



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICA**

MIRELY DE FREITAS PAIVA

**PROCESSO DE DESIDRATAÇÃO DA ALGA *Gracilaria birdiae*
BENEFICIADA EM LABORATÓRIO E ARTESANALMENTE: ANÁLISE
DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSIÇÃO CENTESIMAL**

**NATAL
2010**

MIRELY DE FREITAS PAIVA

**PROCESSO DE DESIDRATAÇÃO DA ALGA *Gracilaria birdiae*
BENEFICIADA EM LABORATÓRIO E ARTESANALMENTE: ANÁLISE
DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSIÇÃO CENTESIMAL**

**Dissertação apresentada
à Universidade Federal do
Rio Grande do Norte – UFRN,
como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre
em Ciências Farmacêuticas.**

ORIENTADOR: Prof^a Dra Maria das Graças de Almeida

CO-ORIENTADOR: Prof^a Dra Ana Vlândia Bandeira Moreira

NATAL

2010

P 89p

Paiva, Mirely de Freitas.

Processo de desidratação da alga *Gracilaria birdiae* beneficiada em laboratório e artesanalmente: análise da atividade antioxidante e composição centesimal / Mirely de Freitas Paiva. – Natal, 2011.

110f.: Il.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria das Graças de Almeida.

Coorientadora: Prof.^a Dr^a Ana Vlândia Bandeira Moreira.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. *Gracilaria birdiae* – Dissertação. 2. Algas Marinhas – Dissertação. 3. Compostos químicos – Dissertação. 4. Atividade antioxidante – Dissertação. I. Almeida, Maria das Graças de. II. Moreira, Ana Vlândia Bandeira. III. Título.

RN-UF/BS-CCS

CDU: 582.26(813)(043.3)

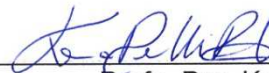
MIRELY DE FREITAS PAIVA

**PROCESSO DE DESIDRATAÇÃO DA ALGA *Gracilaria birdiae* BENEFICIADA EM
LABORATÓRIO E ARTESANALMENTE: ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
COMPOSIÇÃO CENTESIMAL**

Banca Examinadora:



Profa. Dra. Maria das Graças Almeida
Presidente – UFRN



Profa. Dra. Karina Perrelli Randau
Examinador Externo – UFCG



Prof. Dr. Túlio Flávio Accioly de Lima e Moura
Examinador Interno – UFRN

Natal, 26 de novembro de 2010

**NATAL / RN
2010**

“Dedico este trabalho a minha mãe, Marlene, a minha irmã, Karielle, e ao meu noivo, Carlos Eduardo, pois todas as dificuldades encontradas ao longo dessa caminhada foram suavizadas, por sempre contar com vosso amor, incentivo, compreensão, dedicação e com vossas bênçãos. Sei que muitas vezes vocês renunciaram seus ideais, para que eu pudesse realizar o meu, e motivado por vosso testemunho de vida, me entusiasmei para chegar até aqui, e sem mais palavras, dedico a vós mais uma conquista. Amo vocês e obrigada por completarem a minha vida.”

AGRADECIMENTOS

Ao mestre de todas as obras, *Deus*, pois sua força se fez, e faz perfeita em minha vida, em todos os momentos, e fez em mim muito mais do que eu poderia pedir. Obrigada, porque sem ti Senhor, não teria conseguido.

Agradeço em especial a minha mãe Marlene, por tudo que foi e que é em minha vida, a minha irmã Karielle, por ser o anjo que Deus colocou em meu caminho. Sou eternamente grata a vocês pelo amor, carinho, compreensão e paciência depositados em mim. Obrigada.

Ao “meu noivo” Eduardo Popoff pelo agradável convívio, carinho, estímulo e paciência no decorrer da realização desse mestrado.

A Prof^a. Dr^a. Maria da Graças Almeida que tão gentilmente aceitou mais este desafio na orientação desta dissertação. Agradeço profundamente por ter permitido a minha evolução profissional.

A Prof^a. Dr^a. Adriana Rezende, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica da UFRN, pela maneira de mostrar aos alunos a importância da pesquisa na instituição de ensino.

A Prof^a. Dr^a. Telma Maria Lemos, Chefe do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, pelo apoio disponibilizado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica.

A Prof^a. Dr^a. Ana Vlândia Moreira, co-orientadora, por seus ensinamentos, confiança e estímulo. Obrigada por ter sonhado junto comigo.

A Prof^a. Dr^a. Silvana Zucolotto, meus agradecimentos pela colaboração e eterna disposição para discutir sobre a pesquisa, bem como por sua valiosa contribuição na realização de alguns experimentos e na finalização da mesma.

A Prof^a. Dr^a. Karina Randau e a Prof. Dr. Túlio Aciolly por comporem a banca de avaliação desta dissertação e pelas considerações de extrema valia que muito ajudaram na conclusão final do trabalho.

Ao amigo e mestre Rand Randall, meus agradecimentos por sua permanente solicitude em todas as fases da pesquisa, bem como pelo cuidado e diligência na construção. Além do apoio e incentivo, transformando frases em um trabalho de caráter profissional, obrigada pela dedicação e compreensão.

A amiga Girlene Freire pelas palavras de carinho e apoio dedicadas em vários momentos de dúvidas. Obrigada pela reflexão da difícil escolha entre a oportunidade do mestrado e a realização de um sonho: "*Lecionar*".

A Melina Gadelha, pela indescritível solidariedade e afeto inestimável, que se traduziram sempre em entusiasmadas conversas.

Ao aluno de Iniciação Científica Leandro Vinícius, pelo apoio e auxílio na realização dos experimentos.

Aos meus amigos do Laboratório Multidisciplinar, Andrea, Bruno, Benilson, Elizabeth, Emanuel, Freire, Felipe, Gabriel, Gustavo, Ionara, Marcela, Náira e Raul por tornarem todos os momentos mais fáceis e divertidos.

Aos professores, colegas e funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

A todos o meu *multíssimo obrigada*, pois se o desafio era enorme, as motivações eram grandiosas, somadas às espontâneas generosidades que fizeram possível a concretização desta dissertação.

**"Quando se tem uma meta,
o que era um obstáculo passa a
ser uma das etapas do seu plano."**

Gerhard Erich Boehme

RESUMO

O presente estudo tem como finalidade analisar de forma comparativa o procedimento de desidratação de *Gracilaria birdiae* beneficiada laboratorialmente e artesanalmente, cultivada no litoral norte do Rio Grande do Norte. A coleta das amostras foi realizada na praia do Rio do Fogo em março de 2009. Das amostras coletadas seguiram-se dois processamentos, no primeiro o material coletado foi mantido em estufa de ar circulante a 50°C, por 24 horas sendo obtida a amostra laboratorial. No segundo a amostra artesanal foi desidratação ao sol por um período de três dias. A extração consistiu em soluções etanólica, hidroetanólica e aquosa, resultando em extrato etanólico, hidroetanólico e aquoso. De acordo com os resultados o extrato etanólico foi fracionamento obtendo as frações hexano, diclorometano e acetato de etila. As distintas formas de processamento da *Gracilaria birdiae* promoveram a obtenção de amostras com tonalidades distintas. Quanto ao teor de sólidos solúveis a amostra laboratorial apresentou superioridade. A composição centesimal de ambas as amostras caracterizaram-se por apresentar um considerável teor de carboidratos, com maior percentual de resíduo mineral e proteínas, respectivamente, na amostra laboratorial e artesanal. As duas amostras apresentaram um baixo conteúdo de lipídeos e um perfil lipídico caracterizado por uma maior proporção de ácidos graxos monoinsaturados, com ausência de poliinsaturados na amostra artesanal. A triagem fitoquímica evidenciou a presença de flavonóides, taninos, saponinas e alcalóides na amostra laboratorial, apresentando uma maior diversidade de compostos bioativos. Por meio da cromatografia em camada delgada foi possível identificar os fitoesteróis β -sitosterol e stigmasterol em ambas as amostras, além de sugerir a presença do β -caroteno e da clorofila α na amostra laboratorial. Os teores de compostos fenólicos totais e carotenóides totais foram mais expressivos no extrato etanólico da amostra laboratorial. A letalidade *in vitro*, demonstrou que os extratos etanólicos da amostra laboratorial e artesanal a partir de 500 e 125 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, foram altamente letais. Na avaliação da capacidade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico e pelo método de sequestro do radical livre DPPH $^{\bullet}$, o extrato etanólico proveniente do processo laboratorial apresentou atividade significativamente maior que os demais extratos, sendo no primeiro e segundo método, respectivamente, inferior e equivalente ao antioxidante sintético BHT. O extrato etanólico proveniente do processo artesanal não demonstrou habilidade na desativação de radicais livres, mas apresentou atividade na inibição da peroxidação lipídica, porém com valores significativamente inferiores a amostra laboratorial. Conclui-se que o processo de desidratação em laboratório é a técnica mais eficiente, por supostamente promover a manutenção dos compostos químicos presentes na alga marinha, proporcionando propriedades benéficas como a capacidade antioxidante. Ressalta-se que esta propriedade pode ser explorada com o intuito de agregar valor comercial ao produto final, o que promoverá a expansão da produção desta alga na comunidade do Rio do Fogo.

Palavras Chaves: *Gracillaria birdiae*. Algas marinhas. Compostos químicos. Atividade Antioxidante.

ABSTRACT

The main aim of this study was to compare the procedure for dehydration of *Gracilaria birdiae* prepared handmade and laboratory, collected in the northern coast of Rio Grande do Norte. The sample was collected in the Rio do Fogo beach in march 2009. The sample collected followed by two processing, the first the material prepared in laboratory was air-dried at 50°C for 24 hours in air-flow oven. The second the handmade sample was air-dried on the sun during three days. The extract was prepared in three different solvents: ethanol, hydroethanol and water, resulting in ethanol, hidroethanol and aqueous extracts from handmade and laboratory sample. In according with results only the ethanol extract was fractionated yielding the fractions hexane, dichloromethane and ethyl acetate fractions. The different process to obtain *Gracilaria birdiae* resulted in the samples with different shades. The soluble solids content was higher in the laboratory sample. The chemical composition the both samples were characterized by presenting a considerable amounts of carbohydrates, with amior percentage protein and ash, respectively, in the handmade and laboratory sample. In two samples showed a low content of lipids and the lipid profile showed a higher proportion of monounsaturated fatty acids, with the absence polyunsaturated handmade sample. The phytochemical screening by chemical reactions showed the presence of flavonoids, tannins, alkaloids and saponins the laboratory sample, presenting a greater diversity of bioactive compounds. Through of the analysis by thin layer chromatography was possible to identify the phytosterols β -sitosterol and stigmasterol the both samples, also suggest the presence of β -carotene and chlorophyll α the laboratory sample. The levels of total phenolics and flavonoids were more significant in the ethanol extract of the laboratory sample. The *in vitro* lethality showed that extracts of the laboratory sample and handmade from 125 to 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, were highly lethal. In the evaluation of antioxidant capacity by the system β -carotene/ácido linoleic method and by DPPH^{*} radical scavenging assay, the ethanol extract from the laboratory process showed significantly greater activity than the other extracts, being and the first and second methods, respectively, lower and equivalent to the synthetic antioxidant BHT. The handmade ethanol extract has not demonstrated skill in deactivating free radicals, but showed activity in inhibiting lipid peroxidation, although the values were significantly lower than the laboratory sample. We conclude that the dehydration process in the laboratory is the most efficient technique to maintenance of the chemical composition present in the seaweed, providing beneficial properties such as antioxidant capacity. We emphasize that this property can be explored with the objective of adding commercial value to the final product, which will promote the expansion of production of this seaweed in the community of Rio do Fogo.

Key words: *Gracillaria birdiae*. Seaweed. Chemical compounds. Activity Antioxidants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Espécie <i>Gracilaria birdiae</i> coletada no sistema de cultivo na praia de Rio do Fogo.....	30
Figura 2 Estrutura utilizada no cultivo da alga <i>Gracilaria birdiae</i> na praia de Rio do Fogo/RN. A) Implantação da estrutura – B) Esquema ilustrativo da estrutura utilizada	31
Figura 3 Esquema representativo do processo de extração da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	34
Figura 4 Amostra laboratorial (A) e artesanal (B) da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	49
Figura 5 Extrato aquoso (1), hidroetanólico (2) e etanólico (3) obtido a partir da amostra artesanal (A) e laboratorial (B) da alga <i>Gracilaria birdiae</i> , respectivamente.....	49
Figura 6 Cromatografia em Camada Delgada do extrato etanólico e das frações obtidas a partir do processamento laboratorial e artesanal da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Reagentes utilizados para detecção dos alcalóides nos extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso obtido a partir do processamento laboratorial e artesanal da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	40
Tabela 2	Teor de sólidos solúveis dos extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso obtido a partir do processamento laboratorial e artesanal da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	50
Tabela 3	Composição centesimal das amostras processada em laboratório e de forma artesanal da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	50
Tabela 4	Perfil de ácidos graxos (% total de ácidos graxos) das amostras processada em laboratório e de forma artesanal da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	51
Tabela 5	Triagem fitoquímica preliminar dos extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso obtido a partir do processamento laboratorial e artesanal da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	52
Tabela 6	Conteúdo de fenólicos totais (μg equivalentes de ácido gálico/mL de extrato) e carotenóides totais (μg equivalentes de β -caroteno/mL de extrato) dos extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso obtido a partir do processamento laboratorial e artesanal da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	55
Tabela 7	Atividade da letalidade dos extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso obtido a partir do processamento laboratorial e artesanal da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	56
Tabela 8	Atividade antioxidante (% Inibição da oxidação lipídica) dos extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso obtido a partir do processamento laboratorial e artesanal da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	57
Tabela 9	Fatores cinéticos caracterizando a inibição da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico dos extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso obtido a partir a partir do processamento laboratorial e artesanal da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	58
Tabela 10	Equação da reta e coeficiente de correlação linear (r^2) obtidos pelos extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso obtido a partir a partir do processamento laboratorial e artesanal da alga <i>Gracilaria birdiae</i> , utilizando o radical livre DPPH•.....	59
Tabela 11	Capacidade antioxidante (EC_{50} em mg/mL) dos extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso obtido a partir do processamento laboratorial e artesanal da alga <i>Gracilaria birdiae</i> , utilizando o radical livre DPPH•.....	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Esquema para demonstração das curvas para a obtenção dos fatores F1 e F2	47
Gráfico 2	Curva de calibração para determinação de fenólicos totais (A) e carotenóides totais (B).....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHA	Hidroxianisol Butilado
BHT	Hidroxitolueno Butilado
CAT	Catalase
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Liquida de Alta Eficiência
DCC	Desenvolvimento de Comunidades Costeiras
DPPH[•]	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
GSSH	Glutaciona Oxidada
GPX	Glutaciona Peroxidase
GSH-Rd	Glutaciona Redutase
GSH	Glutaciona Reduzida
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HO[•]	Radical Hidroxil
NO[•]	Óxido Nítrico
O₂^{•-}	Ânion Superóxido
¹O₂	Oxigênio Singlete
ONOO⁻	Peroxinitrito
SOD	Superóxido Dismutase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERARIA	19
2.1	Algas Marinhas	19
2.2	Perspectiva Econômica no Cultivo de Algas Marinhas	21
2.3	Algas Marinhas e seu Potencial Antioxidante	24
2.4	Sistema de Defesa Antioxidantes	26
3	OBJETIVO	29
3.1	Objetivo Geral	29
3.2	Objetivos Específicos	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	Alga Marinha	30
4.2	Sistema de Cultivo da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	30
4.3	Coleta da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	31
4.4	Preparo das Amostras da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	32
4.4.1	Processamento Laboratorial	32
4.4.2	Processamento Artesanal	32
4.5	Obtenção dos Extratos da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	33
4.6	Determinação do Peso Seco dos Extratos	34
4.7	Perfil Nutricional da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	35
4.7.1	Análise da Composição Centesimal da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	35
4.7.2	Determinação do Perfil Lipídico da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	35
4.7.2.1	Obtenção da fração lipídica	35
4.7.2.2	Esterificação e Identificação de Ácidos Graxos	36
4.7.2.3	Análise do Perfil de Ácidos Graxos por Cromatografia Gasosa	37
4.8	Investigação Fitoquímica	37
4.8.1	Triagem Fitoquímica Preliminar	38

4.8.1.1	Pesquisa de Flavonóides - Reação de Shinoda.....	38
4.8.1.2	Pesquisa de Antraquinonas Livres - Reação de Bornträeger Direta.....	38
4.8.1.3	Pesquisa de Taninos - Reação da Gelatina.....	39
4.8.1.4	Pesquisa de Alcalóides - Reagente Mayer, Dragendorff, Wagner e Bertrand.....	39
4.8.1.5	Pesquisa de Saponinas – Teste de Formação de Espuma.....	40
4.8.2	Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	41
4.8.2.1	Fracionamento do Extrato para CCD.....	41
4.8.2.2	Análise Cromatográfica.....	42
4.9	Determinação dos Compostos Fenólicos Totais da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	42
4.10	Determinação dos Carotenóides Totais da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	43
4.11	Avaliação da Atividade Biológica.....	43
4.11.1	Avaliação da Letalidade para Larvas <i>Artemia salina</i> Lech.....	43
4.12	Atividade Antioxidante <i>in vitro</i> da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	44
4.12.1	Método do Sistema β -caroteno/ácido linoléico	44
4.12.1.1	Cinética da Atividade Antioxidante	45
4.12.2	Método de Sequestro do Radical DPPH*	47
4.13	Análise Estatística	48
5	RESULTADOS	49
5.1	Caracterização dos Extratos e Determinação do Teor de Sólidos Solúveis (Resíduo Seco).	49
5.2	Perfil Nutricional da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	50
5.2.1	Análise da Composição Centesimal da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	50
5.2.2	Determinação do Perfil de Ácidos Graxos da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	51
5.3	Investigação Fitoquímica.....	52
5.3.1	Triagem Fitoquímica Preliminar.....	52
5.3.2	Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	53
5.4	Determinação dos Compostos Fenólicos Totais e Carotenóides Totais da alga <i>Gracilaria birdiae</i>	54
5.5	Avaliação da Atividade Biológica.....	55
5.5.1	Avaliação da Letalidade para Larvas <i>Artemia salina</i> Lech.....	55

5.6	Determinação da Atividade Antioxidante <i>In Vitro</i>	56
5.6.1	Método do Sistema β -Caroteno/Ácido Linoléico.....	56
5.6.2	Método de Sequestro do Radical DPPH [*]	58
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÃO	68
9	CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	70
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os produtos promotores da saúde têm despertado interesse entre os consumidores e indústrias de alimentos, destacando-se dentro desse contexto as algas marinhas, silvestres e cultivadas.

