Erika Mattos Stein

Avaliação das atividades biológicas e composição química dos
extratos de algas vermelhas do gênero *Laurencia*
(Rhodomelaceae, Ceramiales) do litoral do Espírito Santo, Brasil

Evaluation of biological activities and chemical composition in
extracts of red algae *Laurencia* (Rhodomelaceae, Ceramiales)
from the coast of Espírito Santo, Brazil

São Paulo

2011

Versão corrigida
(O exemplar original encontra-se disponível no Instituto de Biociências)

Erika Mattos Stein

Avaliação das atividades biológicas e composição química dos
extratos de algas vermelhas do gênero *Laurencia*
(Rhodomelaceae, Ceramiales) do litoral do Espírito Santo, Brasil

Evaluation of biological activities and chemical composition in extracts of red algae
Laurencia (Rhodomelaceae, Ceramiales) from the coast of Espírito Santo, Brazil

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Mestre em Ciências, na Área de Botânica.

Orientador(a): Dra. Mutue Toyota Fujii

São Paulo

2011

Stein, Erika M.

Avaliação das atividades biológicas e composição química dos extratos de algas vermelhas do gênero *Laurencia* (Rhodomelaceae, Ceramiales) do litoral do Espírito Santo, Brasil.

167 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. *Laurencia* 2. Atividades biológicas
3. Metabólitos secundários I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora

Prof(a) Dr(a).

Prof(a) Dr(a).

Prof(a) Dr(a). Mutue Toyota Fujii

(Orientadora)

Aos meus pais,
que sempre estiveram ao meu lado
apoando as minhas escolhas e acreditando nos meus sonhos.

“Andei...

Por caminhos difíceis, eu sei.
Mas olhando o chão sob meus pés, vejo a vida correr.
E assim a cada passo que der
Tentarei fazer o melhor que puder.

Aprendi...

Não tanto quanto quis, mas vi que conhecendo
O universo ao meu redor aprendo a me conhecer melhor;
Assim escutarei o tempo que me ensinará
A tomar a decisão certa a cada momento.

E partirei...

Em busca de muitos ideais,
Mas sei que hoje se encontram meu passado, presente e futuro.
Hoje sinto em mim a emoção da despedida.
Hoje é o ponto de chegada.
Mas, ao mesmo tempo, tempo de partida”.

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado coragem e força.

Aos meus pais por terem me apoiado e acreditado.

À minha orientadora Dra. Mutue Toyota Fujii pela oportunidade e confiança, por ter abraçado cada etapa junto comigo.

Ao Prof. Dr. Pio Colepicolo por ter me acolhido e me adotado como aluna em seu laboratório, sem o qual este trabalho não teria sido realizado.

Aos amigos do LabPio atualmente presentes ou que já seguiram seu caminho Cícero Lima, Diego Decleva, Eliézer Estefanelo, João Vasconcelos, Renato Lahos, Luiz Fernando Mendes, Dinaelza Castelo, Paula Laranjeira, pela convivência diária, troca de experiências e os vários momentos de lazer. Vocês se tornaram minha família paulistana!

À Patrícia Miranda pela acolhida no laboratório, pela amizade e por cada coisa que me ensinou.

À Fabi Dörr pela amizade, confiança e o treinamento no GC-MS.

Ao Daniel Andregueti pela companhia, parceria, amizade e alegria no trabalho. Espero que possamos render muitos papers juntos!

À Luiza Marques pela paciência com as incansáveis dúvidas químicas!

À Angela Tonon pelos vários momentos de alegria passados juntas.

À Vanessa Gressler pelo direcionamento no trabalho, pelas dúvidas sanadas e cada trabalho realizado.

Ao Diogo Silva pelas dicas no processamento das amostras.

Ao Leonardo Villela pela dedicação em tudo que faz e pela constante disposição em sanar cada dúvida ou problema.

Ao Felipe Kurachina pelo companheirismo e disposição para o trabalho com os microorganismos.

Ao Ed que está sempre a escutar nossos problemas e resolver pepinos. Obrigada também pelo “cuidar” de cada um dentro do lab.

À Sandrinha que traz sempre alegria, palavras de força e comidas deliciosas, obrigada pela grande contribuição com os materiais de trabalho.

Ao Dr. Ernani Pinto pela colaboração e por deixar sempre seu laboratório à disposição.

Ao Dr. Maurício Yonamine por disponibilizar a biblioteca do GC do LAT.

À Beatriz (LAT) pela troca de experiências, pelas conversas construtivas e por tornar sempre disponível o equipamento para uso.

Ao Dr. Guilherme L. Indig por me ensinar a trabalhar com células humanas e acreditar que podíamos publicar em tão pouco tempo.

Ao Dr. Maurício S. Baptista por disponibilizar seu laboratório de cultura.

À Cleidiane Rocha pela amizade, treinamento e colaboração nos trabalhos com as células humanas.

Ao Marcos Roberto pela paciência nesta fase final e ajuda com as referências.

À Dra. Nair Yokoya por disponibilizar o laboratório de cultura de algas no IBot.

À Neide, Nilzete, Elizete e Zé pelas diversas contribuições nas etapas desenvolvidas no IBot.

A todos os colegas do alojamento do IBot que me acolheram nos primeiros momentos de permanência em São Paulo.

Ao Kleber Renan pela amizade construída, pelos “rangos brutos” e por estar sempre pronto a ajudar.

À Diógina Barata pela calorosa recepção, companheirismo e pelo “guia básico de sobrevivência em Sampa”.

À Elaine Cardoso pelo direcionamento e colaboração e à Maura pela ajuda no desenvolvimento do ensaio anticolinesterásico.

Ao Levi Machado pelo direcionamento no ensaio com fitopatógeno.

Ao Leonardo Nimrichter pela ajuda com o abstract.

Ao Andrey Nunes pela compreensão e apoio incondicional nas minhas escolhas.

À querida Tia Bete Stein que sempre disponibilizou sua casa em Nova Guarapari, sem a qual as coletas tão teriam sido viáveis.

Ao Carlos Eduardo Stein, Aline Martins e Helena Villela pelo companheirismo diário, amizade e tolerância nesta fase final (e em todas as outras fases!).

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo auxílio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida, sem a qual a permanência para o desenvolvimento do trabalho não teria sido viável.

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Vista superficial das células corticais (A e B) e dos tricoblastos (C) nos espécimes vivos de <i>Laurencia</i> mostrando os <i>corps en cerise</i>	22
Figura 2. Localização do estado do Espírito Santo no Brasil e suas coordenadas geográficas, com destaque para os municípios onde foram realizadas as coletas (Guarapari e Anchieta) e a capital Vitória como referência.	30
Figura 3. Detalhe de um dos locais de coleta na Ponta dos Castelhanos, Anchieta, Espírito Santo.	31
Figura 4. Hábito das espécies utilizadas no presente estudo. (A) <i>Laurencia aldingensis</i> . (B) <i>L. catarinensis</i> . (C) <i>L. intricata</i> . (D) <i>L. dendroidea</i> . (A e C) são fotos em laboratório; (B e D) são fotos no ambiente.....	33
Figura 5. Esquema representativo do processo de extração para obtenção das frações hexânicas, clorofômicas, metanólicas e aquosas provenientes da massa algal liofilizada, além do extrato aquoso bruto de cada espécie obtido a partir da massa fresca.	34
Figura 6. Conídios nas hifas de <i>Colletotrichum gloesporioides</i> desenvolvido em cultura sob condições controladas.	41
Figura 7. Esquema demonstrativo do processo de reação com o radical DPPH.	45
Figura 8. Dosagem de proteína em massa fresca (MF) e massa seca (MS) de cada uma das espécies de algas, usando os métodos: Bradford (A e B), Ácido bicinconínico (C e D) e absorção no UV (280nm) (E e F).....	52
Figura 9. Valores de concentrações de ficobilinas em massa fresca de algas das espécies do complexo <i>Laurencia</i> . AFC = aloficocianina; FC = ficocianina; FE = ficoeritrina.	53
Figura 10. Relação dos valores de ficobilinas na quantidade total de proteínas solúveis nas espécies de algas do complexo <i>Laurencia</i> . AFC = aloficocianina; FC = ficocianina; FE = ficoeritrina.....	53
Figura 11. Teor de Clorofila <i>a</i> obtido em massa fresca das espécies do complexo <i>Laurencia</i>	54
Figura 12. Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de <i>Colletotrichum gloesporioides</i> sob exposição a diferentes extratos solubilizados em	

etOH ou DMSO e incorporados ao meio BDA de cultura na concentração final de 1%. O meio de cultura sem solvente e com etOH ou DMSO foram usados como referência.

..... 61

Figura 13. Sensibilidade micelial de *C. gloesporioides* aos extratos LA-EH, LC-EH, LC-EC, LD-EH, LD-EC, LI-EH nas concentrações de 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 e 0,5 mg.mL⁻¹. 63

Figura 14. Cromatograma da fração hexânica. Amostras solubilizadas em etOH, aplicação de 200 µg de amostra, fase móvel Hexano:AcOEt (9:1), fase estacionária Silicagel 60 F254. (A) Luz Branca. (B) Luz UVC. (C) Luz UVL. (D) Placa revelada. (E) Fisostigmina – controle positivo. 66

Figura 15. Cromatograma da fração clorofórmica. Amostras solubilizadas em etOH, aplicação de 100 µg de amostra, fase móvel CHCl₃:MeOH (9:1), fase estacionária Silicagel 60 F254. (A) Luz Branca. (B) Luz UVC. (C) Luz UVL. (D) Placa revelada..... 66

Figura 16. Cromatograma da fração metanólica. Amostras solubilizadas em etOH, aplicação de 200 µg de amostra, fase móvel CHCl₃:MeOH (9:1), fase estacionária Silicagel 60 F254. (A) Luz Branca. (B) Luz UVC. (C) Luz UVL. (D) Placa revelada..... 66

Figura 17. Porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase em diferentes concentrações dos extratos de LA. 68

Figura 18. Porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase em diferentes concentrações dos extratos de LC. 69

Figura 19. Porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase em diferentes concentrações dos extratos de LD. 70

Figura 20. Porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase em diferentes concentrações dos extratos de LI..... 71

Figura 21. 1: Cromatograma do Extrato Hexânico, 2: Cromatograma do Extrato Clorofórmico, 3: Cromatograma do extrato Metanólico. A: Placas reveladas com solução de DPPH. Halos claros indicam atividade antiradicalar da substância. B: Placas reveladas na Luz UVC, C: Placas reveladas na Luz UVL. Catequina e quercetina foram usadas como controle positivo. Adsorvente Silicagel 60 F254. 73

Figura 22. Potencial antioxidante frente ao radical DPPH dos extratos de LA (A), LC (B), LD (C), LI (D) comparativamente com o padrão positivo *Ginkgo biloba*.

(E) Porcentagem de inibição dos padrões comerciais das substâncias puras Ácido gálico e α -tocoferol.....	74
--	----

Figura 23. Efeito citotóxico dos extratos hexânicos de <i>Laurencia dendroidea</i> e <i>Laurencia translucida</i> (LD-EH e LT-EH, respectivamente) e extrato metanólico de <i>Laurencia translucida</i> (LT-EM) sobre a linhagem celular do sarcoma uterino humano (MES-SA) no período de exposição de 72h.	78
---	----

Figura 24. Efeito citotóxico da doxorubicina para diferentes linhagens de células tumorais. (A): células de sarcoma uterino humano (MES-SA) e sua respectiva linhagem mutante droga-dependente (MES-SA/Dx5). (B): células de adenocarcinoma cervical humano (HeLa).	79
---	----

Figura 25. Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM dos extratos hexânico (EH), clorofórmico (EC), metanólico (EM), aquoso (EA) e extrato aquoso bruto (EMB) de <i>Laurencia aldindensis</i> , respectivamente nas sequências de cima para baixo.	82
---	----

Figura 26. Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM dos extratos hexânico (EH), clorofórmico (EC), metanólico (EM) e aquoso (EA) de <i>Laurencia catarinensis</i> , respectivamente nas sequências de cima para baixo.....	85
---	----

Figura 27. Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM dos extratos hexânico (EH), clorofórmico (EC), metanólico (EM), aquoso (EA) e extrato aquoso bruto (EMB) de <i>Laurencia dendroidea</i> , respectivamente nas sequências de cima para baixo.	88
--	----

Figura 28. Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM dos extratos hexânico (EH), clorofórmico (EC), metanólico (EM), aquoso (EA) e extrato aquoso bruto (EMB) de <i>Laurencia intricata</i> , respectivamente nas sequências de cima para baixo.	90
---	----

¹ IK teórico; ² Shashkova <i>et al</i> , 1969; ³ von Kováts, 1958; ⁴ Lazari <i>et al</i> , 2000; ⁵ Sakho <i>et al</i> , 1997; ⁶ Lalel <i>et al</i> , 2003; ⁷ Palmeira <i>et al</i> , 2004; ⁸ Ansorena <i>et al</i> , 2001; ⁹ Zoghbi <i>et al</i> , 1994; ¹⁰ Kim <i>et al</i> , 2000; ¹¹ Pino <i>et al</i> , 2003; ¹² : Richmond & Pombo-Villar, 1998; ¹³ Japp <i>et al.</i> , 1987, * Coluna da literatura diferente daquela utilizada neste trabalho.	92
--	----

Figura 29. Cromatograma do (-)-7- <i>epi</i> -silfiperfolan-6 β -ol (SFP-1) isolado do óleo essencial da <i>Laurencia dendroidea</i>	94
--	----

