ISSN 0868-854 (Print); ISSN 2413-5984 (*Online*).
Algologia. 2021. 31(*2*): *170–199*
https://doi.org/10.15407/alg31.02.170

Фітофармакологічне дослідження водорості *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva (*Rhodophyta*) для застосування при оральних захворюваннях

Шаран Л.В., Венніла Дж.Дж.*

Кафедра біотехнології Школи сільського господарства та біологічних наук, Інститут технологій та наук Каруньї (*Університет*), *Коімбатор, Індія*
*jannetvennila@gmail.com

Надійшла до редакції 01.12.2020. Після доопрацювання 06.01. 2020. Підписана до друку 11.02.2021. Опублікована 29.06.2021

Реферат. Наведено результати дослідження фітофармакологічних властивостей морської червоної водорості *Kappaphycus alvarezii*, які можуть бути використані при захворюваннях порожнини рота. Ротові інфекції (гінгівіт та пародонтоз) і рак порожнини рота все частіше трапляються у країнах, що розвиваються. Продукти з протибактеріальною та протиоксидантною активністю можуть забезпечити комбінований підхід до лікування уражень ротової порожнини. Морські водорості є резервуаром багатьох біоактивних сполук і вважаються потенційними кандидатами для використання у природній фармацевтиці. *Kappaphycus alvarezii* – морська водорість, яка широко культивується для харчових потреб. Для екстракції біоактивних компонентів водорості використовували розчинники різної полярності (етанол, етилацетат та хлороформ), фітохімічний аналіз здійснювали методом газової хроматографії/мас-спектрометрії, також вивчали їхню протиоксидантну, протимікробну та цитотоксичну активність. Всі екстракти *K. alvarezii* показали хорошу протиоксидантну активність та потенційну ефективність щодо патогенних мікроорганізмів ротової порожнини. Екстракт на основі етилацетату мав кращу протиоксидантну, протимікробну та цитотоксичну дію порівняно з хлороформними та етанольними екстрактами. Показано, що екстракти *K. alvarezii* є безпечними для нормальних клітин Vero, а їх інгібуюча активність на ракові клітини ротової порожнини (клітинні лінії KB-3-1) виявилася низькою. Ці висновки свідчать про можливість використання *K. alvarezii* у стоматологічній практиці для боротьби з інфекціями порожнини рота.

Ключові слова: *Kappaphycus alvarezii*, морські водорості, захворювання порожнини рота, пародонтит, протиоксидантна, протимікробна та цитотоксична активність

© Шаран Л.В., Венніла Дж.Дж., 2021

Вступ

Здоров'я порожнини рота – важлива складова тривалого та повноцінного способу життя. Здорова ротова порожнина свідчить про здорове тіло, підвищує самооцінку, впевненість у собі та покращує соціальну взаємодію. Захворювання ротової порожнини не обмежуються порожниною рота, вони сприяють розвитку інших хронічних захворювань, таких як діабет, серцево-судинні захворювання, передчасні пологи, низька вага та ревматоїдний артрит. Приблизно 100% дорослих та 60–90% дітей мають проблеми із зубами. Карієс, гінгівіт, пародонтоз, втрата зубів, рак порожнини рота, бактеріальні, грибкові та вірусні інфекції – це лише деякі захворювання порожнини рота, занесені до списку Всесвітньої організації охорони здоров'я. У більшості промислово розвинутих країн чи країн, що розвиваються, хвороби порожнини рота є четвертим вартісним захворюванням, яке підлягає лікуванню (Godha et al., 2015).

Патогенез захворювань порожнини рота пов'язаний з різними причинами, серед яких інфекції, вірулентні білки, вивільнення вільних радикалів та окислювальний стрес, а також загибель/некроз клітин. Бажано, щоб продукти з потужною протибактеріальною та протиоксидантною активністю могли забезпечити комбінований підхід для лікування розладів ротової порожнини (Cherian et al., 2019). Головними проблемами вже існуючих антибіотиків є стійкість до них бактерій та токсичність. Тому виявлення нових протибактеріальних сполук із природних джерел є нагальною необхідністю.

Фітокомпоненти водоростей вважаються потенційними кандидатами для застосування як продукти для здоров'я людини, а також джерелом харчування. Морські водорості – це резервуар цінних біоактивних сполук із різноманітною структурою, що приваблює дослідників великим потенціалом фармацевтичного ринку. Біоактивні сполуки виділяють із водоростей за допомогою органічних розчинників (метанол, етанол, етилацетат, хлороформ бутанол, гексан та ін.). Розчинники на основі вуглецю застосовуються у фармацевтичній, харчовій, косметичній та нафтовій промисловості. Вони відрізняються щільністю, температурою кипіння, змішуваністю, що допомагає виділити широкий спектр біоактивних сполук із природних джерел (Miazek et al., 2017). Дослідження деяких вторинних метаболітів, таких як поліфеноли, терпени, стерини, ацетогеніни, що продукуються морскими макроводоростями, показало широкий спектр їх біологічної активності (Sumayya, Murugan, 2018).

Морська макроскопічна червона водорість *Kappaphycus alvarezii* культивується в Індії, Філіппінах, Китаї, Японії та Кореї для комерційного видобутку каррагенану – полісахариду, який завдяки його желюючим та в'яжучим властивостям використовується у різних галузях харчової та фармацевтичної промисловості. Ця водорість має різноманітні лікувальні

властивості, включаючи протидіабетичну (Nagarani, Kumaraguru, 2012; Cyriac, Eswaran, 2016) та активність α-амілази (Balasubramaniam et al., 2013). Проведені нами біохімічні дослідження виявили, що морський бромофенол, потужний природний метаболіт, присутній у *K. alvarezii*, може стримувати та контролювати вірулентні білки, що виробляються патогеном пародонтозу *Porphyromas gingivalis in vitro* (Cherian et al., 2019). Хоча були проведені різноманітні дослідження *K. alvarezii* з метою вивчення його лікувальної активності, а також фітохімічного складу, досі немає жодного спеціального дослідження, яке б підтвердило медичну активність його фітокомпонентів у захисті ротової системи.

У даному дослідженні основна увага приділена терапевтичному потенціалу *K. alvarezii* у лікуванні захворювань ротової порожнини. Екстракцію з біомаси *K. alvarezii* здійснювали за допомогою розчинників різної полярності, а фітохімічний аналіз проводили методом газової хроматографії/мас-спектрометрії (GC-MS). Протибактеріальна та протиоксидантна активність одержаних екстрактів була досліджена стосовно їх фітохімічних компонентів. Життєздатність клітин та протиракову активність екстрактів *K. alvarezii* вивчали на лініях нормальних клітин (Vero) та клітин раку ротової порожнини (KB-3-1).

Матеріали та методи

Біомаса *Kappaphycus alvarezii* була закуплена в агропромисловій фірмі Prasmo Agro Private limited, Кумбаконам, Тамілнад, Індія, мікроорганізми для вивчення протимікробної активності придбані у MTCC (Колекція культур мікробних типів, Інститут мікробних технологій, Чандігарх, Індія). Задіяні в експериментах мікроорганізми – грампозитивні *Staphylococcus aureus* (MTCC 3160) і *Bacillus subtilis* (MTCC 441), грамнегативні *Escherichia coli* (MTCC 1687), *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 741), *Klebsiella pneumoniae* (MTCC 109) та грибок *Candida albicans* (MTCC 7253) – підтримувалися згідно з протоколом, визначеним Інститутом клінічних та лабораторних стандартів (CLSI). УФ-поглинання зчитували за допомогою спектрофотометра (U-2910 HITACHI УФ-видимий спектрофотометр). Галова кислота, кверцетин, фенольний реагент Фоліна-Чокальтеу (FC), карбонат натрію (Na_2CO_3), нітрит натрію, гексагідрат хлориду алюмінію ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$), гідроксид натрію (NaOH), β-каротин, аскорбінова кислота, нітропрусид натрію, нітросиній тетразолій (NBT), феназин метосульфат (PMS), нікотинамід-аденин-динуклеотид (NADH), 1,1-дифеніл-2-пікрилгідразил (DPPH), перекис водню (H_2O_2), ципрофлоксацин та флуконазолд отримані від компанії Sigma, США.

Підготовка екстракту

Таломи водорості промивали, видаляли епіфіти, висушували в тіні, подрібнювали та зберігали у холодильнику. 25 г порошку *K. alvarezii* екстрагували в апараті Сокслета 250 мл розчинників різної полярності: етанолом (КАЕ), етилацетатом (КАЕА) і хлороформом (КАС). Екстракти фільтрували (фільтрувальний папір Whatman № 1), концентрували (40 °C, роторний вакуумний випарник) і сушили. Висушені екстракти зберігали при -20 °C до подальшого використання. Відсоток виходу екстрактів *K. alvarezii* розраховували за формулою, зазначеною нижче (Akwu et al., 2019):

Відсоток виходу екстракту = (маса висушеного екстракту *K. alvarezii*, г)/ (маса висушеного *K. alvarezii*, г) × 100.