Nos países orientais, principalmente os asiáticos como a China, Japão e Coréia, as algas são empregadas na indústria de ficocolóides e na dieta (SMIT, 2004) como uma fonte de alimento saudável devido ao seu baixo teor de lipídios e alto teor em polissacarídeos, sais minerais, vitaminas e ácidos graxos insaturados (KORNPROBST, 2005). Adicionalmente, estas se apresentam como uma fonte inesgotável de compostos bioativos, como os carotenóides, compostos fenólicos, ficocolóides, ácidos graxos insaturados e esteróis, para aplicação no setor industrial. (IOANNOU; ROUSSIS, 2009).

A maioria desses compostos bioativos extraídos das algas marinhas têm demonstrado um grande potencial terapêutico, apresentando propriedades antineoplásica (MATSUDA et al., 2010; WANG H et al., 2010), anti-inflamatória (SILVIA et al., 2010), antirretroviral (MENDES et al., 2010; YASUHARA-BELL; LU, 2010), antimicrobiana (VALLINAYAGAM et al., 2009; GUPTA; RAJAURIA; ABU-GHANNAM, 2010), anticoagulante (WANG J et al., 2010) entre outras. Recentemente, as atenções das investigações têm incidido sobre a atividade antioxidante desses metabólitos (ATHIPERUMALSAMI et al., 2010; HWANG P et al., 2010; PLAZA et al., 2010).

A ausência de danos fotodinâmicos nos componentes estruturais, apesar das algas serem exposta à intensa luminosidade e altas concentrações de oxigênio implica que suas células possuem mecanismos de defesa antioxidante (DYKENS et al., 1992; RAMARATHNAM et al., 1995; MATSUKAWA et al., 1997). Isso foi demonstrado pelas espécies *Gracilaria tenuistipitata* var. *tenuistipitata* (YANGTHONG; TOWATANA; PHROMKUNTHONG, 2009), *Palmaria palmata* (WANG T et al., 2010) e *Ulva fasciata* (CHAKRABORTY; PAULRAJ, 2010), que proporcionaram eficácia na captura do radical DPPH*, assim como *Padina antillarum*, *Caulerpa racemosa* e *Kappaphycus alvarezzi* (CHEW et al., 2008) e *Ascophyllum nodosum* (JIMÉNEZ et al., 2010), que apresentaram capacidade de inibir a

peroxidação do ácido linoléico, provavelmente devido à disponibilidade de metabólitos com ação antioxidante. Dentre os compostos mais relevantes responsáveis por essas propriedades das algas, destacam-se os carotenóides (BANERJEE et al., 2009; GERASIMENKO; BUSAROVA; MOISEENKO, 2010) e os compostos fenólicos (AUDIBERT et al., 2010; HU; HEO; WANG, 2009; ONOFREJOVÁ et al., 2010).

Considerando o amplo espectro de utilização comercial das algas marinhas faz-se necessário o desenvolvimento e a implantação de sistemas de cultivo, através da maricultura na modalidade de algicultura, o qual permitirá a preservação ambiental, a produção lucrativa e o desenvolvimento social (OLIVEIRA; ALVEAL; ANDERSON, 2000). As condições de cultivo que são determinadas por fatores biológicos, físicos e químicos podem alterar significativamente o crescimento e a composição bioquímica das algas (REDDY; GUPTA; JHA, 2010). O emprego de diferentes técnicas de processamento para obtenção de matéria-prima para a produção de alimentos pode influenciar as propriedades químicas desses compostos, acarretando em alterações nas suas propriedades terapêuticas, sobretudo a capacidade antioxidante, como verificado por Choi et al. (2010) e Lee S. et al. (2010).

Atualmente, comunidades costeiras do Nordeste brasileiro têm praticado o cultivo da alga *Gracilaria birdiae* com vista à comercialização do ficocolóide (polissacarídeo coloidal extraído das algas) ágar e como fonte de alimento, apresentando assim um caráter econômico, ambiental e social. Nesse contexto, nossa pesquisa tem como finalidade investigar a presença de compostos bioativos na alga marinha *Gracilaria birdiae* beneficiada *artesanalmente* e avaliar a provável ação antioxidante, assim como a melhor técnica de processamento para a sua utilização, para agregar valor comercial ao produto final.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Algas Marinhas

Os oceanos cobrem mais de 70% da superfície terrestre e são habitados por cerca de 200.000 espécies de plantas e invertebrados marinhos e milhões de microorganismos (PINTO et al., 2002). Fazem parte desse universo as algas marinhas que são importantes para a manutenção da estabilidade do ecossistema, pois suas comunidades produzem os nutrientes necessários para a reprodução de outros organismos (FIGUEIREDO, 2000).

As algas marinhas são consideradas seres simples por apresentarem órgãos e sistemas, são avasculares, talófitas (não se apresentam diferenciadas em raiz, caule e folhas), com estruturas reprodutivas desprotegidas (cryptogâmia), produtoras de esporos e desprovidas de sementes e flores. Podem ser procarióticas ou eucarióticas, unicelulares ou pluricelulares, apresentando-se na forma de agregados, filamentos ou talos pseudoparenquimatosos e parenquimatosos. As algas marinhas pertencem a grupos polifiléticos que possuem clorofila α como pigmento fotossintético principal e como acessório os carotenóides (β -caroteno e fucoxantina) e as ficobiliproteínas (ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina) (ASCENCIO, 2006).

Adicionalmente, as algas marinhas apresentam hábito predominantemente aquático e nesse ambiente podem fazer parte dos bentos (indivíduos fixos no substrato) ou plâncton (indivíduos suspensos na água). A faixa litorânea que as algas bênticas habitam pode estar dividida em: supralitoral, mesolitoral e infralitoral. O supralitoral corresponde à faixa mais alta do litoral, nunca ficando submerso. O mesolitoral pode estar temporariamente descoberto nas marés-baixas. Já o infralitoral corresponde à faixa que nunca fica exposta ao ar (HORTA, 2001).

Podem ser classificadas levando-se em conta seus pigmentos fotossintéticos, morfologia, ciclo de vida, natureza química dos produtos de reserva e composição da parede celular. As algas procarióticas compreendem as divisões *Cyanophyta* e *Prochlorophyta* e as eucarióticas estão distribuídas nas divisões *Rhodophyta*, *Phaeophyta*, *Chlorophyta* e *Euglenophyta* (WYNNE, 2005).

No litoral brasileiro as algas habitam uma extensa costa entre as zonas das marés, de cerca de 8.500 km, sendo que na região costeira compreendida entre o Estado do Ceará e o Norte do Rio de Janeiro abrigam uma flora algal das mais diversificadas do país (GIULIETTI et al., 2005). Segundo Horta et al. (2001) o Brasil apresenta 643 espécies de macroalgas, incluindo 178 espécies de algas verdes (Chlorophyta), 388 espécies algas vermelhas (Rhodophyta) e 88 espécies de algas pardas (Phaeophyta).

Marinho-Soriano, Silva e Moreira (2001) identificaram no Rio Grande do Norte uma alta diversidade de espécies de macroalgas com cerca de 51 táxons, distribuídos em 13 *Chlorophyta* (5 ordens e 7 famílias), 8 *Phaeophyta* (3 ordens e 3 famílias) e 30 *Rhodophyta* (6 ordens e 11 famílias). Na classe Rhodophyceae, os gêneros *Galaxaura*, *Gelidiella*, *Pterocliadiella*, *Gelidium*, *Corallina*, *Jania*, *Lithothamnium*, *Cryptonemia*, *Gracilaria*, *Solieria*, *Hypnea*, *Bothyocladia*, *Heterosiphonia*, *Polysiphonia*, *Ceramium*, *Bryothamnium*, *Digenia*, *Amansia*, *Vidalia*, *Chondria*, *Acantophora* e *Laurencia*.

A espécie *Gracilaria birdiae* pertence à divisão *Rhodophyceae*, Classe *Florideophyceae* da ordem *Gracilariales* fazendo parte da família *Gracilariaceae* do gênero *Gracilaria greville*. Apresenta-se distribuída no litoral do Nordeste brasileiro, desde a costa do Ceará até o Espírito Santo. Desenvolve-se sobre substratos duros no infralitoral ou em regiões entre marés, estando presente em todo período do ano. Possui como características morfológicas talo ereto de forma cilíndrica, com coloração rósea (devido à presença do pigmento fotossintético ficoeritina), medindo até 46 cm de altura e 2,3 mm de diâmetro (PLASTINO; OLIVEIRA, 2002).

A espécie *Gracilaria birdiae* possui atualmente poucas pesquisas, apresentando alguns estudos relacionados às condições ideais de crescimento e cultivo e apenas cinco estudos investigando a sua composição química. Costa e Plastino (2001) estudaram o histórico de vida *in vitro* de espécimes selvagens e variantes cromáticas; Ursi e Plastino (2001) pesquisaram o crescimento *in vitro* de espécimes selvagens e variantes cromáticas em diferentes estádios reprodutivos, estabelecendo as melhores condições de cultura; Plastino, Ursi e Fujii (2004) investigaram sobre as características e heranças pigmentares e as taxas de crescimento das variantes cromáticas, onde encontraram menores teores de clorofila

α , ficocianina, ficoeritrina e aloficocianina na variante cromática verde; Marinho-Soriano, Moreira e Carneiro (2006) identificação dos fatores de crescimento da alga *Gracilaria birdiae* em um estuário como perspectiva de avaliar a sua adequação para a produção através do cultivo e Ursi, Guimarães e Plastino (2008) demonstraram o efeito deletério do tampão Tris (hydroxymethyl)-aminomethane (TRIS) no crescimento da alga *Gracilaria birdiae* e na diminuição da concentração dos conteúdos dos pigmentos ficoeritrina e clorofila α .

Ursi e colaboradores (2003) identificaram por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) a presença dos pigmentos β -caroteno, β -criptoxantina, violoxantina, zeaxantina e licopeno na *Gracilaria birdiae*, além de verificaram que a síntese destes compostos é regulada pela necessidade de fotoproteção com aumento para a produção de zeaxantina, β -caroteno e β -criptoxantina. Pires et al. (2008) e Souza et al. (2008) identificaram através de CLAE a presença do β -caroteno e neste último a ocorrência adicional de vitamina E. Schubert e García-Mendoza (2008) induziram a fotoinibição da fotossíntese pelo estresse a alta intensidade de luz na espécie *Gracilaria birdiae* e observaram que a luteína foi rapidamente ativada estando envolvida em mecanismo de fotoproteção. A presença de polissacarídeos solúveis na composição química da alga *Gracilaria birdiae* foi confirmado por Maciel e colaboradores em 2008.

2.2 Perspectiva Econômica no Cultivo de Algas Marinhas

Há um crescente interesse no cultivo das algas marinhas em virtude do seu significado econômico e por apresentar um uso bastante diversificado desde a indústria alimentícia, de medicamentos, de cosmético e agricultura. Na indústria, estima-se que um volume anual em torno de US\$ 5.5 - 6 bilhões, sendo que mais de 7,5 milhões de toneladas de algas marinhas são usadas anualmente. As algas marinhas representam a terceira maior produção em aquicultura, após peixes de água doce e moluscos, o que demonstra sua grande importância social e econômica (McHUGH, 2003).

Os maiores consumidores e produtores destes gêneros são os países asiáticos, notadamente Japão, China e Coreia do Sul. As algas marinhas foram

desenvolvidas inicialmente para serem utilizados na produção de alimentos. Mais tarde, com a descoberta da utilidade dos ficocolóides extraídos das macroalgas como as agaranas, carragenanas e alginatos entre outras, os cultivos passaram a ser realizados também para a produção de biomassa para extração destes ficocolóides. Atualmente, além destes usos, há também a utilização, em menor escala, de macroalgas para outros fins, como fertilizantes e ração para animais (YOSHIMURA, 2006).

Alguns países vêm desenvolvendo cultivos de espécies consumidas localmente e embora não atinjam valores nem produções comparáveis aos obtidos nos países asiáticos, essas algas são importantes para movimentar pequenos mercados, apresentando um considerável potencial para contribuir com o desenvolvimento econômico das comunidades costeiras das regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo (OLIVEIRA, 2002).

No Brasil o cultivo teve início por volta de 1940, no entanto o impacto social e econômico que tal atividade causa ainda é reduzido e está restrito basicamente à região nordeste do país que compreende o Sul da Bahia até o Estado do Ceará, onde se verifica uma grande disponibilidade de mão-de-obra barata e espaço para o cultivo no litoral. Na costa nordestina é possível produzir em escala comercial uma grande quantidade de algas. Estudos preliminares feitos pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) apontaram que as praias de Pitimbú e Acaú, na Paraíba, praia de Pititinga, no Rio Grande do Norte e as praias de Flecheiras e Guajirú, no Ceará como as principais áreas propícias ao cultivo de algas no Brasil por possuírem bancos naturais próximos e um litoral protegido dos fortes batimentos das ondas, além de existir uma comunidade pesqueira na região com mão-de-obra ociosa (CARVALHO FILHO, 2004).

A produção de algas no Brasil se destina ao consumo humano, ao atendimento dos mercados do Japão, China, Taiwan, Indonésia, Tailândia, Coréia e das Filipinas; à extração de produtos químicos, notadamente do ágar-ágar, de alginatos e derivados, utilizados na formulação de rações balanceadas; na fabricação de cosméticos e mais recentemente, na produção de medicamentos (ROCHA, 2007).

O plantio de algas marinhas para a comercialização pode ser proveniente de bancos naturais e/ou de cultivo. A sustentabilidade da indústria de macroalgas reside em grande parte nos cultivos, uma vez que os bancos naturais não são suficientes para atender a crescente demanda que tem sido verificada nas últimas décadas, podendo ocasionar na sobre-exploração de alguns bancos (OLIVEIRA; ALVEAL; ANDERSON, 2000).

O cultivo vegetativo é considerado o método mais simples. Nesse tipo de cultivo as algas não se reproduzem por esporos sendo as mudas inseridas diretamente em cordas ou colocadas para crescer em gaiolas, viveiros, tanques etc. Esse método tem a vantagem de ser simples, porém a reposição de mudas requer uma quantidade considerável de plantas nativas, sendo necessário um sistema eficaz de controle para a conservação das populações naturais (BUSCHMANN et al., 2001).

Ao analisar a viabilidade do cultivo de uma espécie deve-se considerar a escolha da macroalga e a seleção do local mais adequado para o desenvolvimento. Em geral, espera-se que o local seja conveniente para manter as estruturas de cultivo e que a espécie de interesse esteja presente. Isso porque a presença indica que a espécie está bem adaptada às condições hidrológicas do local, aumentando as chances do cultivo ser bem-sucedido (YOSHIMURA, 2006).

Entre as algas exploradas para o cultivo destaca-se o gênero *Gracilaria*, esse interesse se deve, em partes, às altas taxas de crescimento, ampla tolerância aos estresses ambientais e a diversidade morfológica das espécies. A mesma vem sendo bastante avaliada em sistemas de cultivos, especialmente nos países em desenvolvimento, onde esta atividade se apresenta como uma alternativa econômica para as comunidades litorâneas (MSUYA; NEORI, 2002).

De acordo com Ursi e Plastino (2001) o gênero *Gracilaria greville* tem sido alvo da atenção de inúmeros pesquisadores devido, principalmente, o seu conteúdo em ágar. A maioria dos atuais avanços biotecnológicos não teria sido possível sem a utilização deste ficocolóide ágar, que é empregado em géis para eletroforese, como componente de meios de cultura sólidos, bem como em alimentos industriais. O interesse na implantação de cultivos comerciais de *Gracilaria* é crescente (TSENG, 2001).

No litoral potiguar as macroalgas que são potencialmente aptas ao cultivo em águas marinhas e estuarinas estão incluídas na classe Rhodophyceae, especialmente as espécies autóctones produtoras de ágar (*Gracilaria* spp.) e de carragenanas (*Hypnea musciformis*). A viabilidade do cultivo da agarófita nativa *Gracilaria birdiae* foi recentemente demonstrada através de projeto experimental desenvolvido na praia de Pititinga, pelo Departamento de Oceanografia e Limnologia da UFRN com fomento da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (MARINHO-SORIANO, 1999; MARINHO-SORIANO; SILVA; MOREIRA, 2001), sendo essa uma das principais espécies brasileiras atualmente utilizadas para extração de ágar (PLASTINO; OLIVEIRA, 2002).

A diversidade de compostos de interesses comercial que podem ser obtidos das algas parece ser imprevisível. Devido ao crescente interesse em tecnologia limpas, sustentáveis e orgânicas na obtenção de produtos para o consumo humano, existe a necessidade de uma contínua busca por espécies e/ou variedade capazes de sintetizar grandes quantidades de compostos específicos e de como é possível potencializar a síntese destes (condições de cultivo, melhoramento genético etc.). Igualmente, há necessidade de pesquisa visando ao desenvolvimento e, principalmente ao aperfeiçoamento dos sistemas de produção em escala comercial a fim de tornar comercialmente viáveis alguns dos sistemas conhecidos. Também se faz necessário a identificação dos produtos que podem ser extraídos das algas, da possível atividade biológica (estudos clínicos, metabólicos e toxicológicos) e do desenvolvimento de mercados específicos para estes (PULZ; GROSS, 2004).

2.3 Algas Marinhas e seu Potencial Antioxidante

As algas marinhas têm despertado a atenção como fontes naturais de antioxidantes com perspectiva de utilização terapêutica, aplicação na alimentação e na indústria de cosméticos (SMIT, 2004).

O interesse inicial pelo estudo de substâncias com atividade antioxidante em algas surgiu no Japão, na busca de novos aditivos para alimentos, em substituição àqueles antioxidantes sintéticos utilizados, como o hidroxianisol butilado (BHA) e o hidroxitolueno butilado (BHT), os quais mostravam efeitos carcinogênicos,

alterações enzimáticas e lipídicas em animais (ROCHA et al. 2007). O fato de algumas algas secas poderem ser estocadas por um longo período sem o perigo de deterioração oxidativa, mesmo apresentando mais de 30% do total de seus ácidos graxos na forma de cadeias poliinsaturadas despertou o interesse dos pesquisadores em relação ao mecanismo antioxidante presente nessas algas (FUJIMOTO; KANEDA, 1980).

As algas marinhas por serem organismos fotossintéticos desenvolveram uma série de mecanismos fisiológicos de defesa contra os efeitos das espécies reativas de oxigênio, uma vez que as membranas fotossintéticas são alvo primário para os efeitos deletérios oxidativos, por conterem lipídeos não saturados. Portanto, vários mecanismos de proteção são desenvolvidos nessas células em função de estarem sempre submetidas a rápidas variações de intensidade de luz e concentrações de O₂ e CO₂ ao longo da coluna de água e, assim, sua sobrevivência depende de uma resposta eficiente ao estresse oxidativo (MATSUKAWA et al., 1997).