Figura 30. Espectro de massas de baixa resolução (EIMS) obtido de (-)-7- <i>epi</i> -silfiperfolan-6 β -ol (SFP-1).	95
Figura 31. Cromatograma do (-)-silfiperfolan-7 β -ol (SFP-2) isolado do óleo essencial da <i>Laurencia dendroidea</i>	95
Figura 32. Espectro de massas de baixa resolução (EIMS) obtido de (-)-silfiperfolan-7 β -ol (SFP-2).	96
Figura 33. Sesquiterpenos da alga <i>Laurencia dendroidea</i> usados como padrão para identificação nos extratos das espécies de <i>Laurencia</i> em estudo. a) (-)-7- <i>epi</i> -silfiperfolan-6 β -ol (SFP-1) e b) (-)-silfiperfolan-7 β -ol (SFP-2).	96
Figura 34. Corrida cromatográfica da amostra padrão do elatol num tempo de corrida de 106.67 min.	98
Figura 35. Detalhe do pico do elatol com o tempo de retenção (t_R) de 50.195 min.	98
Figura 36. O espectro de massas do elatol em análise.....	99
Figura 37. Elatol	99

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Relação do material coletado usado para preparação dos extratos, com as respectivas datas, locais de coleta e número de acesso das exsiccatas depositadas no herbário ficológico do Instituto de Botânica (SP).	31
Tabela 2. Relação do material adicional coletado para comparação, as respectivas datas, locais de coleta e número de acesso das exsiccatas depositadas no herbário ficológico do Instituto de Botânica (SP).	32
Tabela 3. Condições cromatográficas para injeção dos extratos.	49
Tabela 4. Relação do teor de proteínas totais encontrado nas massas frescas (mg proteína.g ⁻¹ MF) e secas (mg proteína.g ⁻¹ MS) de cada uma das espécies, para cada método espectrofotométrico testado	51
Tabela 5. Valores de CIM (≤ 50 % daqueles obtidos nos poços controle) obtidos a 625 nm, expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ no teste de microdiluição em caldo dos extratos das espécies de <i>Laurencia</i> frente às bactérias e o efeito da concentração sobre elas.	55
Tabela 6. Valores de CIM ($\leq 50\%$ daqueles obtidos nos poços controle) obtidos a 492 nm, expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ no teste de microdiluição em caldo dos extratos das espécies de <i>Laurencia</i> frente aos fungos e o efeito da concentração sobre eles.	57
Tabela 7. Interferência da concentração dos solventes no crescimento micelial do fungo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . (+++) nenhuma interferência no crescimento micelial; (++) alguma interferência no crescimento micelial; (-) muita interferência no crescimento micelial.	60
Tabela 8. Screening dos extratos a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ frente à inibição do crescimento micelial de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> . Resultados do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) expressos em cm.dia^{-1} . Amostras realizadas em triplicata.	62
Tabela 9. Valores médios de IC_{50} (concentração suficiente para inibir 50% do crescimento micelial) dos extratos testados expressos em mg.mL^{-1}	63
Tabela 10. Determinação do IC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) da atividade antiradicalar dos extratos de algas do gênero <i>Laurencia</i> no ensaio com o radical DPPH.	75
Tabela 11. Efeito da toxidez dos diferentes extratos algais em relação a células MES-SA. Onde, (++) ≥ 80 % de morte celular; (+) 50-79 % de morte celular; (-) 30-50	

% de morte celular; (--) 0- 30 % de morte celular. Células incubadas por 24h em presença do extrato (500 µg.mL⁻¹ de meio de cultura)..... 77

Tabela 12. Substâncias identificadas por CG-EM dos extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato metanólico (EM), extrato aquoso (EA) e extrato aquoso bruto (EAB) da espécie *Laurencia aldingensis*. 83

Tabela 13. Substâncias identificados por CG-EM dos extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato metanólico (EM), extrato aquoso (EA) e extrato aquoso bruto (EAB) da espécie *Laurencia catarinensis*. 86

Tabela 14. Substâncias identificados por CG-MS dos extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato metanólico (EM), extrato aquoso (EA) e extrato aquoso bruto (EAB) da espécie *Laurencia dendroidea*..... 89

Tabela 15. Substâncias identificados por CG-EM dos extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato metanólico (EM), extrato aquoso (EA) e extrato aquoso bruto (EAB) da espécie *Laurencia intricata*. 91

SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACh = acetilcolina

AChE = acetilcolinesterase

AcOEt = acetate de etila

AFC = aloficocianina

AIA = ácido indol-3-acético

AIB = ácido Indol-Butírico

ATCC = American Type Culture Collection

BAW = n-Butanol: Acetic acid: Water

BCA= Ácido Bicinconínico

BS = *Bacillus subtilis* ATCC 6633

BSA= Albumina Bovina Sérica

BuOH = n-butanol

C₆H₁₄ = hexano

CA = *Candida albicans* ATCC 10231

CBM = concentração bactericida mínima

CCD = cromatografia de camada delgada

CCDP = cromatografia de camada delgada preparativa

CFM = concentração fungicida mínima

CG-EM = Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrometria de Massas

CHCl₃ = clorofórmio

CIM = concentração inibitória mínima

CN = *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112

CP = *Candida parapsilosis* ATCC 29212

DA = doença de Alzheimer

DMSO = dimetilsulfóxido

DPPH = 2,2-difenil-1-picrilidrazila

EA = extrato aquoso

EAB = extrato aquoso bruto

EC = *Escherichia coli* ATCC 25922

EC = extrato clorofórmico

EF = *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

EH = extrato hexânico

EM = extrato metanólico
EROS = espécies reativas do oxigênio
etOH - etanol
eV = elétron Volt
FC = ficocianina
FE = ficoeritrina
IAChE = inibidores de acetilcolinesterase
IC₅₀= Concentração inibitória de 50%
IK = Índice de Kovat's
KP = *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10231
LA = *Laurencia aldingensis*
LC = *Laurencia catarinensis*
LD= *Laurencia dendroidea*
LDV= *Laurencia dendroidea* “verde” (variante pigmentar da LD)
LI= *Laurencia intricata*
LT= *Laurencia translucida*
MDR = Multidrug resistance
MeOH = metanol
MF= massa fresca
MS= massa seca
PA = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
PF= *Palisada flagellifera*
P-gp = P-glicoproteína
PP= *Palisada perforata*
RPCP = rizobactérias promotora de crescimento em planta
RPM = rotações por minuto
SA = *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
SP = *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619
ST = *Salmonella typhi* ATCC 19430
t_R = tempo de retenção
UFC = unidades formadoras de colônias
UVC = ultravioleta curto (254nm)
UVL = ultravioleta longo (366nm)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. As algas marinhas e seu potencial farmacológico	19
1.2. Análise de pigmentos e dosagem de proteínas	23
1.3. Atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos de patogenicidade humana e rizobactéria	23
1.4. Atividade contra fungo fitopatogênico	25
1.5. Atividade antioxidante.....	25
1.6. Atividade anticolinesterásica	26
1.7. Atividade citotóxica.....	27
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1. Local de estudo	30
4.2. Material biológico.....	31
4.3. Material para análise morfológica e confirmação da espécie	32
4.4. Material para obtenção dos extratos	33
4.5. Preparação dos extratos	33
4.6. Análise das proteínas solúveis totais	34
4.6.1. Método de Bradford	34
4.6.2. Método do BCA (Ácido Bicinconínico) ou método de Smith.....	35
4.6.3. Método de absorção no Ultravioleta (medida a 280nm).....	35
4.7. Análise dos pigmentos ficobilinas e clorofila <i>a</i> por espectrofotometria	36
4.8. Atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos de patogenicidade humana e rizobactéria	36

4.8.1. Crescimento de microorganismos a partir do padrão comercial ATCC	37
4.8.1.1. Bactérias	37
4.8.1.2. Fungos	37
4.8.2. Preparo dos inóculos para teste	37
4.8.2.1. Bactérias	37
4.8.2.2. Fungos	37
4.8.3. Preparação dos veículos de diluição	38
4.8.4. Ensaio de microdiluição em caldo	38
4.8.5. Determinação espectrofotométrica da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	39
4.8.6. Determinação do efeito da concentração dos extratos	40
4.8.7. Análises estatísticas	40
4.9. Ensaio fitopatogênico	41
4.9.1. Obtenção do isolado	41
4.9.2. Teste de inibição do crescimento micelial	42
4.10. Atividade anticolinesterásica	43
4.10.1. Ensaio qualitativo por autografia (Cromatografia de Camada Delgada: CCD)	43
4.10.2. Ensaio quantitativo em microplaca	44
4.11. Avaliação da atividade antiradicalar: método DPPH	45
4.11.1. Ensaio qualitativo por autografia (Cromatografia de Camada Delgada: CCD)	45
4.11.2. Ensaio quantitativo em microplaca	46
4.12. Ensaio citotóxico	47
4.12.1. Reagentes e meios de cultura	47
4.12.2. Instrumentos e metodologia	47
4.12.2.1. Preparo dos extratos	48
4.12.2.2. Linhagens celulares	49

4.13. Análise qualitativa e semi-quantitativa das substâncias químicas por CG-EM presentes nos extratos das espécies de <i>Laurencia</i>	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1. Análise das proteínas solúveis totais	51
5.2. Análise de pigmentos por espectrofotometria: ficobilinas e clorofila <i>a</i>	53
5.3. Atividade antimicrobiana contra bactérias de patogenicidade humana e rizobactéria.....	55
5.4. Atividade antifúngica contra patógenos humanos	57
5.5. Ensaio fitopatogênico	60
5.5.1. Concentração dos solventes para ensaio de crescimento micelial	60
5.5.2. Screening para seleção dos extratos	61
5.6. Atividade anticolinesterásica	66
5.6.1. Ensaio Qualitativo por Autografia (Cromatografia de Camada Delgada CCD)	66
5.6.2. Ensaio quantitativo em microplaca	67
5.7. Avaliação da atividade antiradicalar: método DPPH	73
5.7.1. Ensaio qualitativo por autografia (Cromatografia de Camada Delgada: CCD)	73
5.7.2. Ensaio quantitativo em microplaca	74
5.8. Ensaio citotóxico	76
5.9. Análise qualitativa e semi-quantitativa das substâncias químicas por CG-EM presentes nos extratos das espécies de <i>Laurencia</i>	81
5.10. Obtenção do padrão de (-)-7- <i>epi</i> -silfiperfolan-6 β -ol (SFP-1) e (-)-silfiperfolan-7 β -ol (SFP-2)	94
5.11. Obtenção do padrão de elatol (10-bromo-4-chloro-3,11,11-trimethyl-7-methylidenespiro[5.5]undec-3-en-9-ol)	97
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
ABSTRACT	105

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
ANEXO A: Search for citotoxic agents in multiple <i>Laurencia</i> complex seaweed species (Ceramiales, Rhodophyta) harvested from the Atlantic Ocean zone that bates the Brazilian State of Espírito Santo.	127
ANEXO B: Screening for antifungal activities of extracts from Brazilian seaweed genus <i>Laurencia</i> (Ceramiales, Rhodophyta).....	Erro! Indicador não definido.
ANEXO C: Sesquiterpenes from the essential oil of <i>Laurencia dendroidea</i> (Ceramiales, Rhodophyta): isolation, biological activities and distribution among seaweeds.....	Erro! Indicador não definido.
ANEXO D: Overview of the taxonomy and of the major secondary metabolites and their biological activities related to human health of the <i>Laurencia</i> complex (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil.	Erro! Indicador não definido.
BIOGRAFIA	Erro! Indicador não definido.

1. INTRODUÇÃO

1.1. As algas marinhas e seu potencial farmacológico

A diversidade biológica dos recursos marinhos costeiros tem sua importância pautada não apenas na sua exploração para produção de alimentos, mas também pelo fato de constituir expressivo patrimônio genético, com enorme potencial para utilização biotecnológica (Silva, 2005). Neste contexto, as algas representam um dos recursos vivos renováveis mais importantes nestes biomas.

Os estudos de detecção, isolamento e caracterização de substâncias ativas presentes em algas têm se intensificado nos últimos anos devido à enorme diversidade destes compostos e à sua comprovada aplicabilidade nas mais diferentes áreas da pesquisa científica (Vasconcelos *et al.*, 1994).

Os oceanos cobrem 70% da superfície do planeta e abrigam mais de 200 mil espécies de invertebrados e algas, os quais formam complexas comunidades, estabelecendo os mais variados tipos de associações. Muitos destes organismos sintetizam substâncias a partir de suas dietas e as utilizam em eventos de ecologia química que permeiam. Estes compostos são chamados metabólitos e são definidos como substâncias orgânicas produzidas por vias sintéticas derivadas do metabolismo primário e secundário, os quais estão envolvidos em processos vitais e de adaptação das espécies ao meio ambiente (Teixeira, 2002). Apesar da produção desses metabólitos estar amplamente distribuída nos mais diferentes organismos marinhos (Pereira, 2002), as algas vermelhas (Rhodophyta) se sobressaem por serem capazes de sintetizar metabólitos secundários biologicamente ativos da mais fascinante diversidade, que podem pertencer a praticamente todas as classes químicas, desde hidrocarbonetos de baixo peso molecular, fenóis, acetogeninas a sofisticados terpenos (Fenical & Norris, 1975).

Dentre as Rhodophyta, o gênero *Laurencia* J.V. Lamouroux (Rhodomelaceae, Ceramiales) consiste no maior produtor de metabólitos secundários (Erickson, 1983) e destaca-se como uma fonte fascinante de novos produtos naturais. A descoberta e estudo dos caracteres químicos também têm sido usados para diferenciar táxons morfológicamente relacionados (Fenical & Norris, 1975; Masuda *et al.*, 1997; Fujii, 1998). Acredita-se que dentre as várias substâncias produzidas por esses táxons, pelo

menos uma seja espécie-específica, tornando-se assim, importante ferramenta para subsidiar sérios problemas de delimitação de espécies neste gênero (Fenical & Noris, 1975; Masuda *et al.*, 1997).