Фітохімічний аналіз

Попередній фітохімічний скринінг екстрактів КАЕ, КАЕА та КАС здійснювали за Banu, Cathrine (2015). Подальше вивчення фітосполук проводили за допомогою мас-спектрометрії/газової хроматографії (GC-MS) (модель Trace GC Ultra та DSQII, Thermo Fisher Scientific Limited). Параметри встановлювали наступним чином: температуру порту форсунки, джерела та інтерфейсу підтримували на рівні 250 °C, 220 °C та 250 °C відповідно. Температуру печі програмували на 2 хв при 70 °C, 150 °C при 8 °C/хв, до 260 °C при 10 °C/хв. Співвідношення розбиття 1 : 50 і використаний інжектор був із режимом без розщеплення. Неполярна колонка з розмірами 0,25 мм ID × 0,25 мкм OD × 30 м довж., придбана в Agilent Co., США. Гелій (газ-носій) поступав зі швидкістю 1 мл/хв. Діапазон сканування мас-спектрометрії 50–650 Да. При 200 °C джерело підтримувалося з тиском вакууму двигуна менше 40. Енергія іонізації – 70eV. Нейтральні частинки були зменшені вбудованим фільтром MS. Для ідентифікації спектру використані дві вбудовані бібліотеки системи даних NIST 4 та WILEY 9, які мали понад 5 млн посилань. З'єднання з досконалими спектральними значеннями ≥ 700 розглядалися лише як позитивна ідентифікація (Ganesh, Vennila, 2011; Rajesh et al., 2016). У сирих екстрактах *K. alvarezii* (КАЕ, КАЕА, КАС) визначали вміст загальних фенолів та флавоноїдів.

Визначення загального вмісту фенолів (TPC)

Загальний вміст фенолів в екстрактах *K. alvarezii* визначали методом реагенту FC (Singleton, 1999). Фенольний реагент FC розбавляли у співвідношенні 1.0 : 10. 5 мл розведеного реагенту та 4 мл Na_2CO_3 (7,5% w/v) додавали до 1 мл різних екстрактів *K. alvarezii* (КАЕ, КАЕА та КАС).

Суміш інкубували у темряві протягом 2 год за кімнатної температури, потім зчитували поглинання спектру при 765 нм за допомогою спектрофотометра. Галову кислоту використовували як стандарт і для калібрування. Всі зразки підготовлені та досліджені в трьох повторностях. Значення TPC виражали як мг еквівалентів галової кислоти (GAE)/г.

Визначення загального вмісту флавоноїдів (TFC)

Загальний вміст флавоноїдів визначали за допомогою колориметричного аналізу хлориду алюмінію (Ling et al., 2015). 1 мл екстрактів *K. alvarezii* змішували з 4 мл дистиляту, додавали 3 мл 5%-го $NaNO_3$, через 5 хв додавали 0,6 мл 10%-ний $AlCl_3 \cdot 6H_2O$. Одержану суміш інкубували 6 хв при кімнатній температурі, потім додавали 2 мл 1 М NaOH. Поглинання вимірювали при 510 нм за допомогою спектрофотометра. TFC розраховували як еквіваленти кверцетину (QE) у мг/г екстракту зразка.

Визначення протиоксидантної активності

Активність вилучення радикалів методом DPPH

Радикал-поглинаючу активність різних екстрактів *K. alvarezii* визначали відповідно до модифікованого протоколу, прийнятого Ling et al. (2015). 100 мкл DPPH (200 мкМ у метанолі) додавали до 100 мкл KAE, KAEA та KAC з різною концентрацією (20–100 мкг/мл) у мікропланшет з 96 лунками. Інкубували протягом 30 хв при кімнатній температурі та вимірювали поглинання при 520 нм з метанолом у якості бланку. Аскорбінову кислоту використовували як позитивний контроль. Активність вилучення радикалів за методом DPPH (A_{DPPH}, %) розраховували наступним чином:

$$A_{DPPH} = (A_{Blank} - A_{Sample})/A_{Blank} \times 100.$$

IC_{50} розраховували за графіком лінійної регресії.

Аналіз вилучення радикалів із використанням оксиду азоту

Аналіз вилучення радикалів із використанням NO визначали за модифікованим протоколом, описаним Pradeep et al. (2018). 50 мкл нітропрусиду натрію (10 мМ), фосфатного буфера (1 мМ) та KAE, KAEA та KAC (20–100 мкг/мл) змішували та інкубували 90 хв при 25 °C. Поглинання зчитували при 546 нм після додавання 100 мкл реагенту Гриса. Активність поглинання радикалів за оксидом азоту (A_{NO}, %) розраховували наступним чином:

$$A_{NO} = (A_{Blank} - A_{Sample}) / A_{Blank} \times 100.$$

IC_{50} розраховували за графіком лінійної регресії.

Активність вилучення радикалів із використанням супероксиду

Активність вилучення радикалу супероксиду (SO) визначали згідно Ramamoorthy et al. (2018). 300 мкМ нітросинього тетразолію (NBT), 60 мкМ феназінметасульфату (ПМС), 468 мкМ NADH (нікотинамід-аденін-динуклеотид) готували в 16 мМ *трис*-HCl-буфері з pH 8,0. 50 мкл NADH, NBT змішували з екстрактами КАЕ, КАЕА та КАС різних концентрацій (20–100 мкг/мл) і поміщали у мікропланшет з 96 лунками. Додавали розчин PMS, який ініціює реакцію окисленням NADH, щоб виділити супероксидний радикал і зменшити NBT. Суміші інкубували при кімнатній температурі протягом 5 хв і зчитували поглинання при 560 нм. Активність вилучення радикалів шляхом інгібування супероксиду (A_{SO}, %) розраховували наступним чином:

$$A_{SO} = (A_{Blank} - A_{Sample}) / A_{Blank} \times 100.$$

IC_{50} розраховували за графіком лінійної регресії.

Аналіз вилучення радикалів із використанням перекису водню

Аналіз вилучення перекису водню (H_2O_2) проводили модифікованим методом, адаптованим до Pradeep et al. (2018). До 20 мкл H_2O_2 (10 мМ) додавали 100 мкл екстрактів КАЕ, КАЕА та КАС різних концентрацій (20–100 мкг/мл) та поміщали у мікропланшет. Додавали фосфатний буфер (100 мкл) pH 5 (0,1 М), інкубували планшет при 37 °С протягом 10 хв, зчитували абсорбцію при 230 нм. Антирадикальну активність за пригніченням реакції перекисного окислення (A_{H2O2}, %) розраховували згідно з наведеним нижче рівнянням:

$$A_{H2O2} = (A_{Blank} - A_{Sample}) / A_{Blank} \times 100.$$

IC_{50} розраховували за графіком лінійної регресії.

Експерименти in vitro

Дослідження протимікробної активності

Для дослідження протимікробної активності було відібрано декілька мікроорганізмів, відомих як збудники хвороб ротової порожнини та внутрішньолікарняних інфекцій. Протибактеріальну та протигрибкову активність різних екстрактів *K. alvarezii* (КАЕ, КАЕА та КАС) визначали методом дифузії агарової свердловини. Стандартні препарати ципрофлоксацин та флуконазол (Sigma-Aldrich) використовували як позитивний контроль для бактерій та грибків відповідно. Культуру вирощували при 37 °С протягом 24 г на поживному бульйонному середовищі (бактерії) при 30 °С протягом 48 г на картопляному середовищі з декстрозою (гриби). Інокуляти готували розчиненням добових культур у фізіологічній суспензії (0,9% NaCl) і регулювали розчин до отримання

каламутності 0,5 за стандартом Мак-Фарленда (106 КУО/мл). Стерилізований агар Мюллера Хінтона виливали на чашку. Після затвердіння агару посівний матеріал наносили на його поверхню за допомогою стерильного ватного тампона. Свердловини діаметром 10 мм робили за допомогою стерильного пробкового бура. У свердловини додавали різні концентрації КАЕ, КАЕА та КАС, розчинених у диметилсульфоксиді (20–100 мкг/мл). Стандартні препарати (40 мкг/мл) додавали у відповідні свердловини. Чашки інкубували протягом 18–24 год при 37 °С (бактерії) або 48 год при 30 °С (гриби). Експеримент проводили у трьох повторностях, спостерігали і вимірювали зону гальмування росту та протимікробну активність (Muhaidat et al., 2015).

Життєздатність клітин та цитотоксичні дослідження

Для вивчення життєздатності клітин та цитотоксичної активності екстрактів *K. alvarezii* (КАЕ, КАЕА та КАС) застосовували 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразолій бромід. Аналіз на тіазоліловий синій (МТТ) був використаний для вивчення життєздатності клітин та цитотоксичної активності екстрактів *K. alvarezii* (КАЕ, КАЕА та КАС) у нормальних (клітинні лінії Vero) та клітинних лініях раку ротової порожнини (KB-3-1). Клітини Vero – це лінія нормальних фібробластів, отриманих від африканської зеленої мавпи, що широко використовується у дослідженнях цитотоксичності, росту та диференціації клітин (Elkady, Ramadan, 2016). Лінія KB-3-1 – це епідермоїдні клітини оральної карциноми людини (Dai et al., 2009). Ці лінії клітин були придбані в Національному науковому центрі раку, Пуна, Індія, підтримувалися і культивувалися у модифікованому середовищі Дульбекко (DMEM), доповненому пеніциліном (100 одиниць/мл), глутаміном (2 мкМ), 10%-ю фетальною бичачою сироваткою (FBS) та стрептоміцином (100 мкг/мл). Потім клітини культивували в інкубаторі вуглекислого газу зі зволоженням 5% при 37 °С.