Vários estudos têm sido realizados a fim de se conhecer os nutrientes e o suposto mecanismo pelo qual as algas apresentam propriedades antioxidantes. Novoa e colaboradores (2001) identificaram no extrato aquoso da *Bryothamnion triquetrum* a presença dos ácidos *trans*-cinâmico, *trans*-cumárico e ferúlico os quais são os responsáveis pela inibição da peroxidação lipídica. Estudos envolvendo a elaboração de produtos foram desenvolvidos por Nagai e Yukimoto (2003) onde verificaram a atividade antioxidante de bebidas preparadas com quatro algas comuns na culinária japonesa a *Ecklonia cava*, *Undaria pinnatifida*, *Hizikia fusiforme* e *Ulva pertusa*. Kang et al. (2004) avaliaram atividade antioxidante dos extratos de dezessete algas marinhas, onde três delas, *Ulva pertusa*, *Symphocladia latiuscula* e *Ecklonia stolonifera* apresentaram boa atividade inibidora da formação de radicais livres. Funahashi et al., 2001 e Yuan e Walsh, 2006 observaram uma relação entre o consumo de algas marinhas na alimentação e sua resposta a proteção contra as doenças envolvidas com as espécies reativas de oxigênio (ERO).

Os estudos sobre produtos naturais marinhos são realizados principalmente em países asiáticos e da Oceania. O Brasil possui pouca produção científica sobre investigação química de compostos bioativos de organismos marinhos, inclusive em relação à macroalgas bênticas (LHULLIER, 2006). Lima-Filho (2002) avaliou a

atividade antibacteriana de seis macroalgas da espécie Chlorophyceae (*Ulva fasciata*, *Caulerpa cupressoides*, *Caulerpa prolifera*) e Rhodophyceae (*Gracilaria domingensis*, *Gracilaria* sp., *Amansia multifida*). No litoral catarinense Raymond, Horta e Fett (2004) estudaram o efeito antioxidante de quatro espécies de algas marinhas do filo *Chlorophyta* (*Codium decortcatum*, *Enteromorpha intestinalis*, *Ulva fasciata* e *Chaetomorpha anteninna*) avaliado através da inibição da peroxidação do ácido linoléico em emulsão. A multimistura enriquecida com a alga *Spirulina platensis* apresentou maior conteúdo de fenólicos totais, atividade antioxidante e antifúngica quando comparado com o padrão composto por farelo de arroz, avaliado por Bierhals e colaboradores (2009).

O gênero *Gracillaria greville* tem sido muito estudado devido a sua importância econômica na farmacologia, cosmética e indústrias de alimentos como fonte de ficocolóides, espessamento e agentes gelificação (produção de agar, alginato, carragena, etc) (YOKOYA, 2007). Perez et al. (2003a,b) pesquisaram sobre a atividade antioxidante dos extratos das algas marinhas *Laurencia* sp., *Gelidium* sp., *Bryothamnion* sp. e *Gracilaria* sp frente aos radicais 1O_2 , OH^* e radicais gerados sob luz UV. Araújo (2004) verificou em sua pesquisa a baixa toxicidade da *Gracilaria mammillaris*, utilizando células mononucleares de sangue periférico, garantindo seu uso em humanos sem risco de toxicidade.

As algas marinhas, assim como as plantas superiores, podem ser uma importante fonte de substâncias antioxidantes naturais e, de fato, constam na literatura vários trabalhos de busca por substâncias com atividade antioxidante em algas, porém, no Brasil, apesar da riqueza da nossa flora ficológica marinha, esse campo de pesquisa ainda não foi devidamente explorado (ROCHA et al., 2007).

2.4 Sistema de Defesa Antioxidante

Para que ocorra a manutenção da vida aeróbia é necessário a eliminação das espécies reativas de oxigênio e o organismo o faz através dos sistemas de defesa antioxidante que agem protegendo o organismo por meio de diversos mecanismos como na prevenção da formação de ERO's, que inclui de maneira geral, a quelatação de íons metálicos por proteínas ou substâncias não protéicas específicas; na

interceptação ou inativação de ERO's por sua transformação em produtos não ativos e/ou transferência para outros compartimentos celulares menos sensíveis à oxidação; ou no reparo aos danos causados à molécula pelos ERO's (SIES, 1993).

De acordo com Halliwell e Gutteridge (2007) antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo.

O sistema de defesa antioxidante pode agir de forma associada ou independente através dos antioxidantes enzimáticos composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX) que são ativadas normalmente durante o metabolismo celular e por meio dos antioxidantes não enzimáticos, que incluem as vitaminas E, C e β -caroteno, compostos fenólicos e glutathiona (GSH) entre outros. Grande parte desses antioxidantes são encontrados na alimentação e podem ser supridos por uma dieta alimentar (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A enzima superóxido dismutase é responsável por catalisar a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença de próton H^+ . Sua composição apresenta diferentes grupos protéicos. A enzima é encontrada em duas formas no organismo, a primeira contém Cu^{2+} e Zn^{2+} como centros redox e ocorre no citosol, sendo que sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo. A segunda contém Mn^{2+} como centro redox, ocorre na mitocôndria e sua atividade aumenta com o estresse oxidativo (GUTTERIDGE et al., 2000).

A catalase desempenha importante papel na eliminação do H_2O_2 , promovendo a sua catálise até água. Está presente na maioria dos tecidos, mas concentra-se, principalmente, no fígado, rim, baço e eritrócito (DINAKAR et al., 2010).

A glutathiona redutase (GSH-Rd) é uma flavoproteína que recupera a glutathiona reduzida (GSH, L-gama-glutamil-L-cisteinil-glicina) da glutathiona oxidada (GSSH) quando ocorre a oxidação. A glutathiona peroxidase (GPX) catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outros peróxidos orgânicos. É encontrada no citosol, na mitocôndria e na membrana (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O β -caroteno é um antioxidante não enzimático, isto se deve a sua estrutura, principalmente no sistema de duplas ligações conjugadas, tornando possível a captação de radicais livres. Sua principal atividade antioxidante é a desativação do oxigênio singlet, em uma velocidade superior à dos tocoferóis (STAHL; SIES, 2005).

O ácido ascórbico (vitamina C) é considerado um dos mais potentes e o menos tóxico dos antioxidantes naturais. É considerado um agente redutor, reduzindo metais de transição Fe^{3+} e Cu^{2+} presentes nos sítios ativos das enzimas ou nas formas livres no organismo, sua oxidação produz inicialmente o radical semidesidroascorbato que pode ser reconvertido em ascorbato (HALLIWELL, 1999). Atua na prevenção da peroxidação lipídica doando hidrogênio ao radical lipídico restaurando-o. Nas membranas celulares, age em parceria com o α -tocoferol regenerando-o. Apesar da grande eficiência antioxidante, a vitamina C pode atuar paradoxalmente como pró-oxidante *in vitro* (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

Outro antioxidante considerado como um eficiente inibidor da peroxidação de lipídios *in vivo* é a vitamina E. Esta age como doadores de hidrogênio para o radical peroxila, interrompendo a reação radicalar em cadeia. Cada tocoferol pode reagir com até dois radicais peroxila e, nesse caso, o tocoferol é irreversivelmente desativado. Para que o tocoferol não se desative, necessita do mecanismo de regeneração sinérgico com o ascorbato nas membranas celulares e com a ubiquinona na membrana mitocondrial (SIES; MURPHY, 1991).

Os compostos fenólicos são considerados antioxidantes por agirem no combate aos radicais livres pela doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) da sua estrutura aromática, na indução da fase II de enzimas como glutathione transferase, na quelatação metais de transição, como o Fe^{2+} e o Cu^{+} , na interrupção da reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica e no reparo da lesão das moléculas atacadas por radicais livres (KYNGMI; EBELER, 2008; PODSEDEK, 2007).

Diante desse contexto, o presente trabalho tem como finalidade analisar o processo de desidratação da alga *Gracilaria birdiae* beneficiada em laboratório e artesanalmente, investigar a possível atividade antioxidante e determinar a sua composição centesimal.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Analisar o processo de desidratação da alga *Gracilaria birdiae* beneficiada em laboratório e artesanalmente.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a composição centesimal e o perfil lipídico da alga *Gracilaria birdiae* processada laboratorialmente frente ao processo artesanal;
- Identificar os compostos bioativos presentes na alga *Gracilaria birdiae* processada laboratorialmente e de forma artesanal;
- Determinar o conteúdo de fenólicos totais e carotenóides totais presentes na alga *Gracilaria birdiae* processada laboratorialmente e artesanalmente;
- Avaliar a letalidade da alga *Gracilaria birdiae* processada laboratorialmente e artesanalmente diante da *Artemia salina* Lech;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* da alga *Gracilaria birdiae* obtida pelo processo laboratorial e artesanal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo realizado é do tipo experimental no qual se investigou o potencial antioxidante da espécie *Gracilaria birdiae* cultivada na praia do Rio do Fogo localizada a 86 Km de Natal, litoral norte do Estado do Rio Grande do Norte.

4.1 Alga Marinha

A espécie utilizada no experimento foi *Gracilaria birdiae* recentemente descrita como uma nova espécie por PLASTINO e OLIVEIRA (2002).



Figura 1 - Espécie *Gracilaria birdiae* coletada no sistema de cultivo na praia de Rio do Fogo/RN
Fonte: Bezerra, 2008.

4.2 Sistema de Cultivo da alga *Gracilaria birdiae*

O cultivo da alga *Gracilaria birdiae* é realizado na praia do Rio do Fogo por onze mulheres da comunidade litorânea que fazem parte do Projeto de Desenvolvimento de Comunidades Costeiras – DCC, tendo a atividade como um meio de sustentabilidade econômica. O projeto DCC consiste em uma parceria do Governo Federal com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), sendo detentor da primeira e única licença ambiental do país para cultivo de algas marinhas.

O local do cultivo está localizado próximo à foz do Rio do Fogo, a uma distância de 40 m da praia, entre as coordenadas 05°15' 49" S e 35°23' 03" W. Esse local foi escolhido devido ao recorte do litoral e por apresentar áreas abrigadas e bem protegidas, o que proporcionou um local adequado para o cultivo. Para a realização do cultivo é utilizada duas estruturas de 4,0 m x 1,0 m, confeccionadas com canos de PVC (75 mm) e 04 cordas de polietileno (12 mm). A flutuação das estruturas é obtida com o auxílio de bóias e a ancoragem por blocos de concreto (60 kg). As estruturas são mantidas a 30 cm da superfície da água. As mudas de *Gracilaria birdiae* pesando 50 g são inseridas entre as fibras das cordas a intervalos de 20 cm, totalizando aproximadamente 1 kg de algas marinhas para cada corda (Figura 2 A e B)(BEZERRA, 2008).

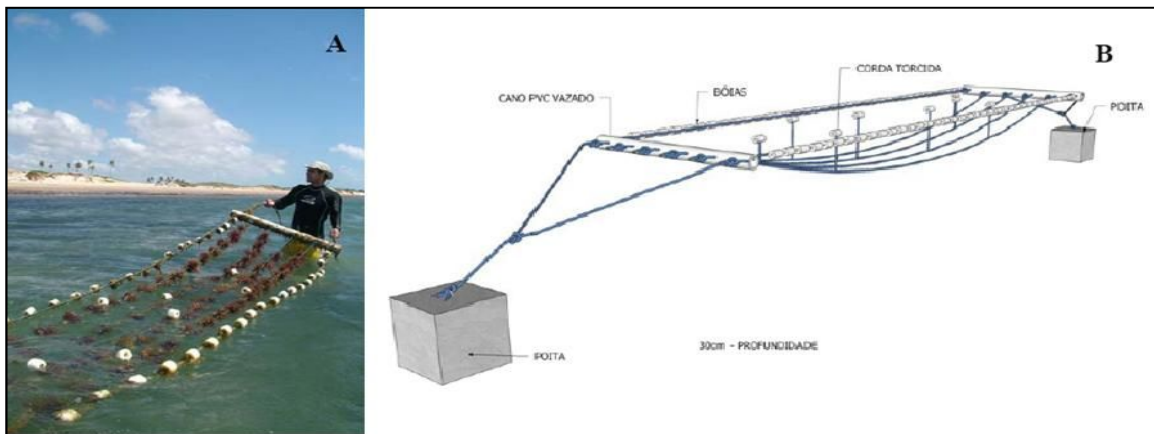


Figura 2 - Estrutura utilizada no cultivo de *Gracilaria birdiae* na praia de Rio do Fogo/RN.

A) Implantação da estrutura – B) Esquema ilustrativo da estrutura utilizada. Fonte: Bezerra, 2008.

4.3 Coleta da alga *Gracilaria birdiae*

As amostras de *Gracilaria birdiae* foram coletadas na Praia de Rio do Fogo no mês de março de 2009. A alga fresca foi selecionada com base na maior abundância e em pontos diversificados nas baías de cultivo de *Gracilaria birdiae* em mar aberto, para garantir variabilidade amostral. O material obtido foi acondicionado em recipientes plásticos etiquetados e mantido em caixas isotérmicas. Em seguida foi transportado para o Laboratório Multidisciplinar (Labmult) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica (PPgCF) e Ciências da saúde (PPgCSa)/UFRN.

4.4 Preparo das Amostras da alga *Gracilaria birdiae*

Da amostra coletada, seguiram-se dois processamentos distintos: o primeiro realizado no Labmult (item 4.4.1), sendo denominado processamento Laboratorial e, outro, realizado nas dependências na Unidade de Beneficiamento do projeto DCC (item 4.4.2, Processamento Artesanal). Ambas as metodologias tiveram como objetivo a obtenção do pó da alga *Gracilaria birdiae*

4.4.1 Processamento Laboratorial

A alga fresca foi inicialmente lavada em água corrente para retirada de impurezas e epífitas macroscópicas, seguida de imersão em água destilada, sendo o excesso drenado com papel absorvente.

A desidratação foi executada em estufa de ar circulante a 50°C, por 24 horas (modelo DM/VF-70, Milane/Brasil LTDA). O material obtido foi pulverizado em moinho de rotor a 12 rpm e o tamanho da partícula do pó não superior a $d = 40 \mu\text{m}$ (modelo Pulverisette 14, Fritsch/Alemanha). O pó resultante foi acondicionado em recipiente de vidro âmbar e mantido sob refrigeração ($2 \pm 4^\circ\text{C}$).

4.4.2 Processamento Artesanal

A desidratação artesanal das amostras foi executada pelas integrantes do Projeto de Desenvolvimento de Comunidades Costeiras na Unidade de Beneficiamento. O processo consiste em expor as algas marinhas ao sol durante o dia, seguida de imersão em água potável no período da noite. O processo foi repetido por três dias até obtenção de matéria vegetal de tonalidade clara e quebradiça ao toque. A pulverização foi realizada através de moinho para moagem de granulados do Tipo de Cilindros, Tigre® (Brasil). Depois de obtida a amostra artesanal da alga *Gracilaria birdiae*, essa foi transportada ao laboratório de pesquisa

LabMult, onde foi acondicionada em recipiente de vidro âmbar e mantido sob refrigeração ($2 \pm 4^\circ\text{C}$).

4.5 Obtenção dos Extratos da alga *Gracilaria birdiae*

Foram preparados extratos com três líquidos extratores diferentes (etanol, etanol: água destilada 1:1 e água destilada). Este procedimento foi empregado para as amostras obtidas laboratorialmente e artesanalmente. Os mesmos foram preparados no laboratório LabMult.

Para obtenção dos extratos de cada amostra, foram pesados 5 g de alga marinha e adicionado 50 mL de etanol. Esta solução foi mantida sob agitação por 1 hora em temperatura ambiente (figura 3), pois longos períodos de extração e temperatura elevadas aumentam a possibilidade de oxidação e decomposição térmica de compostos bioativos como os fenólicos (SHAIDI; NACZK, 1995; MOURE et al, 2001). Em seguida a solução foi filtrada a vácuo utilizando funil Büchner e papel filtro Whatman nº4. O extrato obtido foi concentrado a pressão reduzida a 60°C em um rotaevaporador.

Em seguida foi realizado a obtenção dos extratos hidroetanólico e aquoso na proporção de 1: 20 (p:v) seguindo as mesmas etapas empregadas para obtenção do extrato etanólico, no entanto não houve necessidade de concentrá-los (figura 3). O aumento na proporção amostra: solvente deve-se a presença de polissacarídeos solúveis na composição química da alga, dificultando o processo extrativo. O extrato aquoso foi levemente centrifugado a 3.500 rpm, durante 4 min., a 20°C para facilitar o processo de filtração. Os extratos foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados a -20°C .

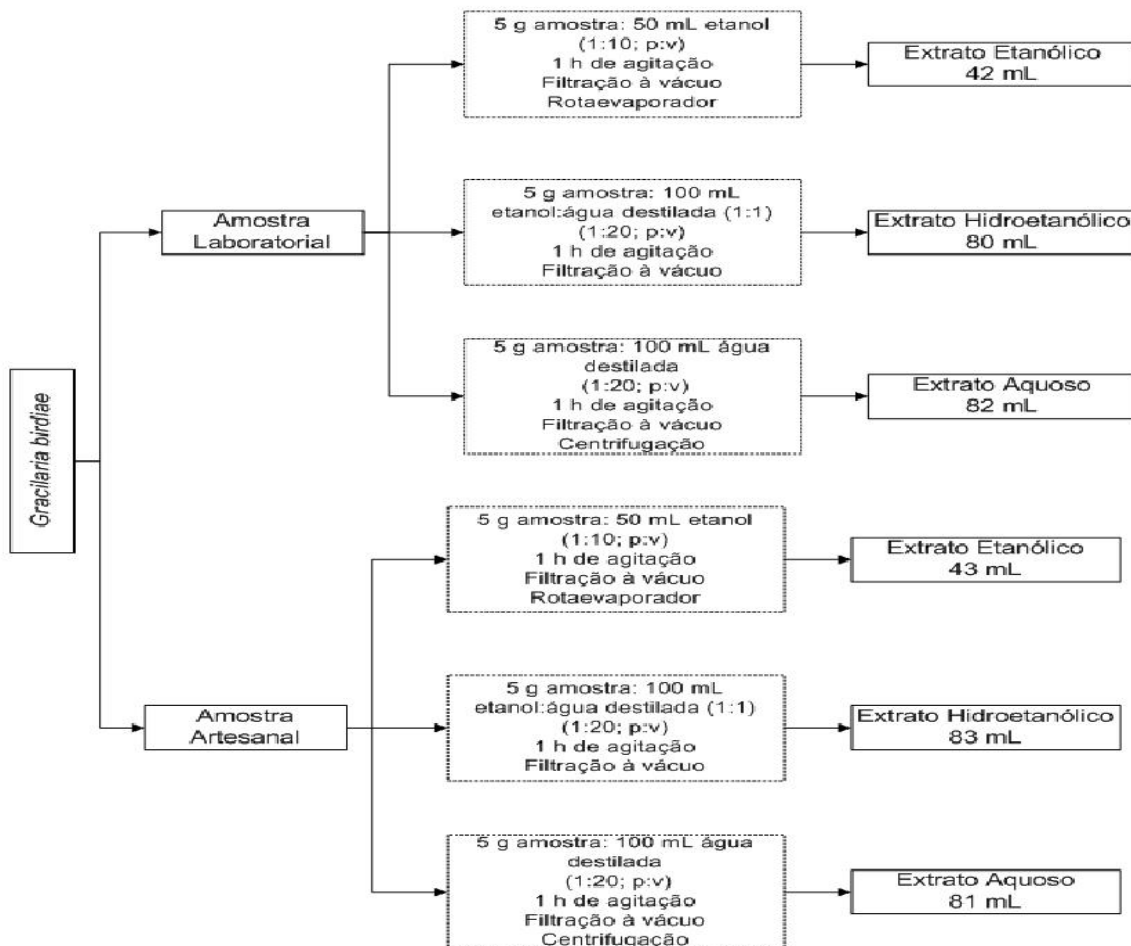


Figura 3 – Esquema representativo do processo de extração da alga *Gracilaria birdiae*.