Sustâncias bioativas são aquelas que causam algum efeito sobre os organismos vivos (Fernández *et al.*, 2005). Uma única espécie pode conter diversas classes de substâncias químicas com grande diversidade de ações biológicas e químicas, propiciando seu desenvolvimento e sobrevivência num meio de natureza muito competitiva por substrato e nutriente. É o desenvolvimento destes mecanismos bioquímicos e fisiológicos que tem permitido às algas produzirem substâncias bioativas que, para o homem, acabam adquirindo propósitos tão variados como na farmacologia, com a identificação de substâncias com atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral e anticâncer (Frugulhetti *et al.*, 2005; Romanos, 2005) e até mesmo na agricultura, utilizando extratos para proteção de plantas contra patógenos (Abreu *et al.*, 2008).

O Brasil desponta no mundo como um país de enorme diversidade de espécies, possuindo um litoral que se estende desde os trópicos até regiões temperadas quentes, com cerca de 800 espécies de algas marinhas bentônicas conhecidas (Fujii *et al.*, 2008). As espécies de *Laurencia* são interessantes porque são capazes de crescer em uma variedade de ambientes, desde o início da zona entremarés até o infralitoral, tanto em costões rochosos como em arenito de praia, em locais protegidos ou expostos, fixas diretamente ao substrato ou epifitando outras algas, em poças de maré e como componente do "turf" (Fujii & Senties, 2005). A produção dos metabólitos pode ser uma resposta às pressões ambientais que, concomitantemente, aumenta o valor adaptativo dessas algas que os produzem (Pereira, 1999).

Mediante tais propriedades ecológicas, foi extraído de uma espécie brasileira de *Laurencia* identificada como *L. dendroidea* J. Agardh (citada como *L. obtusa*), um sesquiterpeno com propriedade antiepibiônica, o elatol (Da Gama *et al.*, 2002), que está sendo trabalhado a fim de compor tintas para cascos de embarcações, plataformas ou qualquer outro tipo de superfície submersa. Da mesma forma, pesquisas por substâncias naturais com atividade antiviral e antitumoral como alternativa viável na produção dos medicamentos têm sido intensificadas nos últimos anos com incentivo da OMS. Dentre os organismos marinhos, esponjas e algas deram origem a cerca de 65% das patentes em antitumorais e antivirais, além de fornecer o maior número de produtos naturais conhecidos. Exemplo concreto disto é o dehydrothyrsoferol (DT), extraído de *Laurencia*

viridis Gil-Rodríguez & Haroun que ocorre nas Ilhas Canárias, Espanha, que induz a apoptose em células estrogênio-dependentes e células cancerígenas mamárias, sendo proposto como possível agente antitumoral (Pec, 2003). Da mesma alga também foram isolados outros polietéres com atividade citotóxica (Fernández, 1998). De *Laurencia coronopus* (J. Agardh), uma espécie do Mar Negro, foi extraído um composto halogenado aleloquímico com efeitos antibacterianos e antifúngicos, que suprime o desenvolvimento de outras algas e o assentamento larval (Kamenarska, 2009). A partir de *Laurencia dendroidea* (como *L. scoparia*) do litoral paulista foram extraídos sesquiterpenos que demonstraram alta atividade antielmíntica, no qual utilizaram *Nippostrongylus brasiliensis* para o ensaio (Davyt *et al.*, 2001).

No Brasil, entretanto, esse tipo de abordagem ainda permanece quase inexplorado. Portanto, avaliar a capacidade inibidora das substâncias extraídas dessas algas assim como promover a prospecção de genes envolvidos na síntese dessas substâncias é de fundamental importância na busca de produtos naturais de origem marinha.

Laurencia aldingensis Saito & Womersley, *Laurencia catarinensis* Cordeiro-Marino & M.T. Fujii, *Laurencia dendroidea* e *Laurencia intricata* J.V. Lamouroux selecionadas para o presente trabalho visando o estudo da bioatividade de suas substâncias, estão amplamente distribuídas no litoral capixaba (Fujii & Senties 2005), mas faltam informações sobre a atividade de seus metabólitos.

L. aldingensis é uma espécie de médio porte, em torno de 10 cm de altura e são encontradas com certa facilidade no litoral sudeste brasileiro; *L. catarinensis* é uma espécie endêmica do Brasil e cresce sobre coralináceas formando um tapete emaranhado na região sudeste e sul; *L. dendroidea* apresenta porte maior, com até 30 cm de altura (o que é interessante para fins de bioprospecção), e o seu metabólito majoritário já é conhecido por apresentar atividades antiincrustantes (da Gama *et al.* 2002) e antiherbivoria (Pereira *et al.*, 2003) e, *Laurencia intricata*, uma espécie de porte pequeno (3 cm de altura), mas crescem em forma de almofadas róseas, principalmente no litoral do Espírito Santo, e praticamente nada se conhece sobre o seus constituintes químicos.

Com relação ao aspecto morfológico, essas espécies de *Laurencia* apresentam em comum, organelas denominadas "*corps en cerise*" em suas células corticais e nos tricoblastos, facilmente visíveis em espécimes vivos, onde confirmaram ser os locais de

armazenamento dos produtos halogenados do metabolismo (Salgado *et al.*, 2008; Paradas *et al.*, 2010) (Figura 1). Esta característica distingue este gênero dos outros gêneros intimamente relacionados, *Palisada* K.W. Nam, *Osmundea* Stackhouse e *Chondrophycus* (Tokida & Saito) Garbary & J.T. Harper e *Yuzurua* (Nam) Martin-Lescanne e que, juntos, compõem o complexo *Laurencia*. Os “corps en cerise” são corpúsculos reniformes ou arredondados com dupla membrana, preenchidos por conteúdo osmiofílico refringente, variando entre homogêneo a granulado (Feldman & Feldman, 1950). A membrana interna é própria dele e a externa é proveniente do vacúolo celular (Bodard, 1968). O fato de seu conteúdo estar mantido em estruturas membranosas sugere que este possa ser tóxico para a célula, evitando assim a apoptose (Salgado *et al.*, 2008). Foi observado por Feldman & Feldman (1950) a ligação dos “corps en cerise” com as células da parede por um canal de comunicação membranar (pedicelo) por onde o conteúdo é exsudado para a superfície da alga. E se as estruturas estão na superfície do talo, ou pelo menos conectadas à superfície de alguma maneira, então os metabólitos podem ter o potencial de exercerem alguma atividade biológica (Steinberg & De Nys, 2002). A distribuição dos metabólitos sobre a superfície do talo da alga é essencial para interações mediadas pela superfície, como inibição de bactérias epibiontes (Salgado *et al.*, 2008).

Figura 1. Vista superficial das células corticais (A e B) e dos tricoblastos (C) nos espécimes vivos de *Laurencia* mostrando os *corps en cerise*.

1.2. Análise de pigmentos e dosagem de proteínas

Como todas as Rhodophyta, as espécies de *Laurencia* apresentam Clorofila *a*, ficobilinas (ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina), carotenóides e outros pigmentos acessórios. Clorofila *a* é um pigmento importante por atuar como antioxidante em testes *in vitro* (Naguib, 2000; Cahyana *et al.*, 1993) e existe na literatura a correlação da atividade antioxidante com ação antiinflamatória (Sadique *et al.*, 1987). Assim sendo, plantas contendo atividade antioxidante poderiam ser utilizadas na terapia de processos antiinflamatórios (Raymundo *et al.*, 2004). Em vista disso, foram realizadas análises de determinação pigmentar de seis espécies do complexo *Laurencia*.

A determinação pigmentar (clorofila *a* e ficobilinas) e a quantificação protéica das espécies de *Laurencia* tornam-se relevantes uma vez que são fundamentais para o controle do desenvolvimento e crescimento das plantas, sendo de grande contribuição em cultivos controlados no qual objetiva-se a obtenção de biomassa. As ficobilinas atuam como reserva orgânica de nitrogênio (Lapointe & Ryther, 1979) e podem ser a sua principal fonte quando a demanda por este elemento for superior à sua disponibilidade na célula ou no ambiente.

1.3. Atividade antimicrobina contra bactérias e fungos de patogenicidade humana e rizobactéria

É sabido que o uso indiscriminado dos antibióticos comerciais proporciona o aumento da resistência múltipla nos microorganismos causadores das mais diferentes enfermidades (Karaman *et al.*, 2003) como, por exemplo, a pneumonia, meningite, endocardite, infecções urinárias, infecções respiratórias, síndrome de choque tóxico e outras mais simples como o impetigo e foliculite e até mesmo a febre tifóide que é um caso de saúde pública nos países em desenvolvimento. Diante disso, há uma busca incansável por antibióticos novos e mais específicos oriundos de fontes alternativas, com a intenção de contribuir na diminuição de infecções oportunistas associadas à Aids, quimioterapia antineoplásica e transplantes (Penna *et al.*, 2001).

Indivíduos com imunodeficiência causada por quimioterapia, infecção por HIV ou imuno-supressão devido ao transplante de órgãos sofrem por várias doenças causadas por bactérias e fungos. E, em muitos casos, não há tratamento efetivo contra essas doenças. Antes da pandemia da AIDS, as criptococcoses eram infecções incomuns

e agora podem se tornar incuráveis nas populações com AIDS. Coquetéis que protegem contra tuberculose é outro problema médico sério em indivíduos imuno-reprimidos (Drlica, 1996). Em adições ao uso de novos e mais potentes agentes antimicrobianos, os microorganismos estão se tornando mais resistentes às quimioterapias existentes (Guiraud *et al.*, 1999). Dessa forma, há uma necessidade contínua por novos antimicrobianos que possam ser efetivos contra estes e outros patógenos (Zgoda & Porter, 2001).

Nos programas de *screening* por novas drogas terapêuticas provenientes de produtos naturais há um interesse crescente pela biodiversidade ainda inexplorada, proveniente dos oceanos (Sasidharan *et al.*, 2010). Neste contexto, as algas marinhas tropicais tem se mostrado uma rica fonte de substâncias bioativas com potencial biomédico e isso tem sido reportado no mundo por décadas (Sieburth, 1964; Burkholder, 1973; Caccamese *et al.*, 1981; Reichelt & Borowitzka, 1984; Robles-Centeno *et al.*, 1996; Plaza *et al.*, 2010). Entretanto, raros são os estudos feitos com algas que ocorrem no litoral brasileiro.

Embora os trabalhos científicos relatem diversas substâncias bioativas em extratos de algas, somente nas últimas décadas produtos à base desses organismos despertaram um maior interesse da comunidade científica e da iniciativa privada (Kelecom, 1997). Entretanto, estudos que determinam o teor de proteínas, vitaminas e sais no conteúdo das algas arribadas visando o enriquecimento do solo merecem ser explorados, assim como o seu potencial. Na área agrícola, algumas espécies de algas já são usadas nas formas secas ou de extratos, sendo atualmente comercializadas como bioestimulantes/fertilizantes em determinados países, em que apresentam a capacidade de aumentar a resistência das plantas a doenças e até mesmo a outros estresses, como geadas (Stadnik, 2003).

Entanto, deve-se tomar maior cuidado na escolha das espécies de algas para uso na agricultura, para evitar que seus metabólitos ativos não destruam os habitantes naturais do solo, como a bactéria *Bacillus subtilis* utilizada no presente trabalho, que produz antibióticos, enzimas e fitohormônios que proporcionam benefícios para as plantas. As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) também fazem parte da comunidade microbiana. Os efeitos desses microorganismos sobre o desenvolvimento das plantas são amplos, incluindo os efeitos benéficos na germinação de sementes, emergência de plântulas e seu crescimento (Lazzaretti & Bettiol, 1997).

1.4. Atividade contra fungo fitopatogênico

Preocupações com o meio ambiente e com o aumento dos custos da produção de gêneros agrícolas devido à utilização de produtos químicos sintéticos tem intensificado o interesse pela busca de moléculas ativas provenientes de fontes alternativas (Talamini & Stadnik, 2004), e os metabólitos das algas marinhas ganham interesse para proteção de plantas contra fitopatógenos pelo seu histórico de atividade antimicrobiana já relatada (Abourriche *et al.*, 1999; Bennamara *et al.*, 1999; Lizzi *et al.*, 1998; Vlachos *et al.*, 1997).

Segundo dados do INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisas Agrícolas) o cultivo do mamão (*Carica papaya* L.) no Espírito Santo abastece o mercado nacional, além de também ser exportado, sendo uma ótima opção para os agricultores. O norte do Espírito Santo é a região que mais produz mamão no Estado chegando a quase 80 toneladas por hectare, sendo o maior exportador da fruta e o segundo maior produtor de mamão do país, só perdendo para a Bahia (site: Globo.com). Entretanto, a antracnose do mamão, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) é a mais séria doença pós-colheita que atinge esse produto. O patógeno, além de infectar frutos maduros, pode também infectar frutos imaturos pela penetração direta da cutícula, diminuindo significativamente o período pós-colheita (Dickman & Alvarez, 1983).

O principal tratamento indicado para o controle de doenças pós-colheita, no caso de mamão, é o tratamento hidrotérmico (48-49 °C/20 minutos, em seguida 10 °C/20 minutos), de acordo com Ventura *et al.* (2003). Mas, concomitantemente ao uso desse tratamento, recomenda-se a aplicação de ceras e fungicidas para garantir uma maior sobrevida ao fruto.

A diminuição da eficiência dos produtos utilizados comercialmente no controle da antracnose é um fator a ser considerado, uma vez que esse fato é associado ao aparecimento de microorganismos com níveis elevados de tolerância a esses produtos (Tavares & Sousa, 2005). Diante disso, há uma necessidade recorrente por novos antifúngicos, diferentes e mais eficientes.

1.5. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante ganha importância uma vez que, mesmo tendo o O₂ como elemento fundamental para os organismos aeróbicos (Fleschin *et al.*, 2000), nas

reações biológicas os radicais livres e outros derivados ativos do oxigênio são inevitavelmente co-produzidos. Esses radicais livres exercem papel fisiológico importante, mas também estão envolvidos em vários processos deletérios ao organismo humano como o câncer, a aterosclerose, a *Diabetes mellitus*, artrite reumática, a distrofia muscular, a catarata, as desordens neurológicas e o envelhecimento (Nordberg & Arnér, 2001).