Клітини лінії Vero та KB 3-1 покривали двома різними 96-лунковими мікропланшетами з плоским дном (1×10^4 клітини на лунку), інкубованими протягом 24 год. Екстракти *K. alvarezii* після дворазового послідовного розведення (100–1,562 мкг/мл) додавали до клітин, інкубували 24 год з подальшим додаванням 10 мкл МТТ та інкубацією протягом 4 год. Середовище викидали, додавали 50 мкл ДМСО і 5–6 разів набирали та випускали піпеткою для розчинення кристалів формазану, що утворилися, для надання фіолетового кольору. Поглинання зчитували при 540 нм. Розрахунки проводили за формулою:

% життєздатності клітин = (середня ОД зразка) / (ОД контролю) × 100.

Була побудована крива доза-реакція концентрації зразка (мкг/мл) проти життєздатності клітин (%). Розраховували значення IC_{50} (концентрація, смертельна для 50% клітин) (Kumar et al., 2018).

Статистичний аналіз

Для порівняння значущості різних екстрактів було проведено однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA), а потім тест Тьюкі. Для порівняння різниці значущості різних екстрактів та контролю використовували критерій Даннета. Концентрацію IC_{50} розраховували за допомогою рівняння нелінійної регресії. Статистичний аналіз проводили за допомогою GraphPad Prism версії 7.00 для програмного забезпечення Windows (Програмне забезпечення GraphPad, La Jolla California, США).

Результати

Водорість *K. alvarezii* екстрагували етанолом (KAE), етилацетатом (KAEA) та хлороформом (KAC). Відсотковий вихід висушеного екстракту з розчинником становив 7,268% (1,817 г), 5,252% (1,313 г) і 5,576% (1,394 г) для KAE, KAEA та KAC відповідно.

Фітохімічний скринінг

Попередній фітохімічний скринінг виявив наявність алкалоїдів, фенолів, стеринів, стероїдів, дитерпеноїдів, флавоноїдів, сапонінів, глікозидів, білків, амінокислот та вуглеводів (рис. 1).

Результати мас-спектрометрії / газової хроматографії (GC-MS) екстрактів *K. alvarezii* свідчать про наявність у них різноманітних летких фітосполук з протибактеріальною та протиоксидантною активністю (табл. 1–3). В екстракті KAE містяться 19 таких сполук, у KAEA – 8, у KAC 11. Ці сполуки з функціональними групами, такими як алкани, алкени, феноли, жирні кислоти, складні ефіри та альдегіди, мають лікувальні властивості.

Загальний вміст фенолу та флавоноїдів

Загальний вміст фенолу (TPC) був помірно вищим у KAC, ніж в інших екстрактах. У екстракті KAEA відмічено найвищий показник загального вмісту флавоноїдів (TFC) (табл. 4).

Дані представлені як середнє значення ± стандартне відхилення (n = 3), статистично значущі при p <0,05. Був проведений однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA), а потім групувальні тести Тьюкі; KAE – етанольний екстракт *K. alvarezii*, KAEA – етилацетатний, KAC – хлороформний. GAE: еквівалент галової кислоти. QE: еквіваленти кверцетину.

Таблиця 1. **Хромато-масс-спектрометричний аналіз фітосполук з етанольного екстракту *Kappaphycus alvarezii* (КАЕ)**

№	Час утримання	Площа піку	Назва	Група	Структура	Молекулярна формула	Молекулярна вага	Біоактивність
1	5,57	0,86	1,1,1,5,5,5-гексафторпентан-3-ол	Галогеновані спирти		$C_5H_6F_6O$	196	Протимікробна, протиракова
2	6.21	1.07	1Н-індол-3-карбоксальдегід (CAS)	Індол-альдегіди		C_9H_7NO	145	Протимікробна
3	6.92	0.64	Метил 3-метил-2-фенілсульфонілбутаноат	Феніл		$C_{12}H_{16}O_3S$	240	Протиоксидантна, протибактеріальна
4	10.00	0.63	3-октилацетат	Похідні жирних кислот		$C_{10}H_{20}O_2$	172	Протимікробна
5	10.35	2.83	Фенол, 2-метил-5-(1-метилетил) (CAS)	Феніл		$C_{10}H_{14}O$	150	Протиоксидантна, протибактеріальна

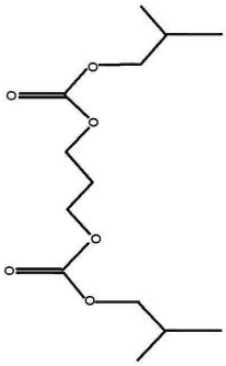
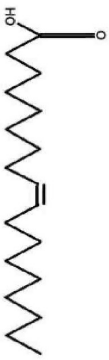
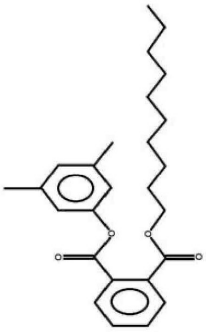
6	17,11	0,73	Бензотрицикло[5.3.0.0. (2,10)] дека-3,5,8-триєн-1-D1	Похідні бензолу		$C_{14}H_{11}D$	180	Протимікробна
7	18,76	4,30	Фітолуацетат	Ефіри		$C_{22}H_{42}O_2$	338	Протимікробна
8	19,78	1,36	3,7,11,15-тетраметил-2-гексадецен-1-ол	Алкани		$C_{20}H_{40}O$	296	Протимікробна
9	23,02	52,78	Етиловий ефір гексадеканової кислоти (CAS)	Метилові ефіри жирних кислот		$C_{18}H_{36}O_2$	284	Протимікробна
10	25,44	0,91	Докозан	Вищі алкани		$C_{22}H_{46}$	310	Протиокси-дантна, протибакте-ріальна
11	26,71	3,32	6,7,8,9-тетрагідро-10-метокси-4-метилбензофуро[2,3, -f] кумарин	Метильовані бензильовані сполуки		$C_{17}H_{16}O_4$	284	Протиракова
12	27,36	1,24	Трикозан	Вищі алкани		$C_{23}H_{48}$	324	Протиокси-дантна, протибакте-ріальна, протиракова
13	28,54	0,98	9-октадеценамід, (Z) (CAS)	Метилові ефіри жирних кислот		$C_{18}H_{35}NO$	282	Протиокси-дантна, протибакте-ріальна, протиракова

14	28,87	1,71	Тетракозан	Вищі алкани		$C_{24}H_{50}$	338	Протиоксидантна, протибактеріальна
15	30,13	2,86	Пентакозан	Вищі алкани		$C_{25}H_{52}$	352	Протиоксидантна, протибактеріальна
16	31,29	1,00	Гексакозан	Вищі алкани		$C_{26}H_{54}$	366	Протиоксидантна, протибактеріальна, Протиракова
17	32,09	0,48	Пальмітоїлхлорид	Жирні кислоти		$C_{16}H_{31}ClO$	274	Протимікробна

Таблиця 2. **Хромато-масс-спектрометричний аналіз фітосполук з етилацетатного екстракту *Kappaphycus alvarezii***

№	Час утримання	Площа піку	Назва	Група	Структура	Молекулярна формула	Молекулярна вага	Біоактивність
1	3,14	1,48	Аланіну 3-антраніло́їл-, метиловий ефір, дл-	Похідні амінокислот		$C_{11}H_{14}N_2O_3$	222	Протиоксидантна, протибактеріальна, лікування хвороб ротової порожнини

2	18,78	31,05	Циклобутан-ацетонітрил 1-метил-2(1-метилетил)-	Метил		$C_{10}H_{15}N$	149	Протиракова
3	23,10	34,32	(2R, 3S, 4S) -3,4-епокси-2-фенілтіооктановий ізомер	Фенольні кетони		$C_{14}H_{20}OS$	236	Протиракова
4	24,22	0,61	3-тетрадециловий ефір 2-фуранкарбонової кислоти	Ефіри		$C_{19}H_{32}O_3$	308	Протиоксидантна, протибактеріальна, лікування хвороб ротової порожнини
5	26,75	2,35	Октадеценова кислота (CAS)	Жирні кислоти		$C_{22}H_{44}O_4$	284	Протиоксидантна, протибактеріальна, лікування хвороб ротової порожнини

6	27,95	0,81	Ізобутилпропан-1,3-диилдикарбонат	Заміщені алкани		$C_{13}H_{24}O_6$	276	Протимікробна
7	28,58	2,32	9-октадеценова кислота (Z) - (CAS)	Жирні кислоти		$C_{18}H_{34}O_2$	282	Протиоксидантна, протибактеріальна
8	37,75	0,54	Децил 3,5-диметилфенілловий ефір фталевої кислоти	Терпеноїди		$C_{26}H_{34}O_4$	410	Протиоксидантна, протибактеріальна, лікування хвороб ротової порожнини

Таблиця 3. **Хромато-масс-спектрометричний аналіз фітосполук з хлороформного екстракту *Kappaphycus alvarezii***