4.6 Determinação do Peso Seco dos Extratos

A determinação do resíduo seco de cada extrato foi realizada por gravimetria. Para tanto, foram pesadas em triplicata alíquotas de 2 mL de cada extrato em béquer de 10 mL, previamente pesados (P_i), sendo em seguida colocados em estufa à 105°C por 1 hora. Posteriormente, foram resfriados por 20 minutos em dessecador e foi repetida a operação até peso constante, sendo obtido o peso do extrato seco (P_f), e conseqüentemente a concentração de cada extrato da *Gracilaria birdiae*, através da fórmula:

$$\% \text{ Resíduo seco} = \frac{P_f - P_i}{g} \times 100$$

g

Onde P_i é o peso inicial (peso do béquer + amostra), P_f é o peso final (peso do béquer + amostra seca) e g é a quantidade da amostra utilizada.

Para avaliação da atividade antioxidante, as concentrações que foram utilizadas de cada extrato foram calculadas a partir do resíduo seco.

4.7 Perfil Nutricional da alga *Gracilaria birdiae*

4.7.1 Análise da Composição Centesimal da alga *Gracilaria birdiae*

A determinação do resíduo mineral fixo (cinzas) das amostras de *Gracilaria birdiae* foi realizada pela incineração em mufla (marca Universal) a 550°C por 5 horas (AOAC, 1995; método 930.22). O conteúdo de nitrogênio determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995; método 991.20) e a estimativa do teor de proteína total foi calculada multiplicando-se o teor de nitrogênio pelo fator de 6,25 (LOURENCO et al., 2002). Os lipídios totais foram obtidos com extração da fração etérea por fluxo intermitente, utilizando éter etílico como solvente sob refluxo, em aparelho de Soxhlet (AOAC, 1995; método 963.15). Os carboidratos foram obtidos por diferença usando a seguinte fórmula $100\% - (\% \text{cinzas} + \% \text{proteínas} + \% \text{lipídeos})$.

4.7.2 Determinação do Perfil Lipídico da alga *Gracilaria birdiae*

4.7.2.1 Obtenção da fração lipídica

A extração dos lipídios totais das amostras de *Gracilaria birdiae* obtido laboratorialmente e artesanalmente foi realizada através do método de Folch, Lees e Stanley (1957). Pesou-se 1 g de cada amostra de *Gracilaria birdiae* adicionou-se 10 mL de metanol, homogeneizando-se à temperatura ambiente por 1 minuto. Em seguida, foi adicionado 20 mL de diclorometano a solução que foi novamente homogeneizada por 2 minutos. Aguardou-se a separação de fases e o sobrenadante foi filtrado a vácuo utilizando de funil de Büchner. O resíduo foi homogeneizado com 30 mL de uma mistura de diclorometano: metanol (2:1 v/v) durante 3 minutos,

seguida da filtração a vácuo do sobrenadante. O processo de extração foi repetido com mais 30 mL da mistura diclorometano: metanol (2:1 v/v), seguida da filtração a vácuo.

Adicionou-se a solução de KCl 0,88% em um volume equivalente a $\frac{1}{4}$ do volume filtrado. A mistura foi agitada manualmente e deixado em repouso até a separação das fases. Em seguida, a fase superior foi aspirada a vácuo e desprezada. O volume da fase inferior foi medido e $\frac{1}{4}$ deste valor foi adicionado de solução metanol: água destilada (1:1 v/v). A mistura foi novamente agitada e deixada em repouso para separação de fases. A fase superior foi aspirada a vácuo e eliminada e a fase inferior foi filtrada em sulfato de sódio anidro e rotaevaporada a 35°C para evaporação do solvente. A fração lipídica foi ressuspensa em 5 mL de clorofórmio, acondicionada em frasco âmbar, sob atmosfera de nitrogênio e armazenada em congelador a -20°C. A fração lipídica extraída foi utilizada para preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos, para posterior análise cromatográfica.

4.7.2.2 Esterificação e Identificação de Ácidos Graxos

A determinação do perfil de ácidos graxos que compõem a fração lipídica das amostras de *Gracilaria birdiae* foi realizada seguindo-se o método de Hartman e Lago (1973). O método consiste na esterificação e análise dos ácidos graxos por cromatografia gasosa.

Uma alíquota da fração lipídica que equivale a 50 mg do conteúdo lipídico foi coletado em tubo de esterificação e evaporado com nitrogênio. Em seguida, foram adicionados 2 mL de hidróxido de sódio em solução metanólica 0,5 N e o material foi colocado em banho fervente (100°C) por 5 minutos. Após esfriar, a amostra foi acrescida de 6 mL de mistura de esterificação e colocada em banho fervente por 3 min.. Após atingir temperatura ambiente foi acondicionado 5 mL de cloreto de sódio saturado ao tubo e o mesmo foi agitado. Após separação de fases, os ésteres metílicos contidos na fase superior foram transferidos para outro tubo e adicionados de 2 mL de hexano p.a.. A fase orgânica foi transferida para outro tubo com auxílio de pipeta Pasteur. O processo de extração a partir da fase inferior foi repetido por

mais duas vezes. Às fases superiores coletadas foram adicionadas 5 mL de solução saturada de cloreto de sódio, agitadas e secas sob pressão reduzida em rotaevaporador (35°C). O conteúdo lipídico foi ressuspenso em 1 mL de hexano p.a. para ser injetado no cromatógrafo a gás.

4.7.2.3 Análise do Perfil de Ácidos Graxos por Cromatografia Gasosa

A identificação dos ácidos graxos que constituem a fração lipídica das amostras de *Gracilaria birdiae* foi feita por cromatografia gasosa utilizando aparelho Shimadzu GC, modelo 17A (Kyoto/Japão), com detector de ionização de chama conectado a integrados CG (Shimadzu, modelo CBM 101, Kioto/Japão). Os parâmetros foram controlados através do software Workstation Class GC10. A identificação dos ácidos graxos das amostras foi realizada com base na comparação dos tempos de retenção com padrões de ácidos graxos (C:12/C:24 - Sigma) determinados nas mesmas condições. A quantificação foi realizada com base na porcentagem de área dos picos. As análises foram feitas em triplicata.

As condições cromatográficas adotadas para a programação foram as seguintes: coluna cromatográfica de sílica fundida Supelcowax 10, de 30 metros de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno; gás de arraste de hidrogênio (fluxo de 1 mL/minuto); programação da temperatura da coluna - aquecimento a 1°C/minuto de 170°C até 225°C permanecendo nessa temperatura por 10 minutos, temperatura do injetor 250°C, temperatura do detector 270°C e volume de injeção da amostra 1 µL; razão de divisão da amostra no injetor foi 1:50.

4.8 Investigação Fitoquímica

Os ensaios fitoquímicos para verificação da presença dos principais grupamentos químicos nos extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso obtidos a partir das amostras processadas em laboratório e artesanalmente da alga *Gracilaria birdiae* foram realizados no Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

4.8.1 Triagem Fitoquímica Preliminar

Foi realizada uma triagem fitoquímica para detecção dos principais metabólitos secundários presentes nos extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso obtidos a partir das amostras processadas em laboratório e artesanalmente da alga *Gracilaria birdiae* por meio de reações químicas clássicas, que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico.

4.8.1.1 Pesquisa de Flavonóides - Reação de Shinoda

A reação da cianidina, de Shinoda ou hidrogenação baseia-se no fato de que os derivados flavônicos são reduzidos a antociânicos, pelo hidrogênio (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007). O ensaio consistiu em transferir para uma cápsulas de porcelana 2 mL dos extratos das amostras processadas em laboratório e artesanalmente da alga *Gracilaria birdiae*. Em seguida foi realizada a evaporação completa do solvente em uma capsula em banho-maria a 45°C. O resíduo da cápsula foi lavado com 0,2 mL de clorofórmio para eliminação da clorofila. Em seguida o resíduo foi ressuspendido em 1 mL de etanol a 70% e transferido para um tubo de ensaio, e adicionado 200 mg de magnésio metálico em pó. As paredes dos tubos foi adicionado lentamente 0,5 mL de HCl concentrado (MATOS, 1998).

A confirmação da presença de flavonóides ocorre pela mudança de coloração dos extratos: amarelo a vermelho, indica a presença de flavonas; vermelho a vermelho-sangue para flavonol e diidroflavonol; vermelho a violeta para flavonona; vermelho rosado, para derivados antocioânicos. Esse ensaio produz reação negativa para chalconas e isoflavonas (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

4.8.1.2 Pesquisa de Antraquinonas Livres - Reação de Bornträeger Direta

A reação de caracterização de quinonas consiste numa hidrólise ácido-oxidativa com ácido clorídrico (HCl e FeCl₃). As hidroxilas, de caráter ácido,

dissociam-se em meio básico, tornando a solução de coloração vermelha ou rosa, dependendo da concentração dos compostos antraquinônicos na amostra analisada (FALKENBERG, 2007).

Transferiu-se 0,5 g das amostras pulverizadas para um tubo de ensaio e adicionou-se 1 mL de tolueno, agitou-se por 2 min. e procedeu-se com a filtração. Adicionou-se ao filtrado 1 mL da solução de hidróxido de amônio (NH₄OH) a 10%, agitando lentamente. A mudança da coloração da fração para vermelho indica que o resultado da reação foi positivo (MATOS, 1998; DUARTE; YASSUMOTO; CECY, 1990).

4.8.1.3 Pesquisa de Taninos - Reação da Gelatina

Os taninos são substâncias polifenólicas de alto peso molecular e apresentam como característica a propriedade de precipitar proteínas. Podendo ser caracterizados por reações de precipitação. A reação de precipitação com gelatina a 2,5% em água é uma reação clássica para determinação de taninos (SANTOS; MELLO, 2007).

Foi colocado em um tubo de ensaio 1,0 mL dos extratos das amostras processadas em laboratório e artesanalmente de *Gracilaria birdiae* e em seguida adicionou-se em cada tubo 1,0 mL de solução de gelatina 2,5%. A formação de precipitado indicava reação positiva (MATOS, 1998; DUARTE; YASSUMOTO; CECY, 1990).

4.8.1.4 Pesquisa de Alcalóides - Reagente Mayer, Dragendorff, Wagner e Bertrand

Os alcalóides formam sais complexos com compostos de mercúrio, ouro, platina e outros metais. Esses sais são obtidos na forma de precipitado. A maioria dos alcalóides precipitam em soluções neutras ou levemente ácidas pelos reagentes de Mayer, Dragendorff, Wagner e Bertrand. Esses precipitados podem ser amorfos

ou cristalinos, possuir cores diferentes variando do branco ao marrom-alaranjado, podendo ser solubilizados em meio alcalino ou em excesso de reagente (HENRIQUES et al., 2007).

Deve-se ressaltar que esses precipitados também podem ser causados por proteínas, purinas, betaínas, alfa-pironas, algumas cumarinas, hidroxifenóis e ligninas. Assim resultados negativos com esses reagentes são indicativos de ausência de alcalóides, enquanto a formação de precipitados pode ser considerada apenas como provável presença de alcalóides (HENRIQUES et al., 2007).

Levou-se para evaporação em banho de água (60°C) 5 mL dos extratos das amostras processadas em laboratório e artesanalmente da alga *Gracilaria birdiae*, em cápsula de porcelana. O resíduo seco foi dissolvido em 0,5 mL de etanol absoluto e acrescido de 10 mL de ácido clorídrico (HCl) 1%. Foi aplicado 2 gotas de cada extrato em uma placa de vidro para cada reagente (Mayer, Dragendorff, Wagner e Bertrand). Foram adicionados os reagentes e observou-se a ocorrência ou não da reação positiva (presença de alcalóides) (MATOS, 1998; DUARTE; YASSUMOTO; CECY, 1990).

Tabela 1 – Reagentes utilizados para detecção dos alcalóides nos extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso obtido a partir do processamento laboratorial e artesanal da alga *Gracilaria birdiae*

Reagente	Tipo de Solução	Reação Positiva
Mayer	Iodeto de potássio e cloreto de mercúrio	Precipitado ou leve turvação branca
Dragendorff	Iodeto de potássio e subnitrito de bismuto	Precipitado ou vermelho-tijolo
Wagner	Iodo e iodeto de potássio	Precipitado
Bertrand	Ácido sílico-túngstânico	Precipitado ou leve turvação branca

Fonte: Henriques et al. (2007).

4.8.1.5 Pesquisa de Saponinas – Teste de Formação de Espuma

As saponinas, em solução aquosa, formam espuma persistente na presença de ácidos. Essa característica detergente deve-se a sua estrutura, composta de uma parte lipofílica apolar (aglicona ou sapogênica) e uma parte hidrofílica polar (açúcares). O teste da formação da espuma baseia-se na característica físico-química dessas substâncias: diminuição da tensão superficial e formação de espuma (SCHENKEL: GOSMANN; ATHAYDE, 2007).

A uma alíquota de 2 mL dos extratos das amostras processadas em laboratório e artesanalmente da alga *Gracilaria birdiae* foi adicionado 4 mL de água destilada. Os tubos foram agitados vigorosamente no sentido vertical, durante 1 minuto. A altura do anel de espuma formado logo após a agitação foi medida. A persistência de anel de espuma de tamanho igual ou maior que 1 cm após o repouso por 15 min., indica a presença de saponinas (MATOS, 1998; DUARTE; YASSUMOTO; CECY, 1990).

4.8.2 Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

4.8.2.1 Fracionamento do Extrato para CCD

O extrato etanólico das amostras da alga *Gracilaria birdiae* procedentes da amostra laboratorial e artesanal exibiu melhor desempenho nos ensaios de avaliação da atividade antioxidante. Por isso esses extratos foram submetidos a fracionamento pela técnica de extração líquido-líquido com os solventes em ordem crescente de polaridade hexano, diclorometano e acetato de etila, obtendo-se as frações hexânica, diclorometano e acetato de etila e as frações residuais aquosas, conforme descrito por Duan et al. (2006).

Após obtenção de 60 mL dos extratos etanólicos de cada amostra, estes foram evaporados sob pressão reduzida em evaporador rotatório (Fisatom, modelo 802, Brasil). Em seguida, foram ressuspensos em 60 mL de solução aquosa de metanol 90% para o fracionamento com hexano (3 x 30 mL), diclorometano (3 x 30 mL) e acetato de etila (3 x 30 mL).

4.8.2.2 Análise Cromatográfica

O extrato etanólico e as frações hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa, obtidas através da partição do extrato etanólico da amostra de *Gracilaria birdiae* obtido laboratorialmente e artesanalmente foram analisadas através de CCD (DUVE; WHITE, 1991).

A fase estacionária utilizada na CCD foi gel de sílica 60 F 254 sobre base de alumínio (Merck, 0,25 mm de espessura e partículas entre 5 a 40 μm de diâmetro). Na análise cromatográfica foram utilizados os padrões de β -sitosterol e stigmasterol para a triagem de esteróides e para a análise de carotenóides foi utilizado o padrão de β -caroteno. O sistema eluente utilizado foi o hexano: acetona (75:25, v/v). Após a migração cromatográfica, a placa foi borrifada com o reagente vanilina sulfúrica ácida e aquecida a 100°C para revelação dos compostos.

4.9 Determinação dos Compostos Fenólicos Totais da alga *Gracilaria birdiae*

O método é baseado na redução do reagente de Folin-Ciocalteu que detecta compostos com base no poder redutor de seus grupamentos hidroxila, apresentando ao final uma coloração azul. É um método inespecífico devido à interferência de compostos não fenólicos redutores como a vitamina C. Método bastante citado por diversos autores, apresentando como vantagem o baixo custo, a boa reprodutividade e a simplicidade de aplicação sendo considerada por isto uma análise de rotina (OLIVEIRA et al., 2009).

A determinação dos fenólicos totais nos extratos da amostra de *Gracilaria birdiae* obtido laboratorialmente e artesanalmente foi estimado segundo o método espectrofotométrico descrito por Subramanian, Padmanaban e Sarma (1965) com algumas modificações, utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (Merck 1.09001) e o ácido gálico (Fluka 48630) como padrão.

Foi preparado uma solução do ácido gálico (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para a construção da curva padrão utilizando-se alíquotas que variaram de 1 a 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para as amostras de *Gracilaria birdiae* obtido laboratorialmente e artesanalmente foram realizadas

diluições dos extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso na concentração de 23 mg/mL. As análises foram feitas em triplicata. Foram preparados controles contendo os respectivos solventes para cada tipo de extrato. Alíquotas 1,25 mL do reagente Folin-Ciocalteu foram adicionadas a 0,25 mL da amostra e de ácido gálico. Após três minutos, adicionou-se 1 mL de solução saturada de carbonato de sódio 7,5%. Os tubos foram agitados e, após 1 hora, as leituras das absorvâncias foram efetuada em espectrofotômetro UV-Visible Spectrophotometer, modelo UV-1650 PC, Shimadzu (Kioto/Japão), a 760 nm. Os cálculos do conteúdo de fenólicos totais foram feitos a partir da equação da reta obtida com a construção da curva de calibração. O teor de fenólicos totais, expresso em µg equivalentes de ácido gálico/mL de extrato.

4.10 Determinação dos Carotenóides Totais da alga *Gracilaria birdiae*

Todos os extratos tiveram o conteúdo de carotenóides quantificados em espectrofotômetro UV-Visible Spectrophotometer, modelo UV-1650 PC, Shimadzu (Kioto/Japão), a 450nm, usando os solventes respectivos como branco, sendo utilizado Trans-β-caroteno tipo I sintético (Sigma C 9750) como padrão (AOAC, 1995).

