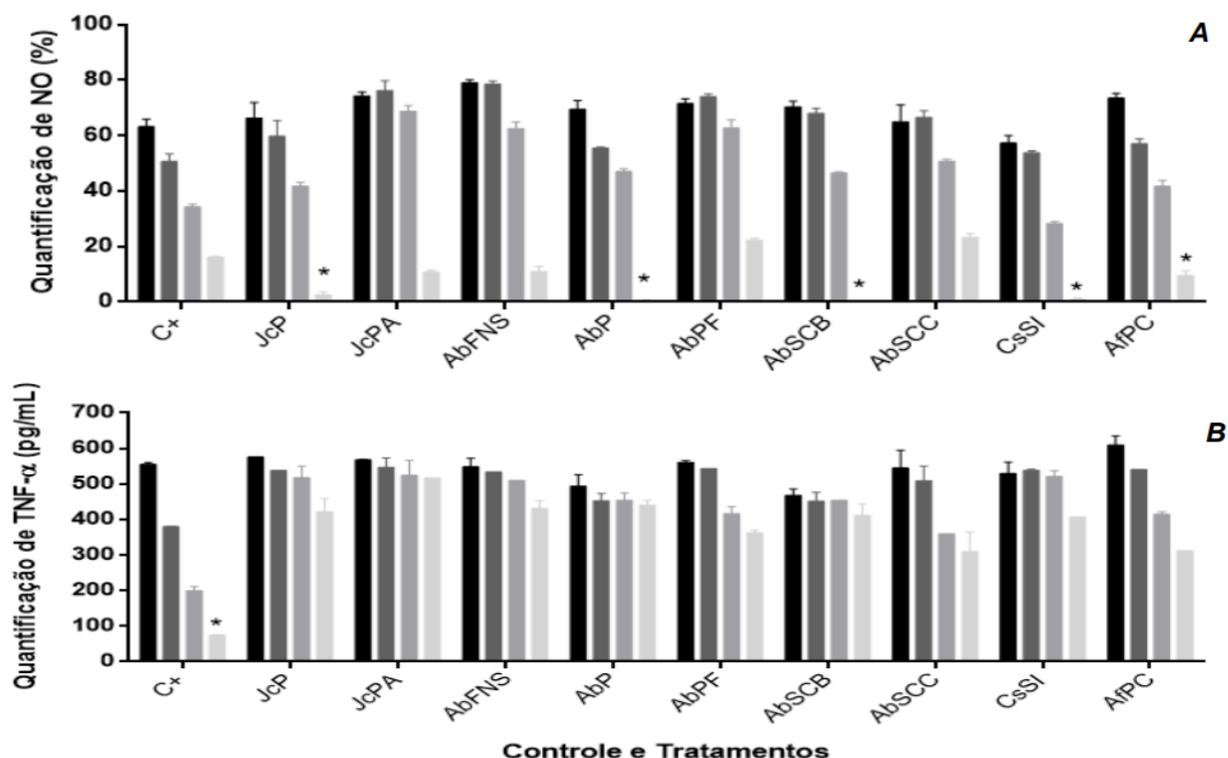
Quando levamos em consideração a concentração inibitória (IC<sub>50</sub>), dentre os nove extratos testados, oito apresentaram atividade anti-inflamatória contra o NO e, dois atividade anti-inflamatória contra o TNF-α. Diferenças significativas foram observadas mediante a comparação entre as diferentes concentrações do controle e tratamentos (**Tabela 14**).

**Tabela 14:** ANOVA da atividade anti-inflamatória dos extratos das algas calcárias geniculadas.

Mediadores inflamatórios	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	F	p
NO	51614,1	39	253,18	<0,001
TNF-α	888152	39	45,70	<0,001

Em relação à inibição de NO, os extratos de *J. crassa* (JcP), *A. beauvoisii* – AbSCB, *C. sagittatum* (CsSI) e *A. flabellata* (AfPC) foram os mais ativos na

concentração de 100 µg/mL (**Figura 26A**). Quanto à inibição de TNF-α, o fármaco ibuprofeno na concentração de 100 µg/mL foi o mais ativo (**Figura 26B**).



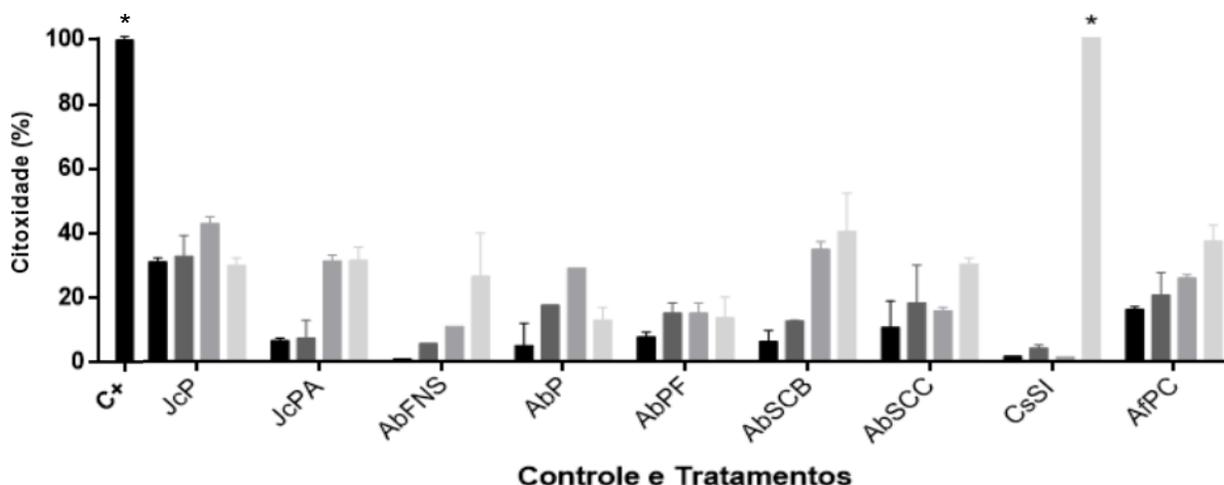
**Figura 26:** Efeito dos extratos algas calcárias geniculadas na produção de mediadores inflamatórios em diferentes concentrações (0,8; 4; 20 e 100 µg/mL). (A) NO (B) e TNF-α. Os controles positivos (C+) foram os fármacos L-NMMA e ibuprofeno (nas mesmas concentrações dos extratos) para o NO e o TNF-α, respectivamente. \*Concentrações mais ativas significativamente (controle e tratamento). AbFNS (*A. beauvoisii* - Fenda de Nossa Senhora); AbP (*A. beauvoisii* - Prainha); AbPF (*A. beauvoisii* - Praia do Forno); AbSCB (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne banco); AbSCC (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne costão); JcPA (*J. crassa* - Praia dos Anjos); JcP (*J. crassa* - Prainha); CsSI (*C. sagittatum* - Saco dos Ingleses) e AfPC (*A. flabellata* - Ponta da Cabeça). Os valores são representados pela média e desvio padrão. As barras representam às concentrações testadas (controle e tratamento) em ordem crescente. Adaptado Santo, 2021.

Quando levamos em consideração a concentração de citotoxicidade (CC<sub>50</sub>) frente aos macrófagos, dos nove extratos testados, oito não apresentaram efeito tóxico. Diferenças significativas foram observadas mediante a comparação entre as diferentes concentrações do controle e tratamentos (**Tabela 15**).

**Tabela 15:** ANOVA da atividade citotóxica dos extratos das algas calcárias geniculadas.

Citotoxicidade	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	F	p
Macrófagos	26453,26	36	26,241	<0,001

Os extratos não apresentaram efeito tóxico, exceto o extrato de *C. sagittatum* (CsSI) na concentração de 100 µg/mL e o controle positivo (**Figura 27**).



**Figura 27:** Atividade citotóxica dos extratos algas calcárias geniculadas contra macrófagos murinos em diferentes concentrações (0,8; 4; 20 e 100 µg/mL). A cultura de macrófagos estimulados e tratados com 1% de Triton X- 100 foi usado como controle positivo (C+). \*Concentrações mais ativas significativamente (controle e tratamento). AbFNS (*A. beauvoisii* - Fenda de Nossa Senhora); AbP (*A. beauvoisii* - Prainha); AbPF (*A. beauvoisii* - Praia do Forno); AbSCB (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne banco); AbSCC (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne costão); JcPA (*J. crassa* - Praia dos Anjos); JcP (*J. crassa* - Prainha); CsSI (*C. sagittatum* - Saco dos Ingleses) e AfPC (*A. flabellata* - Ponta da Cabeça). Os valores são representados pela média e desvio padrão. As barras representam às concentrações testadas (controle e tratamento) em ordem crescente. Adaptado Santos, 2021.

Quando levamos em consideração a concentração inibitória (IC<sub>50</sub>) para os mediadores inflamatórios (NO e TNF-α) e a concentração de citotoxicidade (CC<sub>50</sub>) frente aos macrófagos, os extratos mais ativos foram aqueles que apresentaram o valor de IC<sub>50</sub> ≤ 45 µg/mL e CC<sub>50</sub> > 70 µg/mL (**Tabela 16**).

Quanto à capacidade inibitória de NO, somente o extrato de *A. beauvoisii* (AbPF) não foi considerado ativo. Já o extrato de *C. sagittatum* (CsSI), com valor de IC<sub>50</sub> 6,7 ± 1,3 µg/mL foi o mais ativo em relação aos demais. Quanto à capacidade inibitória de TNF-α, somente os extratos de *A. beauvoisii* - AbSCC (IC<sub>50</sub> 25,2 ± 1,5) e *A.*

*flabellata* - AfPC ( $IC_{50}$   $37,9 \pm 1,4$ ) apresentaram atividade. Em relação à atividade citotóxica, os extratos não apresentaram efeito tóxico, exceto o extrato de *C. sagittatum* (CsSI), que apresentou alta atividade ( $CC_{50}$   $42,0 \pm 1,7$   $\mu\text{g/mL}$ ).

**Tabela 16:** Concentração inibitória ( $IC_{50}$ ) e concentração de citotoxicidade ( $CC_{50}$ ) dos extratos das algas calcárias geniculadas.

Extratos brutos	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$CC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
	NO	TNF- $\alpha$	MTT
AbFNS	$37,0 \pm 1,2$	$99,4 \pm 1,6$	$\geq 100$
AbP	$14,1 \pm 1,3$	$78,4 \pm 1,9$	$\geq 100$
AbPF	$45,3 \pm 1,2$	$47,9 \pm 1,5$	$\geq 100$
AbSCB	$17,6 \pm 1,3$	$63,8 \pm 1,9$	$93,6 \pm 1,8$
AbSCC	$29,4 \pm 1,3$	$25,2 \pm 1,5$	$\geq 100$
CsSI	$6,7 \pm 1,3$	$90,1 \pm 1,6$	$42,0 \pm 1,7$
JcPA	$41,1 \pm 1,3$	$\geq 100$	$\geq 100$
JcP	$13,4 \pm 1,3$	$97,4 \pm 1,5$	$\geq 100$
AfPC	$14,4 \pm 1,2$	$37,9 \pm 1,4$	$\geq 100$
L-MMMA	$11,6 \pm 1,3$	-	-
Ibuprofeno	-	$10,9 \pm 1,1$	-

AbFNS (*A. beauvoisii* - Fenda de Nossa Senhora); AbP (*A. beauvoisii* - Prainha); AbPF (*A. beauvoisii* - Praia do Forno); AbSCB (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne banco); AbSCC (*A. beauvoisii* - Saco do Cherne costão); JcPA (*J. crassa* - Praia dos Anjos); JcP (*J. crassa* - Prainha); CsSI (*C. sagittatum* - Saco dos Ingleses) e AfPC (*A. flabellata* - Ponta da Cabeça). Adaptado Santo, 2021.

### 3.3 Avaliação das frações (coluna) quanto à atividade antimicrobacteriana

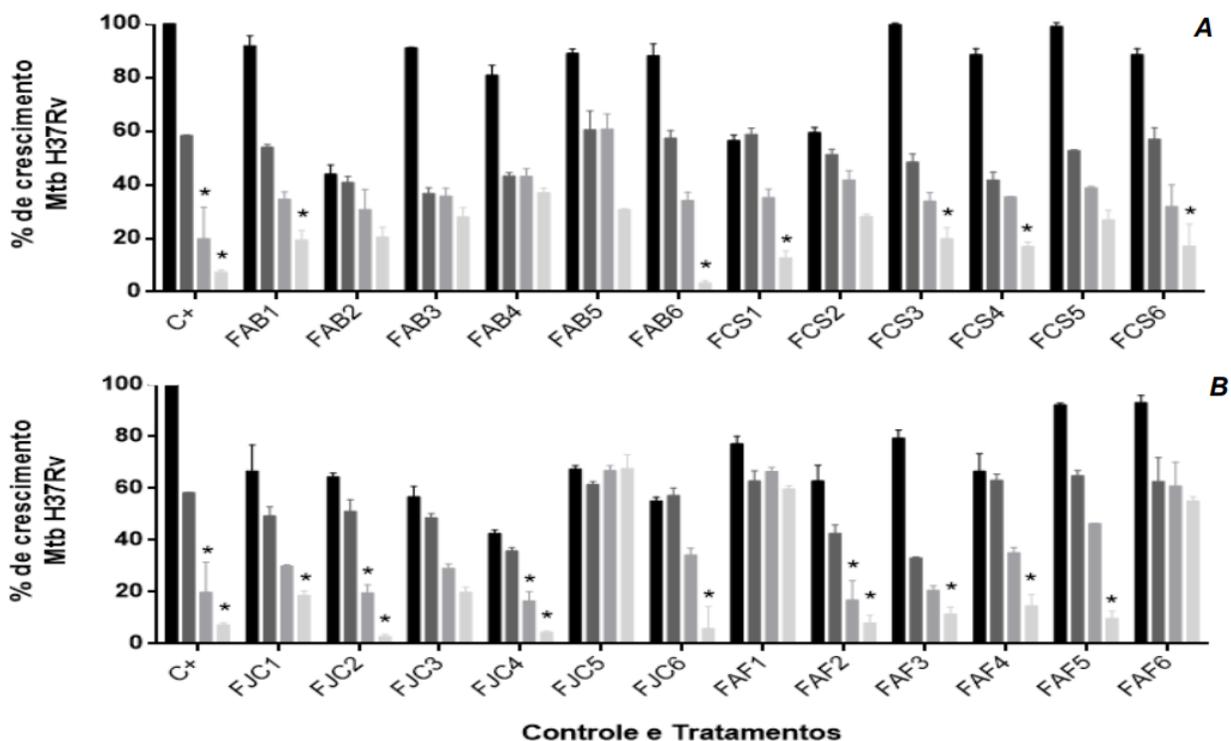
A partir dos resultados obtidos no *screening* dos extratos brutos, as algas calcárias *A. beauvoisii* (AbPF), *C. sagittatum* (CsSI), *J. crassa* (JcP) e *A. flabellata* (AfPC) foram selecionadas como as mais promissoras frente aos modelos testados. Desta forma, foram escolhidas para a etapa de fracionamento, com a finalidade de encontrar as substâncias envolvidas nas atividades através do estudo bio guiado. Quando levamos em consideração a concentração mínima inibitória ( $MIC_{90}$ ), dentre as 24 frações testadas, oito apresentaram atividade micobacteriana contra a cepa Mtb H37RV e, nove contra a cepa hipervirulenta Mtb H37R. Diferenças significativas foram

observadas mediante a comparação entre as diferentes concentrações do controle e tratamentos (**Tabela 17**).