Contra os efeitos das espécies reativas do oxigênio (EROs), todos os organismos aeróbicos desenvolveram mecanismos fisiológicos e biomoleculares. Entretanto, nas células de organismos fotossintetizantes esses mecanismos estão mais fortemente desenvolvidos devido aos tilacóides, que são alvo primário dos efeitos deletérios oxidativos, por conterem lipídios insaturados como componentes majoritários. É fato que as algas possuem numerosas substâncias antioxidantes, também para agüentar as rápidas variações de intensidade de luz e concentrações de O₂ e CO₂ ao longo da coluna d'água. Desta forma, elas podem representar uma importante fonte de substâncias antioxidantes naturais tanto para a indústria alimentícia quanto para a farmacêutica (Matsukawa *et al.*, 1997).

1.6. Atividade anticolinesterásica

Dentre as doenças crônico-degenerativas da terceira idade, a doença de Alzheimer (DA) é a mais comum (Gilani & Atta-Ur-Rahman, 2005). As estratégias atuais e em estudo para o tratamento farmacológico da doença buscam aliviar seu principal sintoma: o declínio cognitivo. Com exceção da memantina, um antagonista dos receptores NMDA, o uso de inibidores de colinesterases é a terapia utilizada para o tratamento da DA (Benson, 2005). Devido aos efeitos colaterais provocados pelos fármacos atualmente disponíveis, a busca de novos anticolinesterásicos sintéticos ou naturais tem despertado grande interesse. Produtos naturais anticolinesterásicos provenientes de plantas e fungos terrestres têm sido alvo de muitos estudos (Viegas *et al.*, 2004). Por outro lado, poucos trabalhos descrevem a atividade anticolinesterásica de produtos naturais marinhos (Ryu *et al.*, 2003).

1.7. Atividade citotóxica

O desenvolvimento de novas drogas anticâncer de origem algal representa uma das linhas menos exploradas na química medicinal. A este respeito, a diversidade de algas encontrada nas águas da costa brasileira pode ser vista como uma fonte natural muito rica e promissora (Chakabourty *et al.*, 2009).

Avanços significativos na descoberta e desenvolvimento de novos anticancerígenos provenientes das algas têm sido reportados recentemente na literatura incluindo representantes dos terpenos, esteróis e da família dos policetídios (Mayer & Gustafson, 2008).

No entanto, uma das principais causas da falha da quimioterapia em clínicas oncológicas é a indução da superexpressão das bombas de efluxo de P-glicoproteínas (P-gp) pelas drogas (Higgins, 2007; Dawson & Locker, 2006; Lage, 2008; Perez-Thomas, 2006).

As P-gp são proteínas de membrana capazes de remover muitos e diferentes agentes quimioterápicos das células-alvo, incluindo até mesmo agentes cujas células nunca foram expostas antes (Higgins, 2007; Dawson & Locker, 2006). A aquisição de resistência de células cancerosas aos tratamentos quimioterápicos é um fenótipo conhecido como *Multidrug Resistance* (MDR)

Assim, uma das mais gratificantes descobertas que podem surgir a partir de qualquer *screening* de drogas é representada pela identificação de novos fármacos capazes de induzir a morte das células tumorais MDR com maior eficiência quando comparado com drogas atualmente usadas. E, o modelo proposto neste trabalho e, em desenvolvimento, poderá facilitar a descoberta de novas drogas inibidoras de bombas de efluxo em células tumorais.

2. JUSTIFICATIVA

Os estudos de detecção, isolamento e caracterização de substâncias ativas presentes em algas têm se intensificado nos últimos anos devido à enorme diversidade destes compostos e à comprovada aplicabilidade deles nas mais diferentes áreas da pesquisa científica (Vasconcelos *et al.*, 1994). E, as espécies de *Laurencia* merecem destaque especial pela enorme variedade de terpenos e acetogeninas que produzem, sendo considerado talvez, um dos gêneros mais ricos em produção de metabólitos secundários. No entanto, pouco se sabe sobre o potencial das espécies deste gênero presentes no litoral brasileiro. Este trabalho visa explorar os extratos das algas coletadas no Espírito Santo frente a vários ensaios biológicos, a fim de proporcionar uma pré-seleção para análises futuras mais detalhadas, assim como uma avaliação dos seus constituintes químicos.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o potencial farmacológico dos extratos das espécies de algas vermelhas do gênero *Laurencia* frente às várias atividades biológicas, assim como a composição bioquímica e identificação de seus constituintes químicos.

E os objetivos específicos consistem em:

- obter extratos usando solventes de diferentes polaridades;
- realizar teste de dosagem de proteínas e pigmentos (ficobilinas e clorofila a) de seis espécies dentro do “complexo *Laurencia*”;
- realizar ensaios de atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos de patogenicidade humana e rizobactéria
- avaliar o potencial dos extratos das espécies de *Laurencia* frente ao fitopatógeno;
- avaliar a ação antioxidante dos extratos das espécies de *Laurencia*;
- investigar o potencial anticolinesterásico dos extratos das espécies de *Laurencia*;
- dar início ao desenvolvimento de um modelo biológico aplicável para identificação de potenciais candidatos a drogas anti-câncer;
- identificar os constituintes químicos presentes em cada fração dos extratos por CG-EM através da comparação dos seus tempos de retenção e espectros de massas com aqueles apresentados em literatura e em bibliotecas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de estudo

Os municípios escolhidos para coleta (Guarapari e Anchieta) estão localizados no estado do Espírito Santo e podem ser visualizados na Figura 2 e, um detalhe da praia onde foi feita a coleta do material (Figura 3).

Figura 2. Localização do estado do Espírito Santo no Brasil e suas coordenadas geográficas, com destaque para os municípios onde foram realizadas as coletas (Guarapari e Anchieta) e a capital Vitória como referência.

Fonte: ArcMap, ArcView

Figura 3. Detalhe de um dos locais de coleta na Ponta dos Castelhanos, Anchieta, Espírito Santo. Foto: Mutue T. Fujii

4.2. Material biológico

Todas as coletas foram realizadas por Erika M. Stein e Mutue T. Fujii e, o material coletado está listado na Tabela 1.

As algas coletadas foram submetidas à triagem em água do mar a fim de eliminar o maior número de epífitas assim como a abundante comunidade fital. Alguns exemplares foram separados para servirem de testemunhas, que foram depositados no Herbário Maria Eneida P. Kauffman Fidalgo do Instituto de Botânica, São Paulo (SP). Outros exemplares serviram para confirmação taxonômica (item 4.3) e a maior parte da biomassa destinou-se ao preparo dos extratos (item 4.4 e item 4.5).

Tabela 1. Relação do material coletado usado para preparação dos extratos, com as respectivas datas, locais de coleta e número de acesso das exsicatas depositadas no herbário ficológico do Instituto de Botânica (SP).

ESPÉCIES DE ALGAS	INFORMAÇÃO DAS COLETAS	NÚMERO DE ACESSO
<i>Laurencia aldingensis</i>	ES, Anchieta, Ponta dos Castelhanos 01/07/2007	SP 399.933
<i>Laurencia catarinensis</i>	ES, Anchieta, Ponta dos Castelhanos 01/07/2007	SP 400.209
<i>Laurencia dendroidea</i>	ES, Anchieta, Praia de Parati 30/06/2007	SP 400.198
<i>Laurencia intricata.</i>	ES, Guarapari, Praia de Meaípe 04/06/2008	SP 400.793

Outras espécies do complexo *Laurencia*, *L. translucida* (M.T. Fujii & Cordeiro-Marino), *Palisada flagellifera* (J. Agardh) K.W. Nam, *P. perforata* (Bory) K.W. Nam e uma variante pigmentar de *L. dendroidea* foram utilizadas em experimentos para comparação (Tabela 2).

Tabela 2. Relação do material adicional coletado para comparação, as respectivas datas, locais de coleta e número de acesso das exsicatas depositadas no herbário ficológico do Instituto de Botânica (SP).

ESPÉCIES DE ALGAS	INFORMAÇÃO DAS COLETAS	NÚMERO DE ACESSO
<i>Laurencia dendroidea</i> “verde”	ES, Anchieta, Praia de Ubú 04/06/2008	SP 399.936
<i>Laurencia translucida</i>	ES, Anchieta, Praia de Parati 30/06/2007	SP 400.213
<i>Palisada perforata</i>	ES, Anchieta, Ponta dos Castelhanos 03/06/2008	SP 400.204
<i>Palisada flagellifera</i>	ES, Anchieta, Ponta dos Castelhanos 03/06/2008	SP 400.203

4.3. Material para análise morfológica e confirmação da espécie

As amostras destinadas às análises morfológicas e confirmação da identificação das espécies foi fixada em formol a 4%, e uma alíquota foi conservada viva em água do mar e transportada ao laboratório de cultura de algas marinhas do Instituto de Botânica de São Paulo, para estudo do material vivo. A identificação foi baseada no trabalho de taxonomia do complexo *Laurencia* de Fujii & Senties (2005) e em bibliografias recentes sobre o grupo em questão. As descrições foram feitas levando-se em conta o aspecto geral, as estruturas vegetativas e reprodutivas em vista superficial e dos cortes transversais e longitudinais dos talos.

Os aspectos gerais das espécies estudadas no presente trabalho estão apresentados na Figura 4.

Figura 4. Hábito das espécies utilizadas no presente estudo. (A) *Laurencia aldingensis*. (B) *L. catarinensis*. (C) *L. intricata*. (D) *L. dendroidea*. (A e C) são fotos em laboratório; (B e D) são fotos no ambiente.

4.4. Material para obtenção dos extratos

As algas foram coletadas na zona das marés durante a maré baixa, limpas em água do mar, enxaguadas em água corrente, separadas em sacos plásticos com fecho hermético, identificados com o nome da espécie, local e data da coleta e congeladas em *freezer* -20 °C com intuito de minimizar alterações nas propriedades químicas das espécies, deixando-as conservadas até o momento dos estudos.

4.5. Preparação dos extratos

Para a preparação dos extratos fracionados as algas foram retiradas do *freezer* e liofilizadas. Triturou-se 30 g da massa seca da alga em nitrogênio líquido até obter um pó. Em seguida adicionou-se 300 mL de hexano e foi colocado no sonicador por 30 min e depois deixado *overnight*. No dia seguinte, o extrato foi centrifugado a 10.000 rpm por

10 minutos e em seguida, filtrado em papel *Whatman*. A massa algal foi novamente eluída com hexano, repetindo-se o procedimento por três vezes. O mesmo procedimento foi adotado para os demais solventes: clorofórmio, metanol e para água. Durante a passagem de um solvente para outro, a massa algal foi deixada em estufa com ventilação em temperatura ambiente para permitir que o solvente precedente evaporasse e não interferisse na extração do subsequente.

Para preparação dos extratos aquosos brutos (EAB) partiu-se de massas de algas fresca e procedeu-se a extração com água da mesma forma como no procedimento acima citado. O esquema representativo está ilustrado na Figura 5.

Figura 5. Esquema representativo do processo de extração para obtenção das frações hexânicas, clorofômicas, metanólicas e aquosas provenientes da massa algal liofilizada, além do extrato aquoso bruto de cada espécie obtido a partir da massa fresca.

4.6. Análise das proteínas solúveis totais

4.6.1. Método de Bradford

Foi adotado o protocolo apresentado por Bradford (1976) no qual usa-se o corante “Coomassie brilliant blue” BG-250 (BioRad) e a absorbância é lida no espectrofotômetro em comprimento de onda de 595nm. Este método é baseado na

interação entre o corante BG-250 e as macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (Compton & Jones, 1985).

4.6.2. *Método do BCA (Ácido Bicinconínico) ou método de Smith*

Este método baseia-se na metodologia proposta por Smith *et al.* (1985) em que há uma reação do cobre (II) com proteínas em meio alcalino, produzindo cobre(I) e formando um complexo com o corante BCA, que absorve fortemente na região de 562nm. Depois de preparadas, as amostras foram incubadas por 30 min a 60°C e em seguida, a absorbância foi lida no espectrofotômetro em comprimento de onda de 562nm.

4.6.3. *Método de absorção no Ultravioleta (medida a 280nm)*

Este método baseia-se no fato de que as proteínas absorvem luz na região do 280nm devido à presença de diversos aminoácidos (fenilalanina, cisteína, cistina, triptofano, metionina, histidina e tirosina) (Stoscheck, 1990). As amostras foram preparadas e a absorbância lida em 280nm.

Para todos os métodos acima descritos foram feitas análises com a massa fresca (MF) e seca (=liofilizada) (MS) das algas. A análise da MS teve por finalidade avaliar o potencial de interferência do teor de água presente no talo das algas. Visto que, em geral, o teor de água ultrapassa 70 % da massa seca, a quantidade pesada para as amostras de MS foram menores em relação à MF. O cálculo da concentração de proteínas foi feito com base em curva-padrão a partir de Albumina Bovina Sérica (BSA).

4.7. Análise dos pigmentos ficobilinas e clorofila *a* por espectrofotometria

A metodologia utilizada baseou-se na tese de Donato (2005). As amostras de MF foram trituradas em sala escura e 300 mg da massa triturada foi eluída em 4 mL de tampão fosfato 0,05M pH 5,5, na temperatura de 4°C. O material foi centrifugado por 20 minutos a 20550 rpm na centrífuga RC-5B da Sorvall, com o rotor SS-34. Todas as amostras foram feitas em triplicatas. Destas, 1 mL de cada sobrenadante foi analisado em espectrofotômetro fazendo-se uma varredura entre 450-700 nm, obtendo-se dados a cada 1,0 nm a uma velocidade de 400 nm.min⁻¹.