4.11 Avaliação da Atividade Biológica

4.11.1 Avaliação da Letalidade para Larvas *Artemia salina* Lech

A letalidade foi avaliada mediante o teste com Náuplios de *Artemia salina* Lech de acordo o método de Sam et al. (1993) com algumas modificações.

Os cistos da *Artemia salina* eclodiram (0,5 g cisto/1L) em água do mar artificial (3,8 g sal marinho/L de água) com temperatura em torno de 27-30° C, sob aeração, ao abrigo de um regime de luz contínua. Aproximadamente 24 h após a eclosão, os náuplios fototróficos foram coletados para o ensaio.

Foram realizadas diluições seriadas do extrato etanólico, hidroetanólico e aquoso da amostra de *Gracilaria birdiae* obtido laboratorialmente e artesanalmente, nas concentrações de 125, 250, 500 e 1000 µg/mL. Estas soluções foram aquecidas em banho de água (50°C) até total evaporação do solvente. Para cada diluição os testes foram realizados em triplicata.

Foram transferidos para cada tubo 10 unidades de larvas náuplios e completado o volume do tubo com água do mar artificial para 5,0 mL. Os tubos foram mantidos sob iluminação contínua. Após 24 h em contato com a suspensão dos extratos, realizou-se a contagem do número de larvas sobreviventes. Foram consideradas mortas aquelas larvas que permaneceram imóveis após agitação suave dos tubos.

Foi calculada a percentagem de mortalidade onde: mortalidade abaixo de 50% foi considerada não letal, mortalidade superior a 50% mas inferior a 75% foi considerado moderadamente letal, enquanto que a mortalidade superior a 75% foi considerados como altamente letal.

4.12 Atividade Antioxidante *in vitro* da alga *Gracilaria birdiae*

4.12.1 Método do Sistema β -Caroteno/Ácido Linoléico

O sistema β -Caroteno/Ácido Linoléico é constituído por uma emulsão, sendo considerado assim um sistema aquoso-lipídico. É um método colorimétrico, realizado em comprimento de onda 470 nm, baseado na leitura referente à descoloração da solução preparada com β -Caroteno e Ácido Linoléico, em meio aquoso. A descoloração ocorre em função das estruturas radicalares formadas pela oxidação do ácido linoléico, que atacam as duplas ligações do β -Caroteno, perdendo seu cromóforo, resultando na descoloração do pigmento alaranjado, característico da solução. A presença de antioxidantes no sistema protege o ácido linoléico, inibindo o processo de oxidação do sistema, evitando ou prolongando o período de formação dos radicais (HUANG; WANG, 2004).

A atividade antioxidante das amostras de *Gracilaria birdiae* foi determinada pelo método desenvolvido por Marco (1968) e modificado por Miller (1971), com adaptações descritas por Moreira e Mancini Filho (2003) empregando-se o ácido linoléico (Sigma L 1268), Tween 60 (Sigma 223484) e Trans- β -caroteno tipo I sintético (Sigma C 9750). Esse sistema foi mantido a 50°C e medidas espectrofotométricas de absorvância foram monitoradas em espectrofotômetro UV-Visible Spectrophotometer, modelo UV-1650 PC, Shimadzu (Kioto/Japão), a 470nm, a cada 15 minutos, durante 2 horas.

Diferentes concentrações de extratos (5, 10 e 15 mg/mL) foram adicionados a 2,9 mL de solução de β -caroteno com ácido linoléico: 50 μ L de β -caroteno + 1,5 mL de clorofórmio, 40 μ L de ácido linoléico e 120 mg de Tween 40, como emulsificante, e, posteriormente, o clorofórmio foi evaporado com nitrogênio. A seguir, foram adicionados 90 mL de água destilada tratada com O₂ durante 30 minutos. A solução inicial deverá estar límpida e apresentar densidade ótica entre 0,6 e 0,7 na absorvância de 470 nm. Todas as determinações foram realizadas três vezes e acompanhadas por um branco sem antioxidante e um controle com diferentes concentrações de solução de Butilato de Hidroxitolueno 99% (Sigma W 218405) nas mesmas proporções das amostras.

As percentagens de inibição da oxidação foram calculadas da seguinte forma: o decaimento da densidade ótica do controle (D.O. inicial - D.O. final) foi considerado como 100% de oxidação. O decréscimo da leitura da densidade ótica das amostras foi correlacionado com o branco e foi estabelecida a percentagem de inibição da oxidação, subtraindo-se a percentagem de oxidação de cada amostra de 100. Sendo desta forma verificada a ação antioxidante dos extratos.

4.12.1.1 Cinética da Atividade Antioxidante

A eficiência da atividade antioxidante dos extratos foi estimada pelo método das tangentes em duas partes das curvas cinéticas, segundo modificação do método, feita por Moreira Moreira e Mancini Filho (2003), descrito por Yanishlieva e Marinova (1995).

Observa-se o decaimento da absorbância das amostras, do branco e do BHT, por 120 minutos e calculam-se os fatores cinéticos. Yanishlieva e Marinova (1995) determinaram que o fator F1 ou Fator de Estabilização, observado no período de 15 a 45 minutos da curva, é mensurada a eficiência do antioxidante em bloquear a reação em cadeia, por meio da interação com os radicais peróxidos. Seriam os chamados antioxidantes primários. (NASCIMENTO et al., 2006; JARDINI; MANCINI FILHO, 2007). Essa eficiência é medida pela relação entre as tangentes das curvas cinéticas, apresentadas pelos meios contendo o extrato e o controle sem antioxidante. Os valores obtidos foram denominados fator 1 (F1):

$$F1 = \frac{\text{tg extrato ou fração}}{\text{tg controle}}$$

Na segunda parte da curva (entre 75 e 105 minutos após o início da reação) foi medida a possibilidade do antioxidante participar de outras reações durante o processo oxidativo, como a decomposição dos hidroperóxidos com oxigênio, produzindo espécies radicalares que aceleram a oxidação no sistema. Essa medida foi obtida pela relação entre as tangentes das curvas cinéticas apresentadas pelo meio contendo o extrato e o controle sem antioxidante. Os valores encontrados foram denominados de fator 2 (F2):

$$F2 = \frac{\text{tg extrato ou fração}}{\text{tg controle}}$$

Seguindo o sistema os resultados foram expressos em curvas, as quais obterão os fatores descritos acima, como ilustrado no esquema (MOREIRA; MANCINI FILHO (2003) abaixo:

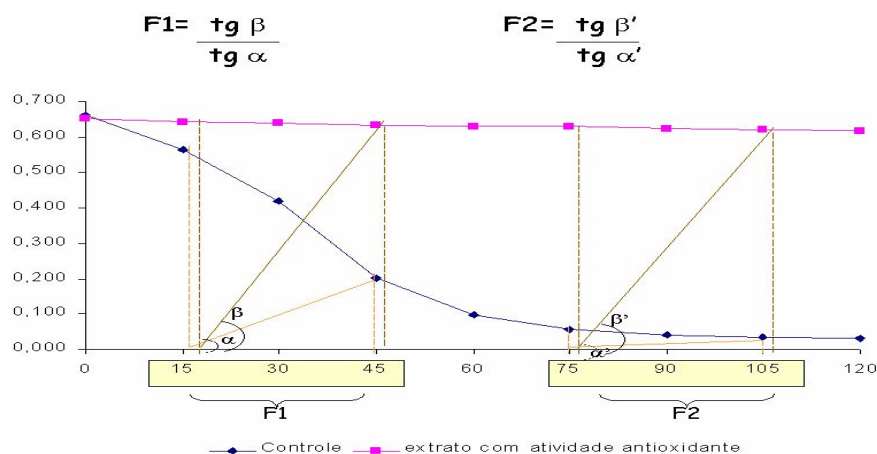


Gráfico 1 - Esquema para demonstração das curvas para a obtenção dos fatores F1 e F2.

Nos dois casos, se o valor da razão entre as tangentes das curvas cinéticas do extrato e do controle forem menor que 1, então atuam efetivamente como antioxidante; se os valores for maior que 1, então não há uma atividade antioxidante nesse intervalo e o extrato pode inclusive atuar como pró-oxidante.

4.12.2 Método de Sequestro do Radical DPPH•

O método de sequestro do radical DPPH• consiste em avaliar a capacidade dos agentes antioxidantes em sequestrar o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•). O DPPH• é um radical livre estável que aceita um elétron ou um hidrogênio para torna-se uma molécula estável e dessa forma na presença de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH• que apresenta coloração púrpura é reduzido formando difenilpicrilhidrazina de coloração amarela. Na forma de radical, o DPPH• possui uma absorção característica a 517 nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio removido do antioxidante. O que permite calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a porcentagem da DPPH• remanescente no meio da reação e/ou a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres, ou seja, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% o radical DPPH•.

O ensaio de sequestro do radical DPPH• foi realizado de acordo com a metodologia descrito por Blois (1958) e adaptado por Brand-Willians (1995). A atividade antioxidante do extrato etanólico, hidroetanólico e aquoso da amostra de *Gracilaria birdiae* obtido laboratorialmente e artesanalmente foram avaliados quanto à capacidade de sequestrar o radical estável DPPH• em comparação com o controle positivo BHT.

Para avaliar a atividade antioxidante dos extratos das amostras da alga marinha, bem como do padrão BHT, foi realizado o preparo das soluções. Para o reagente DPPH• 60 µM (6×10^{-5} M) adicionou-se 2,4 mg de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (Sigma D 9132) em 100 mL de metanol. Diluíram-se concentrações de 1,0; 2,0 e 5,0 mg/mL, do diferentes extratos em álcool etílico PA (Merck 22029-5). Para o

branco sem antioxidante e o controle composto pelo antioxidante sintético Butilato de Hidroxitolueno 99% (Sigma W 218405) foram realizadas as diluições em álcool etílico absoluto nas mesmas concentrações dos extratos.

A mistura da reação foi constituída pela adição de 0,1 mL do extrato adicionado a 2,9 mL da solução do radical DPPH[•] 60 µM. Após a adição da solução do radical DPPH[•] 60 µM, as soluções foram protegidas da luz e mantidas em repouso por 30 min. A atividade antioxidante foi avaliada *in vitro* por meio da medida da absorbância das soluções a 517 nm, utilizando um espectrofotômetro UV-Visible Spectrophotometer, modelo UV-1650 PC, Shimadzu (Kioto/Japão).

Os resultados foram expressos pelos valores de EC₅₀, ou seja, a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH[•] em 50%, calculados por regressão linear e plotados em gráficos onde a abscissa representa a concentração do extrato testado e a ordenada o decaimento da densidade ótica das amostras. No intervalo linear foi determinada a equação de reta de primeiro grau e com isso, foi possível determinar o valor da EC₅₀ para os extratos testados.

4.13 Análise Estatística

Para as variáveis estudadas foram utilizada o modelo de análise de variância (ANOVA) e o Pós-teste de Tukey-Kramer. Os programas computacionais utilizados foram o Microsoft Excel 2007 (Windows[®]) e o software GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad[®]). Para estas análises foi considerado um nível de significância de 5%, onde os intervalos foram construídos com 95% de confiança global.

REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J. et al. **Natural Marine Anti-inflammatory Products**. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, v.8, n. 8, p. 740-754, 2008.
- ALLURI, V. K. et al. Assessment of Bioactivity of Indian plants using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay. **Int J Appl Sci Eng**, v. 3, p.125–34, 2005.
- APOSTOLIDIS, E.; LEE, C. *In Vitro* Potential of *Ascophyllum nodosum* Phenolic Antioxidant-Mediated α -Glucosidase and α -Amylase Inhibition. **J Food Sci**, v.75, p. H97–H102, 2010.
- ARA, J. et al. Cytotoxic activity of marine macro-algae on *Artemia salina* (brine shrimp). **Phytother Res**, v. 13, p. 304–307, 1999.
- ARAUJO, L. et al. Efecto tóxico del extracto de alga roja *Gracilaria Mammillaris* en células mononucleares humanas de sangre periférica. **Rev Fac Farm**, v. 46, n.1, 2004.
- ASCENCIO, S. D. **Heterosídeos sintetizados por linhagens de cor e estádios reprodutivos de macroalgas vermelhas dos gêneros *Hypnea* e *Gracilaria***. 135f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists**. 16. ed. Arlington:AOAC, 1995.
- ATHIPERUMALSAMI, V. D. et al. Antioxidant activity of seagrasses and seaweeds. **Botanica Marina**, v. 53, n.3, p. 251-257, 2010.
- AUDIBERT, L. et al. Phenolic Compounds in the Brown Seaweed *Ascophyllum nodosum*: Distribution and Radical-scavenging Activities. **Phytochem Analysis**, v. 10, p. 13-20, 2010.
- BANERJEE, K. B. et al. Seasonal variation in the biochemical composition of red seaweed (*Catenella repens*) from Gangetic delta, northeast coast of India. **J Earth Syst Sci**, v. 118, n. 5, p. 497-505, 2009.

BATISTA GONZALEZ, A. E. et al. Las algas marinas como fuentes de fitofármacos antioxidantes. **Rev Cubana Plant Med**, Ciudad de la Habana, v. 14, n. 2, jun. 2009.

BENNANI H, et al. Antiproliferative effect of polyphenols and sterols of virgin argan oil on human prostate cancer cell lines. **Cancer Detec Prev**. v. 31, n.1, p. 64-9, 2007.

BEZERRA, A. F. **Cultivo de algas marinhas como desenvolvimento de comunidades costeiras**. 2008. 69f. Dissertação (Mestrado em Programa Regional de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente/Prodema) - Universidade Federal do rio Grande do Norte, Natal, 2008.

BIERHALS, V. S. et al. Compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e antifúngica de multimisturas enriquecidas com a microalga *Spirulina platensis*. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 68, n. 1, p. 42-48, 2009.

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

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

BULBOA, C. et al. First attempt to cultivate the carrageenan-producing seaweed *Chondracanthus chamissoi* (C. Agardh) Kützing (Rhodophyta; Gigartinales) in North Chile. **Aquac Res.**, v. 36, p. 1069-1074, 2005.

BURTIN, P. Nutritional value of seaweeds. **Electron J Environ Agric Food Chem**, v. 2, p.498–503, 2003.

BUSCHMANN, A. H. et al. Red algal farming in Chile: a review. **Aquaculture**, New York, v. 194, p. 203-220, 2001.

CARVALHO FILHO, J. Algas: Uma alternativa para as comunidades pesqueiras? **Panorama da Aquicultura**, 2004.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quím Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CERO´N, M. C. et al. Antioxidant activity of *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.74, n.5, p.1112–1119, 2006.

CHAKRABORTY, K.; PAULRAJ, R. Sesquiterpenoids with free-radical-scavenging properties from marine macroalga *Ulva fasciata Delile*. **Food Chem**, v. 122, p. 31-41, 2010.

CHEW, Y. L. et al. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. **LWT - Food Sci Technol**, v.41, p.1067-1072, 2008.

COFRADES, S. et al. Nutritional and Antioxidant Properties of Different Brown and Red Spanish Edible Seaweeds. **Food Sci Technol Int**, v. 16, n. 4, 2010.

CHO, S. H. et al. The antioxidant properties of brown seaweed (*Sargassum siliquastrum*) extracts. **J Med Food**, v.10, n.3, p. 479-485, 2007.

CHOI, J-I et al. Changes in colour and antioxidant activities of *Hizikia fusiformis* cooking drips by gamma irradiation. **LWT - Food Sci Technol**, 2010.

COSTA, V. L.; PLASTINO, E. M. Histórico de vida de espécimens selvagens e variantes cromáticas de *Gracilaria* sp. (Gracilariales, Rhodophyta). **Rev Bras Bot**, v. 24, p. 491–500, 2001.

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

DEMIREL, Z. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of brown algae from the Aegean Sea. **J Serb Chem Soc**, v.74, n.6, p. 619-628, 2009.

DAHM, C. C. et al. Dietary fiber and colorectal cancer risk: a nested case control study using food diaries. **J Natl Cancer Inst**, v. 102, n. 9, p.614–626, 2010.

DINAKAR et al. Importance of ROS and antioxidant system during the beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. **Planta**, v. 231, p.461-474, 2010.

DYKENS, J. A., et al. Oxygen radical production in the sea anemone *Anthopleura elegantissima* and its endosymbiotic algae. **J Exp Biol**, v.168, p.219-241, 1992.

DUAN, X.J. et al. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. **Food Chem**, v. 95, p. 37–43, 2006.

DUARTE, M. R.; YASSUMOTO, Y.; CECY, C. **Guia de farmacognosia aplicada**. 1. ed. Curitiba: Editora EDUCA, 1990, 84 p.

DUVE, K. J.; WHITE, P. J. Extraction and Identification of antioxidant in Oats. **J Am Oil Chem Soc**, Champaign, v.68, p.365-370, 1991.

EL-BAKY, H. H. A.; EL-BAZ, F. K.; EL-BAROTY, G. S. Evaluation of marine alga *Ulva lactuca* L. as a source of natural preservative ingredient. **Am Eurasian J Agric Environ Sci**, v.3, n.3, p.434-444, 2008.

EL-BAKY, H. H. A.; EL-BAZ, F. K.; EL-BAROTY, G. S. Natural preservative ingredient from marine alga *Ulva lactuca* L. **Int J Food Sci Technol**, v. 44, p. 1688–1695, 2009.

EL-BAKY, H.H.A.; EL-BAZ, F.K.; EL-BAROTY, G.S. Characterization of nutraceutical compounds in *blue green alga spirulina maxima*. **EJEAFChe**, v.8, n.11, p. 1113-1126, 2009a.

FALKENBERG, M. B. Quionas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, p. 657-684.

FAN, D. et al. Commercial extract of the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* enhances phenolic antioxidant content of spinach (*Spinacia oleracea* L.) which protects *Caenorhabditis elegans* against oxidative and thermal stress. **Food Chem**, v. 124, n. 1, p. 195-202, 2010.

FATEN, M. A. E.; EMAD, A. S. Antioxidant Activity of Extract and Semi- Purified Fractions of Marine Red Macroalga, *Gracilaria Verrucosa*. **Austr J Basic Appl Sci**, v.3, n. 4, p.3179-3185, 2009.

FIGUEIREDO, M. A. O. Recifes de corais ou recifes de alga? **Ciênc Hoje**, v. 166, n. 28, p. 74-75, 2000.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids. **J Biol Chem**, Baltimore, v.226, p.497, 1957.

FREITAS, J. B.; NAVES, M. M. V. Chemical composition of nuts and edible seeds and their relation to nutrition and health. **Rev Nutr**, v. 23, n. 2, 2010.

FUJIMOTO, K.; KANEDA, T. Screening test for antioxidigenic compounds from marine algae and fraction from *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifil*. **Bull Japan Soc Sci Fisheries**, v. 46, p.1125-1130, 1980.