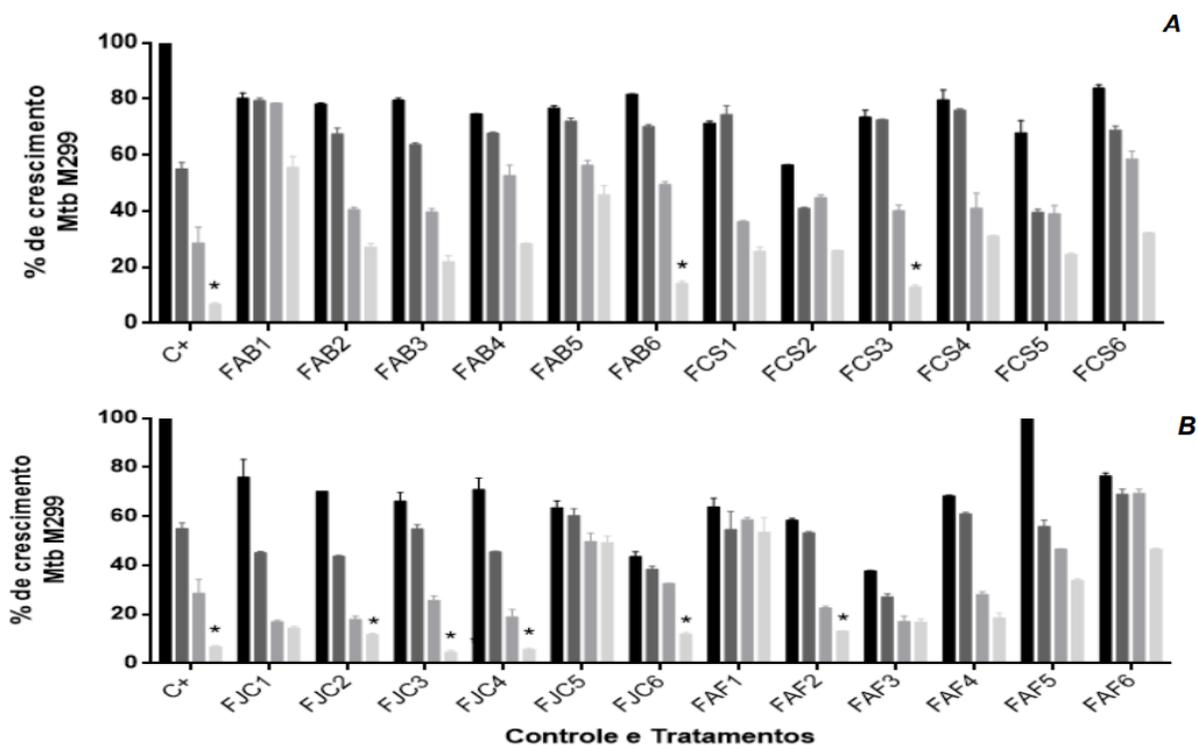
**Tabela 17:** ANOVA da atividade antimicrobacteriana das frações (coluna) das algas calcárias geniculadas.

Micobactérias	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	F	p
Mtb H37RV	124173,4	99	82,89	<0,001
Mtb M299	105285,7	99	215,91	<0,001

As concentrações mais ativas do antibiótico rifampicina foram 0,08 e 1 µg/mL. Dentre as frações testadas, as mais ativas contra a micobactéria Mtb H37RV (laboratorial) foram *A. beauvoisii* (FAB1 e FAB6), *C. sagittatum* (FCS1, FCS3, FCS4 e FCS6), *J. crassa* (FJC1, FJC2, FJC4 e FJC6) e *A. flabellata* (FAF2, FAF3, FAF4 e FAF5) na concentração de 100 µg/mL (**Figura 28A e B**). As frações FJC2, FJC4 e FAF2 também apresentaram atividade similar na concentração de 20 µg/mL (**Figura 28B**).



Quanto à micobactéria Mtb M299 (hipervirulenta), a concentração mais ativa do antibiótico rifampicina foi de 10 µg/mL. Já as frações mais ativas foram *A. beauvoisii* (FAB6), *C. sagittatum* (FCS3), *J. crassa* (FJA2, FJA3, FJA4 e FJA6) e *A. flabellata* (FAF2) na maior concentração testada (100 µg/mL) (**Figura 29A e B**).



**Figura 29:** Efeito das frações (coluna) no crescimento da cepa hipervirulenta (Mtb M299) em diferentes concentrações (0,8; 4; 20 e 100 µg/mL). O antibiótico rifampicina (C+) foi usado nas concentrações de 0,008; 0,04; 0,2 e 10 µg/mL. \*Concentrações mais ativas significativamente (controle e tratamento). **(A)** FAB1:FAB6 - *A. beauvoisii*; FCS1:FCS6 - *C. sagittatum*; **(B)** FJC1:FJC6 - *J. crassa* e FAF1:FAF6 - *A. flabellata*. Os valores são representados pela média e desvio padrão. As barras representam às concentrações testadas (controle e tratamento) em ordem crescente. Adaptado Santo, 2021.

Quando levamos em consideração a concentração mínima inibitória (MIC<sub>90</sub>), as frações mais ativas foram aquelas que apresentaram o valor de MIC<sub>90</sub> ≤ 40 µg/mL (**Tabela 18**). Dentre as frações de *A. beauvoisii* somente a FAB2 e FAB3 apresentaram atividade contra a cepa laboratorial (Mtb H37Rv), sendo a primeira mais ativa com o valor de MIC<sub>90</sub> de 12,7 ± 1,6, já em relação à cepa hipervirulenta (Mtb M299) nenhuma fração apresentou atividade. Quanto às frações obtidas de *C. sagittatum* contra a cepa laboratorial Mtb H37Rv, nenhuma apresentou atividade, já em relação à cepa hipervirulenta (Mtb M299), somente as frações FCS2 e FCS5 apresentaram atividade, exibindo MIC<sub>90</sub> de 27,5 ± 1,7 e 30,8 ± 1,5, respectivamente.

Para *J. crassa*, somente as frações FJC5 e FJC6 não apresentaram atividade contra a cepa laboratorial Mtb H37Rv e a mais ativa foi FJC4, exibindo o MIC<sub>90</sub> de 8,7 ±

1,4. Quanto à cepa hipervirulenta (Mtb M299), quase todas apresentaram atividade, exceto a FJC5, sendo a FJC6 (MIC<sub>90</sub> 11,5 ± 1,6) a mais ativa em comparação as demais. Dentre as frações de *A. flabellata*, somente as frações FAF2 e FAF3 foram ativas para ambas as cepas testadas, exibindo valores de MIC<sub>90</sub> de 20,9 ± 1,2 (FAF2) e 23,8 ± 1,2 (FAF3) contra a cepa laboratorial (Mtb H37Rv) e MIC<sub>90</sub> de 28,8 ± 1,4 (FAF2) e 19,9 ± 1,4 (FAF3) contra a cepa hipervirulenta (Mtb M299).

**Tabela 18:** Concentração inibitória mínima (MIC<sub>90</sub>) das frações (coluna) contra a cepa laboratorial – Mtb H37Rv e a cepa hipervirulenta – Mtb M299.

Frações	MIC <sub>90</sub> (µg/mL)	
	Mtb H37Rv	Mtb M299
<i>A. beauvoisii</i> (AbPF)		
FAB1	66,8 ± 1,2	≥ 100
FAB2	12,7 ± 1,6	≥ 100
FAB3	42,5 ± 1,5	89,3 ± 1,3
FAB4	58,7 ± 1,6	≥ 100
FAB5	≥ 100	≥ 100
FAB6	61,6 ± 1,1	≥ 100
<i>C. sagittatum</i> (CsSI)		
FCS1	45,3 ± 1,5	≥ 100
FCS2	48,4 ± 1,6	27,5 ± 1,7
FCS3	61,6 ± 1,3	98,4 ± 1,3
FCS4	44,6 ± 1,3	≥ 100
FCS5	82,4 ± 1,4	30,8 ± 1,5
FCS6	64,7 ± 1,2	≥ 100
<i>J. crassa</i> (JcP)		
FJC1	35,6 ± 1,4	29,8 ± 1,2
FJC2	28,4 ± 1,2	17,2 ± 1,2
FJC3	27,5 ± 1,5	36,2 ± 1,3
FJC4	8,7 ± 1,4	27,0 ± 1,1
FJC5	≥ 100	≥ 100
FJC6	46,1 ± 1,5	11,5 ± 1,6
<i>A. flabellata</i> (AfPC)		
FAF1	≥ 100	≥ 100
FAF2	20,9 ± 1,2	28,8 ± 1,4
FAF3	23,8 ± 1,2	19,9 ± 1,4
FAF4	63,6 ± 1,4	52,4 ± 1,3
FAF5	≥ 100	≥ 100
FAF6	≥ 100	≥ 100
<b>Rifampicina</b>	0,11 ± 0,2	1,1 ± 0,1

FAB1:FAB6 - *A. beauvoisii*; FCS1:FCS6 - *C. sagittatum*; FJC1:FJC6 – *J. crassa*; FAF1:FAF6 - *A. flabellata*. Adaptado Santo, 2021.

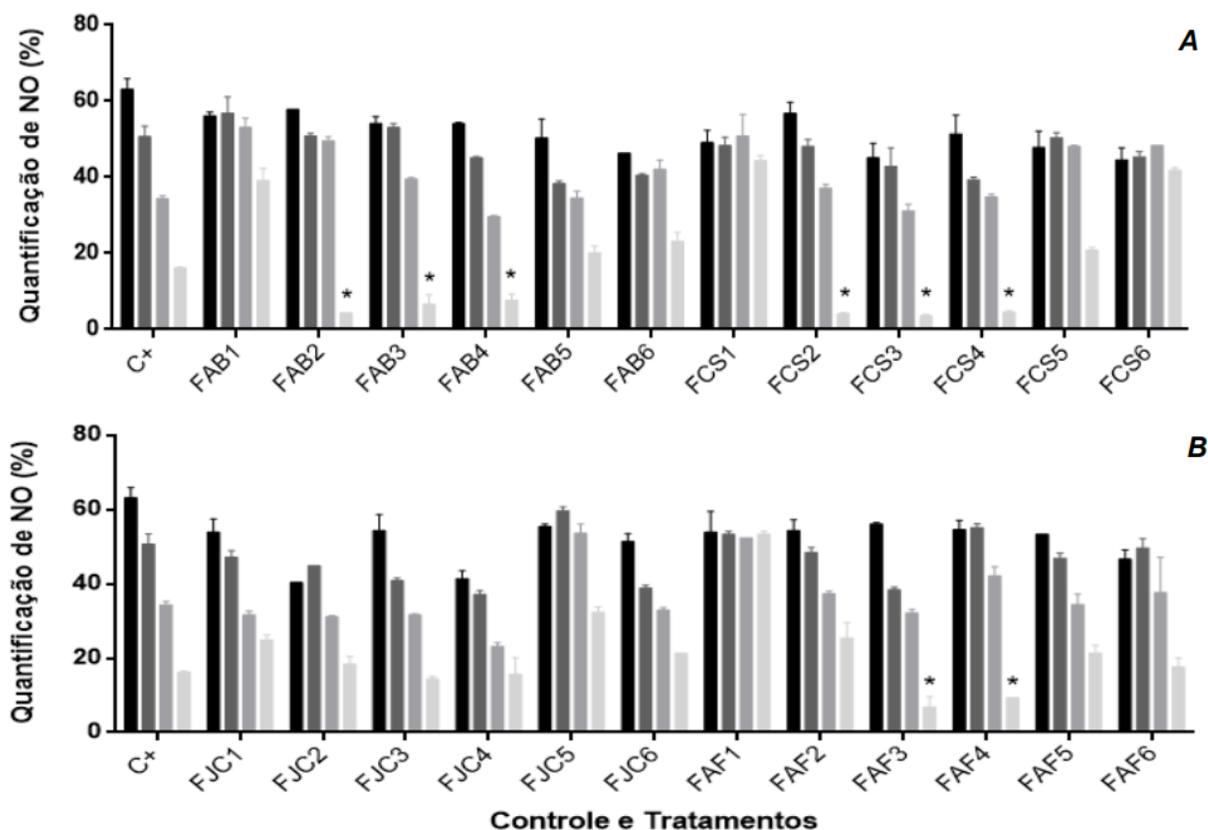
### 3.4 Avaliação das frações (coluna) quanto às atividades anti-inflamatória e citotoxicidade

Quando levamos em consideração a concentração inibitória ( $IC_{50}$ ), dentre as 24 frações testadas, 21 apresentaram atividade anti-inflamatória contra o NO e, dez contra o TNF- $\alpha$ . Diferenças significativas foram observadas mediante a comparação entre as diferentes concentrações do controle e tratamentos (**Tabela 19**).

**Tabela 19:** ANOVA da atividade anti-inflamatória das frações (coluna) das algas calcárias geniculadas.

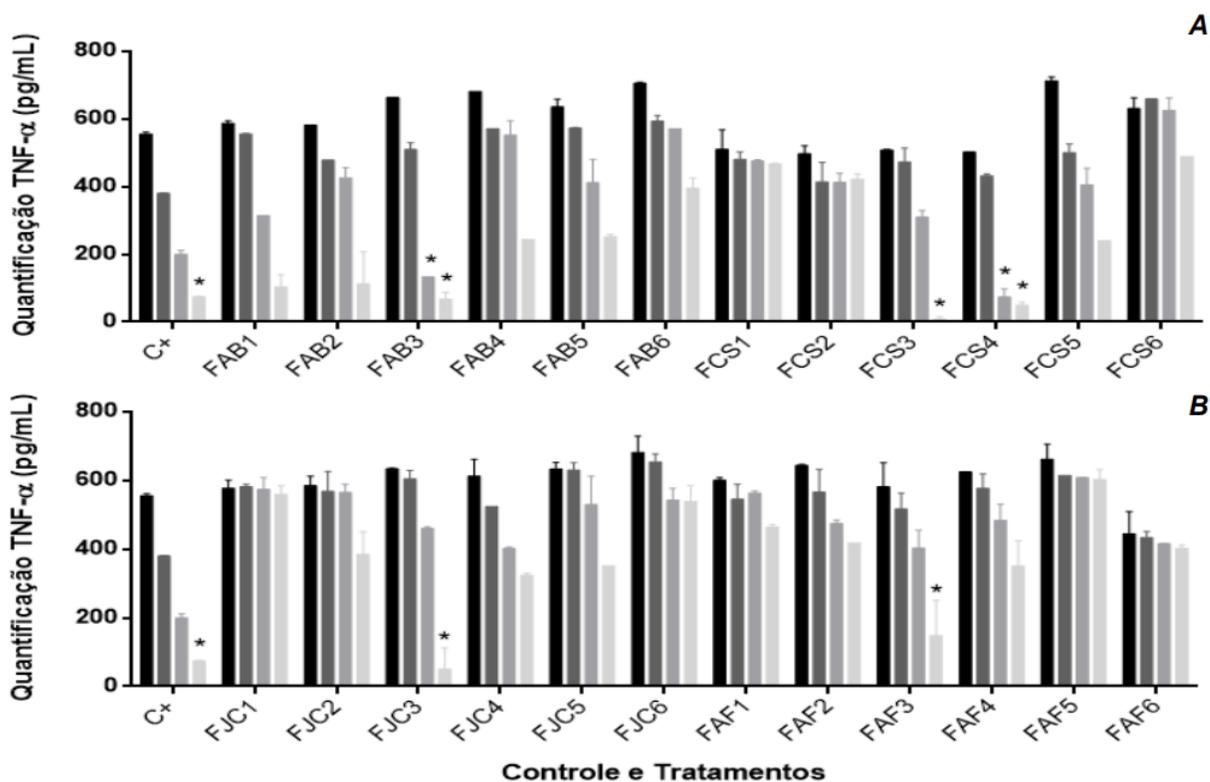
Mediadores inflamatórios	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	F	p
NO	46354,9	99	83,44	<0,001
TNF- $\alpha$	5633972	99	50,15	<0,001

Em relação à inibição de NO, as frações mais ativas foram *A. beauvoisii* (FAB2, FAB3 e FAB4), *C. sagittatum* (FCS2, FCS3 e FCS4) e *A. flabellata* (FAF3 E FAF4) na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  (**Figura 30A e B**).



