



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

JADE DEL NERO OLIVEIRA

**BIOPROSPECÇÃO DE ATIVIDADES ANTI-INCRUSTANTE E ANTIFUNGÍCA DOS
EXTRATOS DA MACROALGA *Asparagopsis taxiformis* (RHODOPHYTA,
BONNEMAISONIACEAE)**

ARRAIAL DO CABO- RJ

2022

JADE DEL NERO OLIVEIRA

**BIOPROSPECÇÃO DE ATIVIDADES ANTI-INCRUSTANTE E ANTIFUNGÍCA
DOS EXTRATOS DA MACROALGA MARINHA *Asparagopsis taxiformis*
(RHODOPHYTA, BONNEMAISONIACEAE)**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e à Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Marinha.

Orientador: Prof. Bernardo A. P. da Gama

Co-orientador: Prof. Renato Crespo Pereira

ARRAIAL DO CABO- RJ

2022

JADE DEL NERO OLIVEIRA

**BIOPROSPECÇÃO DE ATIVIDADES ANTI-INCRUSTANTE E ANTIFUNGÍCA
DOS EXTRATOS DA MACROALGA MARINHA *Asparagopsis taxiformis*
(RHODOPHYTA, BONNEMAISONIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e à Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Marinha.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Levi Pompermayer Machado - Titular Externo
Universidade Estadual de São Paulo

Dra. Daniela Bueno Sudatti - Titular Interno
Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira/Universidade Federal
Fluminense

Prof. Dr. Bernardo A.P. da Gama - Presidente da Banca Examinadora
Universidade Federal Fluminense

Dr. Erwan Plouguerné - Suplente
Universidade Federal Fluminense

Arraial do Cabo, 31 de março de 2022

Com todo carinho e gratidão, dedico o presente trabalho ao meu amado avô, que devido a uma doença pulmonar nos deixou no final do ano passado. Ele que sempre foi um exemplo de dedicação, cuidado e doação para sua família, sempre me apoiou e me ajudou desde o meu nascimento até o último dia de sua vida.

“ Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”

- Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento e finalização desta dissertação envolve diversas pessoas as quais eu sou muito feliz e grata por estarem presentes na minha vida.

Primeiramente agradeço á minha família, que inclui meu padrasto Erick Carbonari, pelo apoio e participação em todas as etapas desse processo, sempre torcendo pelo meu sucesso e me ajudando nos momentos mais desafiadores.

Meus orientadores, Bernardo A. P. da Gama e Renato Crespo, que aceitaram como aluna, me acolhendo e orientando da melhor forma possível durante essa jornada.

Ao professor Abílio Soares, que mesmo não sendo meu orientador, disponibilizou seu laboratório e materiais que me ajudaram na finalização do projeto.

Á Daniela Sudatti, que por mais atarefada que estivesse, sempre esteve disposta a ajudar e contribuir, principalmente quando precisei utilizar o laboratório do LACRO-UFF para realizar uma etapa crucial do projeto. Aproveito agradecer também á Silvana Rodrigues, por ter assinado minha autorização e permitido a utilização do espaço físico e equipamentos do laboratório.

Ao Levi Machado, que aceitou a parceria no projeto desde o início e permaneceu mesmo após a troca de projeto decorrente da pandemia, sempre estando á disposição para colaborar, e a equipe do LAPLA-UNESP, onde foi realizado o bioensaio antifúngico.

Ao Erwan Ploguerné, que me auxiliou na realização do bioensaio anti-incrustação. E ao Felipe Ribeiro, que me ajudou a elaborar alternativas para melhorar o projeto.

Aos meus colegas de laboratório, pela companhia diária, cafés, chás e risadas que tornaram os dias no laboratório mais descontraídos.

Ao meu parceiro Felipe Obeica, e sua família pelo carinho e suporte durante esse período.

RESUMO

As macroalgas marinhas são alvos dos mais importantes no âmbito da bioprospecção de substâncias de interesse provindos do mar devido a variedade de metabólitos produzidos e bioatividades relacionadas a esses metabólitos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação anti-incrustante e antifúngica de extratos hexânicos (Hex), diclorometânicos (DCM) e metanólicos (MeOH) de diferentes pontos de coleta da macroalga *Asparagopsis taxiformis*. O bioensaio anti-incrustação foi realizado com juvenis do molusco bivalve *Perna perna* e para triagem antifúngica foi usado o fungo filamentoso *Cladosporium cladosporioides*. Os extratos foram obtidos por metodologia de extração sucessiva com solventes de três polaridades diferentes com intuito de ampliar a gama de moléculas obtidas no processo de extração. As concentrações dos extratos e incorporação em papel filtro para realização do ensaio anti-incrustante foram preparadas pelo cálculo da concentração natural sendo os controles negativos com filtros embebidos no solvente de extração apenas. A ação anti-incrustação foi avaliada através da mensuração do número de bissos produzidos pelos moluscos e triagem antifúngica foi analisada pelo halo de inibição de crescimento e desenvolvimento de esporos do fungo. A atividade anti-incrustante foi comparada através de ANOVA, seguida do teste de Dunnett, enquanto a ação antifúngica foi por inspeção visual do halo de inibição. A localidade de coleta (ou população de origem) e a polaridade do extrato influenciaram as atividades anti-incrustante e antifúngica. A população da Ilha Comprida foi a única que inibiu significativamente a incrustação relativamente ao controle, sendo que o extrato Hex estimulou a produção de bissos enquanto a fração MeOH inibiu a sua produção. O teste de triagem antifúngica revelou o estímulo da produção de fungos pelas frações Hex de todas as populações e inibição do crescimento dos esporos fúngicos pelas frações DCM e MeOH, sendo que o efeito antifúngico mais forte foi o do extrato em MeOH.

Palavras-chave: Algas vermelhas, antifúngico, anti-incrustante, produtos naturais marinhos.

ABSTRACT

Marine macroalgae are one of the most important targets in the scope of bioprospecting for substances of interest from the sea due to the variety of metabolites produced and bioactivities related to these metabolites. The objective of the present work was to evaluate the antifouling and antifungal action of hexane (Hex), dichloromethane (DCM) and methanolic (MeOH) extracts from different collection points of the macroalgae *Asparagopsis taxiformis*. The antifouling bioassay was performed with juveniles of the bivalve mollusc *Perna perna* while the filamentous fungus *Cladosporium cladosporioides* was used for antifungal screening. The extracts were obtained by successive extraction methodology with solvents of three different polarities in order to expand the range of molecules obtained in the extraction process. The concentrations of extracts and incorporation in filter paper to perform the antifouling assay were prepared by calculating the natural concentration and the negative controls with filters soaked in the extraction solvent only. The antifouling action was evaluated by measuring the number of byssus produced by the molluscs and antifungal screening was analyzed by the halo of inhibition of growth and development of spores of the fungus. Antifouling activity was compared by ANOVA followed by Dunnett's test, while antifungal action was by visual inspection of the inhibition halo. The location of collection (or population of origin) and the polarity of the extract influenced the antifouling and antifungal activities. The population from Ilha Comprida was the only one that significantly inhibited fouling. The Hex extract stimulated the production of byssi while the MeOH fraction inhibited its production. The antifungal screening test revealed the stimulation of fungal production by the Hex fractions of all populations and the inhibition of fungal spores growth by the DCM and MeOH fractions, with the strongest antifungal effect being that of the extract in MeOH.

Keywords: Red algae, antifungal, antifoulant, marine natural products.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Fases do desenvolvimento da bioincrustação marinha.
- Figura 2 - Vermetídeo invasor *Eualetes tulipa*.
- Figura 3 - Ostra invasora *Saccostrea cucullata*.
- Figura 4 - Coral-sol na região entre marés.
- Figura 5 - Diferentes estágios de vida de *Asparagopsis taxiformis*.
- Figura 6 - Imagem referente aos pontos de coleta na Baía de Paraty-RJ.
- Figura 7 - Armazenamento das algas após a coleta.
- Figura 8 - Tamanho aproximado das algas coletadas na Ilha do Mantimento.
- Figura 9 - Algas secas armazenadas em potes transparentes.
- Figura 10 - A- erlenmyers com as algas trituradas. B- Diferentes extratos.
- Figura 11 - Coleta dos mexilhões na Praia de Boa Viagem, Niterói-RJ.
- Figura 12 - Mexilhões nas placas com tratamento.
- Figura 13 - Média + desvio do número de bissos da fração de Hex.
- Figura 14 - Média + desvio do número de bissos da fração de MeOH.
- Figura 15 - Média + desvio do número de bissos da fração de DCM.
- Figura 16 - Resultado da triagem antifúngica.
- Figura 17 - Resultado da cromatografia em camada delgada.
- Figura 18 - Estrutura molecular do bromofórmio.
- Figura 19 - Mahorona e 5-bromomahorona de *A. taxiformis*.
- Figura 20 - Epitaondiol de *Stypopodium zonale*.
- Figura 21 - Cis-pinnatifidenina e trans-pinnatifidenina isolados de *L. pinnatifida*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Substâncias isoladas com atividade anti-incrustante.

Tabela 2 - Resultados dos testes de atividade anti-incrustante.

Tabela 3 - Principais metabólitos descritos na literatura para *A. taxiformis*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Hex	Hexano.
DCM	Diclorometano.
MeOH	Metanol.
ButOH	Butanol.
QS	Quorum Sensing.
IC-Hex	Ilha Comprida fração hexânica.
IC-DCM	Ilha Comprida fração diclorometano.
IC-MeOH	Ilha Comprida fração metanólica.
IM- Hex	Ilha do Mantimento fração hexânica.
IM- DCM	Ilha do Mantimento fração diclorometano.
IM- MeOH	Ilha do Mantimento fração metanólica.
PL- Hex	Praia da Lula fração hexânica.
PL- DCM	Praia da Lula fração diclorometano.
PL- MeOH	Praia da Lula fração metanólica.

.

.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 MACROALGAS COMO FONTE DE PRODUTOS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO.....	13
1.1.1 Cosméticos.....	14
1.1.2 Antimicrobianos	15
1.1.3 Contra doenças negligenciadas.....	16
1.2 BIOINCRUSTAÇÃO MARINHA.....	17
1.2.1 Tintas anti-incrustantes.....	21
1.2.2 Tendências anti-incrustantes baseadas na natureza.....	23
1.3 POTENCIAL ANTI-INCRUSTANTE DE MACROALGAS.....	23
1.4 POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE MACROALGAS.....	26
1.4.1 Fungos patógenos humanos.....	26
1.4.2 Fungos relevantes na agricultura.....	27
1.5 A MACROALGA <i>Asparagopsis taxiformis</i>	
2. OBJETIVOS.....	30
2.1 OBJETIVO GERAL.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 COLETA DAS ALGAS.....	30
3.2 SEGAGEM E EXTRAÇÃO.....	32
3.3 BIOTESTE ANTI-INCRUSTAÇÃO.....	34
3.4 BIOTESTE ANTIFÚNGICO.....	35
3.5 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	36
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4. RESULTADOS.....	37
4.1 BIOTESTE ANTI-INCRUSTANTE.....	37
4.2 BIOTESTE ANTIFUNGÍCO.....	39
4.3 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	40
5. DISCUSSÃO	40
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
7. REFERÊNCIAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

1.1 Macroalgas como fonte de produtos de interesse biotecnológico

Os organismos marinhos são prolíficos produtores de metabólitos secundários que são utilizados para comunicação (Paul & Puglisi, 2004; Dixon & Hay, 2012), defesa química (Kubaneck *et al.*, 2003; Lauritano & Ianora, 2020) e proteção contra o estresse oxidativo (Lesser, 2006). Nas macroalgas marinhas, esta química do seu metabolismo evoluiu para facilitar a proteção contra fatores bióticos e abióticos (Duffy & Hay, 1990; Chadwick & Morrow 2011). As substâncias por elas produzidas dispõem de grande diversidade estrutural, como os terpenos, alcalóides, taninos e compostos fenólicos, entre outros, as quais são responsáveis por desempenhar diferentes funções no contexto da ecologia química marinha e evolução (Harper, 2001). No entanto, também são de enorme valia no âmbito da prospecção de compostos de interesse industrial (Martins *et al.*, 2014).

Os estudos ecológicos são de grande importância para a compreensão de como os organismos marinhos se relacionam quimicamente entre si através dos metabólitos secundários, com a finalidade de obter uma visão global do comportamento químico dessas espécies. Mark Hay e colaboradores, por exemplo, desenvolveram diversos estudos na área de ecologia química marinha com diferentes organismos e espécies, fornecendo informações a respeito de diversos fatores como a biodiversidade e a relação com a sobrevivência de espécies (Clements & Hay, 2019), distribuição de espécies marinhas (Kicklighter & Hay, 2006), estudos sobre os padrões de alimentação e eficiência digestiva (Marion & Hay, 2011) e também na relação existente entre a química dos organismos e o processo de evolução (Sotka & Hay, 2003).

As bioatividades associadas aos produtos naturais de macroalgas marinhas de interesse comercial variam desde substâncias ativas no desenvolvimento de cosméticos, antimicrobianos, antitumorais, química de alimentos até anti-incrustantes e produtos para aquicultura como rações animais e atrativo de larvas.

1.1.1 Cosméticos

Algumas espécies de macroalgas marinhas foram estudadas no contexto de cosmetologia e seus metabólitos já são utilizados por empresas na formulação de produtos comerciais, como por exemplo o extrato de *Porphyra umbilicalis*, que é empregado na formulação de mais de 3 mil cosméticos com diferentes funções, tais como proteção solar, agente hidratante, anti-idade, entre outros (Mercurio *et al.*, 2015)

Os principais metabólitos secundários que estão relacionados à bioatividade são as micosporinas tipo aminoácidos, os flavonoides, e os compostos fenólicos, devido a alta capacidade antioxidante dessas classes de compostos, atuando como sequestradores e estabilizadores de radicais livres, fotoprotetores, anti-envelhecimento ou combatendo o envelhecimento precoce (Schmid *et al.*, 2000; 2006).

Além dos metabólitos secundários utilizados amplamente na formulação cosmética, alguns metabólitos primários como polímeros de ágar extraídos de espécies de *Gracilaria* spp., e *Hydropuntia* ssp. (Marinho-Soriano *et al.*, 2001) a carragenana extraída de *Kappaphycus* spp. (Webber *et al.*, 2012) e *Euclima* spp. (Freile-Peigrín *et al.*, 2006) são utilizadas nessas formulações por possuírem características espessantes e propriedades benéficas para a saúde da pele, tais quais promover elasticidade, serem cicatrizantes e hidratantes (Cheong *et al.*, 2018).

Os alginatos, armazenados nas macroalgas, tais como, o ágar e a carragenana são ficocolóides, polímeros associados a parede celular das macroalgas que proporcionam resistência e flexibilidade, porém essa classe de polímeros é encontrada apenas em macroalgas marrons, como a *Lobophora variegata*, *Ascophyllum nodosum* e *Laminaria digitata* (Fetah *et al.*, 2017). O alginato tem sido amplamente utilizado em muitos campos da indústria, inclusive na indústria cosmética por serem estabilizantes de formulações e espessantes naturais (Venugopal, 2016; Pei *et al.*, 2018).

1.1.2 Antimicrobianos

Extratos de macroalgas, assim como suas substâncias isoladas, são alvos de estudos como potenciais agentes antifúngicos, antibacterianos e antivirais (Machado *et al.*, 2014; Fatima *et al.*, 2019; Bhowmick *et al.*, 2020; Mayer *et al.*, 2021). Os florotaninos derivados de macroalgas pardas, foram testados por Besendova *et al.* (2020) em ensaios antivirais, e os resultados provaram que essas substâncias não só são capazes de desativar o vírus por contato direto, como também atuar em diferentes fases da infecção, bloqueando a ligação do patógeno à superfície da célula e podendo impedir a replicação viral, conseqüentemente, a sua proliferação no organismo. Estes resultados expressam a potencialidade desses polifenóis serem usados como base para o desenvolvimento de antivirais efetivos que possuam novos mecanismos de ação.