№	Час утримання	Площа піку	Назва	Група	Структура	Молекулярна формула	Молекулярна вага	Біоактивність
1	6.87	1.42	2-метиловий ефір бутенової кислоти	Метилові ефіри жирних кислот		$C_5H_8O_2$	100	Протиокси-дантна, протибакте-ріальна, лікування хвороб ротової порожнини
2	20.98	0.47	1-гексадеканол	Метилові ефіри жирних кислот		$C_{16}H_{34}O$	242	Протиокси-дантна, протибакте-ріальна, лікування хвороб ротової порожнини
3	23.09	10.23	Метил 3-метил-2-фенілсульфонілбутаноат	Феніл		$C_{13}H_{11}NO_2$	213	Протиокси-дантна, протибакте-ріальна
4	25.07	3.58	3-октилацетат	Похідні жирних кислот		$C_{25}H_{36}O_2Si_2$	4242	Протиокси-дантна, протибакте-ріальна

5	26.80	2.45	Фенол, 2-метил-5-(1-метилетил) (CAS)	Феніл		$C_{18}H_{36}O_2$	284	Протиокси-дантна, протибакте-ріальна, лікування хвороб ротової порожнини
6	28.58	0.90	Бензотрицикло[5.3.0.0.(2,10)] дека-3,5,8-триєн-1-D1	Похідні бензолу		$C_{16}H_{32}O_2$	256	Протиокси-дантна, протибакте-ріальна, лікування хвороб ротової порожнини
7	29.61	0.76	Фітолуацетат	Ефіри		$C_{32}H_{26}$	410	Протиокси-дантна, протибакте-ріальна
8	30.16	5.09	3,7,11,15-тетраметил-2-гексадецен-1-ол	Алкани		$C_{25}H_{52}$	352	Протиокси-дантна, протибакте-ріальна, лікування хвороб ротової порожнини

9	33.32	6.03	Етиловий ефір гексадеканової кислоти (CAS)	Метилові ефіри жирних кислот		$C_{24}H_{38}O_4$	390	Протиокси-дантна, протибакте-ріальна
10	36.46	5.23	Етиловий ефір гексадеканової кислоти (CAS)	Метилові ефіри жирних кислот		$C_{18}H_{21}NO$	267	Протиокси-дантна, протибакте-ріальна
11	39.09		6,7,8,9-тетрагідро-10-метокси-4-метилбензофуро[2,3, -f] кумарин	Карбоксилати		$C_{19}H_{27}N_5O_4S$	421	Протиокси-дантна, протиракова

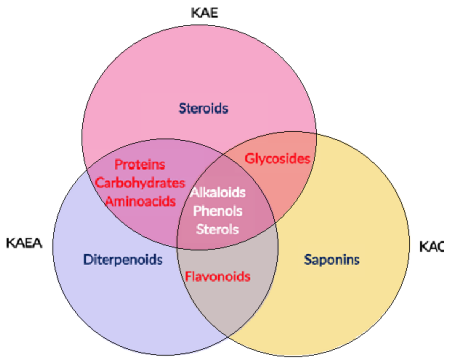


Рис. 1. Результати фітохімічного скринінгу екстрактів *Kappaphycus alvarezii*. KAE – етанольний екстракт; KAEA – етилацетатний; KAC – хлороформний

Таблиця 4. **Загальний вміст фенолу та флавоноїдів в екстрактах *Kappaphycus alvarezii***

Сирий екстракт	Загальний вміст фенолів, мг GAE/г	Загальний вміст флавоноїдів, мг QE/г
KAE	26.802 ± 0.000402	0.0356 ± 0.03
KAEA	26.795 ± 0.000173	0.269 ± 0.04^{ns}
KAC	26.154 ± 0.000574	0.222 ± 0.01^{ns}

Протиоксидантна активність

Протиоксидантна активність екстрактів *K. alvarezii* представлена в табл. 5. Всі екстракти (KAE, KAEA та KAC) показали значно вищу протиоксидантну активність у порівнянні зі стандартною аскорбіновою кислотою.

Таблиця 5. **Протиоксидантна активність екстрактів *Kappaphycus alvarezii***

Екстракт	DPPH (IC_{50} мкг/мл)	NO (IC_{50} мкг/мл)	SO (IC_{50} мкг/мл)	H_2O_2 (IC_{50} мкг/мл)
KAE	52.06 ± 0.21	172.7 ± 0.007	36.75 ± 0.09	23.74 ± 0.06
KAEA	54.02 ± 0.24	240.8 ± 0.21	54.42 ± 0.31	23.88 ± 0.11
KAC	53.55 ± 0.42	140.5 ± 0.13	50.35 ± 0.24	9.603 ± 0.12
Аскорбінова кислота	30.01 ± 0.31	37.82 ± 0.02	20.41 ± 0.05	4.421 ± 0.03

Результати дослідження методом DPPH показали активність вилучення радикалів екстрактами в порядку KAEA > KAC > KAE. Порядок активності в аналізі такий: NOKAEA > KAE > KAC. Аналіз SO виявив активність очищення в порядку KAEA > KAC > KAE. А для аналізу H_2O_2 активність очищення виявлена в порядку KAEA > KAE > KAC.

Значення IC_{50} представлені як середнє значення ± стандартне відхилення (n = 3). Статистичну різницю у значущості отримували шляхом порівняння дії екстрактів *K. alvarezii* з контролем – аскорбіновою кислотою (p < 0,05 ANOVA з подальшими тестами Даннета). KAE – етанольний екстракт *K. alvarezii*, KAEA – етилацетатний, KAC – хлороформний.

Протимікробна активність щодо патогенних мікробів ротової порожнини

Протимікробна активність KAE, KAEA та KAC при концентрації 20 мкг/мл була нульовою. Однак зі збільшенням концентрації до 40 мкг/мл спостерігалося збільшення протимікробної активності проти грам-позитивних і грамнегативних бактерій (рис. 2, 3).

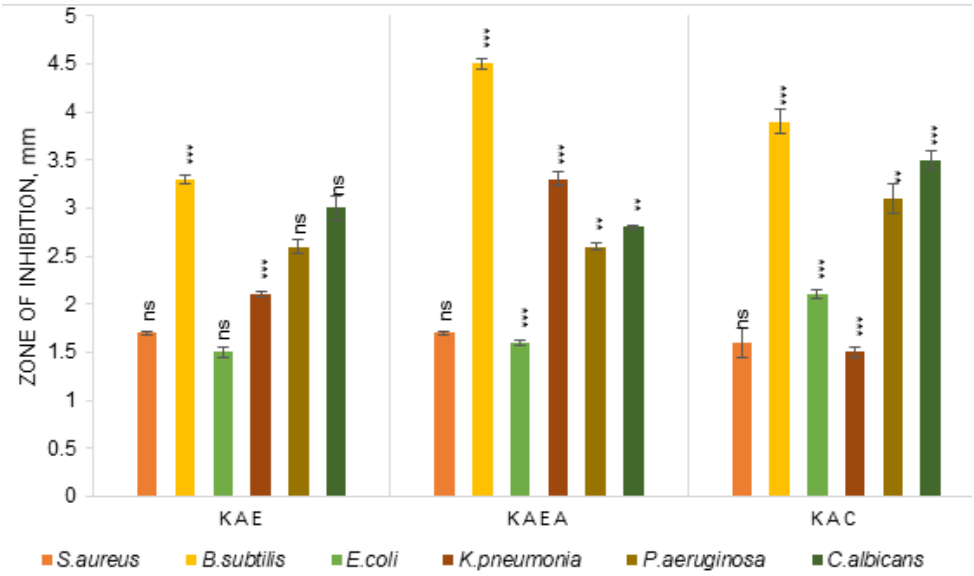


Рис. 2. Протимікробна активність екстрактів *Kappaphycus alvarezii* щодо патогенних мікробів ротової порожнини.

KAE – етанольний екстракт *K. alvarezii*, KAEA – етилацетатний, KAC – хлороформний. Кожна точка виражається як середнє ± стандартне відхилення у трьох повторностях. Статистично значуще p < 0,05. Однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA), потім тест Тьюкі. ** p < 0,01, *** p < 0,001, ns – несуттєві. Протимікробна активність ципрофлоксацину та флуконазолу була надзвичайно високою навіть при найнижчій концентрації, тому не включена до діаграми