Os valores de concentração (µg.mL⁻¹) das ficobiliproteínas, padronizados pela MF, foram calculados seguindo as fórmulas abaixo, de acordo com Kursar *et al.* (1983):

- Aloficocianina: AFC = (181,3 x abs₆₅₁) – (22,3 x abs₆₁₄)
- Ficocianina: FC = (151,1 x abs₆₁₄) – (99,1 x abs₆₅₁)
- Ficoeritrina: FE = (155,8 x abs_{498,5}) – (40 x abs₆₁₄) – (10,5 x abs₆₅₁)
- Clorofila *a*: Cla = (11,85 x abs₆₆₄) – (1,54 x abs₆₄₇) – (0,08 x abs₆₃₀)

4.8. Atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos de patogenicidade humana e rizobactéria

As bactérias e fungos utilizados no presente experimento foram obtidos comercialmente. Dentre as espécies bacterianas, as causadoras de patologias humanas gram-negativas são: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10231, *Salmonella typhi* ATCC 19430 e as espécies gram-positivas são *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49 619, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e a rizobactéria gram-positiva *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Utilizaram-se três espécies de levedura sendo elas: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 29212 e *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112.

A metodologia para realização da atividade antibacteriana por microdiluição seguiu as normatizações do documento de referência M7-A6 (NCCLS, 2003), assim como para a atividade antifúngica foi realizada conforme as normatizações do documento de referência M27-A2 (NCCLS, 2002).

4.8.1. Crescimento de microorganismos a partir do padrão comercial ATCC

4.8.1.1. Bactérias

O crescimento das bactérias foi feito a partir de uma pequena amostra do material obtido comercialmente que foi colocado em contato com o caldo Mueller Hinton II por aproximadamente 24h em temperatura de 35 °C. A partir do caldo, semeou-se as bactérias em placa de Petri contendo de 12-15 mL de ágar-nutriente e deixou-se crescer por 24 h a 35°C.

4.8.1.2. Fungos

O crescimento dos fungos foi feito a partir de uma pequena amostra do material obtido comercialmente que foi colocado em contato com o caldo Sabouraud dextrose num período entre 24-48 h a 35 °C. A partir desse meio, semeou-se os fungos em placa de Petri contendo 12-15 mL de ágar Sabouraud dextrose e deixou-se crescer por 24-48 h a 35°C.

4.8.2. Preparo dos inóculos para teste

4.8.2.1. Bactérias

Com um alça de platina esterilizada transferiu-se 3 a 4 colônias de bactérias para tubos contendo 5 mL de caldo Mueller Hinton II (pH 7.2 a 7.4) e deixou-se crescer em estufa por 2 a 3 horas a 35°C. A densidade celular necessária para o ensaio foi ajustada com o auxílio de um espectrofotômetro Shimadzu UV-1650 PC (Kyoto, Japan), acrescentando-se meio de cultura líquido Mueller Hinton II suficiente para obter uma transmitância equivalente a uma solução-padrão da escala de MacFarland 0.5 em espectrofotômetro ($\lambda=625$ nm) obtendo-se uma absorbância entre 0.08 e 0.1 resultando numa concentração de células 1×10^8 UFC.mL⁻¹. A suspensão utilizada no ensaio foi produzida fazendo-se uma diluição 1:100 seguida de uma diluição 1:10 da suspensão-padrão com meio Mueller Hinton II, resultando na concentração 1×10^5 células.mL⁻¹.

4.8.2.2. Fungos

Com uma alça de platina esterilizada transferiu-se 3 a 4 colônias de fungos para tubos contendo 5 mL de solução salina estéril (0.145 mol.L⁻¹). A suspensão resultante

foi colocada em agitador Vortex durante 15 segundos. A densidade celular foi ajustada com o auxílio de um espectrofotômetro Shimadzu UV-1650 PC (Kyoto, Japan), acrescentando-se solução salina suficiente para obter uma transmitância equivalente a uma solução-padrão da escala de MacFarland 0.5 em espectrofotômetro ($\lambda=530$ nm) obtendo-se uma absorbância entre 0.08 e 0.1 resultando numa concentração de células entre 1×10^6 e 5×10^6 UFC.mL⁻¹. O ajuste da escala também é feito com solução salina de crescimento de fungos. A suspensão utilizada no ensaio foi produzida fazendo-se uma diluição 1:100 seguida de uma diluição 1:20 da suspensão-padrão com meio líquido RPMI 1640, resultando em concentrações de $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células.mL⁻¹.

4.8.3. *Preparação dos veículos de diluição*

Foram testados três veículos para diluição das amostras a serem testadas conforme indicados no documento de referência, sendo que o veículo 1 apresentou-se como o melhor.

Veículo 1: 10% etOH + 2 % Tween 80 + 88% H₂O

Veículo 2: água deionizada

Veículo 3: 10% DMSO (dimetilsulfóxido) + 90% H₂O

4.8.4. *Ensaio de microdiluição em caldo*

Prepara-se o meio com a amostra de modo a se obter uma concentração quatro vezes (4X) a necessária para o teste de microdiluição (4000 µg/mL). As concentrações 4X da amostra são dispensadas nos poços das fileiras 1 a 6 das placas de microdiluição, em volumes de 50 µL, com uma pipeta multicanal. A fileira 1 deverá conter a maior concentração da droga (1000 µg/mL) seguida pelas demais concentrações (500, 250, 125, 62,5, 31,25 µg/mL). Cada poço da placa é inoculado com 50 µL da correspondente suspensão do inóculo nas concentrações acima especificadas ajustadas segundo a escala de McFarland 0,5.

Na fileira 7 da placa serão efetuados os poços controle de crescimento – teste de viabilidade dos microorganismos. Estes conterão 100 µL de meio estéril, isento de droga/extrato, e serão inoculados com 100 µL das suspensões 2X concentradas dos

inóculos. A fileira 8 da placa será utilizada como controle de esterilidade do meio, onde os poços conterão apenas meio de cultura isento de droga.

Padrões antibióticos Tetraciclina nas concentrações finais de 64, 32, 16, 8, 4 e 2 µg/mL para bactérias e Fluconazol nas mesmas concentrações para fungos foram utilizados como controle para esta análise. Essa faixa de concentração utilizada refere-se àquela em que os padrões apresentam atividade sobre os microorganismos. Os testes foram realizados em triplicata.

Após o preparo das placas, as mesmas foram lidas no tempo zero ($t = 0$) de incubação e após o período de incubação de 24 horas a 35°C para bactérias e por 48 horas a 35°C para fungos (exceto *C. neoformans*, que precisa de 72h de incubação).

Após o período de incubação, para análise dos resultados foi observada a presença ou ausência de crescimento microbiano (turvação do meio), e a determinação da CIM foi realizada espectrofotometricamente em leitor de microplaca. Nesta, etapa, quando há formação de grumos na suspensão que possa prejudicar a leitura, deve-se tentar homogeneizar com auxílio de uma pipeta, agitação no próprio leitor de microplaca ou outra técnica.

4.8.5. *Determinação espectrofotométrica da Concentração Inibitória Mínima (CIM)*

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é a menor concentração de um agente antimicrobiano que resulta em manutenção ou redução do inóculo em relação ao controle no teste de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo (Hammer *et al.*, 2003).

Para a determinação espectrofotométrica da CIM pelo método de microdiluição, foi empregada a técnica descrita pela NCCLS modificada (Hammer, *et al.*, 1999; Burt, 2004). Trata-se de um ensaio quantitativo aplicado à avaliação da potência da atividade antimicrobiana de misturas ou substâncias puras.

As leituras espectrofotométricas de cada poço foram realizadas por meio do leitor automático de microplacas Tecan M200 (Männedorf, Switzerland) ajustado a 625 nm para bactérias e 492 nm para fungos após agitação. Os pontos finais da CIM foram determinados como a primeira concentração do agente antifúngico em que a turbidez nos poços foi $\leq 50\%$ que o apresentado nos poços controle (Pfaller *et al.*, 1995).

4.8.6. Determinação do efeito da concentração dos extratos

O efeito da concentração dos extratos foi determinado através da subcultura de 10 µL de cada poço em que houve inibição em placas de Petri contendo ágar Nutriente (bactérias) ou ágar Sabouraud (fungos) e incubando pelos tempos discriminados acima (item 4.8.4). Qualquer crescimento dos inóculos nas placas de ágar corresponde ao efeito bacteriostático/fungistático, enquanto que o efeito bactericida/fungicida é caracterizado pelo não crescimento dos inóculos nas placas de ágar.

4.8.7. Análises estatísticas

As frações dos extratos foram preparadas em triplicatas e as atividades antifúngica e antimicrobiana estão expressas em porcentagem de atividade (% AE) através de uma fórmula adaptada de Felício *et al.* (2008):

$$\% AE = 100 - \frac{AE - AEB}{AC - ACB} \times 100$$

Onde:

AE representa a absorbância das placas após o tempo de incubação;

AEB é a absorbância das placas contendo meio de cultura, amostra e inóculo no t=0 de incubação;

AC é a absorbância das placas contendo o controle negativo (com ou sem veículo) (100% de crescimento do inóculo)

ACB é a absorbância das placas contendo meio de cultura.

Todas as CIM foram calculadas por regressão não-linear.

4.9. Ensaio fitopatogênico

4.9.1. Obtenção do isolado

Os isolados do fitopatógeno foram obtidos de frutos de mamão da variedade Golden, naturalmente infectados, adquiridos no comércio local do Bairro Jardim Bonfiglioli, São Paulo, SP.

Os frutos foram transportados para o laboratório, onde foram mantidos à temperatura de 25 °C e diariamente observados para a verificação do desenvolvimento das lesões da antracnose. Após o desenvolvimento das lesões, procederam-se os isolamentos retirando-se os filamentos dos locais lesionados com auxílio de uma pinça previamente esterilizada. Esses filamentos foram desinfetados passados no etOH 50% por 1 minuto, hipoclorito de sódio a 1% por 30 segundos e em seguida enxaguados com água destilada e esterilizada (Dias *et al*, 2004). Após a desinfestação, procedeu-se a secagem rápida em papel esterilizado e, logo depois, transferidos para as placas de Petri de 9 cm de diâmetro (Corning, NY/USA), contendo como substrato o meio batata dextrose ágar (BDA). Em seguida, procedeu-se a incubação em câmara de crescimento ajustada à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Sucessivas repicagens foram feitas semanalmente a fim de deixar o isolado livre de contaminantes (Goes, 1995) e posteriormente observou-se o aparecimento das estruturas reprodutivas (Figura 6).

Figura 6. Conídios nas hifas de *Colletotrichum gloesporioides* desenvolvido em cultura sob condições controladas.

4.9.2. Teste de inibição do crescimento micelial

O bioensaio foi realizado incorporando-se os extratos das algas ao meio de cultura, adotando-se a técnica descrita por Edgington *et al.* (1971), modificada por Menten *et al.* (1976) e ajustada conforme necessidade.

Inicialmente foi feito um teste para a escolha do solvente capaz de solubilizar eficientemente os extratos, além de não interferir no crescimento das hifas. Para isso, etOH e DMSO foram adicionados ao meio de cultura autoclavado ainda fundente para se obter as concentrações finais de 1 %, 5 % e 10 % dos mesmos. Após solidificação do meio, discos de 5 mm de diâmetro foram retirados do meio de cultura contendo micélio do fungo com o auxílio de um vazador flambado e colocados no centro das placas de Petri de 35 mm x 10 mm (Corning, NY/USA).

Para determinação da possível interferência do solvente no crescimento micelial foi usado como controle positivo apenas meio de cultura com o inóculo. Para distinção entre os resultados foi utilizado sinais: (+++) para crescimento igual ao controle positivo, (++) para crescimento de 95-60 % do controle positivo, (+) para crescimento de 59-30 % do controle positivo, (-) para crescimento inferior a 30 % do controle positivo. O crescimento foi acompanhado por três dias.

Com os resultados obtidos no teste preliminar os extratos foram dissolvidos em DMSO obtendo-se uma solução estoque de 50 mg.mL^{-1} do ingrediente ativo que, ao ser adicionado ao meio de cultura foi obtida uma concentração de $500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ com DMSO a 1 %. Para a incorporação do extrato ao meio de cultura seguiu-se o seguinte procedimento: o meio de cultura foi preparado e autoclavado e, ainda fundente, foi aliquotado em pequenos frascos de 15 mL limpos e autoclavados. Para a adição dos extratos os frascos contendo meio BDA já solidificado foram levados um a um por poucos segundos ao microondas a fim de torná-lo líquido novamente, momento em que se adicionou o extrato. Após a homogeneização verteu-se 2 mL do meio nas placas de Petri de 35 mm x 10 mm (Corning, NY/USA). Após solidificação do meio, discos de 5 mm de diâmetro foram retirados do meio de cultura contendo micélio do fungo com o auxílio de um vazador flambado e colocados no centro das placas de Petri com os extratos. O *screening* inicial foi feito com a concentração de $500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ a fim de selecionar aqueles extratos que são ativos contra o fungo. Nesta etapa selecionou-se os extratos que reduziram 50% do valor do IVCN (Índice de Velocidade de Crescimento

Micelial) de *C. gloesporioides* das placas controle.

A partir dos resultados obtidos, procedeu-se a diluição em série da solução estoque, de modo que, quando adicionada ao meio BDA líquido, produziu as concentrações desejadas de 100, 50, 10 e 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O experimento foi feito em triplicata para cada extrato e controle, no qual cada placa é considerada uma repetição. As placas foram incubadas em câmara de crescimento a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas. Fez-se o controle negativo (esterilidade do meio), controle positivo (crescimento micelial em meio de cultura sem adição de substâncias) e controle do veículo (BDA com adição de DMSO 1 %).

Os resultados foram avaliados medindo-se diariamente o crescimento do diâmetro micelial em dois sentidos, perpendicularmente, usando uma régua graduada em milímetros (mm), até que na placa controle os fungos atingissem o bordo dela.