A bioprospecção de agentes antibacterianos, assim como os antivirais, é de grande importância em relação ao desenvolvimento de drogas em prol da saúde humana por diferentes enfermidades bacterianas. Alguns exemplos de doenças causadas por bactérias, onde até as cepas mais comuns acarretam sérios problemas sanitários, são aquelas causadas pelas espécies *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis* (Kim *et al.*, 2007; Rai *et al.*, 2015), e ainda podem ser mais preocupantes, pois ao longo de seu ciclo esses micro-organismos são capazes de sofrer mutações espontâneas as quais levam a maior resistência. Além das mutações, pode ocorrer o processo de seleção natural das bactérias super-resistentes pelo uso de antimicrobianos não efetivos ou uso inadequado dos mesmos. As superbactérias são até hoje um enorme desafio na saúde pública, principalmente em ambientes hospitalares, alguns exemplos de espécies são a *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* (Holmes *et al.*, 2015; Khan & Khan, 2016).

A macroalgas se mostraram organismos potenciais para o avanço nos estudos de substâncias antibacterianas (Shannon & Nissreen, 2016) tanto em cepas mais simples de bactérias, como é o caso dos polissacarídeos sulfatados presentes no extrato de *Gracilaria ornata*, eficazes contra cepas de *E. coli* (Amorim *et al.*, 2012), assim como nas super-resistentes. Um estudo produzido por Alghazeer *et al.* (2017) concluiu que flavonoides isolados das

macroalgas *Cystoseira compressa* e *Padina pavonica* apresentaram potencialidade antibacteriana contra cepas de diferentes bactérias Gram-Positivas e Negativas multirresistentes.

Outra pesquisa, realizada por Shima *et al.* (2016), evidenciou que o extrato de éter dietílico de *Sargassum fusiforme* e o extrato etanólico de *Sargassum vulgare* apresentaram atividade inibitória contra cepas multirresistentes de *S. aureus* e *K. pneumoniae*, respectivamente. A investigação química indicou a presença de indóis, terpenos, acetogeninas, fenóis, ácidos graxos e hidrocarbonetos halogenados voláteis nas espécies, os quais podem ser responsáveis por tais atividades.

1.1.3 Contra doenças negligenciadas

No Brasil e em outros países em desenvolvimento, as populações mais pobres são acometidas por doenças denominadas negligenciadas, tais como dengue, leishmaniose, malária, doença de Chagas, tuberculose, entre outras (Ministério da Saúde, 2010). Estas são enfermidades consideradas endêmicas apenas em populações de baixa renda e, por isso, sofrem com o baixo investimento em pesquisa e desenvolvimento de medicamentos (Morais *et al.*, 2016). Torna-se então necessário o estudo do mecanismo de ação dessas doenças e medicamentos que possam se mostrar eficientes em diferentes etapas da infecção. Extratos e substâncias isoladas de macroalgas marinhas estão sendo estudadas e várias espécies se mostraram candidatas à continuidade de estudos a respeito do desenvolvimento de drogas a base de produtos naturais marinhos.

O vírus da dengue possui quatro sorotipos, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Os estudos sobre antivirais realizados por Talarico & Damonte 2007 utilizaram duas substâncias isoladas de macroalgas vermelhas, uma carragenana de *Gymnogongrus griffithsiae* e uma galactona de *Cryptonemia crenulata* contra os sorotipos da doença e como resultado obtiveram alta eficácia contra infecção de células Vero pelo sorotipo DENV-2 e média contra o DENV-3 e DENV-4. No estudo foi evidenciado ainda a capacidade biossintética em laboratório das substâncias antivirais produzidas por essas espécies.

Em um trabalho realizado por Bianco *et al.* (2013), foi avaliada a atividade anti-infectiva de diversos extratos de macroalgas em bioensaios *in vitro* contra diferentes parasitos humanos, e os resultados apontaram que o extrato acetônico de *Ochtodes secundiramea* inibiu em 99,7% o crescimento de *Leishmania braziliensis*, demonstrando grande efetividade do extrato, podendo ser futuramente estudado como um potencial agente antiparasitário.

Outra doença relevante nesse contexto é a doença de Chagas, que tem como agente etiológico o parasito *Trypanosoma cruzi* e como vetor os insetos hematófagos triatomíneos (Brenner,1965). Extratos obtidos da macroalga vermelha *Plocamium brasiliense*, também incluindo frações com substâncias previamente identificadas e outra contendo uma mistura de monoterpenos halogenados, assim como ácido atomárico, isolado de *Styopodium zonale*, foram avaliados quanto à sua atividade contra o *Trypanosoma cruzi* e também mensurada a possível citotoxicidade dos extratos e sua seletividade em relação ao alvo (Teixeira *et al.*, 2020). Todos os extratos de *P. brasiliense* apresentaram baixa citotoxicidade e moderado efeito tripanossomicida, apesar do efeito não ter sido alto, inserções de grupos farmacofóricos podem potencializar a atividade. Além disso, o ácido atomárico foi identificado como um potente tripanocida com alto índice de seletividade. Esses resultados identificaram produtos naturais de macroalgas marinhas como candidatos promissores para continuação das pesquisas contra a doença de Chagas (Teixeira *et al.*, 2019).

1.2 BIOINCRUSTAÇÃO MARINHA

A incrustação marinha, ou bioincrustação, é um processo natural de aderência causado pela colonização e crescimento de bactérias, algas ou invertebrados sobre superfícies submersas, sejam elas naturais ou produzidas pelo homem. Por mais que seja um processo natural, a bioincrustação pode gerar problemas nos ambientes marinhos, principalmente quando acomete navios, plataformas de petróleo, fazendas marinhas, entre outros sistemas (da Gama *et al.*, 2009).

O estabelecimento da incrustação envolve diferentes etapas, embora o processo como um todo ainda não seja totalmente esclarecido, segue uma

sequência lógica: I - Adsorção imediata de macro e micromoléculas, orgânicas e inorgânicas; II - Colonização primária de micro-organismos com consequente formação de um biofilme microbiano; III - Colonização secundária por protozoários e diatomáceas; IV - Colonização terciária por esporos de algas e invertebrados, com o desenvolvimento tornando a colonização macroscópica (Amara *et al.*, 2018). A partir do momento que a incrustação biológica se torna macroscópica a reversibilidade do processo se torna trabalhosa e custosa, portanto, a melhor opção para manutenção do sistema é durante os primeiros estágios de colonização (Lehaitre *et al.*, 2008; Qian *et al.*, 2009).

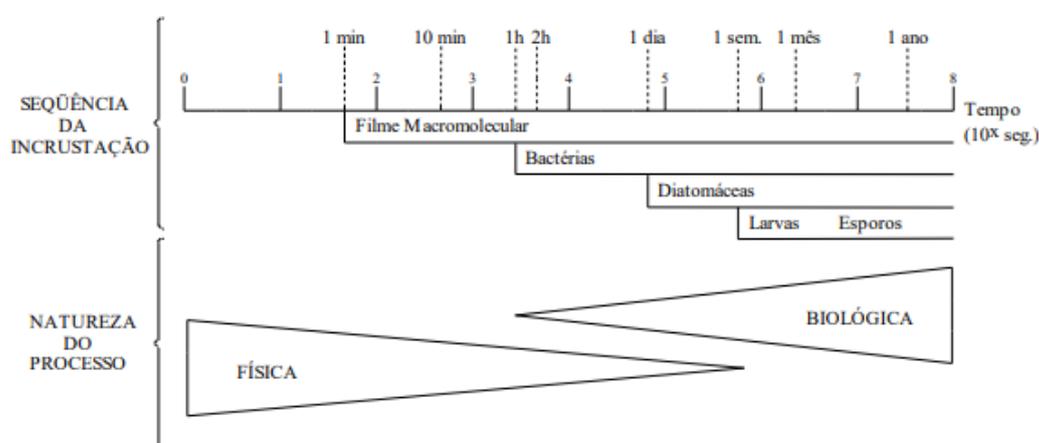


Figura 1: Fases da bioincrustação marinha. Fonte:Da Gama *et al.* (2009).

As atividades marítimas, principalmente o comércio, tiveram significativo crescimento a partir da década de 1990, e avançam cada vez mais rápido desde então (Ducruet *et al.*, 2009). A região que abrange o oceano Índico foi a que obteve maior porcentagem de aumento do fluxo marítimo em relação a outras, com uma taxa de crescimento de 300% em 20 anos, seguido pelo Atlântico Norte, Pacífico Norte e Mediterrâneo, com taxas que variaram de 100 a 200% (Qiu, 2016).

Com esse crescimento tão expressivo, houve o advento de problemas relacionados a ecologia marinha, a questões ambientais e climáticas (Adzigbli & Yuewen, 2018; Schnurr & Walker, 2019). A bioincrustação sobre estruturas submersas e a movimentação dessas estruturas entre os continentes, juntamente com a água de lastro desses navios, causou e ainda causa a introdução de espécies exóticas, que tem potencial invasor e pode gerar

diminuição das espécies nativas, riscos sanitários pela instauração de bactérias, fungos e vírus patogênicos, tanto para humanos quanto para biota marinha, e contaminação em estruturas de maricultura (MacLeod *et al.*, 2021; Subías-Barata *et al.*, 2022)

Um dos exemplos clássicos de organismos incrustantes que se dispersaram pela costa do Brasil são os corais *Tubastraea coccinea* e *T. tagusensis*, popularmente chamados de corais-sol, que tiveram seus registros oficiais de ocorrência na costa entre 1980-1990, na Bacia de Campos, norte do estado do Rio de Janeiro (Paula & Creed, 2005). Hoje, já foram encontrados na Ilha Grande e Paraty, no Rio de Janeiro (De Paula & Creed, 2004) São Paulo (Mantelatto *et al.*, 2011; Zanotti *et al.*, 2021), Espírito Santo, Santa Catarina (Silva & Barros, 2011) e Bahia (Sampaio *et al.*, 2012). Espécies tais quais o bivalve *Isognomon bicolor* (Breves-Ramos *et al.*, 2010) a ostra *Saccostrea cucullata* o vermetídeo *Eualetes tulipa* (Spotorno-Oliveira *et al.*, 2018) também entram na lista de espécies exóticas introduzidas no Brasil, dentre diversas outras.



Figura 2: Vermetídeo invasor *Eualetes tulipa* amostrado nas placas de biomonitoramento de bioincrustação no porto do Forno. Foto: Bernardo da Gama.

Além dos problemas ecológicos referentes a bioincrustação, o desenvolvimento desses organismos no casco de barcos e navios origina um aumento na rugosidade da superfície de contato com a água, elevando assim a

resistência hidrodinâmica e, como consequência, um maior consumo de combustível e liberação de gases do efeito estufa, pois há uma perda de velocidade relativa da embarcação (Safriel *et al.*, 1993; Desher, 2018). Ocasionalmente, ainda, prejuízos financeiros devido ao aumento de gastos com limpeza do casco, remoção da tinta e repintura (da Gama *et al.*, 2009; Desher, 2018).



Figura 3: Ostra invasora *Saccostrea cucullata* nos cabos da estrutura de monitoramento. Foto: Bernardo da Gama.



Figura 4: Coral-sol na região de Arraial do Cabo-RJ. Foto: Matheus Pacheco.

Em sistemas de reprodução, desenvolvimento e engorda de organismos marinhos em estruturas da maricultura, espécies incrustantes são responsáveis por perdas econômicas significativas em razão das despesas com manutenção das redes e gaiolas, refletindo em até 20% o preço do produto. O tratamento de

sistemas aquícolas marinhos para evitar a incrustação é mais complexo, pois a retirada dos incrustantes da superfície dos organismos cultivados resulta em estresse dos mesmos e a falta de cuidado no manejo pode levar os organismos a óbito, também não é possível a utilização de tintas biocidas, por contaminar os organismos alvo da aquicultura e sendo passada também para os humanos que iram consumi-los (da Gama *et al.*, 2009; Bloecher & Floerl, 2020).

1.2.1 Tintas anti-incrustantes

Devido ao problema da incrustação biológica, diferentes métodos de combate a incrustação foram testados ao longo dos anos (Yebra *et al.*, 2004), dando origem ao desenvolvimento de tintas anti-incrustantes de primeira, segunda e terceira geração de acordo com o contexto histórico e tecnologia aplicada para o seu desenvolvimento (Readman, 2006).

As tintas chamadas de primeira geração, que foram as primeiras oficialmente reguladas em meados do século XX, tiveram como principais agentes ativos o cobre e o zinco, funcionando como biocidas de amplo espectro muito utilizados nas formulações como óxidos, mas devido a sua alta toxicidade, e curto período de eficácia, passaram ser substituídos pelos chamados organoestânicos, como o TBT (tributil estanho) e seus derivados (da Gama *et al.*, 2009).

Os compostos organoestânicos, ou anti-incrustantes de segunda geração, atuavam como poderosos biocidas e causavam inibição completa do crescimento da maioria dos organismos incrustantes com uma durabilidade na superfície muito maior quando comparada as tintas de primeira geração. Esse efeito era obtido em concentrações muito baixas (Iwao, 2003), o que em um primeiro momento foi excelente e viável. Além desses benefícios primários, foi observado que os organoestânicos não causavam a oxidação dos metais das plataformas de petróleo, dos navios ou mesmo de outras estruturas metálicas (Anderson, 1998).

Entretanto, estudos demonstraram que essas substâncias são lipossolúveis, e quando se desprendem dos materiais, penetram nas membranas celulares, sendo altamente acumulativas nos tecidos vivos, causando a morte de organismos marinhos, além dos incrustantes, incluindo

espécies de interesse comercial, como ostras e mexilhões e delas podendo atingir o homem através da alimentação (Champ & Lowenstein, 1987). Há mais de 20 anos é sabido também que derivados de estanho levam a efeitos teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos (Manaham, 1991)

Em consequência dos efeitos adversos ao ambiente marinho e à saúde pública, em 2003 saiu uma resolução proibindo a fabricação de tintas contendo orgânoestânicos e a partir de 2008 navios pintados com essa composição de tintas foram proibidos de circular (Almeida *et al.*, 2007). Esta proibição resultou no retorno da utilização do cobre e óxidos de cobre na composição das tintas, mesmo sabendo de sua toxicidade e baixa eficiência (da Gama *et al.*, 2009).

Tem-se ciência da necessidade do banimento do uso de cobre e TBT na composição das tintas, mas isso não é uma realidade esperada a curto prazo, devido as dificuldades perante ao desenvolvimento de tecnologias viáveis na produção de anti-incrustantes efetivos, o que aumenta a necessidade do estudo e viabilização de outras formas de combate a incrustação que sejam altamente eficientes e ambientalmente compatíveis. Alguns exemplos de tecnologias que estão sendo estudadas, são as tintas de baixa adesão, superfícies biomiméticas e biocidas orgânicos com amplo espectro.

1.2.2 Tendências anti-incrustantes baseadas na natureza

O estudo de superfícies biomiméticas é uma tecnologia baseada na natureza que tem como objetivo a simulação de superfícies de organismos marinhos sujeitos a incrustação biológica para utilizá-las em superfícies artificiais (Salta *et al.*, 2010). Uma superfície submersa, seja ela natural ou artificial apresentam características denominadas rugosidade e “molhabilidade” que afetam diretamente a bioincrustação, tanto promovendo quanto impedindo a colonização (Bazaka *et al.*, 2011).

Uma das primeiras superfícies estudadas para o desenvolvimento de tecnologia anti-incrustante foi a pele de tubarão por possuir baixo arrasto, propriedades de autolimpeza e lubrificação (Damoravan *et al.*, 2016). Outros organismos que possuem propriedades parecidas, como baleia e golfinhos também são estudados para a produção de peles artificiais.

Brzozowska *et al.* (2014) inspirados no crustáceo decápode marinho *Myomenippe hardwickii*, projetaram microtopografias de superfície em estrutura artificial imitando as características principais que são responsáveis pela propriedade anti-incrustante observadas na superfície do crustáceo. O muco de organismos marinhos também é estudado como potencial anti-incrustante (Ren *et al.*, 2020).