**Figura 30:** Efeito das frações (coluna) das algas calcárias geniculadas na produção do mediador inflamatório (NO) em diferentes concentrações (0,8; 4; 20 e 100 µg/mL). O fármaco L-NMMA (controle positivo - C+) foi usado nas mesmas concentrações das frações. \*Concentrações mais ativas significativamente (controle e tratamento). (A) FAB1:FAB6 - *A. beauvoisii*; FCS1:FCS6 - *C. sagittatum*; (B) FJC1:FJC6 - *J. crassa*; FAF1:FAF6 - *A. flabellata*. Os valores são representados pela média e desvio padrão. As barras representam às concentrações testadas (controle e tratamento) em ordem crescente. Adaptado Santo, 2021.

Quanto á inibição de TNF- $\alpha$  (**Figura 31A e B**), o fármaco ibuprofeno na concentração de 100 µg/mL foi o mais ativo, assim como as frações de *A. beauvoisii* (FAB1, FAB2 e FAB3), *C. sagittatum* (FCS3 e FCS4), *J. crassa* (FJC3) e *A. flabellata* (FAF3) nas concentrações de 100 µg/mL. As frações FAB3 e FCS4 também apresentaram atividade semelhante na concentração de 20 µg/mL.



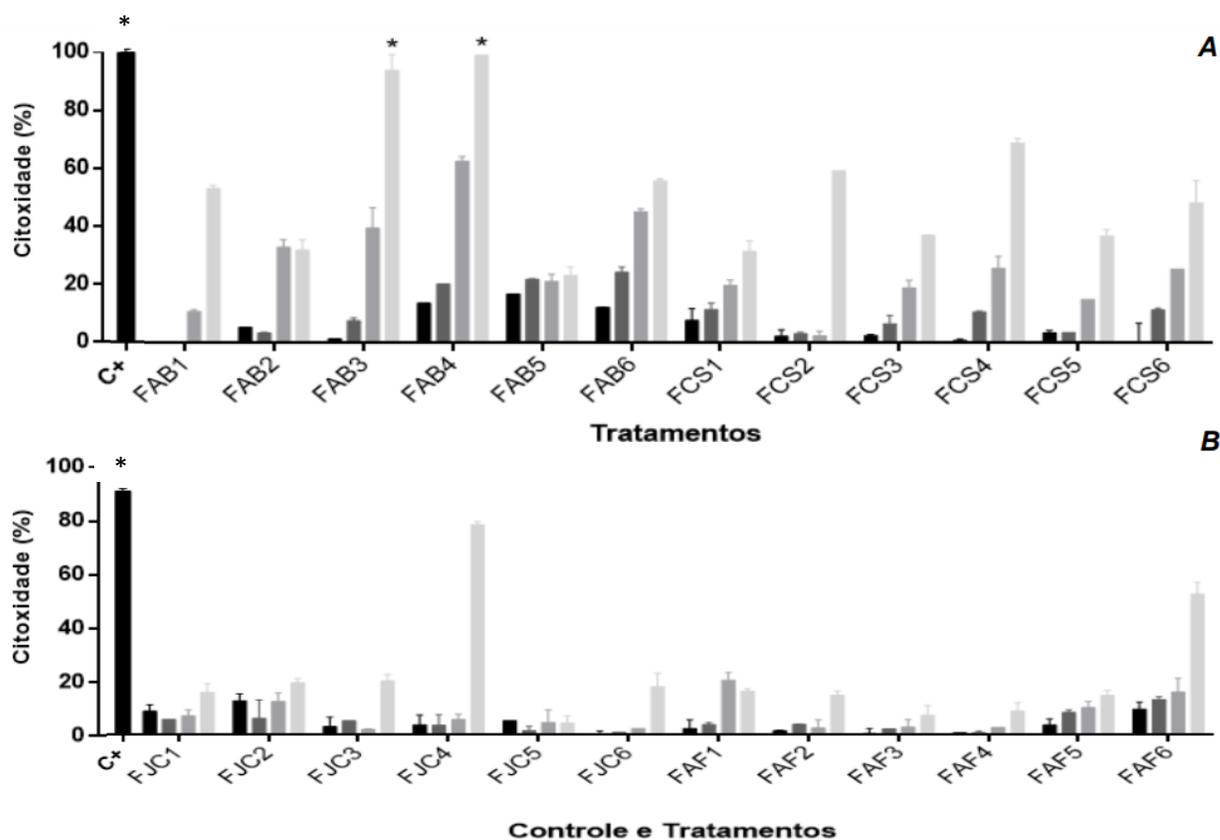
**Figura 31:** Efeito das frações (coluna) das macroalgas calcárias na produção do mediador inflamatório (TNF- $\alpha$ ) em diferentes concentrações (0,8; 4; 20 e 100  $\mu$ g/mL). O fármaco ibuprofeno (controle positivo - C+) foi usado nas mesmas concentrações das frações. \*Concentrações mais ativas significativamente (controle e tratamento). (A) FAB1:FAB6 - *A. beauvoisii*; FCS1:FCS6 - *C. sagittatum*; (B) FJC1:FJC6 – *J. crassa*; FAF1:FAF6 - *A. flabellata*. Os valores são representados pela média e desvio padrão. As barras representam às concentrações testadas (controle e tratamento) em ordem crescente. Adaptado Santo, 2021.

Quando levamos em consideração a concentração de citotoxicidade ( $CC_{50}$ ) frente aos macrófagos, dentre as 24 frações testadas, duas apresentaram efeito tóxico. Diferenças significativas foram observadas mediante a comparação entre as diferentes concentrações do controle e tratamentos (**Tabela 20**).

**Tabela 20:** ANOVA da atividade citotóxica dos extratos das algas calcárias geniculadas.

Citotoxicidade	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	F	p
Macrófagos	85442,30	96	93,778	<0,001

As frações de *A. beauvoisii* (FAB3 e FAB4) na concentração de 100 µg/mL foram as mais tóxicas quando comparadas as demais frações e concentrações e, também o controle positivo (**Figura 32A e B**).



**Figura 32:** Atividade citotóxica das frações (coluna) das macroalgas calcárias contra macrófagos murinos em diferentes concentrações (0,8; 4; 20 e 100 µg/mL). A cultura de macrófagos estimulados e tratados com 1% de Triton X- 100 foi usado como controle positivo (C+). \*Concentrações mais ativas significativamente (controle e tratamento). (A) FAB1:FAB6 - *A. beauvoisii*; FCS1:FCS6 - *C. sagittatum*; (B) FJC1:FJC6 – *J. crassa*; FAF1:FAF6 - *A. flabellata*. Os valores são representados pela média e desvio padrão. As barras representam às concentrações testadas (controle e tratamento) em ordem crescente. Adaptado Santo, 2021.

Quando levamos em consideração a concentração inibitória (IC<sub>50</sub>) para os mediadores inflamatórios (NO e TNF-α) e a concentração de citotoxicidade (CC<sub>50</sub>) frente aos macrófagos, as frações mais ativas foram aquelas que apresentaram o valor de IC<sub>50</sub> ≤ 45 µg/mL e CC<sub>50</sub> > 70 µg/mL (**Tabela 21**).

Dentre as frações de *A. beauvoisii*, com exceção das frações FAB1, FCS1 e FAF1, todas as demais apresentaram capacidade de inibir a produção de NO, sendo a

fração FAB5 a mais ativa, exibindo  $IC_{50}$   $4,7 \pm 1,6$ . Quanto à inibição de  $TNF-\alpha$ , somente as frações FAB4 e FAB6 não apresentaram atividade, sendo a fração FAB3 mais ativa, com  $IC_{50}$   $7,5 \pm 1,1$ . Em relação à citotoxicidade, as frações que apresentaram alta atividade foram FAB3 ( $CC_{50}$   $24,4 \pm 1,2$ ), FAB4 ( $CC_{50}$   $11,4 \pm 1,2$ ) e FAB6 ( $CC_{50}$   $44,2 \pm 1,4$ ).

Em relação às frações de *C. sagittatum*, somente a fração FCS1 não apresentou atividade inibitória de NO e as frações mais ativa foram FCS3 e FCS4, apresentando valores de  $IC_{50}$   $4,0 \pm 1,5$  e  $4,5 \pm 1,5$ , respectivamente. Quanto à inibição de  $TNF-\alpha$ , somente as frações FCS3, FCS4 e FCS5 apresentaram atividade, sendo a FCS4 a mais ativa ( $IC_{50}$   $4,0 \pm 1,2$ ) em comparação as demais. Dentre as frações, somente a FCS4 apresentou toxicidade ( $CC_{50}$   $48,2 \pm 1,1$ ).

Dentre as frações de *J. crassa*, todas apresentaram atividade contra a produção de NO, sendo a FJC4 a mais ativa, exibindo valor de  $IC_{50}$   $2,2 \pm 1,5$ . Em relação à inibição de  $TNF-\alpha$ , somente as frações FJC3 e FJC4 apresentaram atividade de inibição, exibindo  $IC_{50}$   $24,2 \pm 1,3$  e  $IC_{50}$   $36,1 \pm 1,4$ , respectivamente. Quanto à citotoxicidade, somente a fração FJC4 apresentou atividade ( $CC_{50}$   $52,8 \pm 1,4$ ).

Para as frações do extrato de *A. flabellata*, foi possível observar que somente a fração FAF1 não apresentou atividade contra a produção de NO, sendo FAF3 a fração mais ativa ( $IC_{50}$   $4,5 \pm 1,4$ ). Quanto à inibição de  $TNF-\alpha$  a única que apresentou atividade foi a fração FAF3 ( $IC_{50}$   $20,2 \pm 1,3$ ). Nenhuma fração apresentou atividade tóxica frente às células de defesa.

**Tabela 21:** Concentração inibitória ( $IC_{50}$ ) e concentração de citotoxicidade ( $CC_{50}$ ) das frações (coluna) das algas coralinas geniculadas.

Frações	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )		$CC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
	NO	$TNF-\alpha$	MTT
<i>A. beauvoisii</i> (AbPF)			
FAB1	$52,1 \pm 1,6$	$14,4 \pm 1,2$	$90,0 \pm 1,0$
FAB2	$14,8 \pm 1,5$	$18,7 \pm 1,4$	$\geq 100$
FAB3	$10,7 \pm 1,4$	$7,5 \pm 1,1$	$24,4 \pm 1,2$
FAB4	$5,5 \pm 1,4$	$52,3 \pm 1,2$	$11,4 \pm 1,2$
FAB5	$4,7 \pm 1,6$	$32,0 \pm 1,2$	$\geq 100$
FAB6	$10,1 \pm 1,9$	$\geq 100$	$44,2 \pm 1,4$

<i>C. sagittatum</i> (CsSI)			
FCS1	52,9 ± 2,0	≥ 100	≥ 100
FCS2	8,1 ± 1,4	50,7 ± 1,9	85,1 ± 1,3
FCS3	4,0 ± 1,5	8,9 ± 1,4	≥ 100
FCS4	4,5 ± 1,5	4,0 ± 1,2	48,2 ± 1,1
FCS5	18,1 ± 1,7	27,1 ± 1,3	≥ 100
FCS6	35,9 ± 2,1	≥ 100	≥ 100
<i>J. crassa</i> (JcP)			
FJC1	7,9 ± 1,5	≥ 100	≥ 100
FJC2	4,4 ± 1,7	94,5 ± 1,4	≥ 100
FJC3	5,1 ± 1,4	24,2 ± 1,3	≥ 100
FJC4	2,2 ± 1,5	36,1 ± 1,4	52,8 ± 1,4
FJC5	41,9 ± 1,5	77,7 ± 1,2	≥ 100
FJC6	4,8 ± 1,6	≥ 100	≥ 100
<i>A. flabellata</i> (AfPC)			
FAF1	≥ 100	≥ 100	≥ 100
FAF2	11,2 ± 1,6	86,0 ± 1,4	≥ 100
FAF3	4,5 ± 1,4	20,2 ± 1,3	≥ 100
FAF4	13,2 ± 1,4	63,5 ± 1,3	≥ 100
FAF5	8,3 ± 1,5	≥ 100	≥ 100
FAF6	9,2 ± 1,6	45,8 ± 2,0	82,1 ± 1,2
<b>L-MMMA</b>	11,6 ± 1,3	-	-
<b>Ibuprofeno</b>	-	10,9 ± 1,1	-

FAB1:FAB6 - *A. beauvoisii*; FCS1:FCS6 - *C. sagittatum*; FJC1:FJC6 - *J. crassa*; FAF1:FAF6 - *A. flabellata*. Adaptado Santo, 2021.