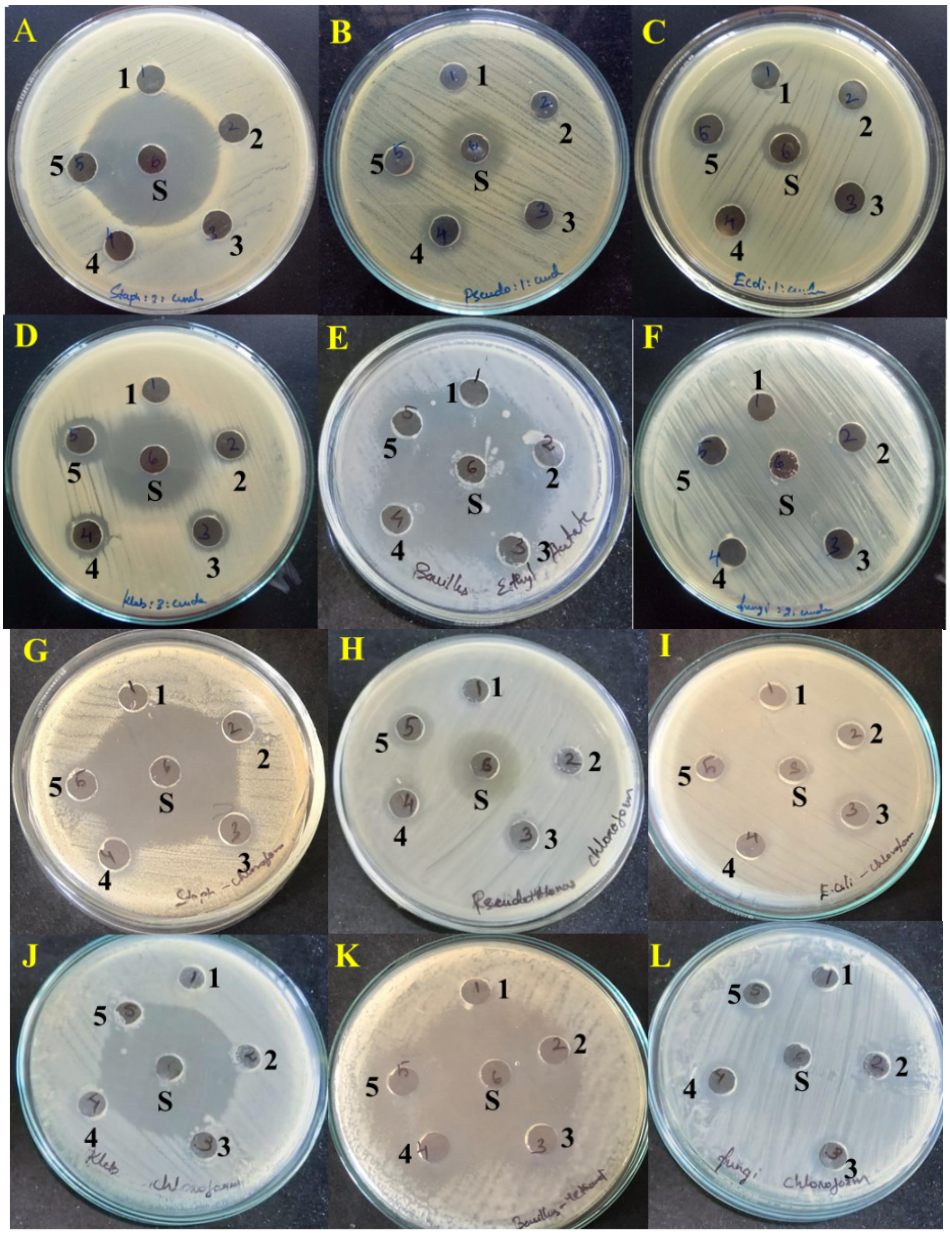
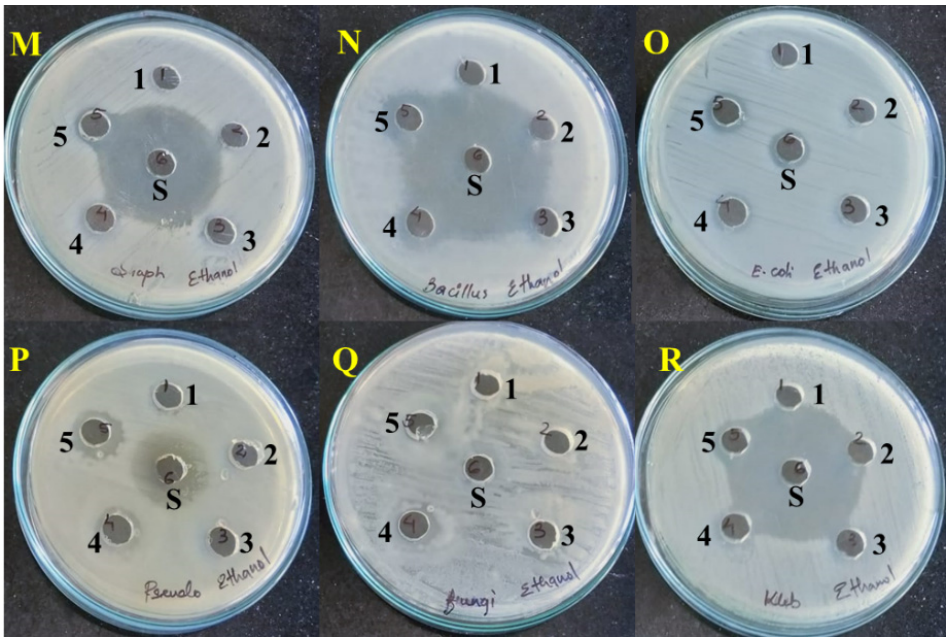


Рис. 3. Протимікробна активність екстрактів *Kappaphycus alvarezii* щодо *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherchia coli, Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Candida albicans*. A – F – екстракт КАЕА, G – L – екстракт КАС,

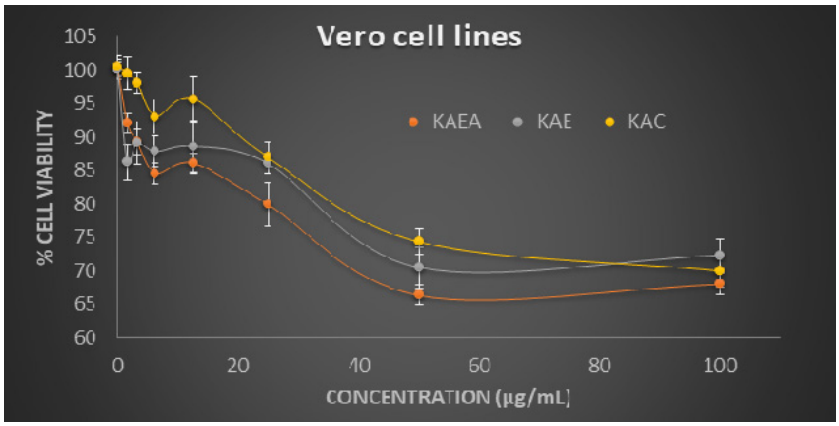


M – R – екстракт КАЕ. Концентрації екстрактів, мкг/мл: *1* – 20; *2* – 40; *3* – 60; *4* – 80; *5* – 100. S – стандартні препарати ципрофлоксацин та флуконазол використовували як позитивний контроль для бактерій та грибів відповідно

Однак активність тестованих екстрактів *K. alvarezii* була меншою, ніж у стандартних препаратів ципрофлоксацин та флуконазол. КАЕА був більш ефективним проти *Bacillus subtilis* та *Klebsiella pneumonia*, а КАС більш ефективним проти *B. subtilis* та *Candida albicans*. Стосовно *Staphylococcus aureus* протимікробна активність усіх екстрактів була однаковою.

Дослідження цитотоксичності

Аналіз цитотоксичності проводили для оцінки токсичності одержаних екстрактів шляхом моніторингу росту клітин в умовах *in vitro*. Цитотоксичність екстрактів КАЕ, КАЕА та КАС на клітинних лініях Vero та KB-3-1 визначали за допомогою аналізу МТТ. Як видно з рис. 4 і табл. 6, екстракт КАЕ показав більший відсоток життєздатності клітин у нормальних клітинах Vero (IC_{50} мкг/мл: 178,87 ± 0,112), за ним КАЕА (IC_{50} мкг/мл: 151,95 ± 0,123) та КАС (IC_{50} мкг/мл: 149,48 ± 0,322). Встановлено, що цитотоксична дія екстрактів *K. alvarezii* має порядок КАЕА > КАС > КАЕ.



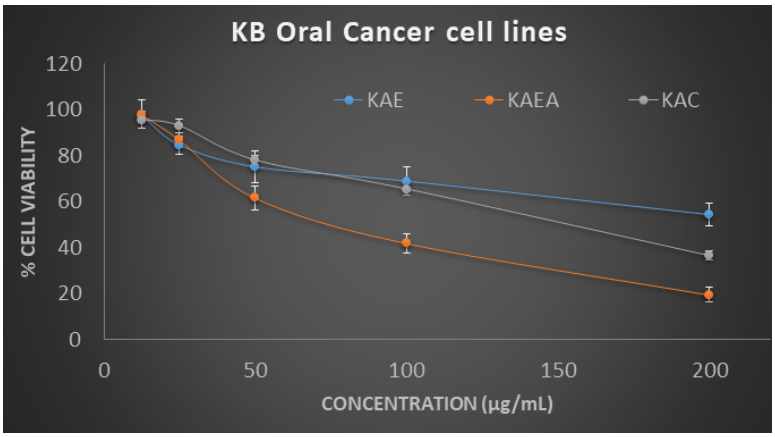


Рис. 4. Цитотоксична активність екстрактів *Kappaphycus alvarezii* щодо ліній нормальних клітин (Vero) та клітин раку ротової порожнини (KB 3-1)

Таблиця 6. **Показники IC_{50} при дії екстрактів *Kappaphycus alvarezii* на лінії нормальних клітин (Vero) та клітин раку ротової порожнини (KB 3-1)**

Екстракт	IC_{50} мкг/мл для ліній клітин	
	Vero	KB-3-1
KAE	178,87 ± 1,12	209,010 ± 2,1
KAEA	151,95 ± 2,45	106,705 ± 4,1
KAC	149,48 ± 2,01^{ns}	156,074 ± 1,9

KAE – етанольний екстракт *K. alvarezii*, KAEA – етилацетатний, KAC – хлороформний. Дані виражені як половина інгібуючої концентрації (IC_{50}). Кожна точка виражається як середнє ± стандартне відхилення у трьох повторностях. ANOVA, потім ANOVA, потім тест Тьюкі. ** $p < 0{,}01$, *** $p < 0{,}001$, ns – несуттєві.