Outra tecnologia relevante para área dos anti-incrustantes é a interrupção da comunicação de bactérias (*Quorum Sensing*) que está diretamente relacionada ao processo de bioincrustação marinha, pois esse mecanismo regula a formação de biofilme, produção de toxinas e metabólitos secundários que podem estar relacionados indução de assentamento. Organismos que ajudam a interromper esse mecanismo estão relativamente menos susceptíveis a incrustação, portanto, substâncias ou extratos que têm a capacidade de interromper esse processo são de interesse para o desenvolvimento de produtos anti-incrustantes (Lqbal *et al.*, 2017).

Muitas macroalgas são estudadas em relação a defesa anti-QS (Hellio *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007), *Asparagopsis taxiformis*, por exemplo, demonstrou ter essa propriedade. O estudo realizado por Carvalho *et al.* (2017) também mostrou a alta atividade das macroalgas contra comunicação das cepas de *Chromobacterium violaceum* e *Serratia liquefaciens*. As frações passaram ainda por análise em Espectrômetro de Massas, o que corroborou com resultados do bioensaio, concluindo que o extrato possui um forte inibidor de QS indicando seu potencial para uso como anti-incrustante.

Substâncias derivadas de esponjas marinhas, tais como purealidin A, aplyzanzinos e outros derivados foram testadas isoladas contra diversas cepas de bactérias e microalgas. Os compostos exibiram inibição de QS e atividades anti-incrustantes contra as microalgas (Tintillier *et al.*, 2020). Outros organismos como corais possuem também muitas substâncias efetivas contra a comunicação bacteriana, knightol e knightal, diterpenos produzidos por *Eunicea knighti*, que inibem significativamente o QS de bactérias Gram-negativas e o aparecimento de biofilme (Tello *et al.*, 2009).

1.3 POTENCIAL ANTI-INCRUSTANTE DE MACROALGAS

As aplicações biotecnológicas das substâncias produzidas pelas macroalgas marinhas vão muito além de pesquisas na área farmacêutica voltadas ao desenvolvimento de novos fármacos e agricultura, seu potencial pode ser também explorado pela indústria de tintas anti-incrustantes e na elaboração de produtos para aquicultura.

Diversas pesquisas realizadas por instituições em todo o mundo utilizaram extratos ou substâncias isoladas de macroalgas em pesquisas de anti-incrustantes que sejam potenciais substitutos para tintas e na proteção de estruturas submersas, que até hoje possuem metais biocidas poluentes marinhos (Torres & De-la-Torre, 2021). Uma pesquisa relevante nesse contexto foi realizada por da Gama *et al.* (2008) que estudaram a atividade anti-incrustação de extratos de 51 populações de macroalgas da costa brasileira, compreendendo 42 espécies, sendo que o maior filo testado foi o das algas vermelhas (Rhodophyta), as quais apresentaram maior atividade quando comparadas às algas dos filios Chlorophyta e Ochrophyta.

Uma revisão sobre macroalgas marinhas e atividade anti-incrustante elaborada por Dahms & Dobretsov (2017) demonstrou o enorme potencial de desenvolvimento de produtos voltados à indústria de anti-incrustantes, pois as espécies apresentam uma ampla variedade de substâncias com efeito comprovado, tais quais a 3-bromo-5-(difenuleto)-2-furanona isolada da macroalga verde *Ulva rigida*, (geranilgeranil)-glicerol de *Taonia atomaria* e *Dictyota* sp. e 2,10-dibromo-3-cloro-7-chamigreno 12-hidroxiisolaureno de *Laurencia dendroidea*, que inibiram o estabelecimento de larvas da craca *Balanus* em uma concentração três vezes menor do que o biocida amplamente utilizado, sulfato de cobre.

Os metabólitos produzidos por esses organismos são de grande interesse para estudos de desenvolvimento de anti-incrustantes, um dos principais motivos é que a produção de muitos desses compostos é estimulada sob condições de epibiose e epifitismo, quando as macroalgas são incrustadas por epibiontes como outras algas chamadas epifitas ou por moluscos, cracas entre outros invertebrados, causando diminuição da fotossíntese, atrapalhando diversos processos metabólicos das algas e podendo levá-la, em casos extremos, a morte (Pereira *et al.*, 2017). Pode-se dizer que o estudo de anti-

incrustantes derivados de macroalgas marinhas é um aspecto eco-evolutivo, pois são utilizados mecanismos ecológicos que se aperfeiçoaram ao longo dos anos para solucionar problemas de grande relevância para o ser humano.

Substâncias isoladas, tais como o elatol de *Laurencia dendroidea* (da Gama *et al.*, 2002), o dolastano isolinearol e seco-dolastano de *Canistrocarpus cerviconis* (Pereira *et al.*, 2008) foram testados contra incrustação biológica e inibiram significativamente a incrustação. A Tabela 1 apresenta algumas substâncias isoladas de macroalgas que foram testadas contra a incrustação biológica

Devido à produção dessas substâncias, muitas macroalgas marinhas estão relativamente livres de epibiontes (Paul 1992, Hellio *et al.* 2001, 2002, Steinberg *et al.* 2002, Kubanek *et al.*, 2003) pois estes metabólitos apresentam atividade antibacteriana, antialgácea, antifúngica, antiprotozoário e antimolusco (Abarzua & Jakubowski, 1995; Abarzua *et al.*, 1999; Etahiri *et al.*, 2001; Hellio *et al.*, 2001, 2002; Bhosale *et al.*, 2002; da Gama *et al.*, 2002, 2003, de Nys e Steinberg, 2002).

A grande aposta nos anti-incrustantes advindos de macroalgas marinhas vem do filo Rhodophyta, conhecidas como algas vermelhas, que possuem maior atividade quando comparadas às do filo Chlorophyta (algas verdes) e Ochrophyta (algas pardas). Um grande diferencial é o fato das macroalgas vermelhas produzirem e armazenarem uma ampla gama de compostos halogenados bioativos (Fenical, 1975; Faulkner, 2001), os quais possuem diferentes atividades ecológicas e potencial biotecnológico para o desenvolvimento de produtos voltados à indústria de anti-incrustantes, como o elatol e o descloroelatol (de Nys *et al.* 1996; König & Wright 1997).

Portanto, o isolamento e a síntese desses produtos naturais de macroalgas marinhas podem ser utilizados efetivamente para a prevenção da bioincrustação, mas estudos fitoquímicos adicionais são necessários para obtermos mais informações sobre a relação entre epibiose e a produção de metabólitos secundários que agem como anti-incrustantes, para que haja tanto uma produção bioguiada e mais eficiente quanto a consolidação de uma

metodologia a respeito da produção de uma tinta natural a base de macroalgas marinhas

1.4 POTENCIAL ANTIFUNGÍCO DE MACROALGAS

A produção de diversos metabólitos secundários pelas macroalgas marinhas, com diferentes estruturas e composições químicas, amplia sua ação biológica, não se limitando apenas a atividade contra vírus e bactérias, também são comprovadas suas atividades biológicas em estudos realizados contra fungos importantes a saúde pública e agricultura (Ma *et al.*, 2021; Mayer *et al.*, 2021).

1.4.1 Fungos patógenos humanos

Os fungos são micro-organismos que causam enfermidades em humanos (Lohse *et al.*, 2018), animais (Reis *et al.*, 2021) e plantas (Ranade *et al.*, 2022). Muitas vezes negligenciados pela falta de informação a respeito, ou sobrepostos pelas bactérias e vírus, eles são responsáveis por causar e também agravar diversas doenças, o senso mostrou que foram 1,7 milhões de mortes no Brasil no ano de 2017, sendo algumas das espécies mais preocupantes *Aspergillus fumigatus*, *Lomentospora prolificans*, *Candida auris* (Lima *et al.*, 2019).

Uma questão muito preocupante somada aos números de casos de infecções são os fungos multirresistentes, a falta de medicamentos efetivos contra esses organismos e a facilidade de dispersão de esporos (Lima *et al.*, 2019). Os grupos de pessoas mais atingidas são pacientes imunossuprimidos em hospitais, como em casos de câncer, HIV e transplantes (Roxana *et al.*, 2021) e pessoas que possuem vulnerabilidade social, desprovidas de saneamento e itens de higiene básicos que ficam susceptíveis a essas enfermidades e outras doenças (Cestari *et al.*, 2021).

Silva *et al.* (2018) revelaram *Osmundea pinnatifida* como uma fonte promissora de compostos que inibem o crescimento e dispersão de fungos, tais quais *Aspergillus fumigatus* e *Alternaria alternata*. Kolanjinathan & Saranraj (2014) estudaram o potencial de *Gracilaria edulis* contra diferentes patógenos humanos, incluindo fungos multirresistentes, seus resultados demonstraram

que a fração metanólica obteve o melhor resultado contra as patologias fúngicas. Nesse sentido, é mostrado que as macroalgas marinhas podem fornecer substâncias diferentes plausíveis de serem utilizadas na produção de novos antifúngicos.

1.4.2 Fungos relevantes na agricultura

Em relação aos fungos e a agricultura são considerados dois aspectos, o primeiro dos fungos patogênicos, que são danosos à agricultura atacando a produção pré e pós-colheita, diminuindo a quantidade de alimento produzido, o tempo de prateleira, causando prejuízos aos agricultores, mercados e impacto direto nos preços que chagam nos consumidores finais (Ranade *et al.*, 2022; EMBRAPA, 2014). E em segundo lugar o dos fungos que desempenham um papel importante na agricultura, sendo essenciais para o crescimento e o desenvolvimento das plantas, como as micorrizas, que ajudam a fixação de nitrogênio no solo e fungos endofíticos simbióticos que auxiliam a manutenção da saúde das plantas (Gu *et al.*, 2022).

Os extratos das macroalgas se provaram eficazes atuando nessas duas frentes, pois algumas espécies possuem compostos que atuam contra patógenos (Smolińska & Kowalska, 2018), e também outras espécies de macroalgas que atuam diretamente na relação simbiótica dos fungos com as raízes de plantas, aumentando os benefícios dessa interação para os produtores e para a natureza.

Kappaphycus alvarezii e *Ascophyllum nodosum*, por exemplo, são macroalgas amplamente estudadas por possuírem metabólitos bioestimulantes que aumentam a produtividade da colheita em condições normais ou de estresse e estimulam a proteção das plantas contra patógenos, sendo que um dos mecanismos de ação é aumentar a quantidade de fungos simbiotes em suas raízes (Hines *et al.*, 2021; Kilowasid, *et al.*, 2022).

No entanto, os cultivos podem ser susceptíveis a fungos patogênicos resistentes, como o *Sclerotinia sclerotiorum*, que leva a grandes perdas econômicas (Yang *et al.*, 1999; Smolińska & Kowalska, 2018) tendo-se a necessidade do desenvolvimento de tecnologias antifúngicas em produtos destinados a agricultura conjuntamente com a otimização nos procedimentos

de triagem e bioprospecção de compostos sintetizados, isolados ou extratos que possam ter atividades de interesse.

A macroalga vermelha *Octodes secundiramea* é um exemplo de macroalga marinha com um grande potencial para o desenvolvimento de produtos antifúngicos de interesse para agricultura, principalmente no pós-colheita, Machado *et al.* (2014) realizaram um estudo em que o extrato de *O. secundiramea* que se mostrou efetivo no combate da antracnose no mamão, elevando a durabilidade do fruto em prateleira. Outras macroalgas, tais como *Cystoseira myriophylloides*, *Laminaria digitata*, e *Fucus spiralis* também demonstraram grande capacidade no combate a fungos patogênicos em plantações de tomate (Esserti *et al.*, 2017).

1.5 A MACROALGA *Asparagopsis taxiformis*

O gênero *Asparagopsis* possui três espécies, *A. svedelii*, *A. armata* e *A. taxiformis* (Zanolla *et al.*, 2022). A espécie *A. taxiformis* (Delile) Trevisan (Bonnemaisoniaceae, Rhodophyta) está distribuída na maioria dos mares temperados e tropicais do mundo, sendo considerada uma espécie invasora expressiva, que possui um grande potencial de dispersão devido ao seu ciclo de vida passar por fases microscópicas de fácil dispersão (Andreakis *et al.*, 2007). Um estudo realizado por Streftaris & Zenetos (2006) considerou *A. taxiformis* uma das 100 piores espécies invasoras no Mediterrâneo, considerando também espécies animais como peixes e poliquetas.

A espécie possui ciclo de vida heteromórfico haplodiplobionte trifásico, no qual as fases são: os gametófitos macroscópicos, carposporófitos microscópicos e tetrasporófitos filamentosos representados na Figura 5 (Feldmann e Feldmann. 1942; Rojas *et al.* 1982). No mundo há registro de seis linhagens genéticas distintas de *A. taxiformis* (Andreakis *et al.*, 2004, 2016; Dijoux *et al.*, 2014), porém até o momento, no Brasil, só há o registro de uma linhagem. Foram realizados dois sequenciamentos referentes a amostras de *A. taxiformis* do Brasil, coletadas no litoral de São Paulo (Andreakis *et al.* 2007).

Segundo os resultados obtidos no sequenciamento, há baixa diferenciação genética entre os exemplares de *A. taxiformis* coletados em uma ampla distribuição geográfica, este fato sugere que a introdução da espécie

não foi realizada por vias naturais de dispersão, mas sim por ação antrópica, como no processo de bioincrustação marinha, água de lastro dos navios ou até mesmo a liberação da espécie diretamente no ambiente.

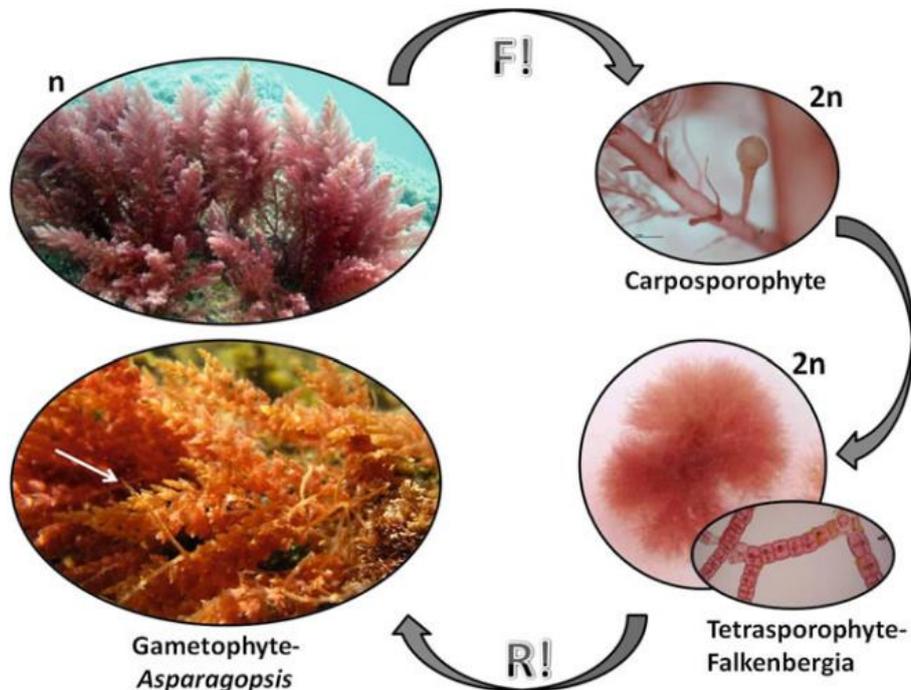


Figura 5: Diferentes estágios de vida de *A. taxiformis*. Fonte: Zanolla *et al.* (2016).

Devido a espécie *A. taxiformis* ser invasora multirresistente a epifauna associada, e estar relacionada diretamente a perda de biodiversidade local em diversas regiões (Zanolla *et al.*, 2016), começou-se o estudo do potencial biotecnológico dessa alga e de quais maneiras ela poderia ser empregada em produtos comerciais. Os principais estudos estão relacionados a capacidade dessa macroalga em reduzir o metano entérico produzido por bovinos de corte (Kinley *et al.*, 2016; Machado *et al.*, 2016). O uso de *A. taxiformis* nas rações ajuda a diminuir os gases gerado na pecuária e melhorar a produtividade da carne (Kinley *et al.*, 2020). Outras atividades de interesse também foram descritas e relacionadas a *A. taxiformis* tais quais anticianobactéria, antialgácea (Manilal *et al.*, 2010), contra bactérias patogênicas de peixes (Genovese *et al.*, 2012), inibidora de “quorum-sensing” de bactérias (Jha *et al.*, 2013), antioxidante (Neethu *et al.*, 2017), antiviral (El-Baroty *et al.*, 2007) o que confirma o grande potencial de substâncias contidas em *A. taxiformis* para o desenvolvimento biotecnológico.