Após a obtenção do diâmetro da colônia em cada dia de avaliação, retirou-se a média entre os eixos e foi calculado o IVCm para cada repetição e expressa em cm.dia^{-1} conforme metodologia descrita por Oliveira (1991) e Labanca (2002), utilizando-se da seguinte fórmula:

$$\text{IVCM} = \frac{\sum(D - D_a)}{N}$$

Onde,

IVCM: Índice de velocidade de crescimento micelial

D: Diâmetro médio atual

D_a: Diâmetro médio anterior

N: número de dias após a repicagem

4.10. Atividade anticolinesterásica

4.10.1. Ensaio qualitativo por autografia (Cromatografia de Camada Delgada: CCD)

Todas as amostras foram solubilizadas em etOH e para o desenvolvimento da cromatografia os seguintes fase móveis foram utilizados:

Fração Hexânica – C₆H₁₄:AcOEt (9:1);

Fração Clorofórmica – CHCl₃:MeOH (9:1);

Fração Metanólica - CHCl₃:MeOH (9:1);

Fração Aquosa – BuOH:AcOEt.:H₂O (4:2:5) (BAW)

Em seguida a placa foi nebulizada com a solução da enzima acetilcolinesterase (6,66 U) acrescida de albumina bovina fração V (0,1 %) e o solvente evaporado novamente. A placa cromatográfica foi incubada em uma câmara úmida fechada a 37 °C por 20 minutos, e em seguida nebulizada com uma mistura das soluções: etanólica de 1-naftil acetato (5 mL; 0,25 %) e aquosa do sal Fast Blue B (20 mL; 0,25 %) (Marston *et al.*, 2002).

A coloração roxa aparece em cerca 2 minutos. O aparecimento de mancha branca (indicação de inibição da reação enzimática), sobre um fundo de coloração roxa indica que houve inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase.

Os cromatogramas obtidos foram observados em comprimento de onda de 254 nm (UVC) e 366 nm (UVL), e fotografados em câmera fotográfica Epson. Foram marcados os pontos onde houve inibição da reação enzimática, ou seja, presença de halos de cor branca indicadores de inibição da acetilcolinesterase. Como controle positivo foi utilizado fisostigmina (1 µg) dissolvida em metanol.

4.10.2. Ensaio quantitativo em microplaca

A atividade anticolinesterásica foi avaliada usando um leitor KC4-Biotek, em absorbância a 405 nm, baseado no método de Ellman (Ellman *et al.*, 1961). Nas 96 cavidades da placa, foram adicionados 25 µL de iodeto de acetiltiocolina 15 mM, 125 µL de 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] 3 mM na solução (C) (DTNB ou reagente de Ellman), 50 µL da solução (B), 25 µL da amostra de extrato dissolvida em etOH e diluída 10 vezes na solução (A) para obter uma concentração final de 1 mg/mL (Rhee *et al.*, 2001).

A absorbância foi medida a 405 nm a cada 30 segundos por 3 vezes. Em seguida, adicionou-se 25 µL da enzima acetilcolinesterase (0,22 U.mL⁻¹) e a absorbância medida novamente a cada 10 minutos por 2 vezes.

A porcentagem de inibição da acetilcolinesterase foi calculada através da comparação das velocidades de reação (hidrólise do substrato) das amostras em relação ao branco (10 % de MeOH na solução A, atividade total AChE=100 %).

Soluções: **Solução A:** Tris/HCl 50 mM, pH=8; **Solução B:** Tris/HCl 50 mM, pH=8, com 0,1% de albumina bovina sérica fração V; **Solução C:** Tris/HCl 50mM, pH=8, com 0,1 M de NaCl e 0,02 M de MgCL₂ .6H₂ O.

4.11. Avaliação da atividade antiradicalar: método DPPH

O ensaio antioxidante utilizando-se DPPH (2,2-difenil¹-picrilidrazila, radical livre) fundamenta-se na propriedade deste radical em extrair prótons de moléculas doadoras, reduzindo-se. O radical DPPH apresenta absorção em 517 nm no espectrofotômetro e, após reação com moléculas antioxidantes, esta absorção é diminuída, ou seja, é observada uma mudança na coloração (de um violeta intenso ao amarelo claro) (Molineux, 2003; Hostettmann *et al.*, 2003).

Figura 7. Esquema demonstrativo do processo de reação com o radical DPPH.

4.11.1. Ensaio qualitativo por autografia (Cromatografia de Camada Delgada: CCD)

Todas as amostras foram solubilizadas em etOH. Para o desenvolvimento da cromatografia foram aplicados 200 µg de extrato hexânico e metanólico e 100 µg de extrato clorofórmico na placa de sílica e, os seguintes fase móveis foram utilizados:

Fração hexânica - Hexano:AcOEt (9:1)

Fração clorofórmica – Clorofórmio:MeOH (9:1)

Fração metanólica - Clorofórmio:MeOH (9:1)

Em seguida, as placas foram nebulizadas com uma solução etanólica do radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, 0.2 %, Fluka) e incubados em temperatura ambiente por 30 minutos. A atividade antiradical é observada com o aparecimento de

halos amarelo esbranquiçados sobre um fundo roxo (Tasdemir *et al.*, 2004). Catequina e quercetina foram utilizadas como controle positivo.

4.11.2. Ensaio quantitativo em microplaca

Para a determinação, foi utilizada uma microplaca no qual, em cada poço continha 100 µL da solução da amostra, onde adicionou-se a ela 20 µL de uma solução DPPH 0,004 % e o volume foi ajustado para 200 µL com etOH. Após o preparo, as amostras foram levadas ao leitor de microplacas multimodular Infinite M200 marca Tecan e incubadas por 30 min em temperatura de 25 °C no escuro e então o decréscimo da absorção foi medido por espectrofotometria num comprimento de onda de $\lambda = 517$ nm.

Os extratos analisados com esta metodologia foram os extratos hexânicos, clorofórmicos e metanólicos das espécies selecionadas nas diferentes concentrações (2000, 1000, 500, 250, 125, 50 e 25 µg.mL⁻¹). Os extratos aquosos não serão testados devido à ineficiência da solubilidade destes na mistura de reação.

Para cada concentração do extrato testado foram descontados o branco da amostra (mesma concentração da amostra em etOH) como também o branco do DPPH (etOH) da solução de DPPH (solução DPPH em etOH).

Para a comparação com os extratos preparados, padrões de extrato bruto de *Ginkgo biloba* e substâncias puras (vitamina E e ácido gálico) também serão avaliados nas mesmas condições, sendo estes, os controles positivos de ação antioxidante. Os testes foram realizados em triplicata para cada concentração, de acordo com Pellati *et al.*, (2004) e Ferreres *et al.* (2006).

A porcentagem de inibição será calculada através da equação:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{abs}_{\text{DPPH}} - \text{abs}_{\text{amostra}}}{\text{abs}_{\text{DPPH}}} \times 100$$

4.12. Ensaio citotóxico

4.12.1. Reagentes e meios de cultura

Meio McCoy's 5A modificado, Meio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), cloridrato de doxorubicina, fungizone (amfotericina B), penicilina, estreptomicina, brometo de tetrazólio azul de tiazolina (MTT), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, sal dissódico), tripsina e azul de tripan foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Soro fetal bovino (SFB) foi obtido da Vitrocell Embriolife (Campinas, Brazil). NaCl da Synth (Diadema, Brazil), bicarbonato de sódio da Merck (Darmstadt, Germany), D-glucose da Becto Chemical (São Paulo, Brazil), KCl da Cetus (São Paulo, Brazil), tampão fosfato salino de Dulbecco (DPBS) da Gibco BRL (Grand Island, USA) e dimetilsulfóxido (DMSO) da Vetec Química Fina LTDA (Duque de Caxias, Brazil). Todos obtidos com alto grau de pureza e usados no ato no recebimento. Água utilizada foi destilada, deionizada e filtrada (sistema Millipore, Milli-Q; resistividade, 18 MΩ cm).

4.12.2. Instrumentos e metodologia

A solução estoque de doxorubicina foi preparada em água e suas respectivas concentrações foram determinadas por espectrometria de luz visível em espectrofotômetro do modelo UV-1650 PC da Shimadzu (Kyoto, Japan) e usando o parâmetro do coeficiente de extinção molar of $11.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 480 nm (Zeman *et al.*, 1998).

Já as soluções estoque dos extratos foram preparadas em DMSO ou etOH e subsequêntemente diluídas no meio de crescimento celular fazendo com que a concentração do solvente orgânico no meio de cultura nunca ultrapassasse 0,5 % (em volume). As espécies utilizadas no estudo foram *Laurencia aldingensis*, *L. catarinensis*, *L. dendroidea*, *L. intricata*, *L. translucida* e *Palisada flagellifera*.

O ensaio de exclusão usando o azul de tripan (Perry *et al.*, 1997) foi rotineiramente empregado para avaliar as condições das células nas culturas originais, permitindo assim, que todos os ensaios fossem realizados com culturas cuja viabilidade celular fosse superior a 95 %. Todos os ensaios foram feitos com células em fase de

crescimento exponencial. Os protocolos de repicagem usados neste estudo seguiram as recomendações especificadas pela ATCC.

A viabilidade celular foi medida usando o método MTT (Mosmann, 1983; Garcia-Peres *et al.*, 2010). Neste ensaio foi utilizado microplacas de 96 poços transparentes de fundo chato onde semeou-se uma densidade de 5.000 células/poço (100 µl/poço) e deixou-se aderir ao fundo da placa e crescer por 24 h em incubadora.

Para um screening inicial objetivou-se explorar em que proporção as substâncias presentes nos extratos das espécies de algas do complexo *Laurencia* são citotóxicos para a linhagem de células tumorais MES-SA, conforme propostas como modelo neste trabalho. Nos ensaios, as células foram expostas ao meio de cultura contendo a droga padrão (doxorubicina) ou extrato de alga por um período de 24 horas (500 µg extrato de alga/mL de meio de cultura celular) e em seguida foi medida a respectiva (e relativa) taxa de sobrevivência após 24 horas de exposição contínua. A avaliação da viabilidade celular foi feita através do método do MTT, e a partir dos resultados mais promissores fez-se um novo ensaio com exposição aos extratos em diferentes concentrações finais (2; 5; 10; 25; 50; 100; 200 µg/mL) por um período de 72 horas. A doxorubicina, para as células MES-SA e HeLA foi testada em concentrações menores (10^{-4} ; 5.10^{-4} ; 10^{-3} ; 5.10^{-3} ; 10^{-2} ; 5.10^{-2} ; 10^{-1} ; 5.10^{-1} , 1; 5 µM) do que para a linhagem mutante MES-SA/DX5 (10^{-2} ; 10^{-1} ; 5.10^{-1} ; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 50; 100 µM) devido à sua resistência adquirida.

O ensaio MTT foi realizado no leitor de microplaca modelo Infinite M200 da Tecan (Männedorf, Switzerland). Os poços com células expostas apenas ao meio de cultura ou ao meio de cultura contendo veículo da droga/extrato (DMSO ou etOH) serviram como controles. Sob as condições experimentais estabelecidas neste trabalho, nenhuma citotoxicidade pôde ser atribuída aos veículos de diluição usados no preparo das soluções estoque dos extratos. A viabilidade celular foi sempre calculada em virtude dos resultados do respectivo controle.

4.12.2.1. Preparo dos extratos

O preparo dos extratos utilizados neste ensaio está descritos no item 4.5. No entanto, mais um extrato alternativo foi preparado a partir de *Palisada flagellifera* usando biomassa algal liofilizada e metanol como solvente de extração, originando o extrato metanólico bruto.

4.12.2.2. Linhagens celulares

A linhagem celular de sarcoma uterino humano MES-SA (ATCC CRL-1976™) e sua respectiva linhagem mutante MES-SA/Dx5 (ATCC CRL-1977™) foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas/VA). Estas células foram crescidas em meio de cultura McCoy's 5A modificado acrescido de 10% SFB, anfotericina B ($0,63 \mu\text{g.mL}^{-1}$), penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

O meio usado para crescimento das mutantes MES-SA/Dx5 continha também doxorubicina ($0,5 \mu\text{M}$) para que a resistência fenotípica adquirida fosse mantida (Harker, 1983; Harker & Sikic, 1985; Larroque-Lombard *et al.*, 2010).

As células de adenocarcinoma cervical humano, HeLa (CCL-2™), foram gentilmente cedidas pela professora Dra. Mari Cleide Sogayar (Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo). Estas células foram crescidas em meio DMEM igualmente acrescidas de 10% SFB, anfotericina B ($0,63 \mu\text{g.mL}^{-1}$), penicilina (100 unidades.mL⁻¹) e estreptomicina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Em todas as etapas do ensaio, o crescimento celular de todas as linhagens, foi mantido a 37°C em incubadora com atmosfera com 5% CO_2 . O experimento foi realizado em triplicata.

4.13. Análise qualitativa e semi-quantitativa das substâncias químicas por CG-EM presentes nos extratos das espécies de *Laurencia*

Para identificar as substâncias presentes em cada um dos extratos algais foi utilizado um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas tipo quadrupolo (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu, Japão) em condições cromatográficas cujas especificações seguem abaixo na Tabela 3.

Tabela 3. Condições cromatográficas para injeção dos extratos.