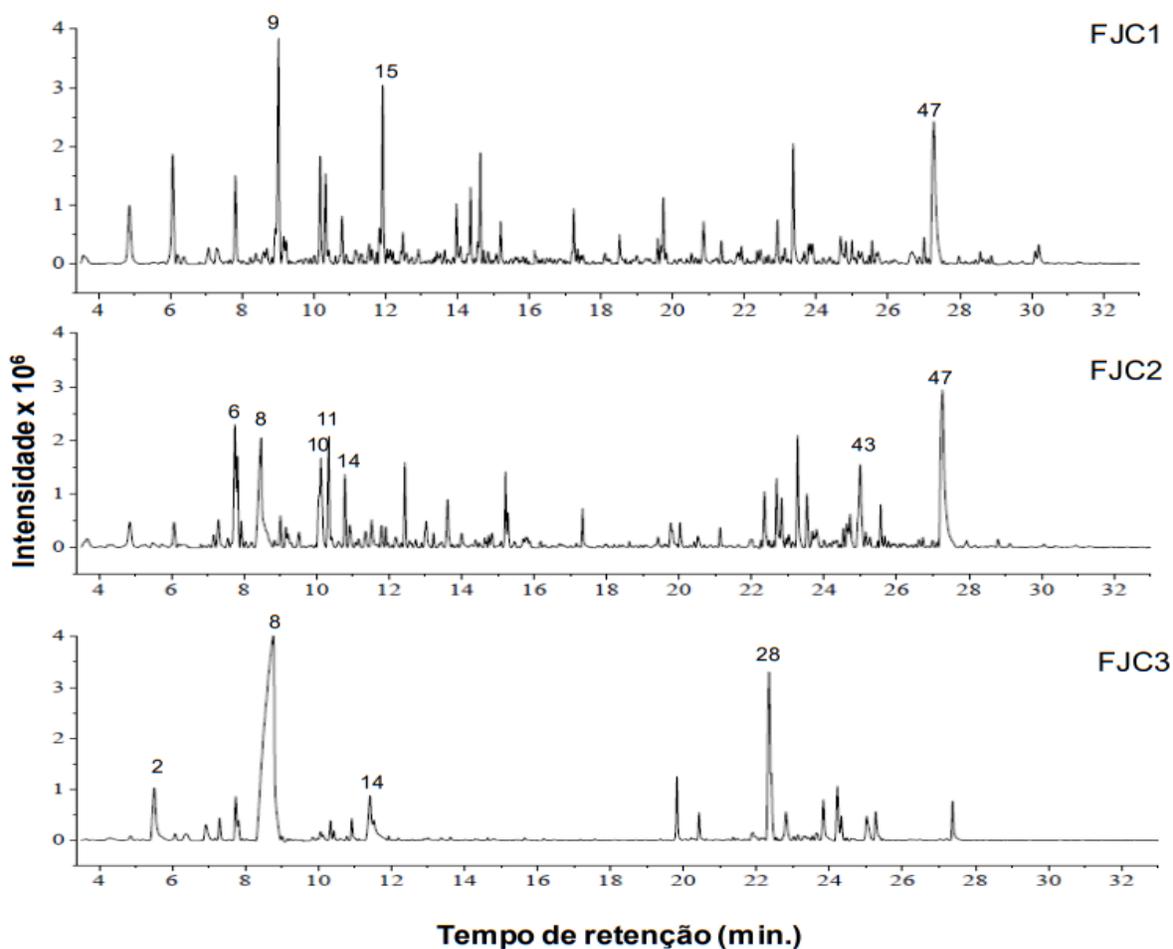
Levando em consideração não somente a atividade antimicrobacteriana, mas também a atividade anti-inflamatória e citotóxica, as frações de *J. crassa* (FJC1, FJC2 e FJC3) e *A. flabellata* (FAF2, FAF3 e FAF4) foram as mais promissoras em comparação as demais.

### 3.5 Análise das Frações (coluna) mais ativas por CG-EM

Com a finalidade de verificar as substâncias possivelmente responsáveis pelas atividades encontradas, o perfil químico das frações mais ativas foi analisado por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), gerando os cromatogramas apresentados na **Figura 33 e 34**. As substâncias com área ≥ 2% de cada fração foram evidenciadas nos seus respectivos cromatogramas.

## *Jania crassa*

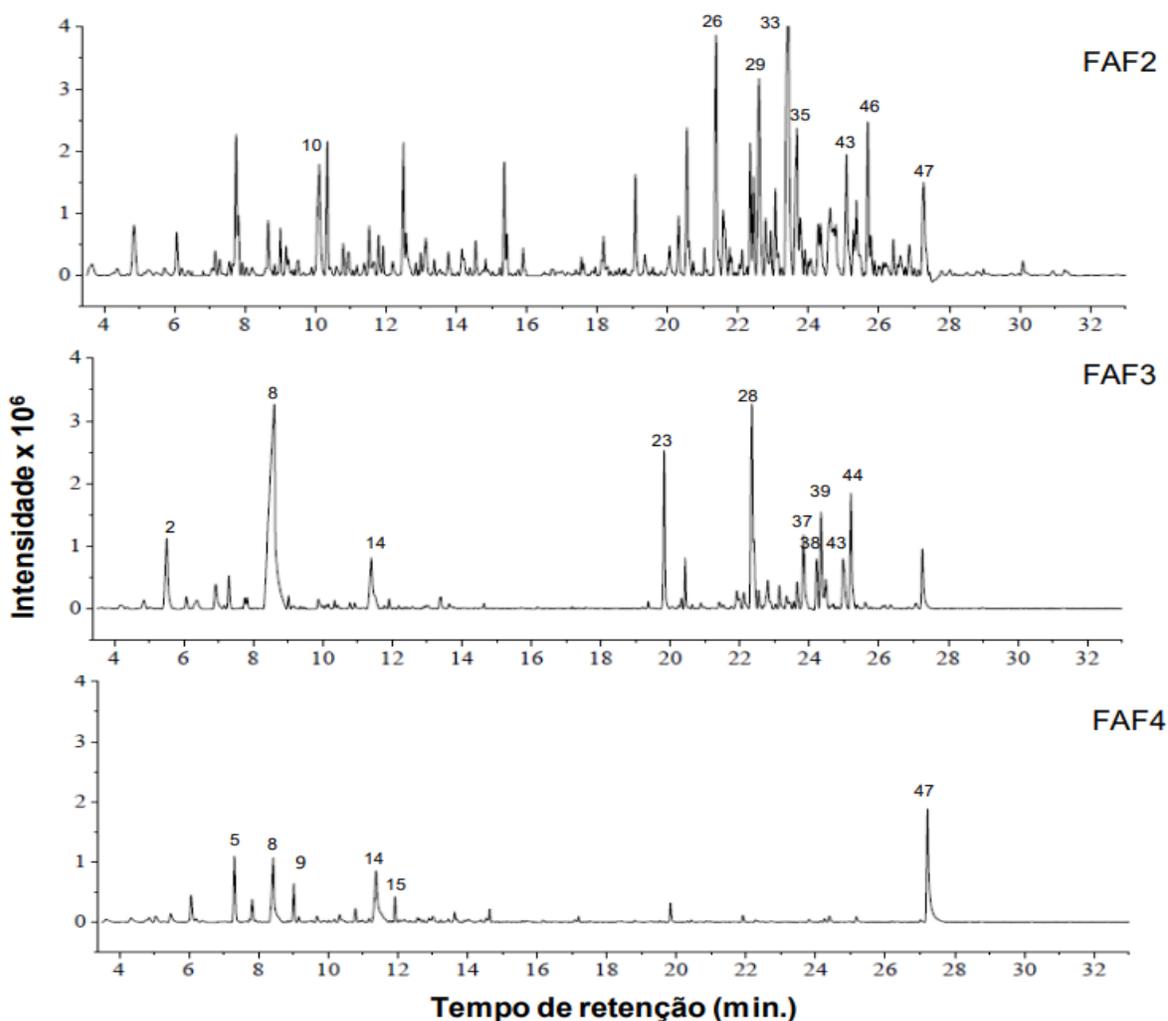
A substância majoritária encontrada em cada fração de *J. crassa* foi: FJC1 e FJC2 (47 - Não identificada); FJC3 (8 - ácido palmítico) (**Figura 33**).



**Figura 33:** Cromatogramas das frações (FJC1, FJC2, FJC3) da macroalga calcária *J. crassa* obtidos por CG-EM

## ***Arthrocardia Flabellata***

A substância majoritária para cada fração de *A. flabellata* foi: FAF2 (**33** - Não identificada); FAF3 (**8** - ácido palmítico); FAF4 (**47** - Não identificada) (**Figura 34**).



**Figura 34:** Cromatogramas das frações (FAF2, FAF3, FAF4) da macroalga calcária *A. flabellata* obtidos por CG-EM

A análise por CG-EM revelou a presença de 47 substâncias, sendo que somente 29 delas foram identificadas levando em consideração os critérios dos bancos de dados (GNPS e NIST) (**Tabela 22**).

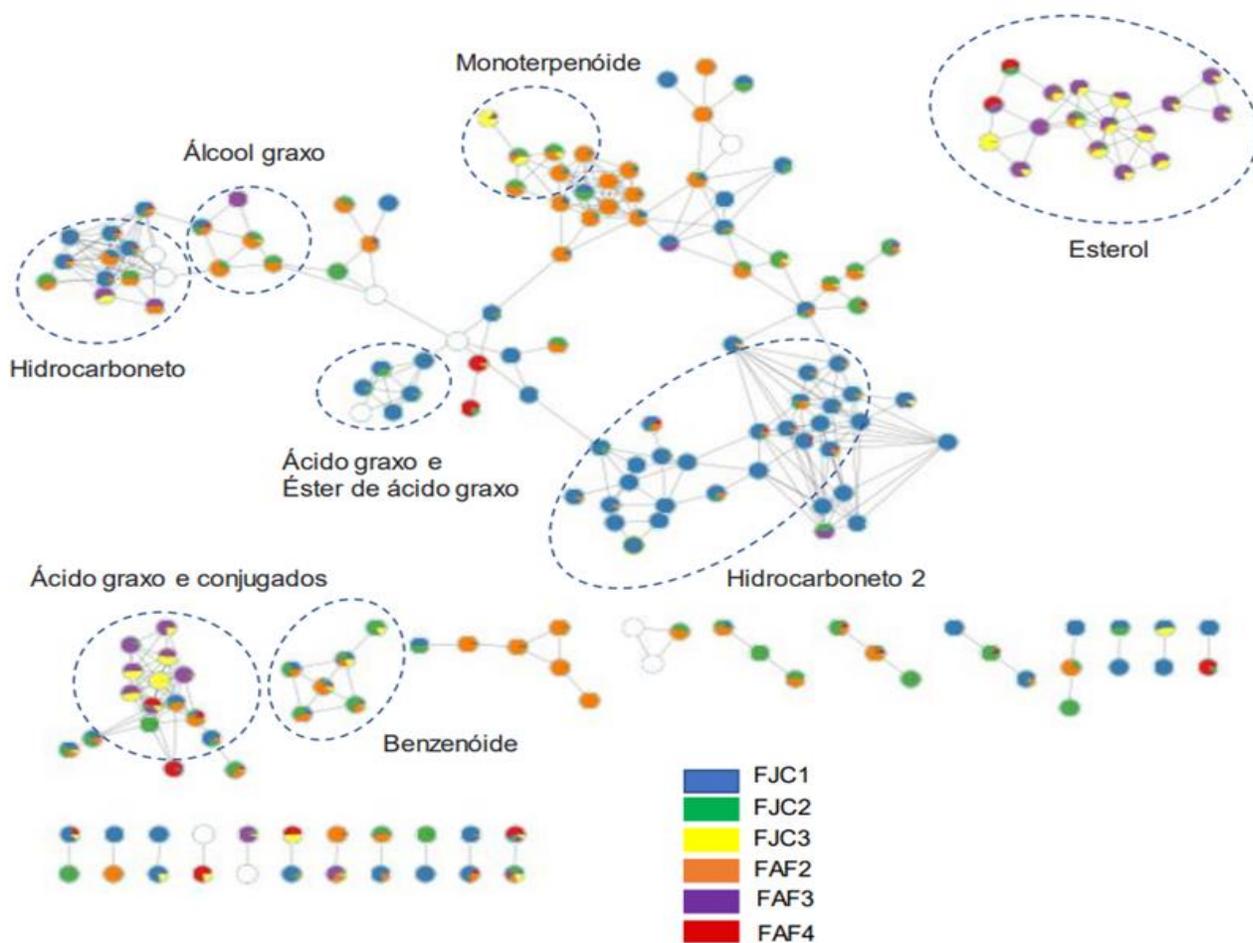
Tabela 22: Substâncias identificadas nas frações ativas analisadas por CG-EM com área ≥1% e identificadas pela biblioteca NIST (≥ 85%) e plataforma GNPS (cosseno ≥ 0,7). X: substâncias identificadas por ambos os bancos (NIST e GNPS); Y: substâncias identificadas somente no banco NIST; X': substâncias não identificadas (NI).

Pico	tR (min)	Componentes fitoquímicos	Fórmula molecular	NIST	GNPS	Área relativa (%)					
								FJC3	FAF2	FAF3	FAF4
1	4,86	Heptadecano	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	X	X	0,64	0,73	0,15	1,04	0,3	0,44
2	5,53	Ácido tetradecanóico	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	X	X	-	-	2,64	-	3,81	0,9
3	6,08	1-Nonadeceno	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub>	X	X	1,28	0,55	0,24	0,66	0,51	1,65
4	6,93	Ácido pentadecanóico	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	X	X	-	0,22	1,24	-	1,37	-
5	7,31	7,9-diterc-butil-1-oxaspiro[4.5]deca-6,9-dieno-2,8-diona	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	X	X	0,75	1	0,93	0,69	1,14	3,9
6	7,78	(Z)-hexadec-7-enal	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O	Y	-	-	2,18	1,1	1,44	0,29	0,21
7	7,84	Éster metílico do ácido hexadecanóico	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	X	X	1,17	1,37	0,58	0,6	0,37	1,24
8	8,52	Ácido palmítico	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	X	X	0,31	4,3	31,11	0,18	22,16	7,58
9	9,03	1-Heptacosanol	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub> O	X	X	2,17	0,97	-	0,58	1,45	2,43
10	10,21	1-Docosanol	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O	X	X	1,79	2	-	2,01	0,42	0,86
11	10,35	Éster metílico do ácido (E)-9-octadecenóico	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	Y	-	1,2	2	1,08	1,31	0,29	1,42
12	10,81	Éster metílico do ácido octadecanóico	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	X	X	0,92	1,26	0,72	0,49	0,13	1,6
13	10,94	NI	-	X'	X'	0,9	0,96	1,03	0,55	0,15	0,64
14	11,43	Ácido esteárico	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	X	X	0,56	-	2,64	-	2,42	8,75
15	11,94	9-Hexacoseno	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub>	X	X	2	0,49	0,81	0,32	0,49	2,19
16	12,07	NI	-	X'	X'	0,59	0,2	0,36	0,09	0,16	1,11
17	12,46	NI	-	X'	X'	0,48	1,41	-	1,17	0,07	0,74
18	12,59	NI	-	X'	X'	0,9	-	0,31	-	0,09	1,01
19	12,77	NI	-	X'	X'	0,62	0,66	0,2	0,31	0,01	1,32
20	13,66	NI	-	X'	X'	-	1,22	0,26	0,38	0,12	1,31
21	14,39	Diisooctil Adipato	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	Y	-	1,25	0,42	-	0,48	0,03	-

**Tabela 22:** Substâncias das frações (coluna) mais ativas, detectadas pelo CG-EM com área  $\geq 1\%$  e identificadas pela biblioteca NIST ( $\geq 85\%$ ) e plataforma GNPS (cosseno  $\geq 0,7$ ). X: substâncias identificadas por ambos os bancos (NIST e GNPS); X': substâncias identificadas somente por um banco (NIST ou GNPS); O: substâncias não identificadas (NI). FJC1:FJC3 – *J. crassa*; FAF2:FAF4 - *A. flabellata*.