Tendo em vista todas as informações apresentadas, a justificativa do presente trabalho e sua discussão destaca ainda mais a necessidade da descoberta de novos compostos com potenciais biológicos de interesse que possam ser utilizados para minimizar os problemas ambientais relacionados (1) ao uso massivo de anti-incrustantes tóxicos, ou biocidas, que são letais para organismos não incrustantes e contaminam o ambiente marinho, assim como (2) a descoberta de novos extratos ou substâncias que tenham diferentes mecanismos de ação e possam ser utilizados no controle de fungos patogênicos.

Os resultados dos ensaios preliminares de fitoquímica e bioprospecção de *A. taxiformis* são grandes aliados para o desenvolvimento de metodologias mais específicas de identificação e produção de compostos bioativos, servindo como base de desenvolvimento técnico científico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Bioprospecção de atividades biológicas anti-incrustação marinha e antifúngica de extratos da macroalga vermelha *Asparagopsis taxiformis*, visando a busca por alternativas sustentáveis e que possam ser comercialmente viáveis no futuro, via síntese verde ou cultivo e incorporação de extratos ou substâncias isoladas em formulações de novos produtos anti-incrustantes e antifúngicos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial anti-incrustante de extratos de *A. taxiformis*, coletadas em três diferentes localizações, através de bioensaio contra o mexilhão *Perna perna*.
- Avaliar o potencial antifúngico de extratos de *A. taxiformis*, coletadas em três diferentes localizações, através de bioensaio contra o fungo *Cladosporium cladosporioides*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta das algas

Todas as amostras da macroalga *A. taxiformis* foram coletadas na Baía de Paraty, litoral sul do Rio de Janeiro, em três localidades diferentes: Ilha do Mantimento (23°10'50" S, 44°39'36" W), Ilha Comprida (23°10'07" S, 44° 40'31" W) e Praia da Lula (23°12'05" S, 44°37'30" W), indicadas na Figura 6.

Como os locais de coleta pertencem a Área de Proteção Ambiental do Cairuçu, foi solicitada e aprovada uma licença especial ao SISBIO, cuja Autorização/Licença referente à solicitação é identificada pelo número 79137.

A coleta dos espécimes foi feita por mergulho em apneia em uma profundidade máxima de 7 m. A biomassa algacéa foi retirada dos costões com o auxílio de espátula e alocada em samburá de tela de nylon durante o mergulho. Após a coleta, elas foram triadas para a remoção de detritos, sedimentos e biota associada e dispostas sobre papel absorvente em bandejas de plástico para retirar o excesso de umidade e obter o mínimo de dano durante o transporte, como demonstrado na Figura 7. A partir da primeira coleta até a organização das algas em bandeja para secagem foi contabilizado um tempo de aproximadamente 4 h, em temperatura ambiente de ca. 25°C.

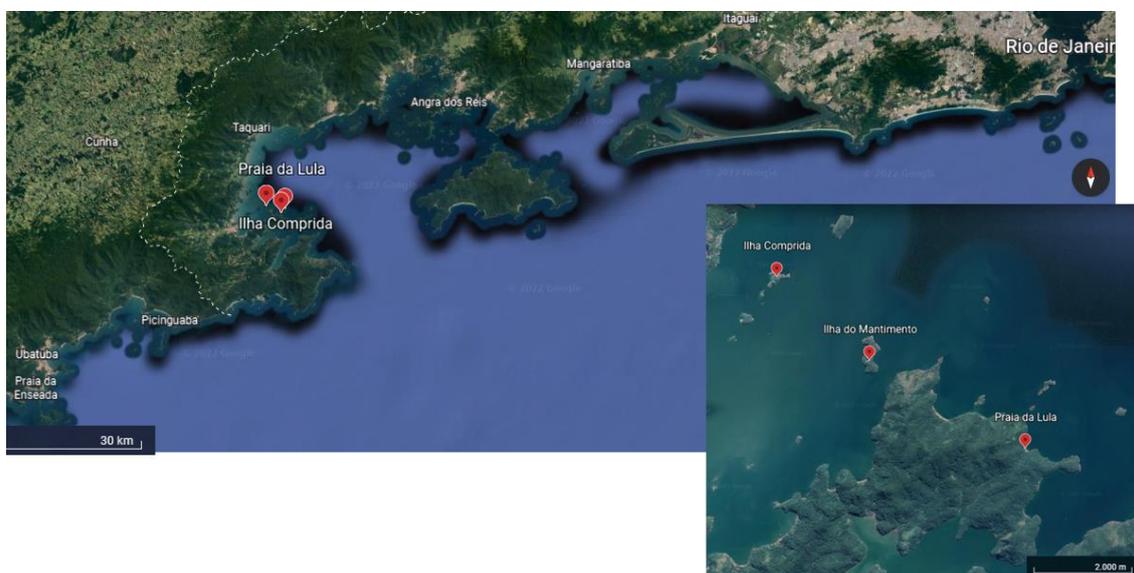


Figura 6: Imagem referente aos pontos de coletas na Baía de Paraty - RJ. Fonte: Google Earth.



Figura 7: Armazenamento das algas após a coleta. Foto da autora.

3.2 Secagem e extração

Após a coleta e transporte, as macroalgas foram novamente dispostas sobre papel absorvente nas bandejas de plástico para secagem em local arejado, temperatura ambiente de 18°C e sem exposição direta à luz (Figura 8). A secagem ocorreu durante 4 dias até estabilização do peso. desta forma, foi obtida a biomassa seca, que foi utilizada na extração dos metabólitos secundários (Figura 9). Logo após a secagem, o material foi transportado para o Laboratório de Bioincrustação Marinha, localizado no Departamento de Biologia Marinha do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense, em Niterói- RJ.



Figura 8: Imagem mostrando o tamanho aproximado das algas coletadas na Ilha do Mantimento. Foto da autora.

A massa seca de macroalgas foi submetida a maceração com nitrogênio líquido e logo após pesada em balança de precisão (Shimadzu, precisão de 0,001 g) para verificação do peso seco total de cada amostra. Com o objetivo de produzir extratos, cada grupo de macroalga foi submetida separadamente a um protocolo de extração sucessiva, que consiste na utilização de solventes com diferentes polaridades para separação de moléculas da mesma faixa de polaridade em cada extrato, partindo do solvente mais apolar e terminado com o mais polar (Plouguerné *et al.*, 2003), o protocolo tem o intuito de otimizar a separação dos compostos bioativos e futuramente realizar extrações bio guiadas do princípio ativo.



Figura 9: Algas secas armazenadas em potes transparentes antes da extração. Foto da autora.

Os solventes aplicados foram hexano (apolar, Shynth P.A, 98,5% de pureza), diclorometano (polaridade intermediária, Tedia, ABSOLV, 99,9% de pureza) e metanol (polar, Sigma-Aldrich, 99,8% de pureza), na proporção de 1g de peso seco de alga para 10ml de solvente. A extração foi realizada sucessivamente por ordem crescente de polaridade. Cada extração foi realizada em triplicata para cada grupo de algas coletadas (Figura 10). A primeira extração ocorreu por 24 h e, as demais extrações duraram 3 h cada, sendo os solventes então evaporados em rotaevaporador (Fisatom 450-5) sob banho-maria (Fisatom 558) a 40° C. Por fim, obtivemos um total de 9 extratos, com 3 polaridades diferentes, provenientes das 3 localidades onde foram coletadas as populações de *A. taxiformis* (Figura 10).

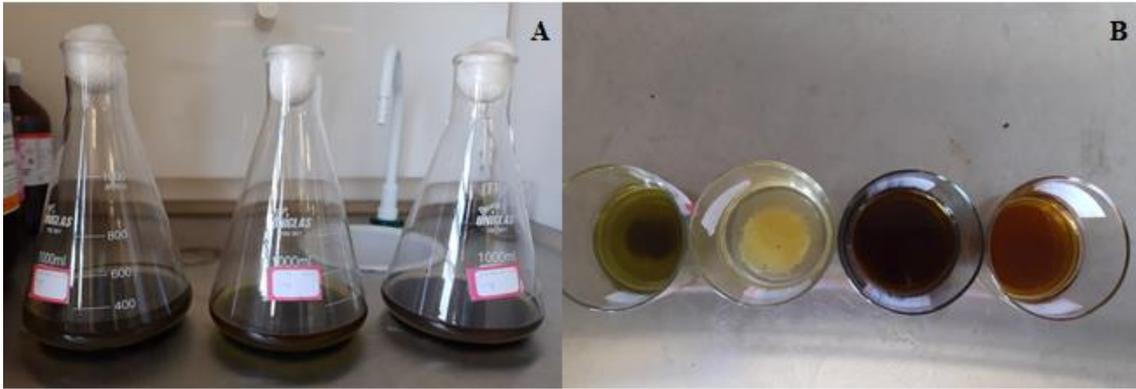


Figura 10: Imagem A- erlenmyers com as algas trituradas e os solventes. Imagem B- diferentes extratos após a filtração. Foto da autora.

3.3 Bioteste anti-incrustação

Com o propósito de avaliar o potencial anti-incrustação dos extratos das diferentes populações de *A. taxiformis*, foi realizado o teste do mexilhão *Perna perna*, amplamente descrito na literatura como eficiente método para determinação do potencial anti-incrustação (da Gama *et al.*, 2003).

Os juvenis desta espécie foram coletados durante a maré baixa da região costeira rochosa de Boa Viagem em Niterói- RJ (Figura 11) e levados para o laboratório de bioincrustação marinha em baldes com água do mar local. Os indivíduos foram desagregados, cortando-se cuidadosamente os biscoitos e separados em diferentes grupos de acordo com o comprimento da casca (3,5 a 4 cm) em uma bandeja de plástico com água do mar. Apenas indivíduos exibindo comportamento de exploração do substrato, ativamente expondo seu pé e rastejando (Figura 12), e com tamanho próprio para o ensaio foram selecionados para experimentos, os outros foram devolvidos ao seu local de origem.

No processo foram realizados 9 extratos de 3 solventes diferentes, e para cada solvente, um controle negativo, obtendo-se então 12 tratamentos no total, cada qual com 10 réplicas. Para realização do experimento foi calculada a concentração natural referente a cada um dos extratos, que é uma relação entre o peso seco de alga, peso seco de extrato e a massa de papel filtro para incorporação dos extratos



Figura 11: Coleta dos mexilhões na Praia de Boa Viagem, Niterói-RJ. Foto da autora.

Discos inteiros de papel filtro com 9 cm de diâmetro com as respectivas concentrações de cada tratamento foram colocados no fundo de placas de Petri de poliestireno estéreis, com aproximadamente 80 ml de água do mar e três espécimes de mexilhão por placa (Figura 12), o experimento ocorreu durante 24 h e como parâmetro indicador da atividade anti-incrustante foi contabilizado a produção de biscoitos por placa.



Figura 12: Mexilhões nas placas com tratamento. Foto da autora.

3.4 Bioteste antifúngico

Para avaliação qualitativa da atividade antifúngica foi realizado o método de bioautografia direta (Homans e Fuchs, 1970) com o fungo

filamentoso *Cladosporium cladosporioides*, um modelo muito eficiente de microrganismo utilizado na detecção de atividade antifúngica (Morandimet *al.*, 2010)

Cada extrato da macroalga foi ressuspendido em seu solvente de extração com concentração padrão de 100 µg.ml⁻¹, após a ressuspensão, metade de cada solução foi aplicada em placa de sílica, o controle positivo utilizado foi a vancomicina, e o controle negativo o próprio solvente de extração. O procedimento foi realizado em triplicata para cada extrato e controle.

Após completa evaporação dos solventes todas as placas foram borrifadas com uma suspensão de esporos (> 2 x 10⁶ esporos.ml⁻¹) de *C. cladosporioides* em solução de glucose e sal, e incubadas por 8 dias no escuro, em câmara úmida a 25 °C. A inibição do crescimento é dada pela área em branco ao redor da aplicação dos extratos, o que significa que o fungo não se desenvolveu com as condições daquela região.

Define-se por atividade forte a inibição total do crescimento do fungo, moderada a inibição parcial do desenvolvimento deste, e fraca quando há pouca alteração no desenvolvimento. O bioensaio teve a finalidade de funcionar com uma triagem inicial do potencial antifúngico dos extratos.

3.5 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia foi realizada em placas de fina camada de sílica com suporte de alumínio (Merck Al TLC 20 x 20 cm sílica gel 60 F₂₅₄) para separação de metabólitos secundários presentes nos extratos, e avaliação do perfil químico de cada população amostrada.

As placas de sílica foram cortadas em formato retangular com dimensões de 5 x 7 cm. Para ressuspensão do extrato, uma alíquota de 0,5 g da fração MeOH de cada população foi diluída em uma solução de 10 ml 1:1 DCM/MeOH. A aplicação na placa (spots) foi feita através de um capilar de vidro. Cada spot corresponde ao extrato MeOH de uma população de *A. taxiformis*: o primeiro corresponde a Praia da Lula, seguido por Ilha do Mantimento e Ilha Comprida.

Após a eluição em fase móvel composta de DCM/MeOH à proporção de 1:1, a distância total percorrida pelo solvente (fase móvel, D_m) foi marcada na placa. Os padrões emergentes foram observados sob luz visível, sob luz UV (em dois comprimentos de onda, 254 nm e 365 nm, respectivamente) e posteriormente reveladas. Logo após esse procedimento, para a revelação as placas foram borrifadas com sulfato cérico e aquecidas em placa aquecedora até a revelação das substâncias. O cálculo do fator de retenção (**Rf**) de cada substância ou mistura visualizada foi obtido dividindo-se **Da** (distância percorrida pela amostra na placa) pela distância total percorrida pela fase móvel (**Dm**).

3.6 Análise estatística

Devido à natureza dos desenhos experimentais, somente foram submetidos a teste de hipóteses os resultados dos testes anti-incrustantes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 13.3.721.

A ação antiincrustante dos extratos das diferentes polaridades das 3 populações amostradas foi avaliada através de análise de variância (ANOVA) após verificação das premissas de homogeneidade de variâncias (Kruskal-Wallis) e distribuição normal (Shapiro-Wilk), seguida do teste de Dunnett, para identificação de qual ou quais populações obtiveram efeito significativo.

Apesar dos dados obtidos do extrato MeOH não apresentarem distribuição normal, a premissa da homogeneidade variâncias foi atendida. Como não houve relação entre médias e variâncias, aplicou-se a ANOVA. Para análise dos resultados obtidos a partir do extrato Hex, foi realizada uma transformação dos dados por raiz quadrada de $x+1$.

4. RESULTADOS

4.1 Bioteste anti-incrustação

Os resultados obtidos pelas análises estatísticas apresentados na Tabela 2 mostram que apenas a população da Ilha Comprida apresentou um efeito estatisticamente significativo em relação ao controle, onde o extrato Hex aumentou significativamente a produção de bissos (Figura 13), enquanto o MeOH inibiu significativamente a produção de bissos (Figura 14). Já a fração

DCM não foi significativa (Figura 15). O teste de Dunnett é realizado para indicar quais médias das populações diferem significativamente do controle quando a ANOVA indica que há alguma diferença (Underwood, 1997).