На основі отриманих результатів проведено порівняльний аналіз біоактивності екстрактів *K. alvarezii* для застосування при захворюваннях порожнини рота. Їх було ранжировано за зростанням (табл. 7). Екстракт КАЕА виявився більш ефективним, ніж КАЕ та КАС.

Таблиця 7. **Ранжування біоактивності екстрактів *Kappaphycus alvarezii* щодо патогенів**

№	Біологічна активність	КАЕ	КАЕА	КАС
1	Загальний вміст фенолу (TPC)	1	2	3
2	Загальний вміст флавоноїдів (TFC)	1	1	2
Протиоксидантна активність				
3	DPPH	3	1	2
4	NO	2	1	3
5	SO	3	1	2
6	H_2O_2	2	1	3
Протимікробна активність				
7	Грам негативні бактерії	3	1	2
8	Грам позитивні бактерії	3	2	1
9	Гриби	3	2	1
10	Безпека нормальних клітин (життєздатність клітин Vero)	1	2	3
11	Чутливість до клітин раку ротової порожнини (цитотоксичність щодо клітин KB)	3	1	2

Обговорення

Морські водорості – це автотрофні організми, які містять широкий спектр біоактивних молекул, таких як алкалоїди, ліпіди, стерини, хініни, пептиди, полісахариди, дитерпеноїди, флоротаніни, полікетиди, гліцерини та феноли. Окрім антиоксидантів виявлені різні фенольні сполуки, що мають значну фармакологічну активність (West, Crawford, 2016; Zhou et al., 2017). Морські червоні водорості також можна віднести до категорії організмів, що мають багато фітохімічних властивостей (Shameel et al., 2013). Результати дослідження екстрактів *K. alvarezii* показали його ефективність

in vitro проти захворювань порожнини рота. Всі екстракти *K. alvarezii* показали хорошу протиоксидантну активність та потенційну ефективність щодо патогенних мікроорганізмів ротової порожнини. Це може бути пов'язано з високим вмістом флавоноїдів та фенольних сполук.

Відомо, що феноли виявляють потужну протизапальну, протиоксидантну активність, що робить їх важливими терапевтичними засобами при захворюваннях порожнини рота (Cory et al., 2018). Загальний вміст фенолів (TPC) в екстрактах *K. alvarezii* становив 26,8–27,2 мг GAE/г. Флавоноїди – це підгрупи фенольних сполук, що мають протигрибкову та протибактеріальну дію (Seleem et al., 2017). Загальний вміст флавоноїдів (TFC) порівняно вищий у KAEA (0,269 ± 0,04 мг QE/г), ніж у KAC (0,222 ± 0,01 мг QE/г). Раніше повідомлялося про високий вміст флавоноїдів у водних та етилацетатних екстрактах (Lalopua et al., 2011; Kanatt et al., 2016) і що флавоноїди морських водоростей мають різну біологічну активність, включаючи гасіння вільних радикалів (Munir et al., 2013). GC-MS-аналіз KAEA дозволив виявити наявність низки сполук (аланін, 3-антранілоїл-, метиловий ефір, 2-фуранкарбонової кислоти 3-тетрадециловий ефір, октадеканову кислоту, ізобутил-пропан-1,3-дііл-дикарбонат, фталевої кислоти децилoвий 3,5-диметилфеніловий ефір, циклобутанацетонітрил, 1-метил-2-(1-метил-етенил), 2R, 3S, 4S)-3,4-епокси-2-фенілтіооктановий ізомер), які мають потужну активність при лікуванні різних розладів, включаючи захворювання порожнини рота.

Встановлено, що етилацетат є кращим розчинником для вилучення дитерпеноїдів, які є середньополярними сполуками (рис. 1). Дитерпени пригнічують ріст ротових бактерій, відповідальних за такі патології, як ендодонтичні інфекції та карієс зубів (Veneziani et al., 2017). Фітосполуки із родзинок, такі як тритерпени, жирні кислоти, амінокислоти, флавоноїди, олеанолова кислота, 5-(гідроксиметил)-2-фурфура, 5-гідроксиметил-2-фуральдегід, олеаноловий альдегід, зупиняють ріст біоплівки, утвореної *Porphyromas gingivalis*, пародонтопатоген червоного комплексу (Chinsembu, 2016). Децил 3, 5-диметилфеніловий ефір фталевої кислоти, похідний дитерпенів, який виявлено нами в екстракті KAEA, за даними Beulah et al. (2018), може мати протибактеріальну активність. Він також використовується для покриття деяких пероральних препаратів (Lara et al., 2017; Rasmussen et al., 2017). 2-фуранкарбонової кислоти 3-тетрадециловий ефір також використовується як фунгіцид та бактерицид. Серед виявлених сполук октадеканова (або стеаринова) кислота має протизапальні, протиракові, протигістамінні та протиекземічні властивості, широко використовується в стоматології та косметології (Yamuna et al., 2017). Pramitha et al. (2016) встановили, що етилацетатна фракція морської водорості *Sargassum wightii* містить октадеценову кислоту.

Протиоксидантна активність – це здатність запобігати або затримувати руйнівні ефекти, спричинені вільними радикалами. Деякі комерційно доступні антиоксиданти (бутильований гідроксиланізол (BHA), аскорбат, α-токоферол, пропілгалат) хімічно синтезуються і можуть викликати побічні ефекти, зокрема пошкодження печінки. Це змушує дослідників до активного пошуку нових антиоксидантів з природних джерел. Морські водорості є багатим джерелом таких сполук, все ще недостатньо досліджених. Вільні радикали значною мірою утворюються у морських водоростях, що зазнають дії світла та кисню як фотосинтезуючі організми. Це, в свою чергу, стимулює синтез багатьох протиоксидантних метаболітів для подолання пошкоджень внаслідок окислення (Chaula et al., 2019). Triphati et al. (2019) повідомляють про використання лікопену з морських водоростей – каротиноїдного пігменту з протиоксидантною властивістю, в десять разів більшою, ніж мають альфа-токоферол, сечова кислота та екстракт зеленого чаю, які є активними сполуками у боротьбі із запаленням ясен. Окислювальний стрес викликає різні захворювання порожнини рота, такі як підслизовий фіброз порожнини рота, лейкоплакія та рак порожнини рота.

Антиоксиданти з природних джерел, такі як вітамін С, селен, цинк, β-каротин, лікопін, куркумін, епігалгалотехін-3-галлат, катехіни, мають терапевтичний ефект при лікуванні раку порожнини рота, кандидозу ротової порожнини, пародонтозу та гінгівіту (Vyas et al., 2018). Ці речовини допомагають стримати активність вільнорадикальних або реактивних форм кисню, полегшуючи запалення тканин ясен (San et al., 2011). Протиоксидантна активність морських водоростей залежить від кількості та положення гідроксильної групи на ароматичному кільці (Zolotareva et al., 2019). Всі екстракти *K. alvarezii* (KAE, KAEA та KAC), що містять потужні фітосполуки, виявляли вищу протиоксидантну активність порівняно зі стандартом – аскорбіновою кислотою.

Також встановлено, що екстракт на основі етилацетату (KAEA) має кращу протиоксидантну, протимікробну та цитотоксичну активність, ніж хлороформний (KAC) та етанольний (KAE) екстракти. Попередні дослідження *K. alvarezii* (Sumayya, Murugan, 2017) показали подібну протиоксидантну активність.

Ротова порожнина має безліч патогенних та непатогенних аеробних та анаеробних мікробів. Хвороби ротової порожнини, включаючи карієс зубів, пародонтоз, гінгівіт, молочницю ротової порожнини та виразковий гінгівіт, виникають через велике скупчення патогенних мікробів. Ці мікроби продукують прозапальні цитокіни, що призводить до набряків, кровотечі, ерозії ясен, поглиблення дірок у зубах та їх втрату. Ротові мікроби також відповідають за інші хронічні розлади, такі як аутоімунні і серцево-судинні захворювання, ревматоїдний артрит (Sharan, Vennila,

2019). *Staphylococcus aureus* – це грампозитивні інфекційні бактерії, що містяться у ротовій порожнині та верхніх дихальних шляхах. *Bacillus subtilis* також міститься у шлунково-кишковому тракті людини. *Escherchia coli* знаходиться в кишечнику і викликає діарею через заражену їжу та воду. *Pseudomonas aeruginosa* викликає інфекції сечовивідних шляхів та шлунково-кишкового тракту. *Klebsiella pneumoniae* – кишкова бактерія, яка може спричинити інфекції, якщо вона поширюється в кров або дихальні шляхи. Відомо, що *Candida albicans* викликає інфекції у людей, включаючи кандидоз порожнини рота. Повідомлялося про присутність в ротовій системі численних аеробних мікробів, що належать до родів *Streptococcus* і *Staphylococcus*, *C. albicans* та *E. coli* (Daniluk et al., 2006). В останні роки дослідники активно вивчали біоактивні сполуки, отримані з морських водоростей, і досліджували їх терапевтичну активність проти патогенних мікробів (El Gamal, 2011).