ITEM	ESPECIFICAÇÕES
Coluna cromatográfica	HP-5MS (5% fenil-metilpolisiloxano) 30 m x 0.250 mm x 0.25 μm
Temperatura do injetor	220°C
Programação da Temperatura do forno	60°C a 260°C ($3^\circ\text{C}/\text{min}$) e mantida a 260°C por 40 min

Temperatura de interface	240 °C
Temperatura do detector	240 °C
Volume de injeção	1 µL
Split	1:5
Gás de arraste	He
Fluxo	1,0 mL/min
Modo de ionização	Impacto de elétrons (EI) (70 eV)
Detector	modo <i>scan</i> ($40^{-1}000\ m/z$)

A identificação dos constituintes químicos foi baseada na comparação dos espectros de massas de substâncias de referência das bibliotecas NIST 08 e NIST 08s disponível no equipamento GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu) e Nist Mass Spectral Search Program da Nist/ Epa/ Nih Mass Spectral Library Version 2.0, e também por meio de comparação dos índices de retenção linear (Índice de Kovat's) calculado em relação aos tempos de retenção (t_R) de uma série homóloga de *n*-alcanos (padrões Sigma-Aldrich) conforme equação abaixo:

$$IK = 100 \times NC + 100 \times \left[\frac{t_R(X) - t_R(P_Z)}{t_R(P_{Z+1}) - t_R(P_Z)} \right]$$

Onde:

NC é o número de carbonos do padrão hidrocarboneto anterior;

X é o tempo de retenção do componente em análise;

P_Z é o tempo de retenção do hidrocarboneto anterior ao componente avaliado;

P_{Z+1} é o tempo de retenção do hidrocarboneto posterior ao componente avaliado.

Para as substâncias cujos IK iguais ou semelhantes foram encontrados na literatura foram considerados percentuais de similaridade iguais ou superiores a 80%. No caso das substâncias cujos IK não foram encontrados na literatura, considerou-se apenas o percentual de similaridade proporcionado pelas bibliotecas NIST 08 e NIST 08s, assim como a comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles disponíveis em literatura e nas outras bibliotecas.

A concentração relativa (%) dos constituintes presentes em cada fração de extrato foi realizada de modo semi-quantitativo. A análise embasou-se na integração de todos os picos obtidos no TIC (Total Ion Chromatogram) e subsequente comparação da área relativa de cada pico em relação ao somatório das áreas relativas dos picos presentes no cromatograma.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise das proteínas solúveis totais

Tabela 4. Relação do teor de proteínas totais encontrado nas massas frescas (mg proteína.g⁻¹ MF) e secas (mg proteína.g⁻¹ MS) de cada uma das espécies, para cada método espectrofotométrico testado

Espécies	Bradford		BCA		UV	
	MF	MS	MF	MS	MF	MS
LA	2,72	11,73	5,78	52,60	35,11	236,61
LD	3,59	11,45	1,87	29,14	18,45	174,67
LDV	1,71	6,27	4,21	45,95	28,16	201,05
LI	4,12	12,45	7,61	15,71	41,36	226,06
LT	4,16	6,15	5,84	9,42	28,90	303,83
PF	2,69	9,74	6,32	21,66	26,36	188,56
PP	2,66	8,84	7,59	32,34	35,25	186,33

Figura 8. Dosagem de proteína em massa fresca (MF) e massa seca (MS) de cada uma das espécies de algas, usando os métodos: Bradford (A e B), Ácido bicinonínico (C e D) e absorção no UV (280nm) (E e F).

Com relação às vantagens e desvantagens dos métodos testados, o grande problema é a interferência que pode explicar os resultados discrepantes entre os métodos, já que todos eles são rápidos e de custo relativamente baixo. O método de UV apresentou resultados com até 30% a mais de proteína na massa de alga, o que é irreal. O método de BCA é bastante preciso e muito usado, mas açúcares em geral já foram confirmados como interferentes devido à redução parcial do cobre (II) podendo acarretar em falso positivo (Zaia *et al*, 1998). O método de Bradford foi o mais coerente entre os dados de MS e MF e quantidade de proteína por grama de algas (0,17-1,24 %), indicando ser o melhor método de quantificação de proteína em algas.

5.2. Análise de pigmentos por espectrofotometria: ficobilinas e clorofila *a*

Figura 9. Valores de concentrações de ficobilinas em massa fresca de algas das espécies do complexo *Laurencia*. AFC = aloficocianina; FC = ficocianina; FE = ficoeritrina.

Figura 10. Relação dos valores de ficobilinas na quantidade total de proteínas solúveis nas espécies de algas do complexo *Laurencia*. AFC = aloficocianina; FC = ficocianina; FE = ficoeritrina.

Figura 11. Teor de Clorofila *a* obtido em massa fresca das espécies do complexo *Laurencia*.

Em todas as espécies analisadas para dosagem de ficobilinas, ficoeritrina (FE) apresentou-se em maior quantidade, corroborando o que já se observa a olho nu com as colorações do talo que variam de rosa intensa a marrom avermelhado.

A variante pigmentar verde (LDV), mesmo com o talo esverdeado, também apresenta mais FE em relação à FC e AFC. Entretanto, os valores de FC e de AFC são maiores na variante pigmentar do que nos exemplares normais (LD); o que se evidencia também no gráfico de ficobilinas *versus* proteínas solúveis totais, demonstrando seu menor teor protéico em relação à LD (Figura 10).

Laurencia intricata e *L. aldingensis* foram as espécies que apresentaram os maiores teores de FE o que pode estar relacionado às suas colorações avermelhada e rosa intensa, respectivamente. Por outro lado, *Palisada perforata* e *L. translucida* apresentaram os menores teores de ficobilinas e de clorofila *a*.

5.3. Atividade antimicrobiana contra bactérias de patogenicidade humana e rizobactéria

Os dados obtidos pela técnica de microdiluição para bactérias estão discriminados na Tabela 5.

Tabela 5. Valores de CIM (≤ 50 % daqueles obtidos nos poços controle) obtidos a 625 nm, expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ no teste de microdiluição em caldo dos extratos das espécies de *Laurencia* frente às bactérias e o efeito da concentração sobre elas.

Extrato	Bactéria	EC	PA	KP	ST	SA	SP	EF	BS
	ATCC nº	(25922)	(27853)	(10231)	(19430)	(29213)	(49619)	(29212)	(6633)
LA-EH	CIM	588,2	62,8	n.d.	562,4	n.d.	353,6	n.d.	n.d.
	Efeito da concentração	bacteriostático	bactericida	-	bacteriostático	-	bacteriostático	-	-
LA-EC	CIM	561,7	118,7	791,2	661,9	n.d.	297,8	213,6	673,3
	Efeito da concentração	bacteriostático	bacteriostático	bacteriostático	bacteriostático	-	bacteriostático	bacteriostático	bacteriostático
LA-EM	CIM	670,7	235,0	n.d.	n.d.	441,1	51,1	n.d.	n.d.
	Efeito da concentração	bacteriostático	bacteriostático	-	-	bacteriostático	bacteriostático	-	-
LA-EA	CIM	n.d.	651,2	n.d.	n.d.	n.d.	374,2	n.d.	n.d.
	Efeito da concentração	-	bacteriostático	-	-	-	bacteriostático	-	-
LA-EAB	CIM	958,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Efeito da concentração	bacteriostático	-	-	-	-	-	-	-
LC-EH	CIM	207,4	952,7	n.d.	n.d.	n.d.	85,1	n.d.	n.d.
	Efeito da concentração	bacteriostático	bacteriostático	-	-	-	bacteriostático	-	-
LC-EC	CIM	440,2	279,5	690,9	605,0	290,3	262,3	n.d.	121,4
	Efeito da concentração	bacteriostático	bacteriostático	bacteriostático	bacteriostático	bacteriostático	bacteriostático	-	bacteriostático
LC-EM	CIM	439,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Efeito da concentração	bacteriostático	-	-	-	-	-	-	-
LC-EA	CIM	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Efeito da concentração	-	-	-	-	-	-	-	-

Extrato	Bactéria	EC	PA	KP	ST	SA	SP	EF	BS
	ATCC n°	(25922)	(27853)	(10231)	(19430)	(29213)	(49619)	(29212)	(6633)
LD-EH	CIM	676,2	700,7	n.d.	n.d.	n.d.	351,0	n.d.	639,1
	Efeito da concentração	bacteriostático	bacteriostático	-	-	-	bacteriostático	-	bacteriostático
LD-EC	CIM	803,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	381,0	n.d.	524,9
	Efeito da concentração	bacteriostático	-	-	-	-	bacteriostático	-	bacteriostático
LD-EM	CIM	577,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	776,7
	Efeito da concentração	bacteriostático	-	-	-	-	-	-	bacteriostático
LD-EA	CIM	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Efeito da concentração	-	-	-	-	-	-	-	-
LD-EAB	CIM	n.d.	n.d.	922,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Efeito da concentração	-	-	bacteriostático	-	-	-	-	-
LI-EH	CIM	n.d.	n.d.	-	899,6	178,6	n.d.	n.d.	136,4
	Efeito da concentração	-	-	-	bacteriostático	bacteriostático	-	-	bacteriostático
LI-EC	CIM	924,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	413,1
	Efeito da concentração	bacteriostático	-	-	-	-	-	-	bacteriostático
LI-EM	CIM	832,8	n.d.	n.d.	n.d.	999,5	n.d.	n.d.	n.d.
	Efeito da concentração	bacteriostático	-	-	-	bacteriostático	-	-	-
LI-EA	CIM	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Efeito da concentração	-	-	-	-	-	-	-	-
LI-EAB	CIM	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Efeito da concentração	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetraciclina	CIM	< 2	< 8	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
	Efeito da concentração	bactericida	bactericida	bactericida	bactericida	bactericida	bactericida	bactericida	bactericida

n.d = não determinado

No ensaio antibacteriano o EH de *L. aldingensis* foi bactericida contra *P. aeruginosa* numa concentração de $62,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o que é bastante promissor em se tratando de extratos. O EM desta mesma espécie mostrou-se bacteriostático a uma concentração de $51,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contra *S. pneumoniae* enquanto que o EH de *L. catarinensis* foi bacteriostático a $85,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para esta mesma bactéria.

De modo geral, os EC de *L. aldingensis* e de *L. catarinensis* podem ser considerados os mais ativos contra as bactérias testadas, pois, foram os extratos capazes de ter ação bacteriostática em sete das oito bactérias testadas.

Dentre as bactérias analisadas, *E. coli* foi a mais suscetível aos compostos das espécies de *Laurencia* pois, mais de 60% dos extratos testados apresentaram substâncias que interferem no crescimento regular das células no teste de microdiluição em caldo.

5.4. Atividade antifúngica contra patógenos humanos

Os dados obtidos pela técnica de microdiluição para fungos estão discriminados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de CIM ($\leq 50\%$ daqueles obtidos nos poços controle) obtidos a 492 nm, expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ no teste de microdiluição em caldo dos extratos das espécies de *Laurencia* frente aos fungos e o efeito da concentração sobre eles.

Extrato	Fungo	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. neoformans</i>
	ATCC nº	(10231)	(29212)	(90112)
LA-EH	CIM	100,6	49,0	130,8
	Efeito da concentração	Fungistático	Fungicida	Fungistático
LA-EC	CIM	85,3	57,8	100,2
	Efeito da concentração	Fungistático	Fungicida	Fungistático
LA-EM	CIM	65,2	< 31,25	33,9
	Efeito da concentração	Fungistático	Fungistático	Fungistático
LA-EA	CIM	n.d.	n.d.	n.d.
	Efeito da concentração	-	-	-
LA-EAB	CIM	n.d.	n.d.	110,0
	Efeito da concentração	-	-	Fungistático
LC-HE	CIM	n.d.	403,4	n.d.
	Efeito da concentração	-	Fungistático	-
LC-EC	CIM	303,8	< 31,25	600,4
	Efeito da concentração	Fungicida	Fungistático	Fungicida
LC-EM	CIM	n.d.	n.d.	n.d.
	Efeito da concentração	-	-	-

LC-EA	CIM	n.d.	n.d.	n.d.
	Efeito da concentração	-	-	-
LD-EH	CIM	183,6	812,50	542,1
	Efeito da concentração	Fungistático	Fungistático	Fungistático
LD-EC	CIM	< 31,25	176,6	176,0
	Efeito da concentração	Fungistático	Fungistático	Fungistático
LD-EM	CIM	< 31,25	n.d.	159,0
	Efeito da concentração	Fungistático	-	Fungistático
LD-EA	CIM	n.d.	n.d.	n.d.
	Efeito da concentração	-	-	-
LD-EAB	CIM	n.d.	n.d.	100,0
	Efeito da concentração	-	-	Fungistático
LI-EH	CIM	n.d.	n.d.	n.d.
	Efeito da concentração	-	-	-
LI-EC	CIM	258,0	222,7	268,6
	Efeito da concentração	Fungistático	Fungistático	Fungistático
LI-EM	CIM	n.d.	n.d.	n.d.
	Efeito da concentração	-	-	-
LI-EA	CIM	n.d.	n.d.	n.d.
	Efeito da concentração	-	-	-
LI-EAB	CIM	367,6	725,4	444,4
	Efeito da concentração	Fungistático	Fungistático	Fungistático
Fluconazol	CIM	< 2	< 2	2,4
	Efeito da concentração	Fungicida	Fungicida	Fungicida

n.d = não determinado

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos EC e EM de *L. dendroidea* foram fungistáticos a uma concentração < 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra *C. albicans*, e o EC de *L. catarinensis* apresentou o mesmo resultado.

O efeito fungistático foi observado para o extrato metanólico de *L. aldingensis* contra CP (CIM <31.25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CN (33.9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e CA (65.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). O efeito fungicida dos extratos hexânicos e clorofórmicos de *L. aldingensis* contra CP foram nos valores de 49,0 e 57,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Os mesmos extratos foram fungistáticos contra CA e CN entre 85,3 and 130,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. E ainda LC-EC foi fungicida contra CA e CN com 303,8 and 600,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

De todos os extratos de *L. intricata*, EC foi o mais ativo, com CIM maior que 220 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os extratos de *L. translucida* não mostraram atividade contra CA, enquanto que, para CP e CN foram fungistáticos em concentrações que variaram entre 177 e 743 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Ao comparar as três diferentes cepas de fungos, *C. albicans* se mostrou a mais suscetível à redução ou inibição do crescimento pelos extratos, enquanto *C. parapsilosis* foi a cepa mais suscetível aos efeitos fungicidas dos extratos. No entanto, *L. aldingensis* aparenta ser, particularmente, a alga mais interessante por se eficiente contra as três espécies de fungos testadas.