FUNAHASHI, H. *et al.* Seaweed prevents breast cancer? **Jpn J Cancer Res**, v.92, n.5, p.483-487, 2001.

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

GERASIMENKO, N. I.; BUSAROVA, N. G.; MOISEENKO, O. P. Age-dependent changes in the content of lipids, fatty acids, and pigments in brown alga *Costaria costata*. **Russ J Plant Physiol**, v. 57, n. 1, p. 62-68, 2010.

GERASIMENKO, N. I.; BUSAROVA, N. G.; MOISEENKO, O. P. Seasonal Changes in the Content of Lipids, Fatty Acids, and Pigments in Brown Alga *Costaria costata*. **Russ J Plant Physiol**, v. 57, n.2, p. 205–211, 2010a.

GIULIETTI, A. M. *et al.* Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v.1, n.1, p. 52-61, 2005.

GOO, H. R.; CHOI, J. S.; NA, D. H. Quantitative determination of major phlorotannins in *Ecklonia stolonifera*. **Arch Pharm Res**, v. 33, n. 4, p. 539-544, 2010.

GUPTA, S.; RAJAURIA, G.; ABU-GHANNAM, N. Study of the microbial diversity and antimicrobial properties of Irish edible brown seaweeds. **Int J Food Sci Technol**, v.45, n. 3, p. 482-489, 2010.

GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWEL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. **Ann N Y Acad Sci**, v. 899, p. 136-147, 2000.

GÜVEN, K. C.; PERCOT, A.; SEZIK, E. Alkaloids in Marine Algae. **Mar Drugs**, v. 8, p. 269-284, 2010.

HAN, C. et al. Arsenic Speciation in *Sargassum fusiforme* by Microwave-Assisted Extraction and LC-ICP-MS. **Chromatographia**, v.69, n. 5/6, p. 587-591, 2009.

HALLIWELL, B. Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. **Trends Biochem Sci**, v. 57, n. 4, p. 104-13, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4. ed. Oxford: Clarendon Press, 2007.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. **Rapid preparation of fatty acid methyl ester from lipids**. Londres: Lab. Pract., v.22, p. 475-476, 1973.

HEMAT, R.A.S. **Fat and muscle dysfunction**. In R. A. S. Hemat (Eds), *Andropathy*. Dublin, Ireland: Urotext, p. 83-85, 2007.

HERNÁNDEZ-CARMONA, G. et al. Monthly variation in the chemical composition of *Eisenia arborea* J.E. Areschoug. **J Appl Phycol**, v. 21, n. 5, p. 607-616, 2009.

HENRIQUES, A. T. et al. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, p. 765-792.

HONG, D.; HIEN, H. Nutritional analysis of Vietnamese seaweeds for food and medicine. **Biofactors**, v. 22, p. 323–325, 2004.

HORTA, P. A. **Aspectos taxonômicos e ecologia de macroalgas bênticas**. Florianópolis: UFSC, 2001.

HUANG, L.H.; WANG, B.G. Antioxidant capacity lipophylic content of seaweed collect from Qingdao coast. **J Agric Food Chem**, v. 58, p.4993-4999, 2004.

HU, W.; HEO, S.; WANG, M. H. Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of *Kalopanax pictus* Leaf. **J Korean Soc Appl Biol Chem**, v.52, n.4, p.360-366, 2009.

HWANG, P et al. Antioxidant and immune-stimulating activities of hot-water extract from seaweed *Sargassum hemiphyllum*. **J Marine Sci Technol**, v. 18, n. 1, p. 41-46, 2010.

HWANG, Y. O. et al. Total arsenic, mercury, lead, and cadmium contents in edible dried seaweed in Korea. **Food Addit Contam Part B Surveill**, v. 3, n. 1, p. 7-13, 2010.

IMBS, T. I. et al. Comparative Study of Chemical Composition and Antitumor Activity of Aqueous–Ethanol Extracts of Brown Algae *Laminaria cichorioides*, *Costaria costata*, and *Fucus evanescens*. **Russ J Mar Biol**, v. 35, n. 2, p. 164–170, 2009.

IOANNOU, E.; ROUSSIS, V. Natural Products from Seaweeds. **Plant Derived Nat Prod**, v.1, p.51-58, 2009.

JAIME, L. et al. Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC and HPLC-DAD. **J Sep Sci**, v. 28, p.2111-2119, 2005.

JAIME, L. et al. Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids' extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. **LWT - Food Sci Technol**, v.43, p.105–112, 2010.

JARDINI, F.A.; MANCINI FILHO J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos de polpa e semente de romã (*Punica granatum*, L.). **Braz J Pharm Sci**, v. 43, n.1, p. 137-147, 2007.

JIMÉNEZ, J. T. et al. Antioxidant, antimicrobial, and tyrosinase inhibition activities of acetone extract of *Ascophyllum nodosum*. **Chem Pap**, v. 64, n. 4, p. 434-442, 2010.

KAMIYA, M. et al. Seasonal variation of phlorotannin in sargassacean species from the coast of the Sea of Japan. **Phycological Res**, v. 58, n. 1, p. 53-61, 2010.

KANG, H. S. et al. Inhibitory phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on total reactive oxygen species (ROS) generation. **Arch Pharm Res**, v. 27, p. 194-198, 2004.

KHANA VI, M. et al. Cytotoxic activity of some marine brown algae against cancer cell lines. **Biol Res**, v.43, p. 31-37, 2010.

KIM, J. A.; KONG, C. S.; KIM, S. K. Effect of *Sargassum thunbergii* on ROS mediated oxidative damage and identification of polyunsaturated fatty acid components. **Food Chem Toxicol**, v. 48, p.1243-1249, 2010.

KYNGMI, M. S.; EBELER, E. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food Chem Toxicol**, v. 46, p. 96-104, 2008.

KORNPROBST, J. M. Substances naturelles d'origine marine: Chimiodiversité, Pharmacodiversité, **Biotechnologies**, Paris: Lavoisier, 2005.

KRISHNAIAH, D. et al. Mineral content of some seaweed from Sabah's south China sea. **Asian J Sci Res**, v. 1, n. 2, p. 166-170, 2008.

KUMAR, N. J. I. et al. Nutrient Composition and Calorific Value of Some Seaweeds from Bet Dwarka, West Coast of Gujarat, India. **Our Nat**, v. 7, p. 18-25, 2009.

KUMAR, M. et al. Biochemical responses of red alga *Gracilaria corticata* (*Gracilariales*, *Rhodophyta*) to salinity induced oxidative stress. **J Exp Mar Biol Ecol**, 2010.

KUMARI, P. et al. Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs. **Food Chem**, v. 120, n. 3, p. 749-757, 2010.

LATEGAN, M. et al. Antiplasmodial and antimicrobial activities of South African marine algal extracts. **Pharm Biol**, v 47, n. 5, p. 408-413, 2009.

LATHA, L. Y. et al. Toxicity study of *Vernonia cinerea*. **Pharm Biol**, v. 48, n. 1, p. 101-104, 2010.

LEE, S. H. et al. Antioxidative effect of *Ecklonia cava* dried by far infrared radiation drying. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n.1, p. 129-135, 2010.

LEE H. J. et al. Algae Consumption and Risk of Type 2 Diabetes: Korean National Health and Nutrition Examination Survey in 2005. **J Nutr Sci Vitaminol**, v. 56, n. 1, p. 13-18, 2010.

LEU, E. et al. Increased irradiance reduces food quality of sea ice. **Mar Ecol Prog Ser**, v. 411, p. 49–60, 2010.

LENIS, V. L. A. et al. Extracción, separación y elucidación estructural de dos metabolitos secundarios del alga marina *Bostrychia calliptera*. **Scientia Et Technica**, v. 13, n. 33, p. 97-102, 2007.

LHULLIER, C. **Triagem de macroalgas bêmicas do litoral de Santa Catarina biomonitorada pelo ensaio de letalidade para larvas de *Artemia Salina* e investigação fitoquímica de *Pterocliadiella Capillace***. 2006. 103f. Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

LI, H. et al. Development of an eco-friendly agar extraction technique from the red seaweed *Gracilaria lemaneiformis*, **Bioresour Technol**, v.99, p.3301–3305, 2008.

LIMA-FILHO, J. V. M. et al. Avaliação de atividade antibacteriana de extratos de seis macroalgas do nordeste brasileiro. **Braz J Microbiol**, São Paulo, v. 33, n. 4, 2002.

LOTTENBERG, A. M. P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 5, p. 595-607, 2009.

LOURENCO, S. O. et al. Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-toprotein conversion factors for 19 tropical seaweeds. **Phycological Res**, v. 50, n.3, p. 233–241, 2002.

LUYEN, Q. K. et al. Isolation of algal spore lytic C17 fatty acid from the crustose coralline seaweed *Lithophyllum yessoense*. **J Appl Phycol**. v. 21, p.423–427, 2009.

MACIEL, J. S. et al. Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae*. **Carbohydrate Polymers**.v. 71, p. 559-565, 2008.

MANILAL, A. et al. Cytotoxic Potentials of Red Alga, *Laurencia brandenii* Collected from the Indian Coast. **Glob J Pharmacol**, v.3, n.2, p. 90-94, 2009.

MATOS, F. J. A. **Introdução á fitoquímica experimental**. 1. ed. Fortaleza: Editora UFC, 1988, 126 p.

MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **J Am Oil Chem Soc**, Champaign, v. 45, p. 594-598, 1968.

MARINHO-SORIANO, E. Species composition of seaweeds in Buzios beach, Rio Grande do Norte, Brazil. **Seaweed Res Utiln**, v. 21, p. 9-13, 1999.

MARINHO-SORIANO, E.; SILVA T. S. F; MOREIRA, W. S. C. Seasonal variation in the biomass and agar yield from *Gracilaria cervicornis* and *Hydropuntia cornea* from Brazil. **Bioresour Technol**, v. 77, n. 2, p.115-120, 2001.

MARINHO-SORIANO, E.; MOREIRA, W. S. C.; CARNEIRO, M. A. A. Some Aspects of the Growth of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) in an Estuary in Northeast Brazil. **Aquac Inter**, v. 14, n. 4, p. 327-36, 2006.

MARTÍNEZ, L. J. M. et al. Actividad inhibidora del crecimiento *in vitro* de *Plasmodium falciparum* de extractos de algas del género *Laurencia*. **Rev Cubana Med Trop**, v. 57, n.3, 2005.

MATANJUN, P. et al. Nutrient content of tropical edible seaweeds, *Euचेuma cottonii*, *Caulerpa lentillifera* and *Sargassum polycystum*. **J Appl Phycol**, v. 21, n. 1, p. 75-80, 2009.

MATSUKAWA, R. et al. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. **J Appl Phycol**, v. 9, p. 29-35, 1997.

MATSUDA, Y. at al. Anti-Cancer Effects of Enzyme-Digested Fucoidan Extract from Seaweed Mozuku. **Basic and Applied Aspects Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects**, v. 16, p. 295-300, 2010.

McHUGH, D. J. A guide to the seaweed industry. **Tetrahedron**, Rome, v. 49, 911 p., 2003.

MEKARY, R. A. et al. Total antioxidant capacity intake and colorectal cancer risk in the Health Professionals Follow-up Study. **Cancer Causes Control**, v. 21, p.1315-1321, 2010.

MELLO, V. D.; LAAKSONEN, D. E.. Fibras na dieta: tendências atuais e benefícios à saúde na síndrome metabólica e no diabetes melito tipo 2. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, n. 5, 2009.

MENDES, G. S. et al. Antiviral activity of the green marine alga *Ulva fasciata* on the replication of human metapneumovirus. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.52, n.1, p.3-10, 2010.

MEENAKSHI, S. et al. Total Flavanoid and *in vitro* Antioxidant Activity of Two Seaweeds of Rameshwaram Coast. **Global J Pharmacol**, v. 3 n. 2, p.59-62, 2009.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **J Am Oil Chem Soc**, Champaign, v.48, p.91, 1971.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI FILHO, J. Atividade Antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva doce em sistemas aquoso e lipídico. **Nutrire Rev Soc Bras Aliment Nutr**, São Paulo, v. 25, p. 31-46, 2003.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chem**, London, v. 72, n. 2, p. 145-171, 2001.

MSUYA, F. E.; NEORI, A. Ulva reticulate and Gracilaria crassa: Macroalgae that can biofilter effluent from tidal fishponds in Tanzania. **W Indian Ocean J Mar Sci**, v. 1, n. 2, p. 117-126, 2002.

NAGAI, T.; YUKIMOTO, T. Preparation and functional properties of beverages made from sea algae. **Food Chem.**, v. 81, p. 327-332, 2003.

NATARAJAN, S. et al. Cholinesterase inhibitors from *Sargassum* and *Gracilaria gracilis*: Seaweeds inhabiting South Indian coastal areas (Hare Island, Gulf of Mannar). **Nat Prod Res**, v. 23, n. 4, p. 355 – 369, 2009.

NASCIMENTO, C.R. et al. *Turnera umifolia* L. (Turneraceae): preliminary study of its antioxidant activity. **Bioresour Technol**, v. 97, n.12, p. 1387-1391, 2006.

NOVOA, A. V. et al. Actividad antioxidant y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G.gmelim) Howe. **Braz J Pharm Sci**, v. 37, p. 373-382, 2001.

OLIVEIRA, E. C.; ALVEAL, K.; ANDERSON, R. Mariculture of the agarproducing Gracilarioid red algae. **Rer Fish Sci**, v. 8, n. 4, p. 345-378, 2000.

OLIVEIRA, E. C. Macroalgas Marinhas da Costa Brasileira - Estado do Conhecimento, Uso e Conservação Biológica. In: ARAÚJO, E. L. et al. **Biodiversidade, Conservação e Uso Sustentável da Flora do Brasil**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2002. p. 122-126.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

ONOFREJOVÁ, L. et al. Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. **J Pharm Biomed Anal**, v. 51, n. 2, p. 464-470, 2010.

ORTIZ, J. et al. Functional and nutritional value of the Chilean seaweeds *Codium fragile*, *Gracilaria chilensis* and *Macrocystis pyrifera*. **Eur J Lipid Sci Technol**, v. 111, p. 320–327, 2009.

PARK, Y. et al. Dietary fiber intake and risk of breast cancer in postmenopausal women: the National Institutes of Health–AARP Diet and Health Study, **Am J Clin Nutr**, v. 90, p.664-71, 2009.

PEREZ, E. et al. Antioxidant capacity of seaweed extracts on superoxide anion, hydroxyl radical and radicals generated by UV-light. **Free Rad Biol Med**, v. 35, 17 p., 2003a.

PEREZ, E. et al. Antioxidant capacity of seaweed extracts during lipid peroxidation wister rat homogenates. **Free Rad Biol Med**, v. 35, p. 121, 2003b.

PINTO, C. A. et al. Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Quím Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PIRES, K. M. S. et al. Teores de a-caroteno e b-caroteno em macroalgas marinhas Desidratadas. **Rev Ciên Agron**, v. 39, n. 2, p. 257-262, 2008.

PLASTINO, E. M.; OLIVEIRA, E. C. *G. birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta), a new species from the tropical South American Atlantic with a terete frond and deep spermatangial conceptacles. **Phycologia**, Lawrence, v. 41, n. 4, p. 389-396, 2002.

PLASTINO, E. M.; URSI, S.; FUJII, M.T. Color inheritance, pigment characterization, and growth of a rare light green strain of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). **Phycological Res**. v. 52, p. 45-52, 2004;

PLAZA, M. et al. Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. **Food Res Int**, v. 43, 2010.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants capacity of brassica vegetables: a review. **J Food Compost Anal**, v. 40, p. 1-11, 2007.

PRABHASANKAR, P.; GANESAN, P.; BHASKAR, N. Influence of Indian Brown Seaweed (*Sargassum marginatum*) as an Ingredient on Quality, Biofunctional, and Microstructure Characteristics of Pasta. **Food Sci Technol Int**, v. 15, n.5, p. 471-479, 2009.

PULZ, O; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 65, p. 635-648, 2004.

RAMARATHNAM, N. et al The contribution of plant food antioxidants to human health. **Trends Food Sci Technol**, v. 6, p. 75-82, 1995.

RAYMUNDO, M. S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). **Rev Bras Cienc Farm**, v.40, n.4, 2004.

REDDY; GUPTA; JHA. Developments in Biotechnology of Red Algae. **Biomed Life Sci**, v. 13, n.3, p. 307-341, 2010.

ROCHA, F.D. et al. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 16. n.4, p. 631-639, 2007.

RODRIGUEZ-GARCIA, I.; GUIL-GUERRERO, J. L. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. **Food Chem**, v. 108, p. 1023–1026, 2008.

SAM, T.W. Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*. **Bio Act Nat**, v. 18, p.441–56, 1993.

SACHINDRA, N. M. et al. Radical Scavenging and Singlet Oxygen Quenching Activity of Marine Carotenoid Fucoxanthin and Its Metabolites. **J Agric Food Chem**, v. 55, p. 8516-8522, 2007.

SACHINDRA, N. M. et al. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of extracts from Indian seaweeds. **J Food Sci Technol**, v. 47, n. 1, p. 94-99, 2010.

SAEIDNIA, S. et al. Biological activity of two red algae, *Gracilaria salicornia* and *Hypnea flagelliformis* from Persian Gulf. **Pharmacogn Res**, v. 1, n.6, p.428-430, 2009.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, p. 615-656.

SANTOSO, J.; STARK, Y. Y.; SUZUKI, T. Comparative Contents of Minerals and Dietary Fibers in Several Tropical Seaweeds. **J Pengolahan Hasil Perikanan Indones**, v. 9, n. 1, 2006.

SANTOYO, S. et al. Functional characterization of pressurized liquid extracts of *Spirulina platensis*. **Eur Food Res Technol**, v. 224, p.75-81, 2006.

SASIDHARAN, S.; DARAH, I., JAIN, K. *In Vivo*. and *In Vitro*. Toxicity Study of *Gracilaria changii*. **Pharm Biol**, v. 46, n. 6, p. 413-417, 2008.

SASIDHARAN, S.; DARAH, I.; NOORDIN, M. K. M. J. Screening antimicrobial activity of various extracts of *Gracilaria changii*. **Pharm Biol**, v.47, n.1, p. 72-76, 2009.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, p. 711-740.

SCHUBERT, N.; GARCÍA-MENDOZA, E. Photoinhibition in red algal species with different carotenoid profiles. **J Phycol**, v. 44, n. 6, p. 1437-1446, 2008.

SELVIN, J. LIPTON, A. P. Biopotentials of *Ulva fasciata* and *Hypnea musciformis* collected from the peninsular coast of India. **J MarSci Technol**, v. 12, n 1, p. 1-6, 2004.

SHAI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic Publishing, p. 281-319, 1995.