Tabela 2: Resultados dos testes post hoc de Dunnett para a atividade anti-incrustante dos extratos hexânicos e metanólicos. A ANOVA não revelou diferença significativa para os extratos de DCM, $F(3,36)= 0,817$ e $p=0,49$

Extratos hexânicos		Extratos metanólicos	
Transformação raiz quadrada $x+1$		Transformação raiz quadrada $x+ 0.5$	
ANOVA $F(3,36)= 2,55$ $p=0,07$		ANOVA $F(3,36)= 4,2$ $p=0,012$	
Probabilidades para o TestePost Hoc (M>Controle)		Probabilidades para o TestePost Hoc (M>Controle)	
Erro: Entre MS=1,6894, df=36		Erro: Entre MS=1,6094, df=36	
Tratamento	Valor de p	Tratamento	Valor de p
Controle		Controle	
Praia da Lula	0,950797	Praia da Lula	0,176388
Ilha do Mantimento	0,171107	Ilha do Mantimento	0,1921
Ilha Comprida	0,030148	Ilha Comprida	0,011943

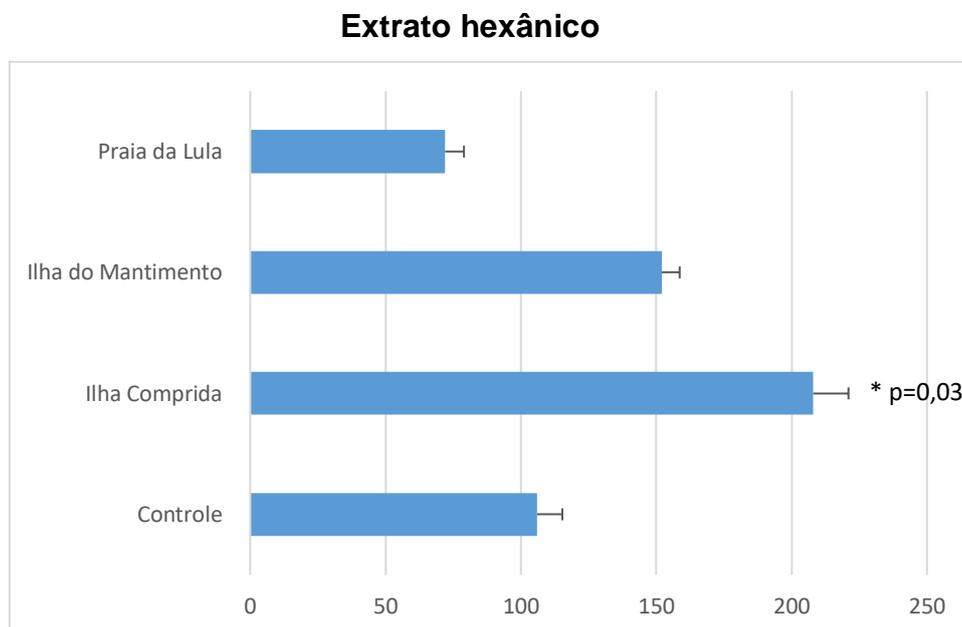


Figura 13: Média + desvio padrão do número de biscoitos produzidos ao final do experimento com o tratamento da fração de hexano. O tratamento significativamente diferente do controle, de acordo com o teste post hoc de Dunnett, foi identificado por * $p = 0,03$ e $n=10$.

Extrato metanólico

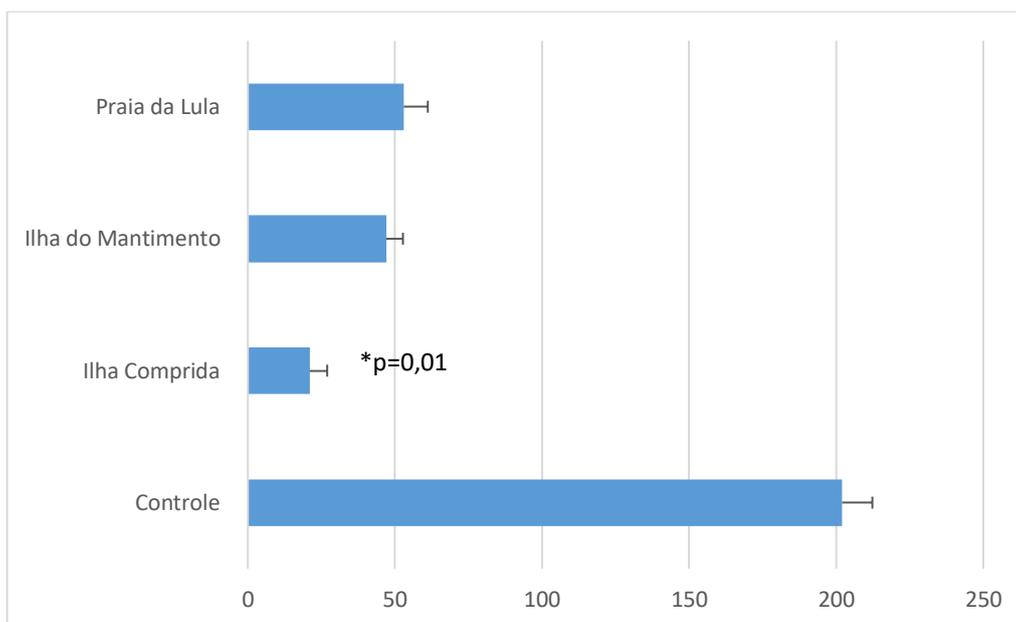


Figura 14: Média + desvio padrão do número de bissos produzidos ao final do experimento com o tratamento da fração de metanol. O tratamento significativamente diferente do controle, de acordo com o teste post hoc de Dunnett, foi identificado por * $p = 0,01$ e $n=10$.

Extrato diclorometânico

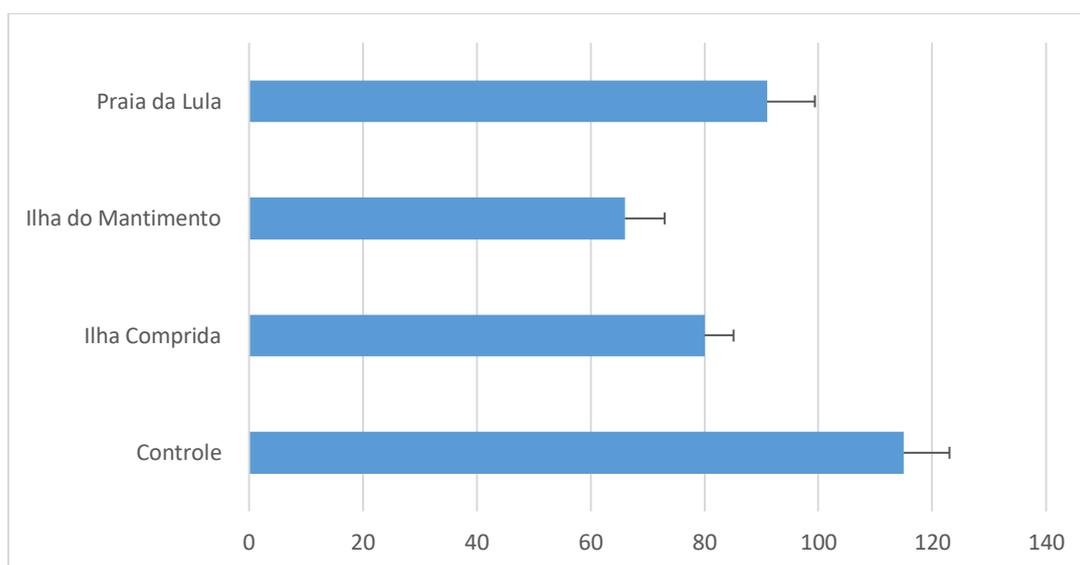


Figura 15: Média + desvio padrão do número de bissos produzidos ao final do experimento com o tratamento da fração de diclorometano. $N=10$.

4.2 Bioteste antifúngico

Os resultados dos testes antifúngicos pelo método de autobiografia de cada extrato das populações de *A. taxiformis* estão representados na Figura 16. A triagem do potencial antifúngico sugere elevada atividade para os extratos

IC-DCM, IM-DCM, PL-MeOH, IC-MeOH. Já os extratos IM-Hex, IC-Hex e PL-MeOH apresentaram potencial estimulante de germinação de esporos e crescimento do fungo *Cladosporium cladosporioides*.

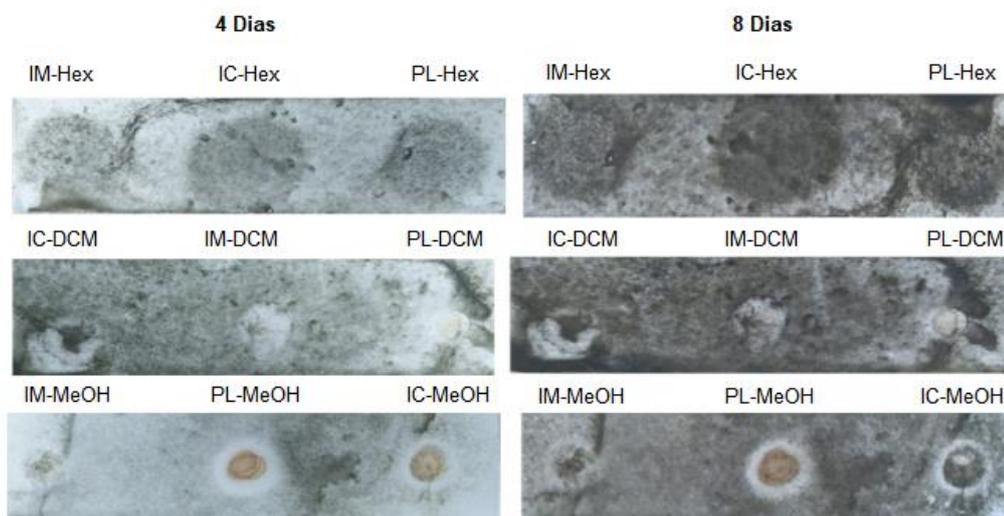


Figura 16: Triagem de atividades dos extratos de *A. taxiformis* em bioautografia com fungo *Cladosporium cladosporioides*. IM: Ilha do Mantimento; IC: ilha Comprida; PL: Praia da Lula; Hex: extrato hexânico; MeOH: extrato metanólico e DCM: extrato em diclorometano.

4.3 Cromatografia em camada delgada

O resultado obtido pela cromatografia em camada delgada realizada está apresentado na Figura 17, e refere-se aos extratos metanólicos de todos os sítios de coleta, pois as frações MeOH apresentaram tanto atividade anti-incrustante quanto antifúngica.



Figura 17: Resultado da CCD das frações MeOH de *A. taxiformis*. Foto da autora.

As marcações na imagem referem-se à fluorescência sob UV (254 nm), sugerindo que a população da Ilha Comprida apresenta uma substância ($R_f = 0,776$) que não está presente nas outras populações ou que está presente em quantidade tão inferior que não foi possível a sua visualização com esta técnica. Por outro lado, as frações metanólicas de todas as populações apresentaram a mesma substância ou mistura, com $R_f = 0,805$, também fluorescente em UV (254 nm).

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi demonstrado que espécies de *A. taxiformis* coletadas em diferentes localizações diferem quanto a atividade anti-incrustante e antifúngica. A atividade anti-incrustante foi comprovada no extrato MeOH da Ilha Comprida e, nessa mesma população foi possível identificar a atividade indutora de incrustação do extrato Hex. Já em relação à triagem antifúngica, todos os extratos hexânicos estimularam a proliferação de fungos enquanto alguns extratos em MeOH e DCM das localizações inibiram o crescimento dos esporos de fungos.

Como é conhecido na literatura pertinente, uma mesma espécie de macroalga pode possuir diferentes perfis químicos (Sudatti *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2013), sendo que a mesma espécie de macroalga submetida a diferentes condições ambientais pode possuir efeitos diferentes quando se tratando de atividades biológicas (Kumar *et al.*, 2020). As populações, por definição, são organismos da mesma espécie, porém separados geograficamente. A distância geográfica, mesmo que baixa, pode implicar em diferentes condições ambientais, sejam elas físicas, de temperatura, PH e pressão, químicas, como quantidade de determinadas substâncias diluídas na água (Steinberg, 1989; Jormalainen *et al.*, 2003) ou biológicas tais quais pressão de herbivoria (Peckol *et al.*, 1996) e epibiose (Saha, *et al.*, 2016) o que podem gerar respostas diferentes da mesma espécie de macroalga (Ank *et al.*, 2017). Assim como as expressões ecológicas podem ser distintas com extratos de diferentes populações de macroalgas marinhas, os potenciais biotecnológicos também podem ser diferentes.

Apenas um contato rápido de uma macroalga com outros organismos, pode desencadear uma reação metabólica gerando a produção de compostos químicos. Greff *et al.* (2017) realizaram uma pesquisa com a própria *A. taxiformis*, objeto desse estudo, determinando que o contato desta macroalga com o coral *Astroides calycularis* induziu uma mudança metabólica nas macroalgas levando a um aumento da atividade antimicrobiana contra *Aliivibrio fischeri*, uma bactéria marinha, sugerindo um aumento da produção de metabólitos com propriedades antimicrobianas e também uma plasticidade metabólica dessa macroalga na produção de defesa química.

Em nosso estudo, a fração MeOH da população de *A. taxiformis* da Ilha Comprida apresentou atividade significativamente maior quando comparada com as populações da Ilha do Mantimento e Praia da Lula. Estes resultados podem ser devido a uma maior pressão de epibiose (Pereira *et al.*, 2017; Sudatti *et al.* 2018), epifitismo (Dworjanyn *et al.*, 1999; Nylund *et al.*, 2007), ou até mesmo de herbivoria, que tendem a aumentar a produção de compostos com propriedade anti-incrustante para a defesa química dessas macroalgas (Wright *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2017).

O solvente metanol tem como característica ser polar, inferindo que as substâncias extraídas por esse solvente também sejam polares, e diversos estudos mostraram as inúmeras bioatividades de moléculas e extratos polares de macroalgas (Jaswir *et al.*, 2014; González-González *et al.*, 2020). Um artigo publicado por Salama *et al.*, (2017) indicou forte atividade anti-incrustante dos extratos metanólicos das espécies de macroalgas *Chaetomorpha linum*, *Turbinaria ornata* e *Sargassum polycystum*, causando a inibição do assentamento das larvas da craca incrustante comum, *Amphibalanus amphitrite*, em ensaios laboratoriais.

Pesquisas de perfil metabólico com *A. taxiformis* demonstram diferentes tipos de substâncias por ela produzidos, em destaque para a grande quantidade de halofórmios, principalmente o bromofórmio (Figura 18), porém essas substâncias são altamente voláteis (Burreson *et al.*, 1975; Woolard & Moore, 1976; McConnel & Fenical, 1977), sendo que o método de secagem das algas contribui para liberação desses compostos no ambiente, sendo pouco provável que o efeito da fração MeOH esteja relacionado a tais

moléculas. Além disso, grande parte das frações contendo compostos halofórmios se decompõem, presumivelmente pela ação de ácidos liberados no processo de extração (McConnel & Fenical, 1977).

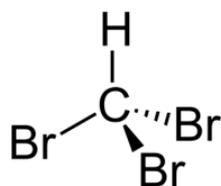


Figura 18: Estrutura molecular do bromofórmio. Fonte: PubChem.

Entretanto, outros estudos químicos de *A. taxiformis* foram capazes de analisar moléculas com características mais polares e que são passíveis de possuir atividade anti-incrustação, como acetonas (Greff *et al.*, 2014) micosporinas tipo amino ácidos (Karsten *et al.*, 1998) e o2-dodecanoexilsulfonato (Bhavanath *et al.*, 2013). A seguir é apresentada na Tabela 3 um resumo com os principais metabólitos e classes de metabólitos em *A. taxiformis*, e a Figura 18 demonstra as estruturas químicas de algumas dessas moléculas.

No artigo publicado por Greff *et al.* (2014), o perfil químico da fração MeOH de *A. taxiformis* mostrou ser muito promissor, evidenciando que os componentes majoritários estavam nessa fração e possuíam fluorescência em UV. As substâncias mahonona e a bromomahonona (Figura 19), que são cicloacetonas halogenadas, foram isoladas e testadas quanto a atividades anti-QS, antibacteriana e antifúngica, apresentando resultados de inibição em todos os casos, o que corroborou com os resultados obtidos pelo presente trabalho.

A placa cromatográfica indicou que a fração IC-MeOH possui uma substância que não estava presente em PL- MeOH e IM-MeOH, podendo ser indicativo do efeito anti-incrustante mais proeminente dessa fração, podendo ainda ser referente a mahonona ou bromomahonona, que possuem atividades similares.

Tabela 3: Principais metabólitos descritos na literatura para *A. taxiformis*.