Наші дослідження показали, що екстракти *K. alvarezii* (КАЕ, КАЕА та КАС) виявляють протимікробну активність проти згаданих вище грибів та бактерій. КАЕА виявився ефективнішим, ніж *Bacillus subtilis* і *Klebsiella pneumonia*, а КАС ефективнішим за *B. subtilis* та *C. albicans*. Протимікробна активність усіх екстрактів для *S. aureus* була однаковою. У попередньому дослідженні (Jennifer et al., 2015) висловлювалося припущення, що протимікробна активність екстрактів *K. alvarezii* може бути пов'язана з наявністю в них фітосполук, таких як хініни та феноли. Seetharaman et al. (2016) повідомляли про подібну протибактеріальну активність метанольного екстракту *K. alvarezii* щодо *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* та *P. vulgaris*.

Встановлено, що екстракти *K. alvarezii* є безпечними щодо життєздатності клітин та цитотоксичної дії на нормальні клітини. КАЕ мав найвищий відсоток життєздатності клітин у нормальних клітинах Vero (IC_{50} мкг/мл: 178,87 ± 0,112), за ним КАЕА (IC_{50} мкг/мл: 151,95 ± 0,123) та КАС (IC_{50} мкг/мл: 149,48 ± 0,322). Ці значення IC_{50} були вищими за значення стандартного препарату цисплатин (хіміотерапевтичний препарат для лікування запущеного плоскоклітинного раку ротової порожнини) у клітинах Vero (76,69 мкг/мл; Andreadis et al., 2003), які визнані безпечними для нормальних клітин. Тому було рекомендовано тривале вживання екстракту *K. alvarezii* для підвищення протиоксидантного потенціалу та захисту від перекисного окислення ліпідів тканин та пошкодження клітин (Nagarani, Kumaraguru, 2012).

Екстракти *K. alvarezii* викликали дуже слабке пригнічення росту клітин раку ротової порожнини (клітинні лінії KB-3-1). Про цей низький цитотоксичний ефект свідчать вищі значення IC_{50} (КАЕА: 106705 ± 0,41 мкг/мл, КАС: 156,074 ± 0,19 мкг/мл і КАЕ: 209 ± 0,21) мкг/мл) порівняно з дією цисплатину у клітинах KB-3-1 (6,90 мкг/мл) (Campos et

al., 2017). Інші автори також відмічали низький цитотоксичний ефект екстрактів *K. alvarezii* на інші лінії клітин раку, такі як лінія раку шийки матки HeLa (Lau et al., 2014) та лінія клітин гепатоми HepG2 (Ariffin et al., 2014). Однак за іншими даними (Chang et al., 2017), екстракти *K. alvarezii* викликали зменшення росту клітин MCF-7 (клітинна лінія раку молочної залози) з 84,91 до 0,81%, а значення IC_{50} становило 4,1 ± 0,69 мг/мл. При дослідженні очищеного полісахариду каппа-каррагінан, отриманого з *K. alvarezii*, також було виявлено протиракову активність стосовно B16F10 (клітинна лінія раку меланоми) та 4T1 (клітинна лінія раку молочної залози), що несуть моделі мишей-ксенотрансплантатів (Kiruba et al., 2018). Ці результати свідчать про те, що, хоча екстракти *K. alvarezii* не ефективні для інгібування росту клітин раку порожнини рота, вони можуть бути ефективними при інших видах раку, таких як рак молочної залози. Подальші цитотоксичні дослідження з очищеною фракцією активних сполук з екстрактів *K. alvarezii* доможуть прояснити питання пригнічення швидкості росту ракових клітин.

Висновки

Отримані результати досліджень свідчать про можливість застосування екстрактів червоної водорості *Kappaphycus alvarezii* при захворюваннях порожнини рота. Використання фітосполук *K. alvarezii* при виробництві стоматологічних товарів, таких як гелі для порожнини рота, освіжувач дихання, рідина для полоскання рота, зубна паста, а також продуктів харчування та напоїв, допоможе підтримати здоров'я зубів споживачів цих продуктів. Але для підтвердження цих фактів потрібні ще дослідження *in vivo*. Хоча в стоматологічних програмах використовується обмежений набір речовин з морських водоростей, необхідно покращувати режим подальшого контролю та проводити відповідні дослідження для стандартизації доступності *K. alvarezii* у стоматологічних продуктах та вивчення його ефектів.

Список літератури

Akwu N.A., Naidoo Y., Singh M., Nundkumar N., Lin J. 2019. Phytochemical screening, *in vitro* evaluation of the antimicrobial, antioxidant and cytotoxicity potentials of *Grewia lasiocarpa* E.Mey. ex Harv. *South Afr. J. Bot.* 123: 180–192.

Andreadis C., Vahtsevanos K., Sidiras T., Thomaidis I., Antoniadis K., Mouratidou D. 2003. 5-Fluorouracil and cisplatin in the treatment of advanced oral cancer. *Oral Oncol.* 39: 380–385.

Ariffin F.D., Abdullah A., Meng C.K., Ariffin S.H., Sahani M. 2014. Cytotoxic effect of red seaweeds *Kappaphycus alvarezii* and *Kappaphycus striatum* on hepatocarcinoma HepG2 cell line. *Adv. Environ. Biol.* 8(15): 79–84.

Balasubramaniam V., Mustar S., Mustafa K.N., Abd R.A., Mohd N.M.F., Wilcox M.D., Chater P.I., Brownlee I.A., Pearson J.P. 2013. Inhibitory activities of three Malaysian edible seaweeds on lipase and α-amylase. *J. Appl. Phycol.* 25: 1405–1412.

Banu K., Cathrine L. 2015. General techniques involved in phytochemical analysis. *Int. J. Adv. Res. Chem. Sci.* 2: 25–32.

Beulah G.G.P., Tresina Soris P., Mohan V.R. 2018. GC-MS Determination of Bioactive Compounds of *Dendrophthoe falcata* (L.F) Ettingsh: An Epiphytic Plant. *Int J Health Sci Res.* 8: 261–269.

Campos F.F., Ramos J.P., De Oliveira D.M., Alves T.M., De Souza-Fagundes E.M., Zani C.L., Sampaio F.C., Converti A., Cota B.B. 2017. *In vitro* leishmanicidal, antibacterial and antitumour potential of anhydrocochlioquinone A obtained from the fungus *Cochliobolus* sp., *J. Biosci.* 42(4): 657–664.

Chang V.S., Okechukwu P.N., Teo S., Sen. 2017. The properties of red seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) and its effect on mammary carcinogenesis. *Biomed. Pharm.* 87: 296–301.

Chaula D., Laswai H., Chove B., Dalsgaard A., Mdegela R., Jacobsen C., Hyldig G. 2019. Effect of clove (*Syzygium aromaticum*) and seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) water extracts pretreatment on lipid oxidation in sun-dried sardines (*Rastrineobola argentea*) from Lake Victoria, Tanzania. *Food Sci. Nutr.* 7: 1406–1416.

Cherian C., Vennila J.J., Sharan L. 2019. Marine bromophenols as an effective inhibitor of virulent proteins (peptidyl arginine deiminase, gingipain R and hemagglutinin A) in *Porphyromas gingivalis*, *Arch. Oral Biol.* 100: 119–128.

Chinsembu K.C. 2016. Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral health. *Acta Trop.* 154: 6–18.

Cory H., Passarelli S., Szeto J., Tamez M., Mattei J. 2018. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Front. Nutr.* 5: 1–9.

Cyriac B., Eswaran K. 2016. Anti- hyperglycemic effect of aqueous extract of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) doty ex. p. silva in alloxan-induced diabetic rats. *J. Appl. Phycol*. 28: 2507–2513.

Dai Chun-Ling, Yong-Ju, Liang, Yan-Sheng Wang, Amit K.T., Yan-Yan Yan, Fang Wang, Zhe-Sheng Chen, Xiu-Zhen Tong, Li-Wu Fu. 2009. Sensitization of ABCG2-overexpressing cells to conventional chemotherapeutic agent by sunitinib was associated with inhibiting the function of ABCG2. *Cancer letters*. 279: 74–83.

Daniluk T., Tokajuk G., Cylwik-Rokicka D., Rozkiewicz D., Zaremba M.L., Stokowska W. 2006. Aerobic and anaerobic bacteria in subgingival and supragingival plaques of adult patients with periodontal disease. *Adv. Med. Sci.* 51: 81–85.

El Gamal A.A. 2011. Biological Importance of Marine Algae. Handbook of Marine Macroalgae. *Saudi Pharm. J.* 18: 1–35.

Elkady A.I., Ramadan W.S. 2016. The aqueous extract of cinnamon bark ameliorated cisplatin-induced cytotoxicity in vero cells without compromising the anticancer efficiency of cisplatin. *Biomed. Papers J. Palacký Univ. Olomouc, Faculty of Medicine and Dentistry, Olomouc, Czech Republic.* 160: 363–371.

Ganesh S., Vennila J.J. 2011. Phytochemical analysis of *Acanthus ilicifolius* and *Avicennia officinalis* by GC-MS. *Res. J. Phytochem.* 5(1): 60–65.

Godha S., Dasar P.L., Sandesh N., Mishra P., Kumar S., Balsaraf S., Bhadauria U.S., Vyas S. 2015. Oral Health: A Window to your Overall Health. *Int. J. Oral Health Med. Res.* 2: 105–108.