SHALABY, E. A.; SHANAB, S. M. M. Salt Stress Enhancement of Antioxidant and Antiviral Efficiency of *Spirulina platensis*. **J Am Sci**, v. 6, n. 10, 2010.

SHEIH, C. et al. Anticancer and Antioxidant Activities of the Peptide Fraction from Algae Protein Waste. **J Agric Food Chem**, v. 58, n.2, p. 1202–1207, 2010.

SILVIA, L. M. C. M. et al. Antineociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from marine red alga *Pterocladia capillacea*. **Biol Pharm Bull**, v.33, n. 5, p. 830-835, 2010.

SIES, H.; MURPHY, M.E. Role of Tocopherols in the protection of Biological Against Oxidative Damage. **J Photochem Photobiol B**, v. 8, p. 211-224, 1991.

SIES, H. Strategies antioxidant defence. **Eur J Biochem**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SMIT, A. J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. **J of Applied Phycology**, v.16, p.245-262, 2004.

SOUZA, M. B. et al. α -, β -caroteno e α -tocoferol em algas marinhas in natura. **Ciênc Tecnol Aliment**, v. 28, n.4, p. 953-958, 2008.

SOUZA, E. V. et al. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of Caulerpin, a Bisindole Alkaloid Isolated from Seaweeds of the Genus *Caulerpa*. **Mar Drugs**, v. 7, p. 689-704, 2009.

SPOSITO, A. C. et al. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol**, São Paulo, 2010.

STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochim Biophys Acta**, v. 7, p. 1740:101, 2005.

SUBRAMANIAN, K. N.; PADMANABAN, G.; SARMA, P. S. Folin-Ciocalteu reagent for the estimation of siderochromes. **Anal Biochem**, v. 12, p.106-112, 1965.

SULLIVAN, A.M.O. et al. Determination of the antioxidant potential of seaweed extracts using different methods. **Ir Sect Nutr Soc**, v. 68, p. 17-19, 2009.

SUN, Y. et al. Gracilarioside and Gracilamides from the Red Alga *Gracilaria asiatica*. **J Nat Prod**, v. 69, p.1488-1491, 2006.

TERASAKI, M. et al. Evaluation of recoverable functional lipid components of several brown seaweeds (*phaeophyta*) from Japan with special reference to fucoxanthin and fucosterol contents. **J Phycol**, v.45, p. 974-980, 2009.

TIERNEY, M.; CROFT, A. K.; HAYES, M. A review of antihypertensive and antioxidant activities in macroalgae. **Botanica Marina**, v. 53, n. 5, p. 387–408, 2010.

TRINCHERO, J. et al. Antiretroviral Activity of Fucoidans Extracted from the Brown Seaweed *Adenocystis utricularis*. **Phytother Res**, v. 23, p. 707-712, 2009.

TSENG, C. K. Algal biotechnology industries and research activities in China. **J Appl Phycol**, v. 13, p. 375-380, 2001.

URSI, S.; PLASTINO, E. M. Crescimento *in vitro* de linhagens de coloração vermelha e verde clara de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) em dois meios de cultura: análise de diferentes estádios reprodutivos. **Rev Bras Bot**, v. 24, n. 4, p. 587-594, 2001.

URSI, S. et al. Intraspecific variation of photosynthesis, respiration and photoprotective carotenoids in *Gracilaria birdiae* (Gracilariales: Rhodophyta). **Mar Biol**, v.142, p.997-1007, 2003.

URSI, S.; GUIMARÃES, M.; PLASTINO, E.M. Deleterious effect of TRIS buffer on growth rates and pigment content of *Gracilaria birdiae* Plastino & E.C. Oliveira (Gracilariales, Rhodophyta). **Acta Bot Bras**, v. 22, n. 3, p.891-896, 2008.

VADLAPUDI, V.; NAIDU, K. C. In vitro Bioevaluation of Antioxidant activities of selected Marine algae. **J pharmac res**, v. 3, n. 2, p.329-33, 2010.

VALENTÃO, P. et al. *Codium tomentosum* and *Plocamium cartilagineum*: Chemistry and antioxidant potential. **Food Chem**, v. 119, n.4, p. 1359-1368, 2010.

VALLINAYAGAM, K. et al. Antibacterial Activity of Some Selected Seaweeds from Pudumadam Coastal Regions. **Glob J Pharmacol**, v. 3, n.1, p.50-52, 2009

VÉLEZ, L. S.; LEÓN, R. A. Comparación bromatológica de las algas nativas (*Gracilariopsis tenuifrons*, *Sargassum filipendula*) y exóticas (*Kappaphycus alvarezii*) del Caribe Colombiano. **Boletín Científico Museo de História Natural**, v.13, n. 2, p.17-25, 2009.

VINAYAK, R. C.; SABU, A.S.; CHATTERJI, A. Bio-Prospecting of a Few Brown Seaweeds for Their Cytotoxic and Antioxidant Activities. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2010.

VON B. K.; SUDHOP T.; LUTJOHANN D. Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. **Am J Cardiol**, v. 96, n.1A, p.10D-4D, 2005.

YANGTHONG, M.; TOWATANA, N. H.; PHROMKUNTHONG, W. Antioxidant Activities of Four Edible Seaweeds from the Southern Coast of Thailand. **Plant Foods Hum Nutr**, v. 64, p. 218-223, 2009.

YANISHLIEVA, N.V; MARINOVA, E.M. Effects of antioxidant on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food chem**, v. 54, n.4, p.377-382, 1995.

YASUHARA-BELL, J.; LU, Y. Marine compounds and their antiviral activities. **Antiviral Res**, v. 86, n. 3, 2010.

YE, W. et al. Antioxidant activities in vitro of ethanol extract from brown seaweed *Sargassum pallidum*. **Eur Food Res Technol**, v. 230, p.101-109, 2009.

YOKOYA, N. S. Compostos biologicamente ativos de algas marinhas e perspectivas de aplicação em novos fármacos: a importância da propagação *in vitro* de macroalgas marinhas como subsídio para a produção sustentável de seus derivados, com ênfase nas Rhodophyta. **A botânica no Brasil: pesquisa, ensino e políticas públicas ambientais**, v.1, p.155-158, 2007.

YOSHIMURA, C. Y. **Avaliação do potencial de cultivo e produção de ágar de *Gracilaria domingensis* e de *Gracilaria caudata* (Rhodophyta, Gracilariales) na Enseada de Armação do Itapocoroy (Penha, Santa Catarina)**. 163f. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Botânica) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

YUAN, Y. V.; WALSH, N. A. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. **Food Chem Toxicol**, v. 44, n. 7, p. 1144-1150, 2006.

YUAN, Y. V. Antioxidants from Edible Seaweeds. **ACS Symp Ser**, v. 956, n. 19, p. 268-301, 2007.

ZANDI, K. et al. *In vitro* antitumor activity of *Gracilaria corticata* (a red alga) against Jurkat and molt-4 human cancer cell lines. **Afr J Biotechnol**, v. 9, n.40, p. 6787-6790, 2010.

ZARAGOZA´, M. C. et al. Toxicity and Antioxidant Activity in Vitro and in Vivo of Two *Fucus vesiculosus* Extracts. **J Agric Food Chem**, v. 56, p. 7773–7780, 2008.

ZHANG, et al. Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from *Symphyclocladia latiuscula* (Rhodomelaceae). **J Appl Phycol**, v. 19, p. 97-108, 2007.

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

ZUBIA, M. Antioxidant and cytotoxic activities of some red algae (Rhodophyta) from Brittany coasts (France). **Botanica Marina**, v. 52, n. 3, p. 268–277, 2009.

ZUBIA, M. et al. Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. **Food Chem**, v. 116, n. 3, p. 693-701, 2009.

ZUANAZZI, S. J. A.; MONTANHA, A. J. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, p. 577-614.

WANG, S.C. et al. Structural features and anti-HIV-1 activity of novel polysaccharides from red algae *Grateloupia longifolia* and *Grateloupia filicina*. **Int J Biol Macromol**, v. 41, n. 4, p. 369-375, 2007.

WANG, B.G. et al. In vitro antioxidative activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga, *Rhodomela confervoides* (Rhodomelaceae). **Food Chem**, v. 113, p. 1101–1105, 2009.

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

WANG, J. et al. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. **Int J Biol Macromol**, v. 46, n. 1, p. 6-12, 2010.

WANG, J. et al. Sulfated modification, characterization and structure–antioxidant relationships of *Artemisia sphaerocephala* polysaccharides. **Carbohydr Polym**, v. 81, n. 4, p. 897-905, 2010a.

WANG, H. et al. A potent antitumor polysaccharide from the edible brown seaweed *Hydroclathrus clathratus*. **Botanica Marina**, v. 53, n. 3, p. 265-274, 2010.

WANG, T. et al. Enzyme-enhanced extraction of antioxidant ingredients from red algae *Palmaria palmata*. **LWT - Food Sci Technol**, v. 43, n.9, p. 1387-1393, 2010.

WYNNE, M. J. **A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: second revision**. Berlin-Stuttgart: Nova Hedwigia, 2005. 152 p.

Title

Assessment of antioxidant potential of processed *Gracilaria birdiae* in coastal communities of Northeastern Brazil

Mirely Freitas Paiva^a; Rand Randall Martins^b; Gabriel Araujo da Silva^c; José Brandão Neto^d; Adriana Rezende^e; Ana Vlândia Bandeira Moreira^f; Silvana Maria Zucolotto^g; Maria das Graças Almeida^{h,1}

- ^a. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, R. Gustavo Cordeiro de Farias, s/n, 59012 570, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil, mirelyfreitas@gmail.com
- ^b. Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Rua Olho D'água da Bica, s/n, 58014 405, Cuité, Paraíba, Brazil, randmartins@yahoo.com.br
- ^c. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, R. Gustavo Cordeiro de Farias, s/n, 59012 570, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil, Gabriel_ar4@yahoo.com.br
Departamento de Medicina Clínica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, R. Gustavo Cordeiro de Farias, s/n, 59012 570, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil, brandao-neto@live.com
- ^d. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, R. Gustavo Cordeiro de Farias, s/n, 59012 570, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil, adrianarezende@yahoo.com
- ^e. Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, 36570 000, Viçosa, Minas Gerais, Brazil, ana.vladia@ufv.br
- ^f. Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, R. Gustavo Cordeiro de Farias, s/n, 59012 570, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil, silvanazucolotto@ufrnet.br
- ^g. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, R. Gustavo Cordeiro de Farias, s/n, 59012 570, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil, mgalmeida128@gmail.com

¹ Corresponding author: tel.: (00 21 55 84) 3342 9807; fax: (00 21 55 84) 3342 9833; e-mail: mgalmeida@diqi.com.br; Address: R. Gen. Gustavo Cordeiro de Farias, s/n, Faculdade de Farmácia, 1º andar, Laboratório Multidisciplinar, Petropolis, 59012 570, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil.

Abstract

Samples of processed red seaweed *Gracilaria birdiae* were assessed for stability of antioxidant activity and nutritional composition. Characterization of nutritional profile was determined by percent composition, including total phenolic and carotenoid content. The β -carotene/linoleic acid and DPPH[•] radical scavenging capacity assays were used to determine antioxidant activity of *Gracilaria birdiae* extracts. The commercial sample was better in terms of percent composition, total phenols and total carotenoids, and consequently, exhibited greater efficiency in lipid peroxidation protection and free radical scavenging capacity. An adequate seaweed drying process is essential to maintain its chemical compounds and antioxidant capacity. Thus, the results will contribute to adding aggregate value to the final product obtained from the seaweed *Gracilaria birdiae*, in coastal communities.

Keywords: *Gracillaria birdiae*. Percent Composition. Phenolic Compounds. Carotenoids. Antioxidant Activity.

1 Introduction

The growing interest in seaweed is due to its economic significance, with annual revenues of around US\$ 7.4 billion (Bostock et al., 2010) and its potential for commercial applications in different areas such as the chemical, pharmaceutical, nutraceutical, cosmetic and food industries (Stengel, Connan, & Popper, 2011). Seaweeds are a source of bioactive compounds such as unsaturated fatty acids, carotenoids, phenolic compounds, steroids, phycocolloids, polysaccharides, vitamins and minerals (Ioannou, & Roussis, 2009). The focus of many recent studies has been on the antioxidant activity of these metabolites (Cho, Lee, Kang, Won, & You, 2011; Yildiz, Celikler, Vatan, & Dere, 2011).

Most bioactive food components are derived from plants, denominated phytochemicals, the vast majority of which are active redox molecules defined as antioxidant, capable of eliminating free radicals and other reactive oxygen and nitrogen species involved in several chronic diseases (Carlsen et al., 2010). The functional properties of some food items have become a business opportunity for commercializing food products, with an estimated global market of US\$ 150 billion (Henson, Cranfield, Masakure, & Blandon, 2009). Seaweeds are part of this group of foods with nutraceutical potential and promising applications as food or an ingredient in food production (Gupta, & Ghannam, 2011).

Commercial scale manufacture of seaweed-related products is achieved by its cultivation. Conditions under which this is accomplished depend on biological, physical and chemical products that can significantly alter seaweed growth and biochemical composition (Reddy, Jha, Fujita, & Ohno, 2008). Using different processing techniques to obtain raw materials for food production may influence the chemical properties of these chemical compounds, altering their therapeutic properties, especially antioxidant capacity, as observed by Choi et al. (2010) and Lee et al. (2010).

The species *Gracilaria birdiae* belongs to the family *Rhodophyceae* and genus *Gracilaria greville*, which grows in the tropical waters of Brazil, from the coast of Ceara to Espirito Santo (Plastino, & Oliveira, 2002). Coastal communities in the Northeast are cultivating this seaweed in order to commercialize phycocolloid agar

and as an alternative food source, exhibiting economic, environmental and social characteristics. Accordingly, the present study aims to investigate the presence of bioactive compounds of *Gracilaria birdiae* and assess likely antioxidant action, as well as the best processing technique for drying, thereby adding aggregate commercial and nutritional value to products derived from this seaweed.

2. Materials and Methods

2.1 Sample Collection and Preparation

Samples of *Gracilaria birdiae* were collected in bays using rope cultivation and the vegetative method, at Rio Fogo beach in Northeastern Brazil (05°15' 49" S and 35°23' 03" W).

Two processing techniques followed sample collection: in the first, collected material was kept in a hot air oven at 50°C (Milane, mod. DM/VF-70, Brasil), for 24 hours and pulverized to a particle diameter of 40 µm in a rotor mill (Fritsch, mod. Pulverisette 14, Germany), to obtain the commercial sample (CS). In the second, the sample was sun dried at a temperature of 35 °C and immersed in potable water at night and repeated for three days until brittle, light-colored plant matter, denominated the artisanal sample, was obtained (AS). The CS and AS were placed in an amber glass bottle and refrigerated ($2 \pm 4^\circ\text{C}$) until analysis.

2.2 Obtaining Extracts

Samples were extracted with ethyl alcohol p.a., under agitation for 1 hour at ambient temperature and in the absence of light. After vacuum filtration the extract obtained was concentrated at reduced pressure at 60°C in a rotaevaporator (IKA, mod. RV 10 Basic, China). Once hydroethanolic (1:1 v:v) and aqueous extracts were obtained, both at a proportion of 1:10 (p:v), the same steps used for acquiring ethanolic extract were employed. The aqueous extract was centrifuged (CIENTEC, mod. CT 5000, Brazil) at 3500 rpm for 4 min. Extracts were placed in amber bottles and stored at -20°C.

2.3 Percent Composition

Ash content was determined using muffle incineration (GP Científica, mod. 2000E, Brazil) at 550°C according to the technique described by the Association of Official Analytical Chemistry (AOAC) (1995). Nitrogen content was determined by the Kjeldahl method (AOAC, 1995) and estimated total protein content was calculated by

multiplying nitrogen content by a factor of 6.25 (Lourenco, Barbarino, Paula, Pereira, & Marquez, 2002). Total lipids were obtained with the ethereal extract fraction by intermittent flow in a Soxhlet apparatus (TOP, Mod. SZF-06C, China) (AOAC, 1995). Total carbohydrates were obtained by difference (AOAC, 1995).

2.4 Determination of Total Phenolic and Total Carotenoid Content

Determination of total phenolic content was measured colorimetrically according to the method proposed by Subramanian, Padmanaban, and Sarma (1965) with modifications in proportion and incubation time. Aliquots of 1.25 mL of Folin-Ciocalteu reagent (Merck 1.09001) were added to 0.25 mL of CS and AS extracts, followed by 1 mL of a saturated solution of 7.5% sodium carbonate. The solution was agitated in a vortex (Phoenix, mod. AP 56, Brazil) for 10 s at 3000 rpm. Absorbance readings were taken on a spectrophotometer (Shimadzu, UV-Visible mod.1650 PC, Japan) at 765 nm, 1 hour after being kept in the dark at ambient temperature. Total phenolic content was estimated from the calibration curve obtained with gallic acid (Fluka 48630), used as standard. However, total carotenoid content was determined in a spectrophotometer (Shimadzu, UV-Visible mod.1650 PC, Japan) at 450 nm, using solvents as blank and synthetic Trans- β -carotene type I as standard (AOAC, 1995).

2.5 *In vitro* Assessment of Antioxidant Activity

2.5.1 β -Carotene/Linoleic Acid System

Antioxidant activity was established using the β -carotene/linoleic acid system and the method developed by Marco (1968) and modified by Miller (1971). Different concentrations of CS and AS extracts were added to the solution of β -carotene (Sigma C 9750) and linoleic acid (Sigma L 1268) and samples were protected from light for 2 hours at 50°C. Absorbance readings were monitored with a spectrophotometer (Shimadzu, UV-Visible mod.1650 PC, Japão) at 470 nm, followed by an antioxidant-free blank and control composed of butylated hydroxytoluene (BHT) (Sigma W 218405). Antioxidant activity was assessed as the percentage of β -

carotene protection against oxidation, calculated by the formula 1 (Appendix A), where $A^{\text{sample}}_{(120)}$ and $A^{\text{sample}}_{(0)}$ are sample absorbances at incubation times of 120 and 0 min, respectively.

2.5.2 DPPH Radical Scavenging Method

The capacity of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) free radical was determined according to methodology described by Blois (1958) and adapted by Brand-Willians (1995). A total of 0.1 mL of CS and AS extracts was added to 2.9 mL of 60 μM radical DPPH[•] solution (Sigma D 9132), protected from the light and kept at rest for 30 min. at ambient temperature. Absorbance readings were monitored at 517 nm using a spectrophotometer (Shimadzu, UV-Visible mod.1650 PC, Japan), with an antioxidant-free blank and control composed of BHT. Results were expressed as values of EC_{50} , that is, the amount of antioxidant required to decrease initial DPPH concentration by 50%, calculated by linear regression.