Metabólitos	Classe	Referência
Halofórmiosiodados Tetrahalopropenos Polihalobut-3-en-Z-onas Monohaloacetonas 3,3-tialoacrole	Halofórmios	Burreson <i>et al.</i> (1975) Burreson <i>et al.</i> (1976)
Palitina Shinorina	Micosporinas tipo amino ácidos	Karsten <i>et al.</i> (1998)
2-dodecanoxiletanosulfonato	Éster	Bhavanath <i>et al.</i> (2013)
Mahorone 5-bromomahorone	Terpeno	Greff <i>et al.</i> (2014)

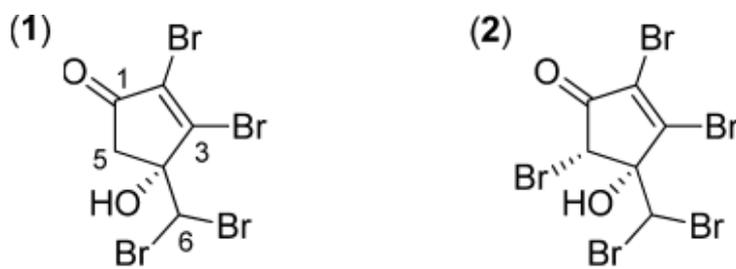


Figura 19: 1 Mahorona e 2 5-bromomahorona de *A. taxiformis*. Fonte: Greff *et al.* (2014).

Apesar das outras populações da fração MeOH e os extratos DCM não terem obtido resultados significativos quanto a atividade anti-incrustante com a concentração natural de extrato, é possível notar uma diminuição do número de bissos quando os dados são apresentados nos gráficos, indicando que possa haver alguma molécula com atividade, porém em menor concentração quando comparada ao extrato em MeOH da Ilha Comprida ou também outras moléculas biologicamente ativas. Da Gama *et al.* (2008) mostraram que algumas espécies de macroalgas tiveram sua atividade aumentada quando se dobrava a concentração natural, algumas espécies chegaram a inibir 100% da produção de bissos dos mexilhões. Em outras palavras, um efeito anti-incrustante dose-dependente.

A maior atividade dos extratos metanólicos das algas da Ilha Comprida pode ser resultado de três processos: (1) diferenças genéticas entre as populações; (2) diferentes pressões ecológicas entre os locais (e.g., mais

epibiontes ou herbívoros poderiam induzir uma produção maior de mahoronas na Ilha Comprida), ou (3) condições ambientais mais próximas do ótimo fisiológico da espécie na Ilha Comprida, permitindo um maior investimento em defesas químicas. Devido à pequena distância entre as populações (ca. 2,5 a 6,5 km), a hipótese 1 parece improvável. Não obstante, não se pode, com os dados disponíveis, diferenciar entre os processos 2 e 3, sendo necessários experimentos de cultivo em laboratório especificamente projetados para tal fim.

Há algum tempo já se estudam soluções anti-incrustantes que substituam os modelos tradicionais de tintas, e as macroalgas marinhas são fontes muito importantes neste contexto por possuírem uma superfície especial e grande diversidade estrutural de moléculas que as protegem de incrustação (Pereira *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2017).

Outro resultado interessante obtido pelo bioteste anti-incrustação foi o estímulo da produção de bissos da fração hexânica dos espécimes da população de *A. taxiformis* da Ilha Comprida, efeito contrário ao que se observou no extrato metanólico da mesma população. Assim como o solvente metanol é polar e extrai moléculas com a mesma característica, o solvente hexano é muito apolar, atraindo também substâncias apolares.

Assim como o resultado obtido em laboratório, com o IC-Hex de *A. taxiformis*, outros artigos relatam esse efeito de indução de incrustação ou de assentamento de larvas de coral e outros organismos (Daume *et al.*, 1999; Hadfield & Paul 2001; Fleck & Fitt 1999; Steinberg & de Nys, 2002), inclusive o artigo de Soares *et al.* (2006) demonstrou a indução da produção de bissos pelo bivalve *Perna perna*, mesmo organismo teste do nosso estudo, conseguindo ainda isolar a substância responsável pela atividade, o epitanodiol da fração apolar do extrato de *Styopodium zonale*, representado na Figura 20.

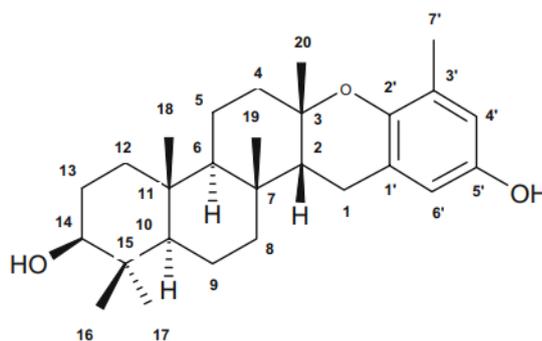


Figura 20: Epitaondiol de *Styopodium zonale*. Fonte: Soares *et al.* (2006).

O mais interessante dos resultados obtidos foi que a mesma população de *A. taxiformis* foi responsável por ambos os efeitos descritos no trabalho que foram estatisticamente significativos, a fração IC-MeOH por efeito anti-incrustante e a fração IC-Hex por estímulo da produção de bissos. Isso se deve aparentemente à diferença de polaridade dos extratos, indicando que houve boa separação dos compostos de polaridades diferentes pelo procedimento de extração.

A química de produtos naturais não segue um padrão específico de atividade, não são todas as moléculas e extratos com uma mesma polaridade que sempre vão ter o mesmo efeito. Até mesmo substâncias com o mesmo esqueleto carbônico, porém, com diferentes grupamentos ou o mesmo composto, porém, isomerias diferentes, expressam efeitos opostos (D'anna *et al.*, 2006). Um clássico exemplo é a substância química talidomida. Enquanto o isômero S causa tem um efeito teratogênico, o isômero R é um potente sedativo (Lima *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2021).

No ambiente marinho também já foram identificados isômeros de macroalgas marinhas, pois Gonzáles *et al.* (1982) descreveram a isomeria cis-trans de um metabólito isolado da espécie *Laurencia pinnatifida* (Figura 21). Eles observaram que a isomeria é referente a apenas um carbono localizado na posição 3, o que muda a conformação espacial do composto podendo mudar a sua atividade. Se apenas a mudança na conformação da molécula pode causar efeitos diferentes, como no caso da talidomida, a probabilidade de grupos de moléculas separados por polaridades diferentes apresentar efeitos opostos é muito maior.

Um exemplo é o estudo de Tian *et al.*, (2009) mostrando que a polaridade dos extratos da planta medicinal *Galla chinensis* afeta diretamente as atividades antioxidantes e antimicrobianas, os resultados indicaram que os extratos apolares continham galotaninos de maior peso molecular responsáveis pela maior atividade, enquanto os extratos mais polares não continham essas classes de moléculas.

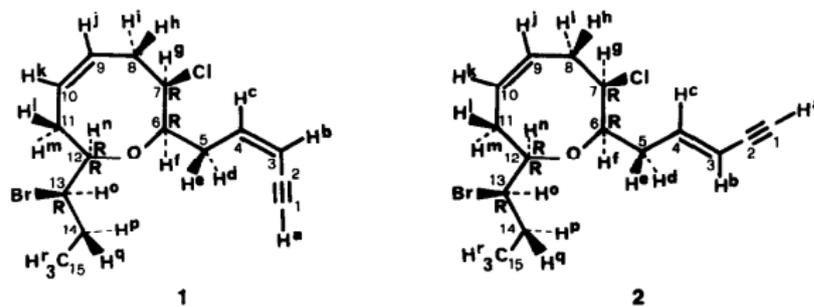


Figura 21: (1) cis-pinnatifidenina e (2) trans-pinnatifidenina isolados de *L. pinnatifida*.
 Fonte: Gonzáles et al. (1982).

Um estudo realizado por Becerro *et al.* (1997), demonstrou o múltiplo potencial de extratos de diferentes polaridades da esponja *Crambe crambe*, em relação a inibição da divisão celular de ovos de *Paracentrotus lividus*, e assentamento larvar de *Bugula neritina*. Enquanto concentrações mais baixas dos extratos em DCM e ButOH inibiram completamente a divisão celular, as concentrações mais altas permitiram a divisão celular até a etapa de gástrula do desenvolvimento embrionário, o assentamento larvar de *Bugula neritina* foi inibido pelas frações DCM e ButOH da esponja. O estudo mostrou que além dos diferentes extratos apresentarem diferentes funções ecológicas, os mesmos extratos em concentrações diferentes desempenharam efeitos opostos.

No presente estudo, IC-Hex estimulou a produção de biscoitos, o que é muito interessante para o desenvolvimento do potencial biotecnológico do extrato. Em alguns casos, por exemplo, o favorecimento da bioincrustação é desejável, como na produção de recifes artificiais e para atração de larvas de moluscos bivalves em sistemas de aquicultura (da Gama *et al.*, 2009). São encontrados na literatura estudos com macroalgas que possuem essa habilidade (Alfaro *et al.*, 2005), inclusive um artigo de Gribben *et al.* (2012) que estuda o comportamento do assentamento de larvas do mexilhão *Perna canaliculus*, mostrou que os extratos apolares das macroalgas *Osmundaria colensoi*, *Ballia callitricha*, *Melanthalia abscissa* e *Scytothamnus australis* foram responsáveis por aumentar o assentamento das larvas em relação ao controle, enquanto os extratos polares diminuíram o assentamento, resultado esse que corrobora com os obtidos pelo nosso trabalho e que podem ser utilizados na

pesquisa e desenvolvimento de produtos para melhora da obtenção de sementes de mexilhão através da indução química.

O estímulo da incrustação biológica para composição de recifes de corais artificiais também possui uma grande relevância ambiental, são utilizados ao redor do mundo para tentar reverter os efeitos causados pelo aquecimento global. O aumento da média de temperatura da água do mar acarreta a perda das zooxantelas, os organismos fotossintetizantes associados aos corais, levando ao branqueamento e a possível morte desses organismos que já não estão tão saudáveis (Hughes *et al.*, 2018). Assim, substâncias de macroalgas que estimulem a colonização em substratos artificiais podem ser a chave para recuperação de biotas bentônicas, como os recifes coralinos (Gleason & Hofman, 2011; Gómez-Lemos *et al.*, 2018).

Em relação a triagem antifúngica, os resultados obtidos foram parecidos quando comparados com os resultados dos anti-incrustantes, em que a fração Hex teve o potencial de estimular o crescimento do fungo enquanto a fração MeOH causou inibição da proliferação dos esporos fúngicos, porém, na triagem alguns extratos DCM obtiveram efeito inibidor de crescimento fúngico.

É sabido da multifuncionalidade das atividades de proteção que os metabólitos secundários das macroalgas marinhas exercem nesses organismos, como anti-incrustante, antifúngica e antibacteriana (Largo & Nishijima, 1995; Tahiluddin & Terzi, 2021), porém as macroalgas também são responsáveis por liberar pistas químicas no ambiente capazes de recrutar microrganismos que possam ser benéficos para a alga em determinada situação (Zuccaro *et al.*, 2008; Egan *et al.*, 2013).

Tais fatos podem significar que as substâncias da fração Hex devem estar funcionando como pistas químicas pré-colonização de algumas espécies, recrutando os organismos marinhos, que se comunicam quimicamente, a exemplo do estabelecimento larvar e metamorfose de invertebrados marinhos (Hadfield & Paul, 2001), e de corais que recrutam peixes para consumir algas competidoras (Dixon & Hay, 2012).

Um questionamento levantado foi em relação a mesma população de macroalgas, porém extratos com polaridades diferentes, apresentarem efeitos opostos, tanto no testes anti-incrustação, quanto no teste antifúngico. No ponto

de vista puramente químico, a explicação pode ser dada pela boa separação de moléculas com mesmas características de polaridade possuírem efeitos diferentes, o que é interessante quando se tratando de potenciais produtos para desenvolvimento industrial, porém do ponto de vista ecológico, qual seria a explicação?

O gênero *Asparagopsis*, assim como outros gêneros de macroalgas vermelhas, é conhecido por possuir estruturas morfológicas denominadas “células glandulares” (Paul *et al.*, 2006). Essas células são responsáveis por estocar metabólitos secundários (El-Baroty *et al.*, 2007). Na macroalga *Leurencia dendroidea*, é conhecida uma estrutura com a mesma função chamada “*corps in cerise*” que ao ser rompida, as substâncias que estavam em seu interior, se demonstraram autotóxicas. Ainda não é bem estabelecido o funcionamento dos mecanismos dinâmicos de transporte e exsudação de metabólitos secundários, portanto há possibilidade dessas substâncias estarem estocadas em compartimentos diferentes dessa alga, ou serem liberados em momentos de necessidade específica.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos pelo presente trabalho mostram que substâncias de uma mesma faixa de polaridade foram responsáveis por múltiplas atividades, sugerindo que os metabólitos secundários não desempenham apenas um papel na natureza, o que é relevante para nossa compreensão da ecologia e evolução. Além disso, foi demonstrado que a atividade química tanto anti-incrustante quanto antifúngica varia conforme a localização das populações.

O maior objetivo dentro desse trabalho foi a exploração do potencial biotecnológico envolvido, pois a prospecção de novas moléculas bioativas, assim como novas formas de produzi-las são de grande interesse. O principal desafio, além de identificar as bioatividades e as moléculas responsáveis por determinada atividade, é a produção dessas substâncias em larga escala, sendo o trabalho de bios prospecção um ponto de partida essencial para que haja uma forma de produção bioguiada desses metabólitos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarzua, S. & Jakubowski, S. (1995) Biotechnological investigation for the prevention of biofouling. Biological and biochemical principles for the prevention of biofouling. *Marine Ecology Progress Series*.123: 301–312.
- Abarzua, S., Jakubowski, S. Eckert & Fuchs, P. (1999). Biotechnological investigation for the prevention of marine biofouling II. Blue-green algae as potential producers of biogenic agents for the growth inhibition of microfouling organisms. *Botanica Marina* 42: 459–465.
- Adzibli, L., & Yuewen, D. (2018). Assessing the impact of oil spills on marine organisms. *Journal of Oceanography Marine Research*, 6, 472-479.
- Alfaro, A. C., Copp, B. R., Appleton, D. R., Kelly, S., & Jeffs, A. G. (2006). Chemical cues promote settlement in larvae of the green-lipped mussel, *Perna canaliculus*. *Aquaculture International*, 14, 405-412.
- Amara, I., Miled, W., Slama, R. B., & Ladhari, N. (2018). Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine environment. A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 57, 115-130.
- Amorim, R. D. N. D. S., Rodrigues, J. A. G., Holanda, M. L., Quinderé, A. L. G., Paula, R. C. M. D., Melo, V. M. M., & Benevides, N. M. B. (2012). Antimicrobial effect of a crude sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria ornata*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55, 171-181.
- Andreakis, N., Procaccini, G., & Kooistra, W.H.C.F. (2004) *Asparagopsis taxiformis* and *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta): genetic and morphological identification of Mediterranean populations. *European Journal of Phycology* 39, 273–283.
- Andreakis N., Procaccini G., Maggs, C., & Kooistra, W.H.C.F. (2007) Phylogeography of the invasive seaweed *Asparagopsis* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta) reveals cryptic diversity. *Molecular Ecology* 16, 2285–2299.
- Almeida, E., Diamantino, T. C., & de Sousa, O. (2007). Marine paints: the particular case of antifouling paints. *Progress in Organic Coatings*, 59, 2-20.
- Alghazeer, R., Elmansori, A., Sidati, M., Gammoudi, F., Azwai, S., Naas, H., & Eldaghayes, I. (2017). In vitro antibacterial activity of flavonoid extracts of two selected Libyan algae against multi-drug resistant bacteria isolated from food products. *Journal of Biosciences and Medicines*, 5, 26
- Ank, G., da Gama, B. A. P., & Pereira, R. C. (2013). Polyphenols from *Stypopodium zonale* (Phaeophyceae): Intrapopulation variation, induction by simulated herbivory, and epibiosis effects. *Aquatic Botany*, 111, 125-129.