22	14,66	NI	-	X'	X'	1,02	0,3	0,04	0,21	0,1	0,97
23	19,84	(3 $\beta$ )colesta-4,6-dien-3-ol	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O	X	X	0,1	0,26	1,26	0,1	3,71	0,88
24	20,34	NI	-	X'	X'	-	0,08	0,03	1,34	-	0,04
25	20,42	NI	-	Y	-	0,24	-	0,56	0,34	1,18	-
26	21,22	Anidrido oléico	C <sub>36</sub> H <sub>66</sub> O <sub>3</sub>	X	X	-	0,24	-	2,7	0,05	-
27	22,27	(Z)-13-Docosen-1-ol	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O	X	X	-	-	0,02	1,29	-	-
28	22,36	(3 $\beta$ )colest-5-en-3-ol	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O	X	X	0,34	1,14	6,36	1,24	6,21	0,11
29	22,52	NI	-	X'	X'	0,26	0,09	0,04	2,96	1,09	0,08
30	22,7	Desmosterol	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O	X	X	-	1,25	0,01	1,1	0,26	-
31	22,81	(3 $\beta$ , 5 $\alpha$ )-ergosta-7-en-3-ol	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O	X	X	0,62	0,91	1,17	0,68	1,39	-
32	23,27	Cloreto de oleoil	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> ClO	X	X	1,12	1,68	0,09	-	0,12	0,02
33	23,36	NI	-	X'	X'	-	-	0,09	5,5	0,49	-
34	23,56	Colest-4-en-3-ona	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O	Y	-	0,26	1,1	0,1	-	0,33	-
35	23,62	NI	-	X'	-	-	-	0,25	2,79	1,05	-
36	23,73	NI	-	X'	-	-	-	-	1,4	-	-
37	23,83	Acetato de colestanol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	X	X	0,31	0,44	1,01	0,67	3,03	0,12
38	24,19	4 $\beta$ ,5-epoxy-5beta-cholestan-3-ona	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	X	X	-	0,26	1,46	-	2,42	0,02
39	24,3	Acetato de colest-3,5-dieno-3.beta.-ol	C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	X	X	0,16	-	0,76	0,87	3,86	0,24
40	24,43	NI	-	X'	X'	0,15	-	0,24	-	1,53	0,43
41	24,56	NI	-	X'	X'	0,11	-	0,1	1,44	0,52	-
42	24,72	1-Hexadecanol	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O	X	X	0,16	0,82	-	1,14	-	0,07
43	25,01	(Z,Z) 9,12-Octadecadien-1-ol	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O	X	X	0,36	2,48	0,82	2,08	3,08	0,07
44	25,19	NI	-	X'	X'	-	-	0,76	0,67	4,22	0,33
45	25,27	Ácido Undec-10-inóico, éster octadecil	C <sub>29</sub> H <sub>54</sub> O	X	X	0,38	-	-	1,18	-	-
46	25,62	NI	-	X'	X'	-	0,79	0,01	2,09	-	-
47	27,3	NI	-	X'	X'	2,5	6,49	1,01	2,53	1,81	9,84

A rede molecular criada na plataforma do GNPS destacou as substâncias presentes nas frações mais ativas e evidenciou o agrupamento de algumas substâncias pertencentes a mesma classe química, tais como ácido graxo e conjugados, hidrocarboneto, esterol, éster de ácido graxo, álcool graxo, monoterpénide e benzenóide (**Figura 35**).

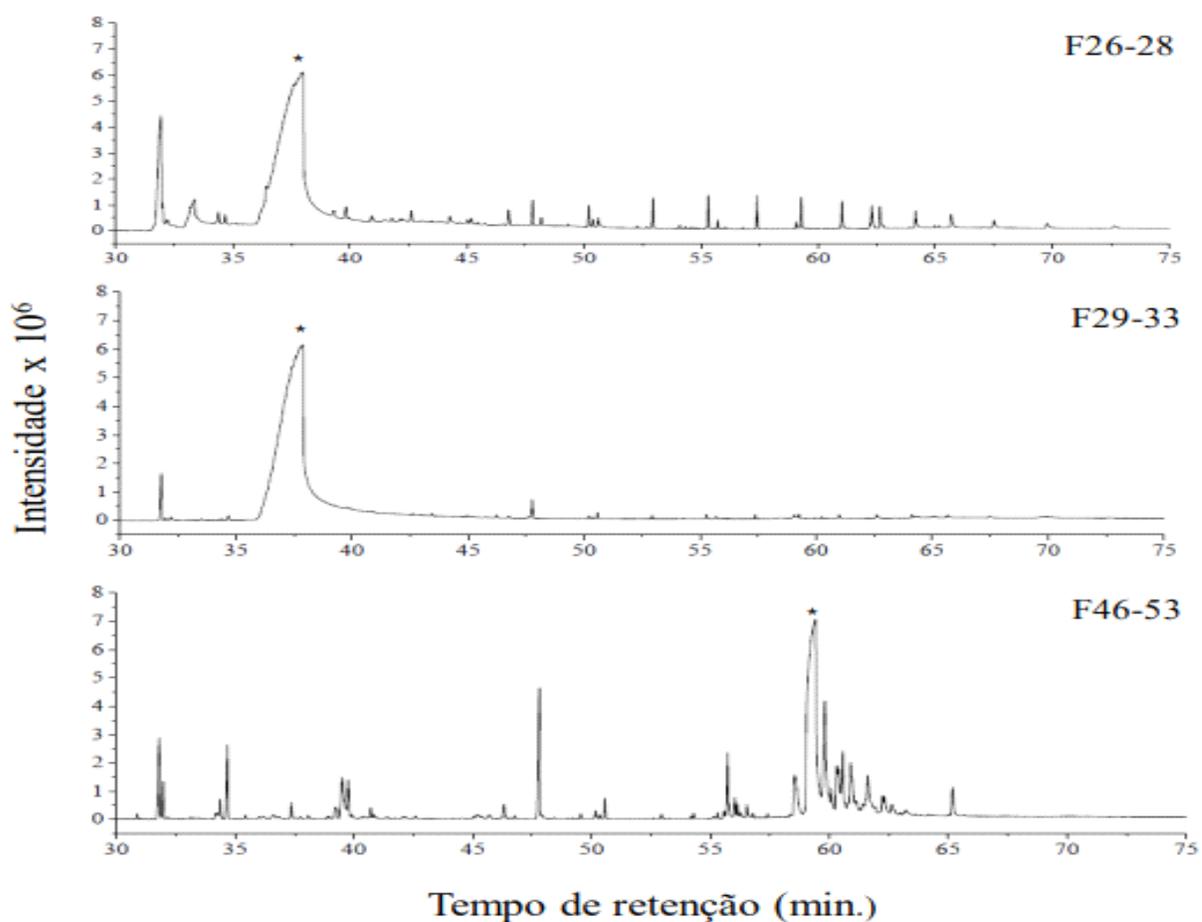


**Figura 35:** Rede molecular obtida na plataforma GNPS das frações (coluna) mais ativas contra os modelos testados. FJC1:FJC3 – *J. crassa*; FAF2:FAF4 - *A. flabellata*.

### 3.6 Análise por CG-EM das frações purificadas na cromatografia contracorrente

*Jania crassa*

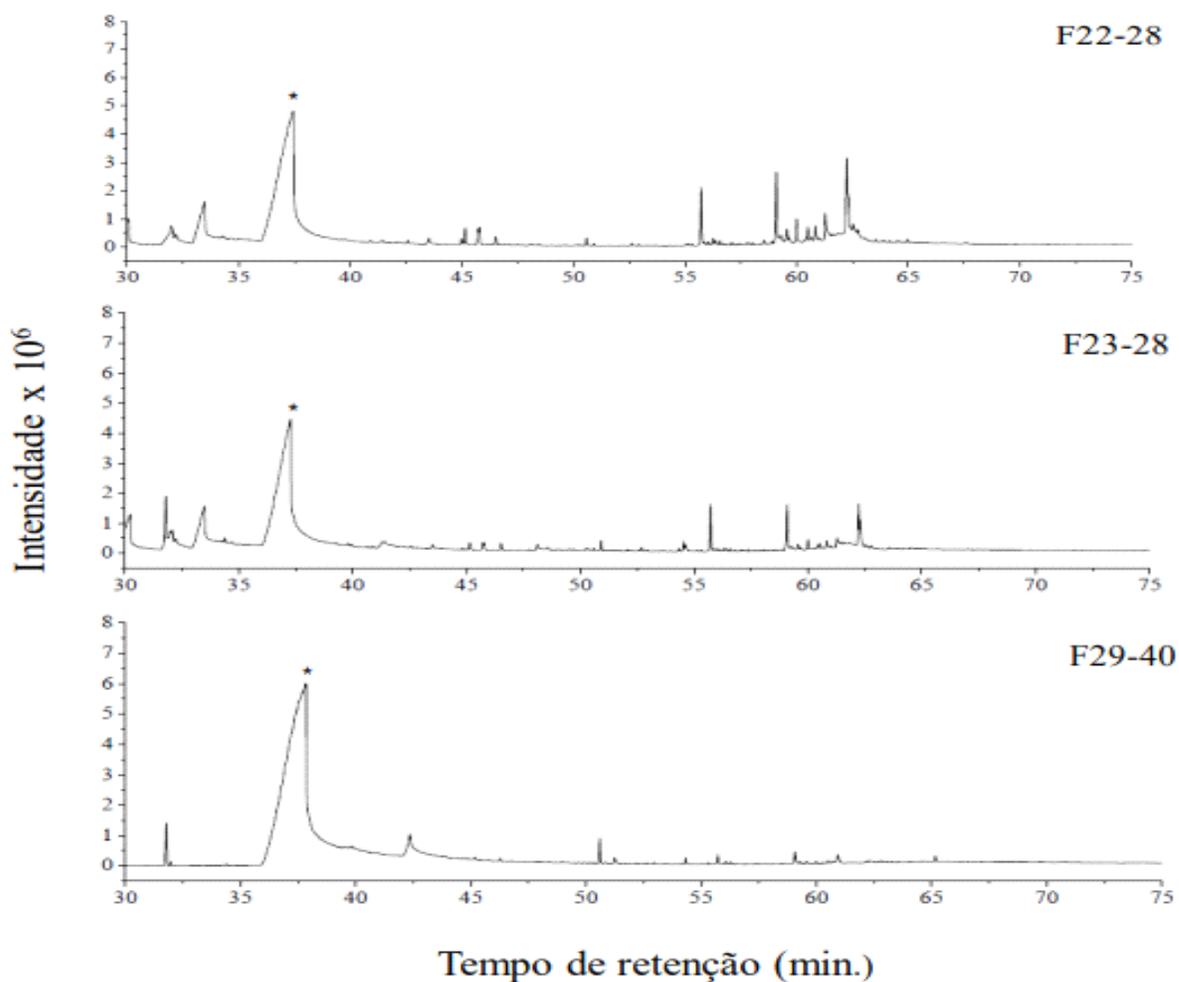
Os cromatogramas das frações F26-28 e F29-33 (**Figura 36**) apresentaram como substância majoritária o ácido palmítico, com área de 47,43% e 71,56%, respectivamente. Já no cromatograma da fração F46-53 (**Figura 36**), a substância mais abundante foi o esteroide (3 $\beta$ ) colest-5-en-3-ol apresentando área de 30,85%.



**Figura 36:** Cromatogramas das frações mais purificadas (F26-28, F29-33 e F46-53) da macroalga calcária *J. crassa* obtidos por CG-EM. \* Indica a substância majoritária.

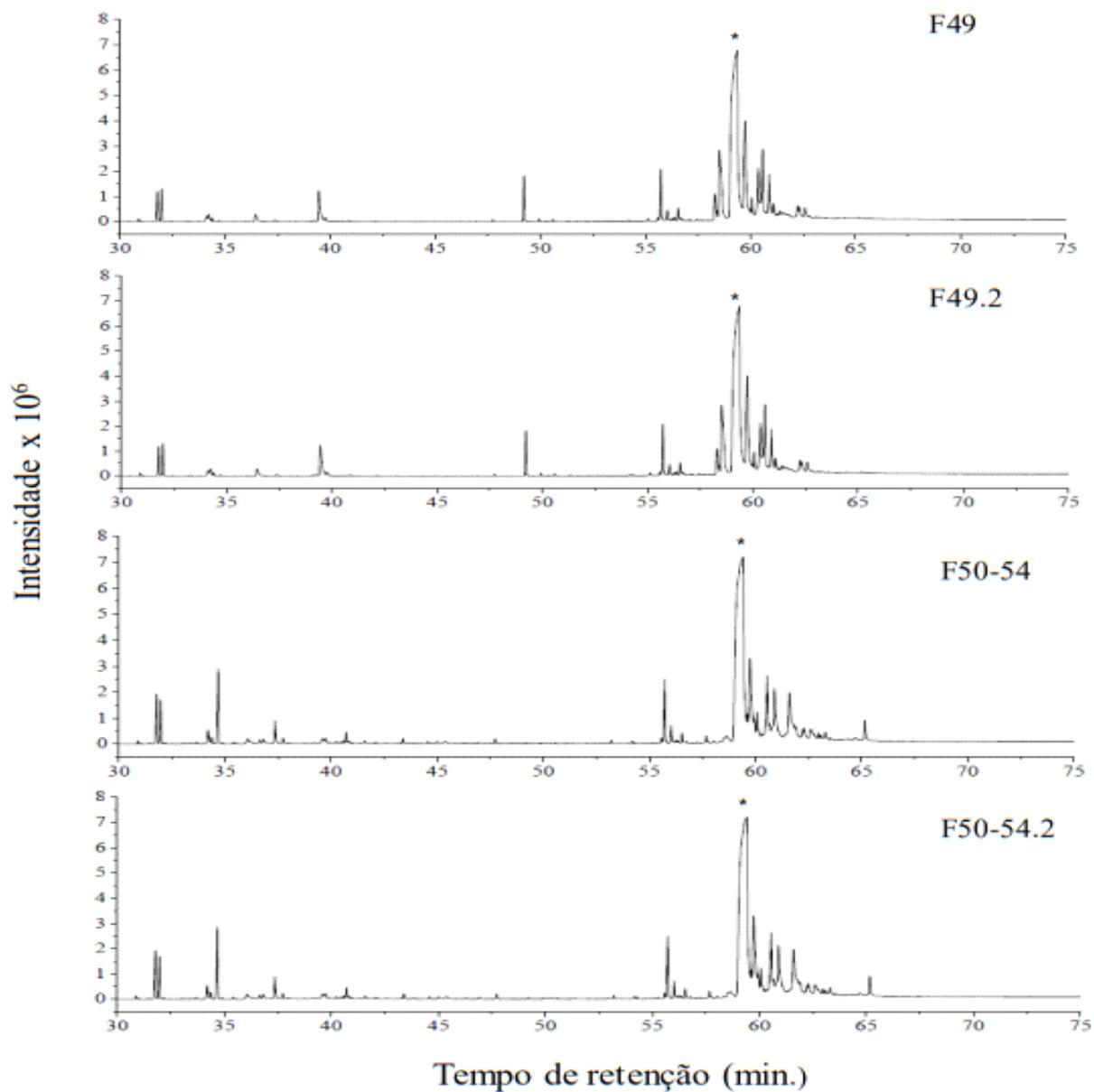
*Arthrocardia flabellata*

Os cromatogramas das frações F22-28, F23-28 e F29-40 (**Figura 37**) apresentaram o ácido palmítico como à substância majoritária com área de 35,35%, 32,88%, 65,2%, respectivamente.