Jennifer N., Kiruba M., Pradeep M.A., Jemima S., Juliana B. 2015. Study of Phytoconstituents and antibacterial activity of *Kappaphycus alvarezii*. *Int. J. Cur. Microbiol. App. Sci.*4: 1209–1217.

Kanatt S.R., Lahare P., Chawla S.P., Sharma A. 2016. *Kappaphycus alvarezii*: Its antioxidant potential and use in bioactive packaging films. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 5: 1–6.

Kiruba N.J., Pradeep M.A., Thatheyus A.J. 2018. Discovering Promising Anti-cancer Drug Candidates from Marine Algae. *Sci. Int.* 6(2): 44–50.

Kumar U.S., Jothy S.L., Kavitha N., Chen Y., Kanwar J.R., Sasidharan S. 2018. Genoprotection and Cytotoxicity of *Cassia surattensis* Seed Extract on Vero Cell Evaluated by Comet and Cytotoxicity Assays. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *India*, *Sect. B: Biol. Sci.* 88: 313–320.

Lalopua V.P., Purnomo H., Sukoso, Aulani'am. 2011. Red seaweed (*Kappaphycus alvarezii* DOTY) from Mollucas island water as potential flavonoid resource of natural antioxidant, *Livest. Res. Rural Dev.* 23: 254.

Lara N.L., van den Driesche S., Macpherson S., França L.R., Sharpe R.M. 2017. Dibutyl phthalate induced testicular dysgenesis originates after seminiferous cord formation in rats. *Sci. Rep.* 7(1): 1–3.

Lau T.Y., Vittal D.F., Chew C.S.Y., Yong W.T.L. 2014. Antiproliferative Potential of Extracts from Kappaphycus Seaweeds on HeLa Cancer Cell Lines. *Sains Malays.* 43: 1895–1900.

Ling A.L.M., Yasir S., Matanjun P., Abu Bakar M.F. 2015. Effect of different drying techniques on the phytochemical content and antioxidant activity of *Kappaphycus alvarezii*. *J. Appl. Phycol.* 27: 1717–1723.

Miazek K., Kratky L., Sulc R., Jirout T., Aguedo M., Richel A., Goffin D. 2017. Effect of organic solvents on microalgae growth, metabolism and industrial bioproduct extraction: a review. *Int. J Mol. Sci.* 18(7): 1429.

Muhaidat R., Al-Qudah M.A., Samir O., Jacob J.H., Hussein E., Al-Tarawneh I.N., Bsoul E., Abu Orabi S.T. 2015. Phytochemical investigation and in vitro antibacterial activity of essential oils from *Cleome droserifolia* (Forssk.) Delile and *C. trinervia* Fresen. (*Cleomaceae*). *South Afr. J. Bot.* 99: 21–28.

Munir N., Sharif N., Naz S., Farkhanda M. 2013. Algae: A potent antioxidant source. *Sky J. Microbiol. Res.*1: 22–31.

Nagarani N., Kumaraguru A.K. 2012. Investigation of the effect of *K. alvarezii* on antioxidant enzymes, cell viability and DNA damage in male rats. *Front Life Sci.* 6: 97–105.

Pradeep C.K., Channarayapatna-Ramesh S., Kujur S., Basavaraj G.L., Madhusudhan M.C., Udayashankar A.C. 2018. Evaluation of in vitro Antioxidant Potential of *Phyllanthus acidus* Fruit. *Res. J. Life Sci., Bioinfo., Pharm. and Chem. Sci.* 4: 30–41.

Pramitha V.S., Sree Kumari N. 2016. Anti-inflammatory, antioxidant, phytochemical and GC-MS analysis of marine brown macroalga*, Sargassum wightii*. *Int. J. Pharm. Chem. Biol. Sci.* 6(1): 7–15.

Rajesh K.D., Vasantha S., Panneerselvam A., Valsala R.N., Jeyathilakan N. 2016. Phytochemical Analysis, *in vitro* Antioxidant Potential and Gas Chromatography-Mass Spectrometry Studies of *Dicranopteris Linearis*, *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 9(2): 1–6.

Ramamoorthy S., Gnanakan A., Lakshmana S., Meivelu M., Jeganathan A. 2018. Structural characterization and anticancer activity of extracellular polysaccharides from ascidian symbiotic bacterium *Bacillus thuringiensis*, *Carbohydr. Polym.* 190: 113–120.

Rasmussen L.M., Sen N., Vera J.C., Liu X., Craig Z.R. 2017. Effects of *in vitro* exposure to dibutyl phthalate, mono-butyl phthalate, and acetyl tributyl citrate on ovarian antral follicle growth and viability. *Biol. Reprod.* 96(5): 1105–1117.

San S.M., Opperman L.A., Allen E.P., Svoboda K.K. 2011. Use of antioxidants in oral healthcare. *Compendium of continuing education in dentistry* (Jamesburg, NJ: 1995). 32(9): E156–159.

Seetharaman S., Indra V., Selva Muthu B., Daisy A., Geetha S. 2016. Phytochemical profiling and Antibacterial potential of *Kappaphycus alvarezii* methanol extract against clinical isolated bacteria. *World J. Pharm. Pharmctol. Sci.* 5(6): 1328–1337.

Seleem D., Pardi V., Murata R.M. 2017. Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-Candida albicans activity *in vitro*. *Arch. Oral Biol.* 76: 76–83.

Shameel M., Afaq-Husain S., Zarina A. 2013. Phycochemical studies on seven species of *Rhodophycota* from Karachi coast of Pakistan. *Int. J. Algae*. 15(3): 285–290.

Sharan L., Vennila J. 2019. Marine algae as a promising natural resource in treating Periodontitis: Current status and applications. *Res. J. Biotechnol.* 14: 71–82.

Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. *Methods Enzymol.* 299: 152–178.

Sumayya S., Murugan K. 2017. Phytochemical screening, RP-HPLC and FTIR Analysis of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C.Silva: Macro red algae. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 6: 325–330.

Sumayya S., Murugan K. 2018. Fractionationation of purified terpenoids from red algae *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V.Lamouroux. and *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C. Silva. By Gc: Ms analysis*. J. Pharm. Phytochem.* 7: 636–640.

Tripathi P., Vikram B., Preeti U., Manika J., Shweta G., Sadaf N. 2019. Antioxidant therapy (lycopene and green tea extract) in periodontal disease: A promising paradigm*, J. Indian Soc. Periodontol.* 23: 25.

Veneziani R.C.S., Ambrósio S.R., Martins C.H.G., Lemes D.C., Oliveira L.C. 2017. Chap. 4 – Antibacterial Potential of Diterpenoids. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 54: 109–139.

Vyas T., Sood P., Kaur M. 2018. Antioxidants in Oral Diseases and Future Prospects and their Application in Dentistry. *J. Adv. Med. Dent. Sci. Res.* 6: 53–62.

West K., Crawford A. 2016. Marine Bio discovery Goes Deeper: Using In. Vivo Bioassays Based on Model Organisms to Identify Biomedically Relevant Marine Metabolites. *Planta Med*. 82: 754–760.

Yamuna P., Abirami P., Vijayashalini P., Sharmila M. 2017. GC-MS analysis of bioactive compounds in the entire plant parts of ethanolic extract of *Gomphrena decumbens* Jacq. *J. Med. Plants Stud.* 5(3): 31–37.

Zhou Y., Zhang W., Liu X., Yu H., Lu X., Jiao B. 2017. Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatase 1B from Marine Natural Products. *Chem. Biodivers.* 14: e1600462.

Zolotareva E.K., Mokrosnop V.M., Stepanov S.S. 2019. Polyphenol Compounds of Macroscopic and Microscopic Algae. *Int. J. Algae*. 21(1): 5–24. https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v21.i1.10

Підписав до друку С.Шалигін

Sharan L.V., Vennila J.J. 2021. **Phyto-pharmacological investigation of algae *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva for oral diseases (*Rhodophyta*)**. *Algologia*. 31(2): 170–199

Department of Department of Biotechnology, School of Agriculture and Biosciences,
Karunya Institute of Technology & Sciences (Deemed University), Coimbatore, India

Oral infections (gingivitis and periodontitis) and oral cancer are under rise in developing countries. Products with antibacterial and antioxidant activity can provide a combined approach to treat oral disorders. Marine algae is a reservoir of rich bioactive phytochemicals and are considered to be potential candidates in natural pharmaceutics. *Kappaphycus alvarezii* is a marine algae widely cultivated for food applications. The current study investigates the phyto-pharmacological properties of *K. alvarezii* for oral diseases. Different polarity solvents (ethanol, ethyl acetate and chloroform) were used in the extraction of bioactive components of *K. alvarezii*, partially characterized by GCMS and studied for their antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activity. All the *K. alvarezii* extracts exhibited good antioxidant activity and potential efficacy against oral pathogenic microbes. Although *K. alvarezii* extracts were found to be safe for normal Vero cells, their inhibitory activity on oral cancer cells (KB-3-1 cell lines) was found to be low. These findings have suggested the possibility of *K. alvarezii* using in the dental preparation/product to combat oral infections.

Key words: *Kappaphycus alvarezii*, marine algae, oral disease, dental applications, periodontitis, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activity