- Bazaka, K., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P. (2011). Do bacteria differentiate between degrees of nanoscale surface roughness? *Biotechnology Journal*, 6, 1103-1114.
- Besednova, N. N., Andryukov, B. G., Zaporozhets, T. S., Kryzhanovsky, S. P., Fedyanina, L. N., Kuznetsova, T. A., & Shchelkanov, M. Y. (2021). Antiviral effects of polyphenols from marine algae. *Biomedicines*, 9, 200.
- Becerro, M. A., Turon, X., & Uriz, M. J. (1997). Multiple functions for secondary metabolites in encrusting marine invertebrates. *Journal of Chemical Ecology*, 23, 1527-1547.
- Bhosale, S. H., Nagle, V. L., & Jagtap, T. G. (2002). Antifouling potential of some marine organisms from India against species of *Bacillus* and *Pseudomonas*. *Marine Biotechnology*, 4, 111-118.
- Bianco, É. M., Rogers, R., Teixeira, V. L., & Pereira, R. C. (2009). Antifoulant diterpenes produced by the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis*. *Journal of Applied Phycology*, 21, 341-346.sch
- Bianco, E. M., De Oliveira, S. Q., Rigotto, C., Tonini, M. L., da Rosa Guimarães, T., Bittencourt, F. & Schenkel, E. P. (2013). Anti-infective potential of marine invertebrates and seaweeds from the Brazilian coast. *Molecules*, 18, 5761-5778.
- Bloecher, N., & Floerl, O. (2021). Towards cost-effective biofouling management in salmon aquaculture: a strategic outlook. *Reviews in Aquaculture*, 13, 783-795.
- Breves-Ramos, A., Junqueira, A. O. R., Lavrado, H. P., Silva, S. H. G., & Ferreira-Silva, M. A. G. (2010). Population structure of the invasive bivalve *Isognomon bicolor* on rocky shores of Rio de Janeiro State (Brazil). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 90, 453-459.
- Burreson, B. J., Moore, R. E., & Roller, P. P. (1976). Volatile halogen compounds in the alga *Asparagopsis taxiformis* (Rhodophyta). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24, 856-861.
- Brener, Z. (1965). Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 59, 19-26.
- Buschmann, A. H., & Gómez, P. (1993). Interaction mechanisms between *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta) and epiphytes. *Hydrobiologia*, 260, 345-351.
- Sampaio, C. L., Miranda, R. J., Maia-Nogueira, R., & José de Anchieta, C. C. (2012). New occurrences of the nonindigenous orange cup corals *Tubastraea coccinea* and *T. tagusensis* (Scleractinia: Dendrophylliidae) in Southwestern Atlantic. *Check List*, 8, 528-530.

- Carvalho, A. P., Batista, D., Dobretsov, S., & Coutinho, R. (2017). Extracts of seaweeds as potential inhibitors of quorum sensing and bacterial growth. *Journal of Applied Phycology*, 29, 789-797.
- Cestari, V. R. F., Florêncio, R. S., Sousa, G. J. B., Garces, T. S., Maranhão, T. A., Castro, R. R. & Moreira, T. M. M. (2021). Vulnerabilidade social e incidência de COVID-19 em uma metrópole brasileira. *Ciência & Saúde Coletiva*, 26, 1023-1033.
- Chadwick, N. E., & Morrow, K. M. (2011). Competition among sessile organisms on coral reefs. In *Coral reefs: an ecosystem in transition*, 347-371.
- Champ, M. A., & Lowenstein, F. L. (1987). TBT-The Dilemma of High-Technology Antifouling Paints. *Oceanus*, 30, 69-77.
- Cheong, K. L., Qiu, H. M., Du, H., Liu, Y., & Khan, B. M. (2018). Oligosaccharides derived from red seaweed: Production, properties, and potential health and cosmetic applications. *Molecules*, 23, 2451.
- Clements, C. S., & Hay, M. E. (2019). Biodiversity enhances coral growth, tissue survivorship and suppression of macroalgae. *Nature ecology & evolution*, 3, 178-182.
- Da Gama, B. A. P., Pereira, R. C., Carvalho, A. G., Coutinho, R., & Yoneshigue-Valentin, Y. (2002). The effects of seaweed secondary metabolites on biofouling. *Biofouling*, 18, 13-20.
- Da Gama, B. A. P., Pereira, R. C. & Coutinho, R. (2009), Bioincrustação marinha. In: Pereira, RC & Soares-Gomes, A. (orgs.). *Biologia Marinha. Interciência*, Rio de Janeiro.
- Dahms, H. U., & Dobretsov, S. (2017). Antifouling compounds from marine macroalgae. *Marine Drugs*, 15, 265.
- D'Anna, F., Frenna, V., Noto, R., Pace, V., & Spinelli, D. (2006). Study of aromatic nucleophilic substitution with amines on nitrothiophenes in room-temperature ionic liquids: Are the different effects on the behavior of para-like and ortho-like isomers on going from conventional solvents to room-temperature ionic liquids related to solvation effects? *The Journal of Organic Chemistry*, 71, 5144-5150.
- Damacena, F. D. L., & da Silva, R. C. (2015). Bioinvasão por água de lastro: um problema de direito e uma ameaça à sustentabilidade. *Revista Eletrônica Direito e Política*, 10, 175-196.
- Damodaran, V. B., & Murthy, N. S. (2016). Bio-inspired strategies for designing antifouling biomaterials. *Biomaterials Research*, 20, 1-11.

- Davis, A. R., & Moreno, C. A. (1995). Selection of substrata by juvenile *Choromytilus chorus* (Mytilidae): are chemical cues important? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 191, 167-180.
- Daume S, Brand-Gardner S, Woelkerling WJ (1999) Settlement of abalone larvae (*Haliotis laevis* Donovan) in response to non-geniculate coralline red algae (Corallinales, Rhodophyta). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 234, 125–143
- De Nys R, Leya T, Maximilien R, Afsar A, Nair PSR, Steinberg PD (1996) The need for standardised broad scale bioassay testing: a case study using the red alga *Laurencia rigida*. *Biofouling* 10, 213–224
- Deshner, A. A (2018) Biofouling impacts on the environment and ship energy efficiency, *World Maritime University Dissertations*. 617.
- De Moraes Reis, A. C. S., Borges, D. P. L., Barbosa, M. S., Ternes, Y. M. F., Santiago, S. B., & da Silva Santos, R. (2016). O cenário de políticas públicas do Brasil diante do quadro das doenças negligenciadas. *Saúde & ciência em ação*, 2, 99-107.
- De Paula, A. F., & Creed, J. C. (2004). Two species of the coral *Tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia) in Brazil: a case of accidental introduction. *Bulletin of Marine Science*, 74, 175-183.
- Dixon, D. L., & Hay, M. E. (2012). Corals chemically cue mutualistic fishes to remove competing seaweeds. *Science*, 338, 804-807.
- Ducruet, C., Roussin, S., & Jo, J. C. (2009). Political and economic factors in the evolution of North Korea's maritime connections. *Journal of International Logistics and Trade*, 7, 1-23.
- Duffy, J. E., & Hay, M. E. (1990). Seaweed adaptations to herbivory. *BioScience*, 40, 5.
- Dijoux L, Viard F, Payri C (2014) The more we search, the more we find: discovery of a new lineage and a new species complex in the genus *Asparagopsis*. *PloS One* 9, 7.
- Dworjanyn A., S., T. Wright, J., A. Paul, N., De Nys, R., & D. Steinberg, P. (2006). Cost of chemical defence in the red alga *Delisea pulchra*. *Oikos*, 113, 13-22.
- Egan, S., Harder, T., Burke, C., Steinberg, P., Kjelleberg, S., & Thomas, T. (2013). The seaweed holobiont: understanding seaweed–bacteria interactions. *FEMS Microbiology Reviews*, 37, 462-476.
- El-Baroty, G. S., Moussa, M. Y., Shallan, M. A., Ali, M. A., Sabh, A. Z., & Shalaby, E. A. (2007). Contribution to the aroma, biological activities, minerals, protein, pigments and lipid contents of the red alga: *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan. *Journal of Applied Sciences Research*, 3, 1825-1834.

- El Shafay, S. M., Ali, S. S., & El-Sheekh, M. M. (2016). Antimicrobial activity of some seaweeds species from Red sea against multidrug resistant bacteria. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 42, 65-74.
- Esserti, S., Smaili, A., Rifai, L. A., Koussa, T., Makroum, K., Belfaiza, M., & Faize, M. (2017). Protective effect of three brown seaweed extracts against fungal and bacterial diseases of tomato. *Journal of Applied Phycology*, 29, 1081-1093.
- Etahiri, S., Bultel-Poncé, V., Caux, C., & Guyot, M. (2001). New bromoditerpenes from red alga. *Journal of Natural Products*, 64, 1024-1027.
- Faulkner, D. J. (2001). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 1, 1-49.
- Fenical, W. (1975). Halogenation in the Rhodophyta 1, 2 a review. *Journal of Phycology*, 11, 245-259.
- Feldmann, J. (1942). Recherches sur les Bonnemaisoniacées et leur alternance de générations. *Annales des Sciences Naturelles; Botanique*, 11, 75-175.
- Fertah, M., Belfkira, A., Taourirte, M., & Brouillette, F. (2017). Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan *Laminaria digitata* brown seaweed. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S3707-S3714.
- Fleck J. & Fitt W.K. (1999) Degrading mangrove leaves of *Rhizophora mangle* Linne provide a natural cue for settlement and metamorphosis of the upside down jellyfish *Cassiopea xamachana* Bigelow. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 234, 83–94.
- Genovese, G., Tedone, L., Hamann, M. T., & Morabito, M. (2009). The Mediterranean red alga *Asparagopsis*: a source of compounds against Leishmania. *Marine Drugs*, 7, 361-366.
- Genovese, G., Faggio, C., Gugliandolo, C., Torre, A., Spanò, A., Morabito, M., & Maugeri, T. L. (2012). In vitro evaluation of antibacterial activity of *Asparagopsis taxiformis* from the Straits of Messina against pathogens relevant in aquaculture. *Marine Environmental Research*, 73, 1-6.
- Gleason, D. F., & Hofmann, D. K. (2011). Coral larvae: from gametes to recruits. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 408, 42-57.
- Gómez-Lemos, L. A., Doropoulos, C., Bayraktarov, E., & Diaz-Pulido, G. (2018). Coralline algal metabolites induce settlement and mediate the inductive effect of epiphytic microbes on coral larvae. *Scientific reports*, 8, 1-11.
- González, A. G., Martín, J. D., Martín, V. S., Norte, M., Pérez, R., Ruano, J. Z. & Clardy, J. (1982). Non-terpenoid C-15 metabolites from the red seaweed *Laurencia pinnatifida*. *Tetrahedron*, 38, 1009-1014.

- González-González (2020). Physiological, ecological, and biochemical implications in tomato plants of two plant biostimulants: Arbuscular mycorrhizal fungi and seaweed extract. *Frontiers in Plant Science*. 11, 999.
- Greff, S., Aires, T., Serrão, E. A., Engelen, A. H., Thomas, O. P., & Pérez, T. (2017). The interaction between the proliferating macroalga *Asparagopsis taxiformis* and the coral *Astroides calycularis* induces changes in microbiome and metabolomic fingerprints. *Scientific Reports*, 7, 1-14.
- Gribben, P. E., Jeffs, A. G., de Nys, R., & Steinberg, P. D. (2011). Relative importance of natural cues and substrate morphology for settlement of the New Zealand Greenshell™ mussel, *Perna canaliculus*. *Aquaculture*, 319, 240-246.
- Gu, T., Mao, Y., Chen, C., Wang, Y., Lu, Q., Wang, H., & Cheng, W. (2022). Diversity of arbuscular mycorrhiza fungi in rhizosphere soil and roots in *Vetiveria zizanioides* plantation chronosequence in coal gangue heaps. *Symbiosis*, 1-12.
- Güven, K. C., Percot, A., & Sezik, E. (2010). Alkaloids in marine algae. *Marine Drugs*, 8, 269-284.
- Hadfield M.G & Paul V.J (2001). Natural chemical cues for settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae. *Marine Chemical Ecology*, 431–462.
- Hellio, C., De La Broise, D., Dufosse, L., Le Gal, Y., & Bourgougnon, N. (2001). Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. *Marine environmental research*, 52, 231-247.
- Hellio, C., Berge, J. P., Beaupoil, C., Le Gal, Y., & Bourgougnon, N. (2002). Screening of marine algal extracts for anti-settlement activities against microalgae and macroalgae. *Biofouling*, 18, 205-215.
- Hellio, C., Simon-Colin, C., Clare, A., & Deslandes, E. (2004). Isethionic acid and floridoside isolated from the red alga, *Grateloupia turuturu*, inhibit settlement of *Balanus amphitrite* cyprid larvae. *Biofouling*, 20, 139-145.
- Hines, S., van der Zwan, T., Shiell, K. (2021) Alkaline extract of the seaweed *Ascophyllum nodosum* stimulates arbuscular mycorrhizal fungi and their endomycorrhization of plant roots. *Scientific Reports* 11, 13491.
- Hughes, T. P., Kerry, J. T., Baird, A. H., Connolly, S. R., Dietzel, A., Eakin, C. M., & Torda, G. (2018). Global warming transforms coral reef assemblages. *Nature*, 556, 492-496.
- Jaswir, I., Tope, A. H. T., Raus, R. A., Monsur, H. A., & Ramli, N. (2014). Study on anti-bacterial potentials of some Malaysian brown seaweeds. *Food Hydrocolloids*, 42, 275-279.

- Jha, B., Kavita, K., Westphal, J., Hartmann, A., & Schmitt-Kopplin, P. (2013). Quorum sensing inhibition by *Asparagopsis taxiformis*, a marine macroalga: separation of the compound that interrupts bacterial communication. *Marine Drugs*, 11, 253-265.
- Jormalainen, V., Honkanen, T., Koivikko, R., & Eränen, J. (2003). Induction of phlorotannin production in a brown alga: defense or resource dynamics? *Oikos*, 103, 640-650.
- Karsten, U., Sawall, T., & Wiencke, C. (1998). A survey of the distribution of UV-absorbing substances in tropical macroalgae. *Phycological Research*, 46, 271-279.
- Kicklighter, C. E., & Hay, M. E. (2006). Integrating prey defensive traits: contrasts of marine worms from temperate and tropical habitats. *Ecological Monographs*, 76, 195-215.
- Kilowasid, L. M. H., Ariansyah, R., Afa, L., Sutariati, G. A. K., Rakian, T. C., Sanjaya, M. F., & Hisein, W. S. A. (2022). Seaweed extract effect on arbuscular mycorrhizae spore in soil engineered by earthworm, and the soil effect on upland rice growth. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 951,1.
- Kim, J. S., Lee, G. G., Park, J. S., Jung, Y. H., Kwak, H. S., Kim, S. B & Kwon, S. T. (2007). A novel multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of five pathogenic bacteria: *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food Protection*, 7, 1656-1662.
- Kim, J. S., Kim, Y. H., Seo, Y. W., & Park, S. (2007). Quorum sensing inhibitors from the red alga, *Ahnfeltiopsis flabelliformis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12, 308-311.
- Kinley RD, de Nys R, Vucko MJ, Machado L, Tomkins NW (2016) The red macroalgae *Asparagopsis taxiformis* is a potent natural antimethanogenic that reduces methane production during in vitro fermentation with rumen fluid. *Animal Product Science* 56, 282–289.
- Kinley RD, Martinez-Fernandez G, Matthews MK, de Nys R, Magnusson M, Tomkins NW (2020) Mitigating the carbon footprint and improving productivity of ruminant livestock agriculture using a red seaweed. *Journal of Cleaner Production*. 120, 836.
- König GM, Wright AD (1997) *Laurencia rigida*: chemical investigations of its antifouling dichloromethane extract. *Journal of Natural Products* 967–970.
- Kubanek, J., Jensen, P. R., Keifer, P. A., Sullards, M. C., Collins, D. O., & Fenical, W. (2003). Seaweed resistance to microbial attack: a targeted chemical

defense against marine fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 6916-6921.