**Figura 37:** Cromatogramas das frações mais purificada (F22-28, F23-28 e F29-40) da macroalga calcária *A. flabellata* obtidos por CG-EM. \* Indica a substância majoritária.

Quanto aos cromatogramas das frações F49, F49.2, F50-54 e F50-54.2 (**Figura 38**), a substância majoritária foi o esteroide (3 $\beta$ ) colest-5-en-3-ol com área de 28,12%; 34,42%; 28,11%; 35,34%, respectivamente.



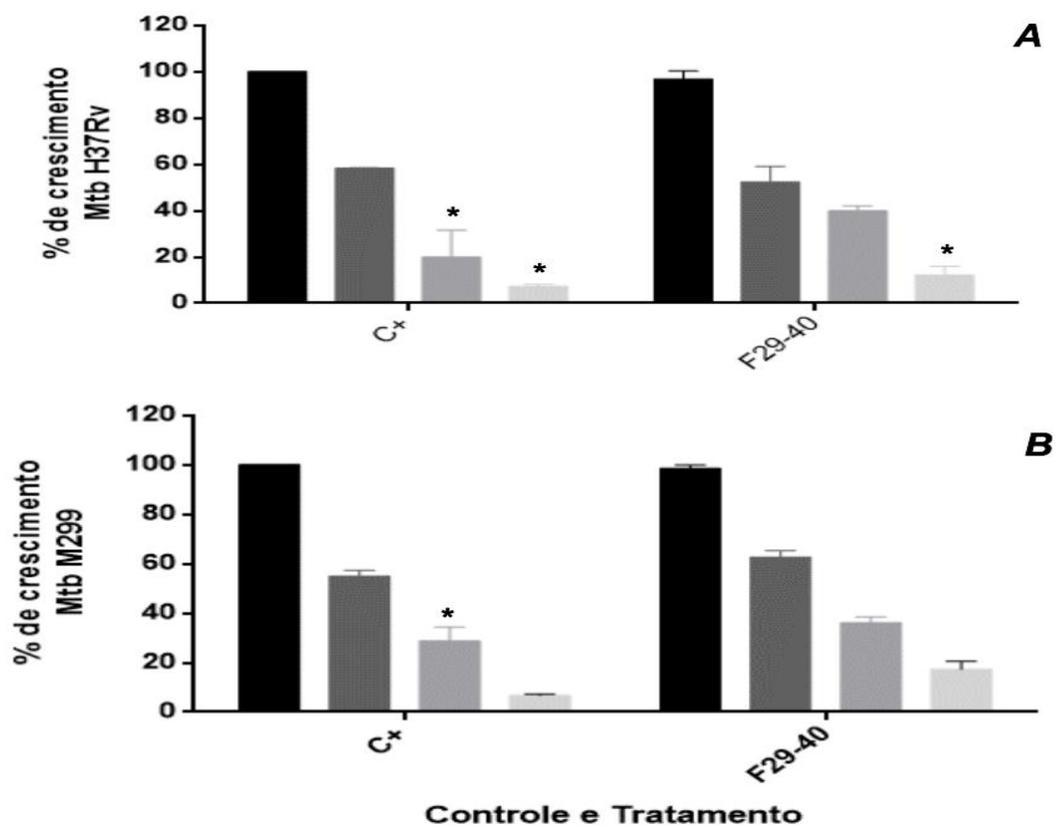
**Figura 38:** Cromatogramas das frações mais purificada (F49, F49.2, F50-54 e F50-54.2) da macroalga calcária *A. flabellata* obtidos por CG-EM. \* Indica a substância majoritária.

### 3.7 Avaliação da fração (F29-40) de *Arthrocardia flabellata* quanto à atividade antimicobiana

Devido à quantidade de massa obtida para cada fração, somente a fração F29-40 de *A. flabellata* foi utilizada nos testes biológicos. O ácido palmítico foi a substância mais abundante presente nesta fração. Diferenças significativas foram observadas mediante a comparação entre as diferentes concentrações do controle e tratamentos (**Tabela 23**). O antibiótico rifampicina apresentou maior atividade nas concentrações de 0,08 e 1 µg/mL contra a cepa Mtb H37Rv e na concentração de 10 µg/mL contra a cepa Mtb M299. Em relação à fração, a concentração mais ativa foi de 100 µg/mL para a cepa Mtb H37Rv (**Figura 39**).

**Tabela 23:** ANOVA da atividade antimicobacteriana fração 29-40 de *A. flabellata*.

Micobactérias	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	F	p
Mtb H37RV	21774,49	7	127,463	<0,001
Mtb M299	21041,15	7	420,698	<0,001



**Figura 39:** Efeito da fração F29-40 de *A. flabellata* no crescimento de cepas micobacterianas em diferentes concentrações (0,8; 4; 20 e 100 µg/mL). **(A)** cepa laboratorial - Mtb H37Rv **(B)** cepa hipervirulenta - Mtb M299. O antibiótico rifampicina (controle positivo - C+) foi usado nas concentrações de 0,0032; 0,016; 0,08 e 1 µg/mL para a cepa laboratorial - Mtb H37Rv e de 0,008; 0,04; 0,2 e 10 µg/mL para a cepa hipervirulenta – Mtb M299. \*Concentrações mais ativas significativamente (controle e tratamento). Os valores são representados pela média e desvio padrão. As barras representam às concentrações testadas (controle e tratamento) em ordem crescente.

Quando levamos em consideração a concentração mínima inibitória ( $MIC_{50} \leq 40$  µg/mL), a fração foi considerada ativa, apresentado  $MIC_{50} 7,9 \pm 1,2$  µg/mL (Mtb H37Rv) e  $MIC_{50} 9,9 \pm 1,1$  µg/mL (Mtb M299) **(Tabela 24)**.

**Tabela 24:** Concentração inibitória mínima ( $MIC_{50}$ ) da fração F29-40 de *A. flabellata* contra cepa laboratorial – Mtb H37Rv e cepa hipervirulenta – Mtb M299.

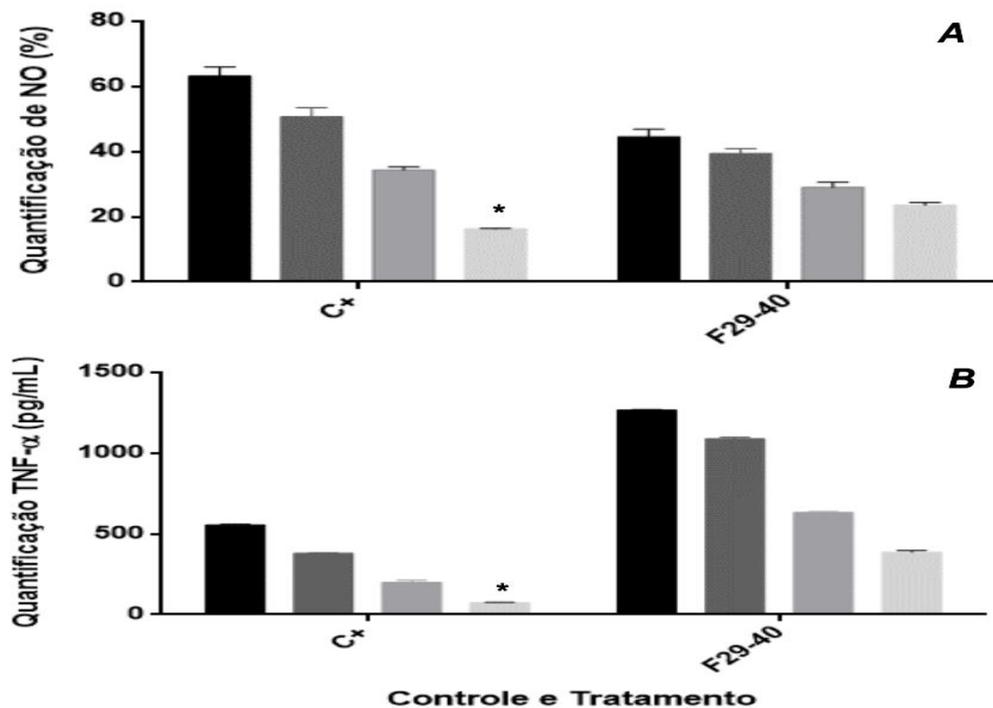
	$MIC_{50}$ (µg/mL)	
	Mtb H37Rv	Mtb M299
Fração 29-40	$7,9 \pm 1,2$	$9,9 \pm 1,1$
Rifampicina	$0,11 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,1$

### 3.8 Avaliação da fração (F29-40) de *Arthrocardia flabellata* quanto às atividades anti-inflamatória e citotoxicidade

Diferenças significativas foram observadas mediante a comparação entre as diferentes concentrações do controle e tratamentos (**Tabela 25**). Os fármacos L-NMMA e ibuprofeno apresentaram maior atividade nas concentrações de 100 µg/mL contra as cepas NO e TNF- $\alpha$ , respectivamente (**Figura 40**). Quanto à citotoxicidade, o controle positivo apresentou efeito tóxico elevado quando comparado aos tratamentos.

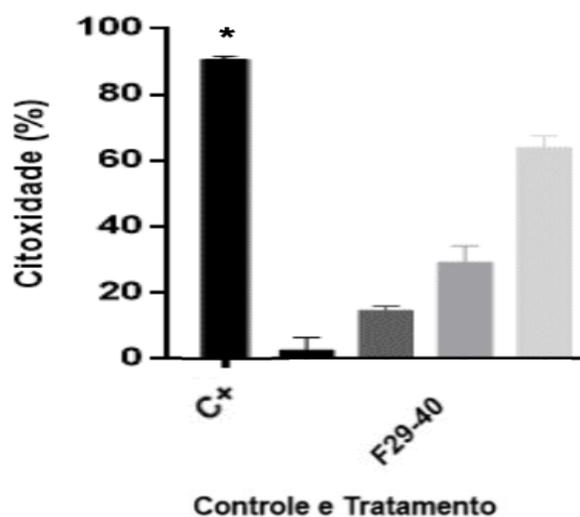
**Tabela 25:** ANOVA da atividade anti-inflamatória da fração 29-40 de *A. flabellata*

Mediadores inflamatórios	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	F	p
NO	4853,51	7	208,66	<0,001
TNF- $\alpha$	3137598	7	7897,0	<0,001



**Figura 40:** Efeito da fração F29-40 de *A. flabellata* na produção de mediadores inflamatórios em diferentes concentrações (0,8; 4; 20 e 100 µg/mL). (A) NO (B) e TNF-α. Os controles positivos (C+) foram os fármacos L-NMMA e ibuprofeno (nas mesmas concentrações dos extratos) para o NO e o TNF-α, respectivamente. \*Concentrações mais ativas significativamente (controle e tratamento). Os valores são representados pela média e desvio padrão. As barras representam às concentrações testadas (controle e tratamento) em ordem crescente.

Em relação à concentração inibitória ( $IC_{50} \leq 45 \mu\text{g/mL}$ ) frente aos mediadores inflamatórios (NO e TNF-α) e a concentração de citotoxicidade ( $CC_{50} > 70 \mu\text{g/mL}$ ) frente aos macrófagos, a fração foi considerada ativa, apresentando valores de  $IC_{50} 39,2 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$  (NO) e  $IC_{50} 17,1 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$  (TNF-α). A fração também apresentou atividade tóxica contra células de defesa, com valor de  $CC_{50} 52,9 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$  (**Figura 41; Tabela 26**).



**Figura 41:** Atividade citotóxica da fração F29-40 de *A. flabellata* contra macrófagos murinos em diferentes concentrações (0,8; 4; 20 e 100 µg/mL). A cultura de macrófagos estimulados e tratados com 1% de Triton X- 100 foi usado como controle positivo (C+). \*Concentrações mais ativas significativamente (controle e tratamento). Os valores são representados pela média e desvio padrão. As barras representam às concentrações testadas (controle e tratamento) em ordem crescente.

**Tabela 26:** Atividade anti-inflamatória e citotóxica fração mais purificada (F29-40). O valor de  $IC_{50} \leq 45$  µg/mL e  $CC_{50} > 70$  µg/mL apresentam atividade.

	$IC_{50}$ (µg/mL)	$IC_{50}$ (µg/mL)	$CC_{50}$ (µg/mL)
	NO	TNF	MTT
Fração 29-40	39,2 ± 1,3	17,1 ± 1,2	52,9 ± 1,1

#### 4. DISCUSSÃO

Organismos marinhos têm sido uma fonte promissora de substâncias bioativas com atividade antimicrobiana, destacando o potencial das algas vermelhas, das quais já foram extraídas diversas classes químicas com aplicações farmacológicas (Kasanah *et al.* 2015; Cotas *et al.* 2020; Majnaqui & Kadmiri, 2021).

Neste trabalho, o *screening* inicial de 9 extratos de algas calcárias geniculadas foi realizado para avaliar as atividades antimicobacteriana, anti-inflamatória e a citotoxicidade. Quanto a atividade antimicobacteriana, os extratos que apresentaram atividade inibitória contra a cepa laboratorial (Mtb H37Rv) foram JcP, AbFNS, AbPF, AbSCB, CsSI e AfPC. Em relação à cepa hipervirulenta (Mtb M99), os extratos considerados ativos foram JcP, AbPF, AbSCC, CsSI e AfPC.

O extrato de *J. crassa* coletado na Prainha (JcP) apresentou atividade inibitória contra as duas cepas micobacterianas, principalmente contra a cepa hipervirulenta (Mtb M99). Estudos farmacológicos com o gênero *Jania* são mais abundantes do que os demais gêneros estudados. O estudo realizado por Soares *et al.* (2012) também relatou atividade antimicrobiana do extrato bruto (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH 1:1) de *J. crassa*, contra dois tipos de vírus da Herpes. Stirk *et al.* (2003) demonstrou a atividade contra diferentes cepas bacterianas para os extratos etanólicos *Jania sp.*, no entanto, não foi um dos mais ativos. Já no estudo proposto por Sasikala & Geetha (2017), o extrato metanólico da espécie *Jania rubens* foi um dos mais promissores frente a diferentes cepas bacterianas, principalmente contra as bactérias *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pyogenes*. Allmendinger *et al.* (2010) relatou a ausência de atividade inibitória contra *M. tuberculosis* (MIC>256 µg/mL) para o extrato bruto de *Jania rubens*, diferente do nosso estudo que apresentou valor de MIC<sub>50</sub> 12,6 ± 1,4 µg/mL para o mesmo gênero. Val *et al.* (2001) também relatou a ausência de atividade de duas espécies do gênero *Jania* (*J. rubens* e *Jania adhaerescens*) contra diferentes microorganismos, incluindo a cepa de *Mycobacterium smegmatis*.