2.6 Statistical Analysis

Statistical analyses were conducted with GraphPad Prisma 5.0 software (GraphPad[®]). Analysis of variance (ANOVA) and the Tukey-Kramer test were used, considering a significance level of 5%.

3 Results and Discussion

3.1 Percent Composition

The CS contained a lower percent of carbohydrates and proteins; however, they preserved a larger amount of lipids and mineral residue compared to the AS (Table 1). According to Maciel et al. (2008), *Gracilaria birdiae* exhibits predominance in soluble carbohydrates, primarily high-molecular-weight polysaccharides, which can confer antioxidant activity (Yang, Liu, Wu, Chen, & Wang, 2011; Sokolova, Barabanova, Homenko, Solov'eva, Bogdanovich, & Yermak, 2011). According to their fatty acid profile, seaweeds can bestow antioxidant potential, as proposed by Kim, Kong, & Kim (2010) and **Kumar, Kumari, Gupta, Reddy, & Jha** (2010). The AS showed lower concentration of mineral residue, indicating losses during artisanal processing, likely via dissolution. The higher mineral concentration observed in the CS adds commercial value, since seaweeds, which are rich in these elements, especially sodium, potassium, calcium and magnesium, are nutritionally important (Matanjun, Mohamed, Mustapha, & Muhammad, 2009; Cofrades et al., 2010). The nutritional profile assessed in the AS is similar to that found in the species *Gracilaria bursa-pastoris* (Yildiz, Vatan, Çelikler, & Dere, 2011), *Ulva lactuca* (Yaich, Garna, Besbes, Paquot, Blecker, & Atti, 2011) and *Ulva rigida* (Frikha et al., 2011).

3.2 Determination of Total Phenolic and Total Carotenoid Content

Total phenolic content was greater in the CS than in the AS. In both samples, ethanolic extract was more concentrated, followed by hydroethanolic and aqueous extract (Table 2). Ganesan, Kumar, & Bhaskar (2008) and Sachindra, Airanthi, Hosokawa, & Miyashita (2010), who assessed seaweeds from the family *Gracilariaceae*, corroborated these results, where total phenolic compound content was best obtained from non-polar solvents. Total carotenoids (Table 2) showed the presence of pigment in all the samples, the largest concentration being in the ethanolic extract of the CS and the smallest in the aqueous extract of the AS. As observed in the previous section, artisanal processing, using successive washings and prolonged exposure to the sun, significantly alters the nutritional properties of the

sample. Similarly, the AS had a lower concentration of total phenolic compounds and carotenoids, resulting in a reduction in their functional characteristics. Species rich in total phenols and carotenoids exhibit intense biological activity, including antibacterial, antineoplastic, antiretroviral and antioxidant action (Cox, Abu-Ghannam, & Gupta, 2010; Khanavi et al., 2010; Devi, Manivannan, Thirumaran, Rajathi, & Anantharaman, 2011; Sadati, Khanavi, Mahrokh, Nabavi, Sohrabipour, & Hadjiakhoondi, 2011). Thus, the CS has advantages over the AS, due to its greater bioactive potential.

3.3 *In vitro* Assessment of Antioxidant Activity

3.3.1 β -Carotene/Linoleic Acid System

The CS of *Gracilaria birdiae* demonstrated greater efficiency in the lipid peroxidation protection assay in all the extracts (Table 3), primarily the ethanolic extract. The genus *Gracilaria* exhibits significant lipid peroxidation inhibition capacity, as observed in the species *Gracilaria vermiculophylla*, *G. lemaneiformes*, *G. gracilis* and *G. textorll* (Zhang, Duan, Huang, Zhang, & Wang, 2007). Some of the antioxidant capacity of seaweeds is attributed to the presence of phenolic and carotenoid compounds (Faten, Emad, & Shalaby, 2009; Hwang, Wu, Gau, Chien, & Hwang, 2010). The CS contained higher phenolic and carotenoid levels, and a correlation between total phenolic and carotenoid concentration and antioxidant activity was observed. Ethanolic extract in the CS showed both greater antioxidant activity and bioactive compound concentration (Table 2 and 3). Despite better performance by the CS, it was not superior to the synthetic antioxidant BHT. Nevertheless, the processing method used in the community caused significant loss in antioxidant capacity of the processed sample.

3.3.2 DPPH Radical Scavenging Method

It was observed that the EC_{50} of the ethanolic extract of the CS was compatible with antioxidant BHT (Table 4), followed by the hydroethanolic extract. The AS showed no antioxidant activity using the proposed method. Zubia, Robledo

and Freile-Pelegrin (2007), in a study conducted with six seaweed species belonging to the family *Gracilariaceae*, exhibited a slight free radical scavenging effect. Zubia et al. (2009) and Lee et al. (2010a) detected the DPPH free radical scavenging capacity of *Dictyota dichotom* and *Ecklonia cava*, respectively. Their results showed that the CS was once again better than the AS in maintaining antioxidant activity in this methodology, confirmed by the higher content of total phenol compounds and carotenoids.

4 Final Considerations

In summary, we can confirm that the methodology used by the coastal community of Rio do Fogo in Northeast Brazil, when processing *Gracilaria birdiae* results in significant losses of nutritional value and antioxidant potential. The use of industrial ovens results in a product with higher mineral content, bioactive compounds and antioxidant activity. It is therefore necessary to assess the methodology of *Gracilaria birdiae* processing, in order to add nutritional and commercial value to this activity.

Acknowledgements

We would like to thank the Special Secretariat for Aquiculture and Fishing/SEAP in partnership with the Food and Agriculture organization (FAO) of the United Nations and the Brazilian Federal Agency for the Improvement of Higher Education (CAPES) for technical and financial support.

References

Association of Official Analytical Chemistry. (1995). *Official methods of Analysis*. (16th ed.), Association of Official Analytical Chemists. Washington.

Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.

Bostock, J., McAndrew, B., Richards, R., Jauncey, K., Telfer, T., Lorenzen, K., ... Corner, R. (2010). Aquaculture: global status and trends. *Phil Trans R Soc B*, 365, 2897–2912.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebenson WissTechnol*, 28, 25-30.

Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., Holte, K., Bohn, S. K., Dragland, S., Sampson, L., ... Blomhoff, R. (2010). The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr J*, 9,3-14.

Cho, M., Lee, H., Kang, I., Won, M., & You, S. (2011). Antioxidant properties of extract and fractions from *Enteromorpha prolifera*, a type of green seaweed. *Food Chem*, 27, 99-1006.

Choi, J.I., Hyun-Joo, K., Jae-Hun, K., Byeong, S. C., Dong, H. A., Gwang, H. K., & Ju-Woon, L. (2010). Changes in colour and antioxidant activities of *Hizikia fusiformis* cooking drips by gamma irradiation. *LWT - Food Sci Technol*, 43:1074-1078.

Cofrades, S., López-López, I., Bravo, L., Ruiz-Capillas, C., Bastida, S., Larrea, M. T., & Jiménez-Colmenero, F. (2010). Nutritional and Antioxidant Properties of Different Brown and Red Spanish Edible Seaweeds. *Food Sci Technol Int*, 16, 1-9.

Cox, S., Abu-Ghannam, N., & Gupta, S. (2010). An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. *Int Food Res J*, 17, 205-220.

Devi, G. K., Manivannan, K., Thirumaran, G., Rajathi, F. A. A., & Anantharaman, P. (2011). *In vitro* antioxidant activities of selected seaweeds from Southeast coast of India. *Asian Pac J Trop Med*, 4 (3), 205-211.

Faten, M. A. E., & Emad, A. S. (2009). Antioxidant Activity of Extract and Semi-Purified Fractions of Marine Red Macroalga, *Gracilaria Verrucosa*. *Aust J Basic Appl Sci*, 3, 3179-3185.

Frikha, F., Kammoun, M., Hammami, N., Mchirgui, R. A., Belbahri, L., Gargouri, Y., Miled, N., & Ben-Rebah, F. (2011). Chemical composition and some biological activities of marine collected in Tunisia. *Cienc Mar*, 37 (2), 113-124.

Ganesan, P., Kumar, C. S., & Bhaskar, N. (2008). Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresour Technol*, 99 (8), 2717–2723.

Gupta, S., & Ghannam, N. A. (2011). Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *IFSET-Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12, 600-609.

Henson, S., Cranfield, J., Masakure, O., & Blandon, J. (2009). Understanding Consumer Acceptance of Functional Foods and Nutraceuticals. *A Research Report from the Advanced Foods & Materials Network*, 21-27.

Hwang, P., Wu, C. H., Gau, S. Y., Chien, S. Y., & Hwang, D. F. (2010). Antioxidant and immune-stimulating activities of hot-water extract from seaweed *Sargassum hemiphyllum*. *J Mar Sci Technol*, 18, 41-46.

Ioannou, E., & Roussis, V. (2009). Natural Products from Seaweeds. *Plant Derived Nat Prod*, 1, p.51-58.

Khanavi, M., Nabavi, M. Sadati, N., Ardekani, M. S., Sohrabipour, J. Nabavi, S. M. B.,... Ostad, S. N.(2010). Cytotoxic activity of some marine brown algae against cancer cell lines. *Biol Res*, 43, 31-37.

Kim, J. A., Kong, C. S., & Kim, S. K. (2010). Effect of *Sargassum thunbergii* on ROS mediated oxidative damage and identification of polyunsaturated fatty acid components. *Food Chem Toxicol*, 48, 1243-1249.

Kumar, M., Kumari, P., Gupta, V., Reddy, C. R. K., & Jha, B.(2010). Biochemical responses of red alga *Gracilaria corticata* (*Gracilariales, Rhodophyta*) to salinity induced oxidative stress. *J Exp Mar Biol Ecol*, 391, 27-34.

Lee, S. H., Ko, S. C., Kang, S. M., Cha, S. H., Ahn, G. N., Um, B. H., & Jeon, Y. J. (2010). Antioxidative effect of *Ecklonia cava* dried by far infrared radiation drying. *Food Sci Biotechnol*, 19, 129-135.

Lee, S. H., Ko, S. C., Kang, S. M., Cha, S. H., Ahn, G. N., Um, B. H., & Jeon, Y. J. (2010a). Antioxidant properties of tidal pool microalgae, *Halochlorococcum porphyrae* and *Oltamannsiellopsis unicellularis* from Jeju Island, Korea. *Algae*, 25, 45-56.

Lourenco, S. O., Barbarino, E., Paula, J. C., Pereira, L. O. S., & Marquez, U. M. L. (2002). Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycol Res*, 50, 233–241.

Maciel, J. S., Chaves, L. S., Souza, B. W. S., Teixeira, D. I. A., Freitas, A. L. P., Feitosa, J. P. A., & Paula, R. C. M. (2008). Structural characterization of cold extracted fraction of soluble sulfated polysaccharide from red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Carbohydr Polym*, 71, 559-565.

Marco, G. J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc*, 45, 594-598.

Matanjun, P., Mohamed, S., Mustapha, N. M., & Muhammad, K. (2009). Nutrient content of tropical edible seaweeds, *Euचेuma cottonii*, *Caulerpa lentillifera* and *Sargassum polycystum*. *J Appl Phycol*, 21, 75-80.

Miller, H. E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J Am Oil Chem Soc*, 48, 91.

Plastino, E. M., & Oliveira, E. C. (2002). *G. birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta), a new species from the tropical South American Atlantic with a terete frond and deep spermatangial conceptacles. *Phycologia*, 41, 389-396.

Reddy, C. R. K., Jha, B., Fujita, Y., & Ohno, M. (2008). Seaweed micropropagation techniques and their potentials: an overview. *J Appl Phycol*, 20, 609-617.

Sachindra, N. M., Airanthi, M. K. W. A., Hosokawa, M., & Miyashita, K. (2010). Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of extracts from Indian seaweeds. *J Food Sci Technol*, 47 (1), 94-99.

Sadati, N., Khanavi, M., Mahrokh, A., Nabavi, S. M. B., Sohrabipour, J., & Hadjiakhoondi, A. (2011). Comparison of Antioxidant Activity and Total Phenolic Contents of some Persian Gulf Marine Algae. *J Med Plant*, 10 (37), 73-79.

Sokolova, E. V., Barabanova, A. O., Homenko, V. A., Solov'eva, T. F., Bogdanovich, R. N., & Yermak, I. M. (2011). *In Vitro* and *Ex Vivo* Studies of Antioxidant Activity of Carrageenans, Sulfated Polysaccharides from Red Algae. *Bull Exp Bio Med*, 150, 426-428.

Stengel, D. B., Connan, S., & Popper, Z. A. (2011). Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnol Adv*, 29, 483-501.

Subramanian, K. N., Padmanaban, G., & Sarma, P. S. (1965). Folin-Ciocalteu reagent for the estimation of siderochromes. *Anal Biochem*, 12, 106-112.

Zhang, W. W., Duan, X. J., Huang, L. H., Zhang, Y., & Wang, B. G. (2007). Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from *Symphocladia latiuscula* (Rhodomelaceae). *J Appl Phycol*, 19, 97-108.

Zubia, M., Robledo, D., & Freile-Pelegrin, Y. (2007). Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *J Appl Phycol*, 19, 449–458.

Zubia, M., Fabre, M.S., Kerjean, V., Lann, K. L, Stiger-Pouvreau, Fauchon, M., & Deslandes, E. (2009). Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chem*, 116, 693-701.

Yaich, H., Garna, H., Besbes, S., Paquot, M., Blecker, C., & Attia, H. (2011). Chemical composition and functional properties of *Ulva lactuca* seaweed collected in Tunisia. *Food Chem*, 128, 895-901.

Yang, Y., Liu, D., Wu, J., Chen, Y., & Wang, S. (2011). In vitro antioxidant activities of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Corallina officinalis*. *Int J Biol Macromol*, 49, 1031-1037.

Yildiz, G., Celikler, C., Vatan, O., & Dere, S. (2011). Determination of the Antioxidative Capacity and Bioactive Compounds in Green Seaweed *Ulva rigida* C. Agardh. *Inte J Food Prop*,

Yildiz, G., Vatan, Ö., Çelikler S., & Dere, Ş. (2011). Determination of the Phenolic Compounds and Antioxidative Capacity in Red Algae *Gracilaria bursa-pastoris*. *Inte J Food Prop*, 14, 496-502.

Appendix A

Formula 1 – Antioxidant activity assess as the percentage of β -carotene protection against oxidation.

$$\text{Antioxidant Activity} = A^{\text{sample}}_{(120)} / A^{\text{sample}}_{(0)} \times 100$$

Where,

$A^{\text{sample}}_{(0)}$: Absorbances at incubation times of 0 min.

$A^{\text{sample}}_{(120)}$: Absorbances at incubation times of 120 min.

Table**Table 1 – Percent composition of commercial and artisanal samples of *Gracilaria birdiae*.**

Percent Composition (%)	Commercial	Artisanal
Carbohydrates	60.75	78.76
Proteins	5.51	10.84
Lipids	0.80	0.34
Mineral Residue (Ash)	32.94	10.06

Table 2 – Total phenolic (μg equivalents of gallic acid/mL of extract) and carotenoid content (μg equivalents of β -carotene /mL of extract) of ethanolic, hydroethanolic and aqueous extract obtained from the commercial and artisanal processing of *Gracilaria birdiae*.

Types of extracts from <i>Gracilaria birdiae</i>	Total phenols (μg equivalents of gallic acid/mL of extract)		Total carotenoids (μg equivalents of β - carotene/mL of extract)	
	Commercial	Artisanal	Commercial	Artisanal
	Ethanolic	186.1 \pm 1.7 ^c	16.1 \pm 1.4	1.9 \pm 0.1 ^c
Hydroethanolic	105.2 \pm 1.6 ^{ac}	13.5 \pm 1.4 ^a	1.6 \pm 0.2 ^{ac}	1.0 \pm 0.06 ^a
Aqueous	60.7 \pm 1.6 ^{bc}	10.2 \pm 1.5 ^b	0.7 \pm 0.1 ^{bc}	0.3 \pm 0.02 ^b

Legend ²

² Results are expressed as mean \pm standard deviation, a = significant difference compared to the ethanolic extract, b = significant difference compared to the ethanolic extract and hydroethanolic, c = significant difference compared to the equivalent craft. p <0.05%.

Table 3- Antioxidant activity (% lipid oxidation inhibition) of ethanolic, hydroethanolic and aqueous extract obtained from commercial and artisanal processing of *Gracilaria birdiae*

<i>Gracilaria birdiae</i> Processing		Commercial	Artisanal
Types of Extracts	Concentration	% Lipid oxidation inhibition	
Ethanolic	5 mg/mL	18.57 ± 2.96 ^{abcd}	15.38 ± 1.86 ^{abcd}
	10 mg/mL	34.38 ± 1.45 ^{bcd}	26.60 ± 2.42 ^{bcd}
	15 mg/mL	42.87 ± 4.96 ^{cde}	30.17 ± 0.73 ^d
Hydroethanolic	5 mg/mL	10.02 ± 2.97 ^{bde}	3.57 ± 1.73 ^d
	10 mg/mL	14.60 ± 3.88 ^{bd}	10.33 ± 6.71 ^d
	15 mg/mL	31.53 ± 4.41 ^{de}	13.79 ± 10.11
Aqueous	5 mg/mL	-2.08 ± 1.08 ^{abe}	-13.29 ± 1.56
	10 mg/mL	-4.13 ± 1.36 ^e	-11.45 ± 0.91
	15 mg/mL	-5.21 ± 1.03	-2.33 ± 1.23
Synthetic Antioxidant			
	Concentration	% Lipid oxidation inhibition	
BHT	5 mg/mL	82.34 ± 0.82 ^{ab†}	
	10 mg/mL	59.91 ± 1.65 ^{bt}	
	15 mg/mL	38.22 ± 1.68 [†]	

Legend³

³ Results are expressed as mean ± standard deviation, a = significant difference compared to 10 mg / mL, b = significant difference compared to 15 mg / mL, c = significant difference compared to the extract hydroethanolic d = significant difference compared to aqueous extract, e = significant difference compared to the equivalent craft, f = significant difference compared to other extracts in the same concentration. p <0.05%.

Table 4 – Antioxidant capacity (EC₅₀ in mg/mL) of ethanolic, hydroethanolic and aqueous extracts obtained from commercial and artisanal processing of *Gracilaria birdiae*, using the DPPH free radical

Types of extracts from a <i>Gracilaria birdiae</i>	Commercial	Artisanal
	EC ₅₀ (mg/mL)	
Ethanolic	3.97	0.00
Hydroethanolic	64.98 ^a	0.00
Aqueous	129.50 ^{ab}	0.00
Synthetic Antioxidant	EC ₅₀ (mg/mL)	
BHT	5.20	

Legend ⁴

⁴ Results are expressed as mean ± standard deviation, a = significant difference compared to the ethanolic extract and BHT, b = significant difference compared to hydroethanolic extract. p <0.05%.