Kumar, A., Buia, M. C., Palumbo, A., Mohany, M., Wadaan, M. A., Hozzein, W. N., ... & AbdElgawad, H. (2020). Ocean acidification affects biological activities of seaweeds: A case study of *Sargassum vulgare* from Ischia volcanic CO₂ vents. *Environmental Pollution*, 259, 113765.

Lanças, F. M. (2009). A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. *Scientia Chromatographica*, 1, 35-61.

Largo, D. B., Fukami, K., & Nishijima, T. (1995). Occasional pathogenic bacteria promoting ice-ice disease in the carrageenan-producing red algae *Kappaphycus alvarezii* and *Euclima denticulatum* (Solieriaceae, Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 7, 545-554.

Lauritano, C., & Ianora, A. (2020). Chemical defense in marine organisms. *Marine Drugs*, 18, 518.

Lehaitre, M., Delauney, L., & Compère, C. (2008). Biofouling and underwater measurements. Real-time observation systems for ecosystem dynamics and harmful algal blooms: Theory, instrumentation and modelling. *Oceanographic Methodology Series. UNESCO, Paris*, 463-493.

Lesser, M. P. (2006). Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology*.68, 253-278.

Lima, L. M., Fraga, C. A. M., & Barreiro, E. J. (2001). O renascimento de um fármaco: talidomida. *Química Nova*, 24, 683-688.

Lima, S. L., Colombo, A. L., & de Almeida Junior, J. N. (2019). Fungal cell wall: emerging antifungals and drug resistance. *Frontiers in Microbiology*, 2573.

Lohse, M. B., Gulati, M., Johnson, A. D., & Nobile, C. J. (2018). Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 19-31.

Ma, X., Hu, J., Yu, Y., Wang, C., Gu, Y., Cao, S. & Peng, G. (2021). Assessment of the pulmonary adaptive immune response to *Cladosporium cladosporioides* infection using an experimental mouse model. *Scientific Reports*, 11, 1-13.

Machado, L. P., de Carvalho, L. R., Young, M. C. M., Zambotti-Villela, L., Colepicolo, P., Andregueti, D. X., & Yokoya, N. S. (2014). Comparative chemical analysis and antifungal activity of *Ochtodes secundiramea* (Rhodophyta) extracts obtained using different biomass processing methods. *Journal of Applied Phycology*, 26, 2029-2035.

Machado, L., Magnusson, M., Paul N.A., Kinley, R., de Nys, R. & Tomkins N. (2016). Identification of bioactives from the red seaweed *Asparagopsis*

taxiformis that promote antimethanogenic activity *in vitro*. *Journal of Applied Phycology* 28, 3117–3126.

MacLeod, M., Arp, H. P. H., Tekman, M. B., & Jahnke, A. (2021). The global threat from plastic pollution. *Science*, 373, 61-65.

Manilal, A., Sujith, S., Sabarathnam, B., Kiran, G. S., Selvin, J., Shakir, C., & Lipton, A. P. (2010). Bioactivity of the red algae *Asparagopsis taxiformis* collected from the southwestern coast of India. *Brazilian Journal of Oceanography*, 58, 93-100.

Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., & Kim, S. K. (2014). Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiological Research*, 169, 262-278.

Marinho-Soriano, E., Silva, T. S. F., & Moreira, W. S. C. (2001). Seasonal variation in the biomass and agar yield from *Gracilaria cervicornis* and *Hydropuntia cornea* from Brazil. *Bioresource Technology*, 77, 115-120.

Marion, Z. H., & Hay, M. E. (2011). Chemical defense of the eastern newt (*Notophthalmus viridescens*): Variation in efficiency against different consumers and in different habitats. *PLoS One*, 6(12), e27581.

Martins, A., Vieira, H., Gaspar, H., & Santos, S. (2014). Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: Tips for success. *Marine Drugs*, 12, 1066-1101.

Mayer, A., Guerrero, A. J., Rodríguez, A. D., Tagliatela-Scafati, O., Nakamura, F., & Fusetani, N. (2021). Marine pharmacology in 2016–2017: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Marine Drugs*, 19, 49.

McConnell, O., & Fenical, W. (1977). Halogen chemistry of the red alga *Asparagopsis*. *Phytochemistry*, 16, 367-374.

McConnell, O. J., & Fenical, W. (1978). Ochtodene and ohtodiol: novel polyhalogenated cyclic monoterpenes from the red seaweed *Ochtodes secundiramea*. *The Journal of Organic Chemistry*, 43, 4238-4241.

Mercurio, D. G., Wagemaker, T. A. L., Alves, V. M., Benevenuto, C. G., Gaspar, L. R., & Campos, P. M. (2015). In vivo photoprotective effects of cosmetic formulations containing UV filters, vitamins, Ginkgo biloba and red algae extracts. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 153, 121-126.

Ministério da Saúde (2010). Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. *Revista Saúde Pública*, 44, 200-2.

- Moorthi, P. V., & Balasubramanian, C. (2015). Antimicrobial properties of marine seaweed, *Sargassum muticum* against human pathogens. *Journal of Coastal Life Medicines*, 3, 122-125.
- Neethu, P. V., Suthindhiran, K., & Jayasri, M. A. (2017). Antioxidant and antiproliferative activity of *Asparagopsis taxiformis*. *Pharmacognosy Research*, 9, 238.
- Omae, I. (2003). Organotin antifouling paints and their alternatives. *Applied Organometallic Chemistry*, 17, 81-105.
- Oktaviani, D. F., Nursatya, S. M., Tristiani, F., Faozi, A. N., Saputra, R. H., & Meinita, M. D. N. (2019). Antibacterial Activity From Seaweeds *Turbinaria ornata* and *Chaetomorpha antennina* Against Fouling Bacteria. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 255, 1012045.
- Paul, V. J., Hay, M. E., Duffy, J. E., Fenical, W., & Gustafson, K. (1988). Chemical defense in the seaweed *Ochtodes secundiramea* (Montagne) Howe (Rhodophyta): effects of its monoterpene components upon diverse coral-reef herbivores. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 114, 249-260.
- Paul, V. J. (1992). *Ecological roles of marine natural products*. thaca: Comstock Pub. Associates.
- Paul, V. J., & Puglisi, M. P. (2004). Chemical mediation of interactions among marine organisms. *Natural Product Reports*, 21, 189-209.
- Paul N. A., Cole L., de Nys R. & Steinberg P.D. (2006). Ultrastructure of the gland cells of the red alga *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniaceae) *Journal of Phycology*. 42:637–45.
- Paula, A. F. & Creed, J. C. 2004. Two species of the coral *Tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia) in Brazil: a case of accidental introduction. *Bulletin of Marine Science* 74, 175-183.
- Peckol, P., Krane, J. M., and Yates, J. L. (1996). Interactive effects of inducible defense and resource availability on phlorotannins in the north Atlantic brown alga *Fucus vesiculosus*. *Marine Ecology Progress*. 138, 209–217.
- Pei, M., Jia, X., Zhao, X., Li, J., & Liu, P. (2018). Alginate-based cancer-associated, stimuli-driven and turn-on theranostic prodrug nanogel for cancer detection and treatment. *Carbohydrate Polymers*, 183, 131-139.
- Pereira, R. C., da Silva Costa, E., Sudatti, D. B., & da Gama, B. A. P. (2017). Inducible defenses against herbivory and fouling in seaweeds. *Journal of Sea Research*, 122, 25-33.
- Pereira, R. C., & Soares-Gomes, A. (orgs.)(2021). *Ecologia Marinha*. Interciência, Rio de Janeiro.
- Qian, P. Y., Xu, Y., & Fusetani, N. (2009). Natural products as antifouling compounds: recent progress and future perspectives. *Biofouling*, 26, 223-234.

- Qiu, L. (2014). China's growth fuels boom in World Shipping Traffic. *National Geographic*, 27.
- Quémener, M., Kikionis, S., Fauchon, M., Toueix, Y., Aulanier, F., Makris, A. M. & Hellio, C. (2022). Antifouling Activity of Halogenated Compounds Derived from the Red Alga *Sphaerococcus coronopifolius*: Potential for the Development of Environmentally Friendly Solutions. *Marine Drugs*, 20, 32.
- Rai, M., Ingle, A. P., Gade, A., & Duran, N. (2015). Synthesis of silver nanoparticles by *Phoma gardeniae* and in vitro evaluation of their efficacy against human disease-causing bacteria and fungi. *IET Nanobiotechnology*, 9, 71-75.
- Readman, J. W. (2006). Development, occurrence and regulation of antifouling paint biocides: historical review and future trends. In *Antifouling Paint Biocides*, 1-15.
- Rojas J., Lemus A. & Ganesan E. (1982) El ciclo vital "in vitro" del alga marina roja *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Collins & Hervey (Bonnemaisoniales, Rhodophyta) del Mar Caribe. *Boletín Institucional Oceanográfico*, 21, 101-12.
- Saha, M., Wiese, J., Weinberger, F., & Wahl, M. (2016). Rapid adaptation to controlling new microbial epibionts in the invaded range promotes invasiveness of an exotic seaweed. *Journal of Ecology*, 104, 969-978.
- Salama, A. J., Satheesh, S., & Balqadi, A. A. (2018). Antifouling activities of methanolic extracts of three macroalgal species from the Red Sea. *Journal of Applied Phycology*, 30, 1943-1953.
- Safriel, U. N., Cohen, Y., Erez, N., Gateno, D., Keasar, T., & Dolev, Y. (1993). Biological control of marine biofouling. *Oebalia*, 19, 193-199.
- Schmid, D. (2004). UV-A sunscreen from red algae for protection against premature skin aging. *Cosmetic and Toiletries Manufacture worldwide*.
- Schmid, D., Schürch, C., & Züllli, F. (2006). Mycosporine-like amino acids from red algae protect against premature skin-aging. *European Cosmetics*, 9, 1-4.
- Scuarcialupi, L. N., Pereira, F. C., & Baquero, O. S. (2021). Feline sporotrichosis: social vulnerability and prioritization of geographic areas in Guarulhos, SP, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 58.
- Shannon, E., & Abu-Ghannam, N. (2016). Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of pharmacological mechanisms and applications. *Marine Drugs*, 14, 81.
- Silva, A. G., Lima, R. P., Gomes, A. N., Fleury, B. G., & Creed, J. C. (2011). Expansion of the invasive corals *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea*

tagusensis into the Tamoios Ecological Station Marine Protected Area, Brazil. *Aquatic Invasions*, 6.

Silva, E. C., & Barros, F. (2011). Macrofauna bentônica introduzida no Brasil: lista de espécies marinhas e dulcícolas e distribuição atual. *Oecologia* 15, 326-344.

Silva, P., Fernandes, C., Barros, L., Ferreira, I. C., Pereira, L., & Gonçalves, T. (2018). The antifungal activity of extracts of *Osmundea pinnatifida*, an edible seaweed, indicates its usage as a safe environmental fungicide or as a food additive preventing post-harvest fungal food contamination. *Food & function*, 9, 6187-6195.

Silva, M. S. C. D., & da Silva, F. C. V. (2021). Proposal for the conceptual and historical approach of isomeria content in organic chemistry using a problem situation. *Dynamis*, 27, 20-42.

Soares, A. R., da Gama, B. A. P., da Cunha, A. P., Teixeira, V. L., & Pereira, R. C. (2008). Induction of attachment of the mussel *Perna perna* by natural products from the brown seaweed *Styopodium zonale*. *Marine Biotechnology*, 10, 158-165.

Sotka, E. E., Wares, J. P., & Hay, M. E. (2003). Geographic and genetic variation in feeding preference for chemically defended seaweeds. *Evolution*, 57, 2262-2276.

Spotorno-Oliveira, P., Coutinho, R., & de Souza Tâmega, F. T. (2018). Recent introduction of non-indigenous vermetid species (Mollusca, Vermetidae) to the Brazilian coast. *Marine Biodiversity*, 48, 1931-1941.

Steinberg, P. D. (1989). Biogeographical variation in brown algal polyphenolics and other secondary metabolites: comparison between temperate Australasia and North America. *Oecologia*, 78, 373-382.

Steinberg, P. D., & De Nys, R. (2002). Chemical mediation of colonization of seaweed surfaces. *Journal of Phycology*, 38, 621-629.

Streftaris, N., & Zenetos, A. (2006). Alien marine species in the Mediterranean—the 100 ‘Worst Invasives’ and their impact. *Mediterranean Marine Science*, 7, 87-118.

Subías-Baratau, A., Sanchez-Vidal, A., Di Martino, E., & Figuerola, B. (2022). Marine biofouling organisms on beached, buoyant and benthic plastic debris in the Catalan Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 175, 113405.

Sudatti, D. B., Fujii, M. T., Rodrigues, S. V., Turra, A., & Pereira, R. C. (2018). Prompt induction of chemical defenses in the red seaweed *Laurencia dendroidea*: The role of herbivory and epibiosis. *Journal of Sea Research*, 138, 48-55.

- Tahiluddin, A., & Terzi, E. (2021). Ice-ice disease in commercially cultivated seaweeds *Kappaphycus* spp. and *Eucheuma* spp.: A review on the causes, occurrence, and control measures. *Marine Science and Technology Bulletin*, 10, 234-243.
- Talarico, L. B., & Damonte, E. B. (2007). Interference in dengue virus adsorption and uncoating by carrageenans. *Virology*, 363, 473-485.
- Tello, E., Castellanos, L., Arevalo-Ferro, C., & Duque, C. (2009). Cembranoid diterpenes from the Caribbean sea whip *Eunicea knighti*. *Journal of Natural Products*, 72, 1595-1602.
- Teixeira, V. L., Lima, J. C. R., Lechuga, G. C., Ramos, C. J. B., Pereira, M. C. D. S., Calvet, C. M., & Bourguignon, S. C. (2020). Natural products from marine red and brown algae against *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29, 735-738.
- Tian, F., Li, B., Ji, B., Yang, J., Zhang, G., Chen, Y., & Luo, Y. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry*, 113, 173-179.
- Tintillier, F., Moriou, C., Petek, S., Fauchon, M., Hellio, C., Saulnier, D., & Debitus, C. (2020). Quorum sensing inhibitory and antifouling activities of new bromotyrosine metabolites from the Polynesian sponge *Pseudoceratina* sp. *Marine Drugs*, 18, 272.
- Torres, F. G., & De-la-Torre, G. E. (2021). Environmental pollution with antifouling paint particles: Distribution, ecotoxicology, and sustainable alternatives. *Marine Pollution Bulletin*, 169, 112529.
- Underwood, A. J. (1997). *Experiments in ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance*. Cambridge University Press.
- Venugopal, V. (2016). *Marine Polysaccharides: Food applications*. CRC Press.
- Wahl, M. (1989). Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Marine Ecology Progress Series*, 58, 175-189.
- Wahl, M., & Hay, M. E. (1995). Associational resistance and shared doom: effects of epibiosis on herbivory. *Oecologia*, 102, 329-340.
- Webber, V., Carvalho, S. M. D., Ogliari, P. J., Hayashi, L., & Barreto, P. L. M. (2012). Optimization of the extraction of carrageenan from *Kappaphycus alvarezii* using response surface methodology. *Food Science and Technology*, 32, 812-818.
- Woolard, F. X., Moore, R. E., & Roller, P. P. (1976). Halogenated acetamides, but-3-en-2-ols, and isopropanols from *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trev. *Tetrahedron*, 32, 2843-2846.

- Yang, X. B., Lundeen, P., & Uphoff, M. D. (1999). Soybean varietal response and yield loss caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, 83, 456-461.
- Yebra, D. M., Kiil, S., & Dam-Johansen, K. (2004). Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*, 50, 75-104.
- Zanotti, A.A., Gregoracci, G.B. & Kitahara, M.V (2021). The microbial profile of a tissue necrosis affecting the Atlantic invasive coral *Tubastraea tagusensis*. *Scientific Reports* 11, 9828.
- Zuccarello, G. C., Burger, G., West, J. A., & King, R. J. (1999). A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. *Molecular Ecology*, 8, 1443-1447.
- Zuccaro, A., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Kohlmeyer, J., Draeger, S., & Mitchell, J. I. (2008). Detection and identification of fungi intimately associated with the brown seaweed *Fucus serratus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 931-941.