Em relação aos extratos de *A. beauvoisii*, os mais ativos contra a cepa laboratorial (Mtb H37Rv) e a cepa hipervirulenta (Mtb M99), foram os extratos coletados

na Fenda de Nossa Senhora - AbFNS ( $MIC_{50}$   $24,7 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$ ) e Praia do forno - AbPF ( $MIC_{50}$   $15,0 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$ ), respectivamente. Estudo sobre atividade antimicrobiana do gênero *Amphiroa* também já foram descritos na literatura. Vlachos *et al.* (1997) apresentaram resultados da atividade dos extratos etanólicos de *Amphiroa ephedraea* contra quatro espécies de fungos e onze espécies de bactérias, sendo mais ativo contra a bactéria *Bacillus subtilis* EL39 (20-25mm). Em contrapartida, foi observado inatividade ou baixa inibição dos extratos de *A. beauvoisii*, *Amphiroa cryptarthrodia* e *Amphiroa rigida* frente a diferentes modelos biológicos (bactérias, vírus e fungos), no estudo realizado por Ballesteros *et al.* (1992). No estudo de Stirk *et al.* (2003), os extratos etanólicos de *Amphiroa bowerbankii* e *A. ephedraea* apresentaram inibição no crescimento de diferentes cepas bacterianas (Gram positivas e Gram negativas), mas não foram os mais promissores. Mofeed *et al.* (2022) demonstrou que o extrato de *Amphiroa anceps* (MeOH: Hex 1:1), contendo o ácido 1,2-benzenodicarboxílico, éster diisooctil (30,4%) e o ácido pentadecanóico, 14-metil-, éster metílico (29,5%) como as substâncias mais abundantes, apresentou atividade antibacteriana contra *S. typhimurium*, *S. aureus* e *E. coli*, e atividade antiviral contra rotavírus e vírus coxsackie B3.

A atividade biológica dos extratos está diretamente ligada à sua composição química, que pode ser afetada por diversos fatores, tais como temperatura, salinidade, luz (Stengel *et al.* 2011; Sudatti *et al.* 2011; Cotas *et al.* 2020), localização (Plouguerné *et al.* 2010a, Stengel *et al.* 2011), sazonalidade (Stengel *et al.* 2011; El Maghraby & Fakhry, 2015, Mansur *et al.* 2020), disponibilidade de nutrientes e exposição a diferentes interações ecológicas (Stengel *et al.* 2011). Além destes fatores, o solvente utilizado no processo de extração também pode influenciar a composição química refletir na variação dos resultados obtidos (Saleh & Al-Mariri, 2017; El-Nuby *et al.* 2021).

Quanto ao extrato de *C. sagittatum* (CsSI) também foi observado atividade contra a cepa laboratorial (Mtb H37Rv) e a cepa hipervirulenta (Mtb M99), no entanto, não foi um dos extratos mais promissores, apresentando  $MIC_{50}$   $37,2 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$  e  $MIC_{50}$   $25,3 \pm 1,6 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. O estudo realizado por Vlachos *et al.* (1997)

também apresentou atividade do extrato *C. sagittatum* contra quatro espécies de fungos e doze espécies de bactérias, sendo mais ativo na inibição das bactérias *B. subtilis* EL39, *Micrococcus* sp. e *S. aureus*. No estudo de Stirk *et al.* (2003) também foi possível verificar atividade do extrato etanólico de *Cheilosporum* contra cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Além da atividade antibacteriana, o estudo realizado por Premanathan *et al.* 1994, demonstrou alta atividade antiviral para o extrato de *Cheilosporum spectabile*.

Quanto ao extrato de *A. flabellata* (AfPC), apresentou atividade contra as duas cepas de micobactérias, sendo o mais ativo, dentre todas os extratos testados, contra a cepa laboratorial (Mtb H37Rv), apresentando valor de MIC<sub>50</sub> 4,6 ± 1,3 µg/mL. No trabalho realizado por Vlachos *et al.* (1997) o extrato etanólico de *Arthrocardia carinata* apresentou atividade contra quatro espécies de fungos e onze espécies de bactérias, sendo mais ativo na inibição da bactéria *Bacillus subtilis* EL39 (20-25mm), seguido das bactérias *Micrococcus* sp. e *Staphylococcus aureus*, com inibição entre 15-20 mm para ambas. Stirk *et al.* (2003) também demonstrou a atividade contra três cepas de bactérias Gram-positivas e quatro cepas de bactérias Gram-negativas para os extratos etanólicos *Arthrocardia* sp., apresentando mais atividade contra uma das cepas de *S. aureus* (MIC 0.065 mg/mL).

Estudos sobre o potencial biotecnológico e a composição química dos gêneros *Cheilosporum* e *Arthrocardia* são mais escassos em comparação aos demais. Neste sentido, o presente estudo apresenta resultados promissores quanto à caracterização química e o potencial farmacológico dos mesmos.

Em relação à capacidade inibitória de NO, quase todos os extratos apresentaram atividade, exceto o extrato *A. beauvoisii* coletado na Praia do forno (AbPF), sendo o extrato de *C. sagittatum* o mais ativo comparado aos demais (IC<sub>50</sub> 6,7 ± 1,3 µg/mL). Quanto a capacidade inibitória de TNF-α, o mesmo não foi observado, visto que, somente dois extratos apresentaram atividade (AbSCC e AfPC), sendo o segundo mais ativo (IC<sub>50</sub> 25,2 ± 1,5 µg/mL). Mediadores inflamatórios, produzidos pelos macrófagos, são importantes no combate da infecção causada pelas micobactérias. No entanto, a produção excessiva destas substâncias pode contribuir para o agravamento

da patologia (Medzhitov, 2010; Delogu *et al.* 2013; Ventura *et al.* 2015; Araujo *et al.* 2021). Neste sentido, encontrar substâncias bioativas (de macroalgas marinhas) que sejam capazes de controlar a produção excessiva destes mediadores é mais uma alternativa importante no tratamento da patologia em questão.

As substâncias mais abundantes encontradas nos extratos brutos (Capítulo 1) foram: o esteróide ( $3\beta$ ) colest-5-en-3-ol e o ácido palmítico, variando quantitativamente de acordo com cada extrato estudado e podem estar envolvidas nas atividades observadas, visto que, estudos prévios apresentaram atividades biológicas para ambas as substâncias (Plouguerné *et al.* 2010b; Putra & Hadi, 2017; Bahrún *et al.* 2021; Pourakbar *et al.* 2021).

A partir dos resultados obtidos com os extratos brutos, os mais promissores (AbPF, JcP, CsSI e AfPC) foram selecionados para realizar o fracionamento em coluna. Seis sistemas de solventes foram escolhidos, com a finalidade de concentrar possíveis substâncias bioativas e aumentar a eficiência nas atividades envolvidas. Levando em consideração não somente a atividade antimicrobiana, mas também a atividade anti-inflamatória e citotóxica, as frações FJC1, FJC2 e FJC3 de *J. crassa* (JcP) e as frações FAF2, FAF3 e FAF4 de *A. flabellata* (AfPC) foram consideradas mais promissoras em relação as demais. Como já foi mencionado, a produção excessiva dos mediadores inflamatórios pode contribuir para o agravamento da patologia. Desta forma, torna-se importante encontrar substâncias bioativas capazes de inibir a bactéria patogênica, sem matar as células de defesa e sem aumentar a produção de mediadores inflamatórios.

Através da análise por CG-EM e a identificação pelos bancos de dados utilizados (NIST e GNPS), diferentes classes químicas foram reveladas nas frações mais ativas, tais como ácido graxo, éster de ácidos graxo, hidrocarboneto, álcool graxo, monoterpenóide, esterol e benzenóide foram às classes químicas encontradas nas frações mais ativas. A análise por rede molecular realizada na plataforma do GNPS foi uma ferramenta metabolômica importante para a organização, representação visual e identificação, permitindo observar o agrupamento de substâncias dentro da mesma classe química e contribuindo para a identificação de substâncias junto com a

biblioteca NIST. Dentre as substâncias mais abundantes identificadas, destaca-se ácido palmítico e o (3 $\beta$ ) colest-5-en-3-ol. Estudos prévios também relataram a presença das mesmas nos extratos brutos de macroalgas coralinas dos gêneros *Amphiroa*, *Jania* e *Cheilosporum* (Venkatesalu *et al.* 2012; Jayasree *et al.* 2013; Caf *et al.* 2019; Mofeed *et al.* 2021).

A partir dos resultados obtidos com as frações da coluna, as amostras de *J. crassa* (JcP) e *A. flabellata* (AfPC) foram selecionadas para obtenção de frações mais purificadas, usando como ferramenta a cromatografia contracorrente. Este tipo de cromatografia apresenta várias vantagens, comparadas as outras técnicas de separação e isolamento, tais como rapidez, eficiência, boa resolução, reprodutibilidade, economia de solvente e recuperação da amostra (Leitão 2005; Buttenbender *et al.* 2018). As frações mais purificadas foram analisadas por CG/EM e as substâncias majoritárias identificadas foram encontradas nas duas espécies de algas *J. crassa* (JcP) e *A. flabellata* (AfPC). A primeira substância foi identificada com ácido palmítico e a segunda como o esteróide (3 $\beta$ ) colest-5-en-3-ol. Estas substâncias foram destacadas como majoritárias tanto no extrato bruto quanto em algumas frações da coluna.

Os esteróis são pertencentes à família dos lipídios e estão categorizados como esteróides. Embora sejam classificados como metabólitos secundários, são componentes estruturais indispensáveis da membrana celular de diversos organismos eucarióticos (Kim & Ta, 2011; Alassali *et al.* 2016, Thirumurugan *et al.* 2018; Fagundes & Wagner, 2021). São substâncias químicas promissoras em diversas atividades biológicas, tais como antitumoral, antioxidante e antibacteriana (Kim & Ta, 2011; Fagundes & Wagner, 2021). Desta forma, o esteróide (3 $\beta$ ) colest-5-en-3-ol encontrado em abundância no presente estudo, pode ser uma das substâncias associadas as atividades biológicas.

Quanto ao ácido palmítico, estudos descreveram o seu potencial contra diferentes modelos de microorganismos (Bazes *et al.* 2009; Plouguerné *et al.* 2010b; Bakar *et al.* 2017) e o seu envolvimento em processos inflamatórios e citotóxico (Lima *et al.* 2006, Korbecki & Bajdak, 2019). Além disso, o estudo realizado por Sandoval-Montemayor *et al.* (2012), apresentou atividade promissora do ácido palmítico

comercial frente à diferentes cepas de *M. tuberculosis*, corroborando para sua relação nas atividades propostas, visto que, os resultados da fração mais purificada F29-40 de *A. flabellata*, contendo esta substância como majoritária, foram considerados ativos, dentro dos critérios estabelecidos, na inibição de cepas micobacterianas e mediadores inflamatórios. Em contrapartida, a fração F29-40 também apresentou toxicidade contra as células de defesa. Neste sentido, novos testes com outras concentrações são importantes na busca de resultados que sejam capazes de inibir o crescimento das micobactérias, mas que apresente baixa ou nenhuma toxidez.

Os resultados obtidos para algas coralinas geniculadas (*J. crassa*, *A. beauvoisii*, *C. Sagittatum* e *A. flabellata*) são inéditos para as atividades testadas no presente estudo, contribuindo com mais informações sobre a composição química e evidenciando o potencial biotecnológico deste grupo de macroalgas na área farmacológica.

## 5. CONCLUSÃO

- A caracterização da diversidade química dos extratos brutos de *Amphiroa beauvoisii*, *Cheilosporum sagittatum*, *Jania crassa* e *Arthrocardia flabellata* revelou a variação quali-quantitativa tanto a nível interespecífico quanto a nível intraespecífico, mesmo dentro de uma área de amostragem tão pequena como Arraial do Cabo. As substâncias mais abundantes nos extratos brutos foram o esteróide (3 $\beta$ ) colest-5-en-3-ol e o ácido palmítico, variando de acordo com cada amostra estudada.
- Os extratos brutos apresentaram atividade frente aos modelos de organismos incrustantes (capítulo 1), no entanto, o extrato de *C. sagittatum* (CsSI), seguido do extrato de *Amphiroa beauvoisii* (AbSCC) foram os mais ativos contra as bactérias marinhas, inibindo significativamente o crescimento de quatro cepas testadas (*P. elyakovii*, *P. fluorescens*, *P. irgensii* e *S. putrefaciens*). Frente ao mexilhão *P. perna*, o extrato de *C. sagittatum* (CsSI) foi o mais ativo.
- Os extratos também apresentaram atividade antimicobacteriana, anti-inflamatória e citotóxica (capítulo 2), sendo os extratos de *C. sagittatum*, *A. beauvoisii* (AbPF), *J. crassa* (JcP) e *A. flabellata* (AfPC), os mais promissores frente aos modelos testados. Estes foram selecionados para etapa de fracionamento (bioguiado) através da cromatografia líquida em coluna com diferentes sistemas solventes orgânicos.
- O fracionamento em coluna foi uma etapa importante no processo de estudo bioguiado, para evidenciar as frações mais ativas nas atividades farmacológicas. Levando em consideração não somente a atividade antimicobacteriana, mas também a atividade anti-inflamatória e citotóxica, as frações FJC1, FJC2 e FJC3 de *J. crassa* (JcP) e as frações FAF2, FAF3 e FAF4 de *A. flabellata* (AfPC) foram consideradas as mais ativas. Estas duas amostras de algas calcárias foram selecionadas para a etapa de isolamento usando como ferramenta a cromatografia contracorrente.
- O esteróide (3 $\beta$ ) colest-5-en-3-ol e o ácido palmítico foram as substâncias majoritárias identificadas nas frações mais purificadas da cromatografia contracorrente e possivelmente estão associadas as atividades do presente estudo.

- Os resultados obtidos para os extratos e frações das espécies *J.crassa*, *A. beauvoisii*, *C. sagittatum* e *A. flabellata* coletadas em Arraial do Cabo são inéditos quanto à composição química, a variabilidade química intra-interespecífica e atividade frente aos modelos testados, contribuindo com mais informações sobre as substâncias químicas produzidas por este grupo de macroalgas e evidenciando o seu potencial biotecnológico, as quais poderão ser alvo de estudos futuros na obtenção de novas substâncias bioativas.

## REFERÊNCIAS

AHMED, H. H. *et al.* Antitumour and antioxidant activity of some red sea seaweeds in Ehrlich ascites carcinoma in vivo. **Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 66, p. 367 - 76, 2011.

AKBARY, P.; ADESHINA, I.; JAHANBAKHSIC, A. Growth performance, digestive enzymes, antioxidant activity and immune responses of *Litopenaeus vannamei* fed with *Jania adhaerens* J.V. supplemented diet against *Photobacterium damsela* infection. **Animal Feed Science and Technology**, v. 270, p. 114 - 696, 2020.

ALASSALI, A. *et al.* Methods for upstream extraction and chemical characterization of secondary metabolites from algae Biomass. **Advanced Techniques in Biology & Medicine**, v. 4, p. 1- 16, 2016.

ALLMENDINGER, A. *et al.* Antiprotozoal, antimycobacterial and cytotoxic potential of twenty-three British and Irish red algae. **Phytotherapy Research**, v. 24, p.1099 - 1103, 2010.

ANKRAH, A. O. *et al.* Tuberculosis. *Seminars in nuclear medicine*, v. 48, n. 2, p. 108 - 130, 2018.

ARAUJO, M. H. *et al.* Anti-mycobacterial and anti-inflammatory activity of restinga plants: a dual approach in searching for new drugs to treat severe tuberculosis, **Rodriguésia**, v.72: e01152019, 2021.

AWAD, N. E Bioactive brominated diterpenes from the marine red alga *Jania rubens* (L.) Lamx. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 275 - 279, 2004.

BAHRUN, B. *et al.* In vitro and in silico analysis for antibacterial activities of various extracts of *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) from selayar islands, Indonesia. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 64, p. 7203 - 7212, 2021.

BAKAR, K. *et al.* Fatty acids compositions of *Sargassum granuliferum* and *Dictyota dichotoma* and their anti-fouling activities. **Journal of Sustainability Science and Management**, v.12, p. 8 - 16, 2017.

BALLESTEROS, E. Biological activity of extracts from some mediterranean macrophytes. **Botanica Marine**, v. 35, p. 481 – 485, 1992.

BAZES, A. *et al.* Investigation of the antifouling constituents from the brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, p. 395 - 403, 2008.

BUTTENBENDER, S. L, *et al.* Cromatografia contracorrente: princípios e aplicações. **Revista Eletrônica De Farmácia**, 15(e), 2018.

BHOSALE, S.H. *et al.* Antifungal activity of some marine organisms from India, against food spoilage *Aspergillus* strains. **Mycopathologia**, v. 147, p. 133-138, 1999.

BHOWMICK, S. *et al.* Algal metabolites: An inevitable substitute for antibiotics. **Biotechnology Advances**, v. 43, 2020.

CAF, E. *et al.* Fatty acid and lipophilic vitamin composition of seaweeds from Antalya and Canakkale (Turkey). **Grasas y aceites**, v.70, p. 1 - 7, 2019.

CALADO, L. *et al.* **Características geológicas e oceanográficas**. In: Biodiversidade marinha dos costões rochosos de Arraial do Cabo: Histórico, Ecologia e Conservação. Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira, p. 407, 2020.

CIKOS, A. *et al.* Bioprospecting of coralline red alga *Amphiroa rigida* J.V. Lamouroux: volatiles, fatty acids and pigments. **Molecules**, 26, p. 1 - 21, 2021.

COTAS, J. *et al.* A comprehensive review of the nutraceutical and therapeutic applications of red seaweeds (Rhodophyta). *Life*, v. 10, p. 1 - 23, 2020.

CHAKRABORTY. K.; RAOLA, V. K. In vitro bioactive analysis and antioxidant activity of two species of seaweeds from the Gulf of Mannar. **Natural product research**, v. 32, n. 22, p. 2729 - 2734, 2018.

CLEMENTINO, L. C. *et al.* The antileishmanial activity of the antarctic brown alga *Ascoseira mirabilis* Skottsberg. **Natural Product Research**, v. 35, p. 1 - 5, 2020.

CRISAN-DABIJA, R. *et al.* Tuberculosis and COVID-19: lessons from the past viral outbreaks and possible future outcomes. **Canadian Respiratory Journal**, 2020.

DELOGU, G. *et al.* The Biology of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 5, e2013070, 2013.

DIXIT, D.; REDDY, C. R. K. Non-targeted secondary metabolite profile study for deciphering the cosmeceutical potential of red marine macro alga *Jania rubens* - An LCMS Based Approach. **Cosmetics**, v. 4, p. 1 - 17, 2017.

DMYTRYK A. *et al.* **Algae as source of pharmaceuticals**. In: Tripathi, B.N., Kumar, D. (Eds.), *Prospects and Challenges in Algal Biotechnology*. Springer Singapore, Singapore, p. 295 - 310, 2017.

ELANGOVAN, M.; ANANTHARAMAN, P. Nutritional composition and phytochemistry profile of seaweeds collected from Rameshwaram coast. **International Journal of Scientific & Technology Research**, v. 8, p. 3137 - 3140, 2019.

EI-ANSARYA M. S M.; Hamouda, R. A. Biocontrol of root-knot nematode infected banana plants by some marine algae (2014). **Russian Journal of Marine Biology**, 40: 140 - 146.

EL-MAGHRABY, D. M.; FAKHRY, E. M. Lipid content and fatty acid composition of Mediterranean macro-algae as dynamic factors for biodiesel production. **Oceanologia**, v. 57, p. 86 - 92, 2015.

EL-NUBY, A. S. M. *et al.* In vitro evaluation of the toxicity of different extracts of some marine algae against root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). **Pakistan Journal of Phytopathology**, v. 33, p. 55 - 66, 2021.

EL-ZAMKAN, M. A. *et al.* Control of virulent *Listeria monocytogenes* originating from dairy products and cattle environment using marine algal extracts, silver nanoparticles there of, and quaternary disinfectants. **Infection and Drug Resistance**, v.14, p. 2721 - 2739. 2021.

ESTEBAN, R. *et al.* Carotenoid composition in Rhodophyta: insights into xanthophyll regulation in *Corallina elongata*. **European Journal of Phycology**, v. 44, p. 221 - 230, 2009.

ESSA, H. *et al.* Towards optimizing the conventional and ultrasonic-assisted extraction of sulfated polysaccharides from marine algae. **Materials Science and Engineering**, v. 464, p. 1 - 11, 2018.

FAGUNDES, M. B.; WAGNER, R. **Sterols biosynthesis in algae**. In Biosynthesis; Zepka, L.Q., Do Nascimento, T.C., Jacob-Lopes, E., Eds.; IntechOpen: London, UK, p. 137 - 144, 2021.

FONSECA, J. D. *et al.* The complex evolution of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 32, p. 94 -100, 2015.

GARCÍA-DAVIS, S. *et al.* Antimycobacterial activity of laurinterol and aplysin from *Laurencia johnstonii*. **Marine Drugs**, v. 18, p. 287, 2020.

GRIESS, J.P. Philos. Trans. R. Soc. Lond. 154: 679/A.C. Bratton, E.K. Marshall Jr., **Journal of Biology and Chemical**, v. 537,1939.

HARADA, H.; KAMEI, Y. Selective cytotoxicity of marine algae extracts to several human leukemic cell lines. **Cytotechnology**, v. 25, n. 1, p. 213 - 219, 1997.

JAYASREE, N. B. *et al.* GC-MS, HPLC and AAS analysis of fatty acids, amino acids and minerals in red algae *Amphiroa anceps*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 187 - 190, 2013.

KADHIRAVAN, T.; DEEPANJALI, S. Role of corticosteroids in the treatment of tuberculosis: an evidence-based update. **Indian journal of chest diseases and allied sciences**, v. 52, p. 153 - 158, 2010.

KASANA, N. *et al.* Antibacterial compounds from red seaweeds (Rhodophyta). **Indonesian Journal of Chemistry**, v. 15, p. 201 - 209, 2015.

KUMAR, T.S. *et al.* Fatty acids-carotenoid complex: An effective anti-TB agent from the *Chlorella* growth factor-extracted spent biomass of *Chlorella vulgaris*. **J Ethnopharmacol**, v. 249:11239, 2019.

KIM, S.; TA, Q. V. Potential beneficial effects of marine algal sterols on human health. In: **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 64, p.191 - 198, 2011.

KORBECKI, J.; BAJDAK, R. K. The effect of palmitic acid on inflammatory response in macrophages: an overview of molecular mechanisms. **Inflammation Research**, v. 68, p.915 - 932, 2019.

LEITÃO, G. G. Uso da Cromatografia contracorrente na obtenção de padrões de origem Vegetal. **Revista Fitos**, v.1, 2005.

LIMA, T. M *et al.* Fatty acid control of nitric oxide production by macrophages. **FEBS Letters** , v. 580,p. 3287 - 3295, 2006.

MACHADO, F. L. S. *et al.* Chemical diversity and antileishmanial activity of crude extracts of *Laurencia* complex (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p 635 - 643, 2014.

MAJNAQUI, S. E.; KADMIRI, N. E. Pharmaceutical benefits of red seaweed (Rhodophyta): A narrative review. **EWASH & TI Journal**, v. 5, p. 678 - 687, 2021.

MANNINO, A. M.; MICHELI, C. Ecological function of phenolic compounds from Mediterranean fucoid algae and seagrasses: An overview on the genus *Cystoseira* sensu lato and *Posidonia oceanica* (L.) Delile. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 8, p. 2 - 19, 2020.

MANSUR, A. A. The cytotoxic activity of extracts of the brown alga *Cystoseira tamariscifolia* (Hudson) Papenfuss, against cancer cell lines changes seasonally. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, p. 2419 - 2429, 2020.

MATTEELLI, Alberto *et al.* Tuberculosis elimination: where are we now?. **European Respiratory Review**, v. 27, p. 180035, 2018.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, p. 771 - 776, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Brasília, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico**. Tuberculose 2020 [Internet]. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2020 [cited 2020 Dec7].

MOFEED, J. *et al.* Antimicrobial activities of three seaweeds extract against some human viral and bacterial pathogens. **BIOCELL**, v. 46, p. 247-261, 2022.

NGUYEN, L. Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis*: an update. **Archives of Toxicology**, v. 90, p.1585 - 1604, 2016.

PARBHOO, T. *et al.* Recent developments in the application of flow cytometry to advance our understanding of *Mycobacterium tuberculosis* physiology and pathogenesis. **Cytometry Part A**, v. 97, p. 683 - 693, 2020.

Pinteus S, Silva J, Alves C, Horta A, Fino N, Rodrigues A I, Mendes S, Rui Pedrosa. Cytoprotective effect of seaweeds with high antioxidant activity from the Peniche coast (Portugal). **Food Chemistry**, v. 218, p. 591 - 599, 2017.

POURAKBAR, L. *et al.* Antifungal activity of the extract of a macroalgae, *Gracilariopsis persica*, against four plant pathogenic fungi. **Plants**, v. 10, p. 1 - 13, 2021.

PUTRA, M. Y.; Hadi, T. A. Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antiplasmodial activities of three sponges from Buton Islands, Indonesia. **Indonesian Journal of Marine Sciences**, v 22, p. 147 - 154, 2017.

PLOUGUERNÉ, E. *et al.* Antifouling activity as a function of population variation in *Sargassum vulgare* from the littoral of Rio de Janeiro. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, p. 717 - 724, 2010a.

PLOUGUERNÉ, E. Anti-microfouling activity of lipidic metabolites from the invasive brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. **Marine Biotechnology**, v.12, p. 52 - 61, 2010b.

PREMANATHAN M, KATHIRESAN K, CHANDRA K. Antiviral activity of marine and coastal plants from India. **International journal of pharmacognosy**, v. 32, n. 4, p. 330 - 336, 1994.

PREMARATHNA, A. D. *et al.* Preliminary screening of the aqueous extracts of twenty-three different seaweed species in Sri Lanka with in-vitro and in-vivo assays. **Heliyon**, v. 6, p. 1 - 16, 2020.

RAJ, T. S. *et al.* Efficacy of seaweed extract against downy mildew of grapes caused by *Plasmopara viticola*. **Plant Archives**, v. 19, p. 2877 - 2882, 2019.

SALEH, B.; AL-MARIRI, A. Antimicrobial activity of the marine algal extracts against selected pathogens. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 19, p. 1067-1077, 2017.

SANDOVAL-MONTEMAYOR, N. E. *et al.* Chemical Composition of Hexane Extract of *Citrus aurantifolia* and Anti-*Mycobacterium tuberculosis* Activity of Some of Its Constituents. **Molecules**, v. 17, p. 11173 - 11184, 2012.

SANTO, C. C. DO E. **Estudo de extratos e frações derivados de macroalgas calcárias quanto a atividade antimicobacteriana e anti-inflamatória na busca de novos fármacos para o tratamento de infecções pulmonares graves causadas por micobactérias**. Monografia – curso Bacharel em Ciências Biológicas - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2021.

SASIKALA, C; GEETHA, R. D. Comparative study on antimicrobial activity of seaweeds. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v.10, p. 384 - 386, 2017.

SOARES, A. R. *et al.* Antiviral activity of extracts from Brazilian seaweeds against herpes simplex virus. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 22, p. 714 - 723, 2012.

SUDATTI, D. B. *et al.* Effects of abiotic factors on growth and chemical defenses in cultivated clones of *Laurencia dendroidea* J. Agardh (Ceramiales, Rhodophyta). **Marine Biology**, v. 158, p.1439 - 1446, 2011.

SUDATTI, D. B. *et al.* Diel variation of sesquiterpene elatol production: a chemical defense mechanism of the red seaweed *Laurencia dendroidea*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v, 64, p.131 - 135, 2016.

SCHOREY, J. S.; SCHLESINGER, L. S. Innate immune responses to tuberculosis. **Tuberculosis and the Tubercle Bacillus**, p. 1 - 31, 2017.

SCHUTZ, C. *et al.* Corticosteroids as an adjunct to tuberculosis therapy. **Expert review of respiratory medicine**, v. 12, p. 881-891, 2018.

SCRIBA, T. J.; COUSSENS, A. K.; FLETCHER, Helen A. Human immunology of tuberculosis. **Tuberculosis and the Tubercle Bacillus**, p. 213 - 237, 2017.

STENGEL, D. B.; CONNAN, S.; POPPER, Z. A. Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 483 - 501, 2011.

STIRK, W. A. *et al.* Potential medicinal value of some South African seaweeds. **South African journal of botany**, v. 69, p. 462 - 468, 2003.

STIRK, W. A. *et al.* Seasonal variation in antifungal, antibacterial and acetylcholinesterase activity in seven South African seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, p. 271 - 276, 2007.

SY, K. T. L. *et al.* Previous and active tuberculosis increases risk of death and prolongs recovery in patients with COVID-19. **Infectious Diseases**, v. 52, p. 902 - 907, 2020.

THIRUMURUGAN, D. *et al.* **An introductory chapter: secondary metabolites**. In: Vijayakumar R, Raja SSS, editors. *Secondary Metabolites sources and Applications*, London, UK. IntechOpen Limited, p. 1 - 21, 2018.

VAL, A. *et al.* Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). **International Microbiology**, v. 4, p. 35 - 40, 2001.

VENKATESALU, V. *et al.* Seasonal variation on fatty acid composition of some marine macro algae from Gulf of Mannar Marine Biosphere Reserve, Southeast cost of India. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**, v. 41, p. 442-450.

VENTURA, T. L. B. *et al.* Nitric Oxide Production Inhibition and Anti-mycobacterial activity of extracts and halogenated sesquiterpenes from the Brazilian red algae *Laurencia Dendroidea* J. Agardh. **Pharmacognosy Magazine**, v.11, p. S611 - S618, 2015.

VLACHOS, V. *et al.* Antimicrobial activity of extracts from selected southern African marine macroalgae. **South Journal of Science**, v. 93, p. 328 - 332, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report**. Geneva: World Health Organization (WHO), 2021.

YOUNG, C. *et al.* Therapeutic host-directed strategies to improve outcome in tuberculosis. **Mucosal immunology**, p. 1 -15, 2019.