Em geral, os resultados mostraram que os extratos aquosos estimulam o crescimento celular, com exceção para os extratos aquosos brutos de *L. aldingensis* e *L. dendroidea*, que apresentaram percentuais razoáveis de inibição, sendo $110 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, contra CN.

Os valores de CIM para o controle positivo fluconazol estão de acordo com aqueles apresentados pela NCCLS ($\text{CIM} \leq 2 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

O teste antimicrobiano pelo método em microplaca foi bem sucedido para comparar a atividade das frações dos extratos das diferentes plantas. Segundo Ellof (1998) o teste é 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, requer pequena quantidade de amostra, pode ser usado com grande número de amostras, deixa resultados permanentes e não requer tempo demorado.

A atividade antimicrobiana depende tanto da espécie de alga quanto da eficiência da extração dos seus princípios ativos. Entretanto os extratos lipossolúveis das macroalgas marinhas merecem destaque na investigação como fonte de substâncias com propriedades farmacológicas (Lima-Filho, 2002).

Caccamese (1980) trabalhando com *screening* dos extratos lipídicos das espécies de algas coletadas no leste da Itália relatou a ação de *L. obtusa* (Huds.) Lamouroux contra *B. subtilis* e *E. coli*. Demonstrou também que existe diferença no potencial de inibição desses patógenos entre plantas tetraspóricas e femininas da mesma localidade coletadas na mesma data, sendo que as plantas femininas demonstraram maior potencial de inibição. Estudo mais detalhado destes extratos demonstrou de fato haver diferenças nos padrões de produção dos metabólitos nas plantas em diferentes estágios reprodutivos. *Chondrophycus undulatus* (Yamada) Garbary & Harper (como *L. undulata* Yamada) também foi ativo contra *B. subtilis*, porém *Palisada thuyoides* (Kützinger) Cassano, Senties, Gil-Rodríguez & M.T.Fujii (como *L. paniculata* J. Agardh) não apresentou nenhuma atividade.

Em outros trabalhos, como o de Silveira *et al.* (2005), já se tinha observado que, de uma maneira geral, a atividade antimicrobiana contra cepas gram-negativas e gram-

positivas aumentava com a diminuição da polaridade dos extratos de *Syagrus oleracea* (Arecaceae, Palmae), provavelmente devido à presença de ácidos graxos. O que está coerente com os resultados obtidos neste estudo, uma vez que, EH e EC foram mais ativos em relação a EA e EAB. Estes últimos, em muitos casos, estimularam o crescimento celular. Quanto à possível atividade dos ácidos graxos das algas contra os patógenos, não foi investigada neste trabalho.

Esse estudo que busca a descoberta da atividade farmacológica de novos agentes é de extrema importância num país como o Brasil, que oferece uma imensa diversidade e manifesta a ocorrência de espécies do gênero *Laurencia* já com estudos bastante promissores no mundo. Esse tipo de estudo pode vir a contribuir no desenvolvimento na área da saúde indicando os caminhos para a busca de substâncias menos tóxicas e mais eficazes na corrida contra a resistência e surgimento de microorganismos patogênicos (Meng *et al.*, 2000).

5.5. Ensaio fitopatogênico

5.5.1. Concentração dos solventes para ensaio de crescimento micelial

Os resultados da ação da concentração dos solventes etOH e DMSO sobre o crescimento micelial está demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7. Interferência da concentração dos solventes no crescimento micelial do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. (+++) nenhuma interferência no crescimento micelial; (++) alguma interferência no crescimento micelial; (-) muita interferência no crescimento micelial.

Concentração	Solvente	
	etOH	DMSO
1%	+++	+++
5%	++	+
10%	+	-

Visto que ambos os solventes etOH e DMSO a 1 % não interferiram no crescimento micelial, realizou-se um teste com os extratos hexânico, clorofórmico e metanólico de *L. dendroidea* na concentração final de 500 µg.mL⁻¹ (não houve qualquer

critério para a escolha da espécie). Os resultados foram avaliados medindo-se diariamente o crescimento do diâmetro micelial em dois sentidos, perpendicularmente, usando uma régua graduada em milímetros (mm), até que na placa controle os fungos atingissem o bordo dela (Figura 12).

Figura 12. Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de *Colletotrichum gloesporioides* sob exposição a diferentes extratos solubilizados em etOH ou DMSO e incorporados ao meio BDA de cultura na concentração final de 1%. O meio de cultura sem solvente e com etOH ou DMSO foram usados como referência.

DMSO foi usado para solubilizar os extratos no ensaio de inibição de crescimento micelial, pois mostrou resultado mais próximo daquele apresentado pelo controle e com desvio padrão menor. Ambos os solventes testados apresentaram resultados semelhantes de crescimento micelial. No entanto, dos extratos testados, o hexânico em DMSO apresentou maior crescimento, enquanto os extratos clorofórmicos e metanólicos apresentou crescimento um pouco menor que os correspondentes em etOH.

5.5.2. Screening para seleção dos extratos

Os resultados do *screening* para avaliar o potencial dos extratos são apresentados

na Tabela 8.

Tabela 8. Screening dos extratos a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ frente à inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloesporioides*. Resultados do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) expressos em cm.dia^{-1} . Amostras realizadas em triplicata.

Amostra	IVCM (cm.dia^{-1})	$\pm$
Controle crescimento	1,42	0,05
LA-EH	0,71	0,04
LA-EC	0,94	0,09
LA-EM	1,34	0,08
LA-EA	1,22	0,09
LA-EAB	1,14	0,18
LC-EH	0,59	0,03
LC-EC	0,17	0,07
LC-EM	1,39	0,04
LC-EA	1,26	0,11
LD-EH	0,44	0,06
LD-EC	0,79	0,03
LD-EM	1,11	0,11
LD-EA	1,47	0,07
LD-EAB	1,07	0,15
LI-EH	0,44	0,06
LI-EC	0,79	0,03
LI-EM	1,11	0,11
LI-EA	1,47	0,07
LI-EAB	1,07	0,15

Dos extratos testados, LA-EH, LC-EH, LC-EC, LD-EH, LI-EH mostraram-se mais ativos, com IVCM 50% menor ao do controle. Sendo, portanto, selecionados para o ensaio de curva de concentrações para determinação do IC_{50} . O resultado do teste efeito da concentração dos extratos selecionados assim como IC_{50} dos mesmos estão apresentados na Figura 13 e na Tabela 9 que se seguem.

Figura 13. Sensibilidade micelial de *C. gloesporioides* aos extratos LA-EH, LC-EH, LC-EC, LD-EH, LD-EC, LI-EH nas concentrações de 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 e 0,5 mg.mL⁻¹.

Tabela 9. Valores médios de IC₅₀ (concentração suficiente para inibir 50% do crescimento micelial) dos extratos testados expressos em mg.mL⁻¹.

Extratos	IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹)
LA-EH	0,16
LC-EH	0,07
LC-EC	ND
LD-EH	0,04
LD-EC	0,23
LI-EH	0,22
ND – não determinado	

Os resultados mostram que o extrato hexânico de *Laurencia catarinensis* e de *L. dendroidea* foram os que apresentaram o menor IC₅₀.

Já foi observado que a substância alolaurinterol extraída de *L. obtusa* coletada em Dominica (Caribe) inibe diversos fungos fitopatogênicos como o *Ustilago violacea* (Pers.) Roussel (Ustomycetes) e *Fusarium oxysporum* Schltdl. (Deuteromycetes) (Konig & Wright, 1997).

No Brasil, outros ensaios contra fitopatógenos foram realizados usando extratos ou substâncias isoladas de algas. Talamini *et al.* (2005) fizeram um *screening* com 20 espécies de algas marinhas na forma de extrato para teste de controle do oídio e antracnose do feijoeiro comum. Dentre as espécies, a alga verde *Ulva fasciata* Delile reduziu significativamente o número de colônias do fungo nos cultivares testados, o índice de velocidade de crescimento micelial em *Colletotrichum lindemuthianum*, assim como a germinação dos conídios deste último (Talamini *et al.*, 2004). Galvão *et al.* (2006) avaliaram a eficiência do extrato de *U. fasciata* no controle do míldio (*Plasmopara viticola*) e da antracnose (*Sphaceloma ampelinum* de Bary) em videiras (*Vitis labrusca*), sendo que o extrato da alga controlou os patógenos de forma significativa em relação à testemunha (água). Extratos de outras algas, tais como *Chara wallichii* A.Braun (Charophyta) também mostraram-se ativos contra fungos (Khaliq-Uz-Zaman *et al.*, 2001).

Caccamese (1981) mostrou que a ação do extrato lipídico resultante da extração metanol:tolueno (3:1) de *Laurencia obtusa*, foi de 74 % de inibição contra o fitopatógeno de citrus *Phoma tracheiphila* quando aplicou 250 µg.mL⁻¹ de extrato.

Vários trabalhos identificaram substâncias bioativas de algas contra diversos fungos causadores de doenças em plantas como é o caso do diterpenóide metoxifurcarenona extraído da alga marrom *Cystoseira tamariscifolia* (Hudson) Papenfuss que mostrou forte atividade contra *Fusarium oxysporum* e *Verticillium albo-atrum* (fitopatogênicos vasculares) (Abourriche *et al.*, 1999; Bennamara *et al.*, 1999). De outra espécie de alga marrom *Jolya laminarioides* S.M. Guimarães foi extraído o fucosterol que também inibiu o crescimento de fungos (Rahman *et al.*, 1997).

Dentre as substâncias de algas, algumas mostraram-se tão interessantes que já são mundialmente comercializados, como é o caso de Iodus 40® um concentrado de laminarina (um oligômero linear de β-1,3 glucano) obtido a partir da alga marrom *Laminaria digitata* (Klarzynski *et al.*, 2000 apud Talamini & Stadnik, 2004) e o

Stimplex® (Acadian Seaplants) composto do extrato de *Ascophyllum nodosum* (Lizzi *et al.* 1998 apud Abreu, 2005).

No entanto, estas substâncias atuam de modo diferenciado, não com uma ação inibitória direta sobre o fungo, mas estimulando a síntese de moléculas bioativas capazes de induzir a resistência em plantas (Talamini & Stadnik, 2004).

Tentativas como esta também se iniciaram no Brasil, ainda que bastante preliminares, como é o caso de um trabalho *in vivo*, em que a ulvana, extraída da *U. fasciata* apresentou uma possível indução de resistência quando pulverizada quatro dias antes da inoculação do fungo *C. lindemuthianum* (Paulert, 2005).

No âmbito da agricultura, a incorporação de substâncias orgânicas e inorgânicas tem colaborado para o manejo de patógenos de solo (Cook & Baker, 1983). As preparações resultantes da mistura de rizobactéria promotora do crescimento de plantas (RPCPs) com outros resíduos orgânicos têm apresentado resultados satisfatórios no crescimento de plantas e proteção contra doenças (Reddy *et al.*, 1999). O complexo *Laurencia* é um grupo que apresenta um bom teor de proteínas e também apresenta parcelas de vitaminas, carboidratos, lipídios e sais e pode contribuir na composição de matéria orgânica enriquecedora de solo. As frações mais apolares das espécies testadas apresentaram atividade frente a várias bactérias, o que é bastante interessante. Entretanto deve-se tomar cuidado quanto à utilização das mesmas para fins agriculturáveis, uma vez que também foram ativas contra a bactéria *Bacillus subtilis*, uma importante RPCPs que habita o solo.

As RPCPs são agentes potenciais para controle biológico de fitopatógenos (Kloepper, 1999). As rizobactérias podem suprimir as doenças por vários modos de ação como, por exemplo, induzindo a produção de antifúngicos (como a iturina) em *B. subtilis* (Araújo *et al.*, 2005). A maioria dos trabalhos sobre a influência das rizobactérias no crescimento das plantas atribui esse fenômeno a um efeito indireto associado ao controle biológico de patógenos secundários (Kloepper & Schroth, 1981).

No entanto, em alguns trabalhos, observou-se que a promoção de crescimento de plantas por rizobactérias também tem sido relacionada à produção de hormônios como giberilinas (Holl *et al.*, 1988), auxinas (Araújo *et al.*, 2005) e os ácidos láctico e succínico (Yoshikawa, 1993). Há o relato no trabalho de Araújo *et al.* (2005) que *Bacillus subtilis* produziu AIA e AIB (ácido indolbutírico) em resposta aos exsudatos de raiz de soja.

5.6. Atividade anticolinesterásica

5.6.1. Ensaio Qualitativo por Autografia (Cromatografia de Camada Delgada CCD)

Figura 14. Cromatograma da fração hexânica. Amostras solubilizadas em etOH, aplicação de 200 µg de amostra, fase móvel Hexano:AcOEt (9:1), fase estacionária Silicagel 60 F254. (A) Luz Branca. (B) Luz UVC. (C) Luz UVL. (D) Placa revelada. (E) Fisostigmina – controle positivo.

Figura 15. Cromatograma da fração clorofórmica. Amostras solubilizadas em etOH, aplicação de 100 µg de amostra, fase móvel CHCl_3 :MeOH (9:1), fase estacionária Silicagel 60 F254. (A) Luz Branca. (B) Luz UVC. (C) Luz UVL. (D) Placa revelada.

Figura 16. Cromatograma da fração metanólica. Amostras solubilizadas em etOH, aplicação de 200 µg de amostra, fase móvel CHCl_3 :MeOH (9:1), fase estacionária Silicagel 60 F254. (A) Luz Branca. (B) Luz UVC. (C) Luz UVL. (D) Placa revelada.

Neste ensaio qualitativo a revelação da fração hexânica apresentou halos de inibição da enzima acetilcolinesterase para todas as espécies. A fração clorofórmica é bastante rica em pigmentos podendo-se ver bandas equiparáveis de clorofila (bandas verdes) e carotenóides (bandas amarelas) em todas as espécies. A revelação da placa mostrou os halos de inibição imediatamente abaixo das bandas de carotenóides com as seguintes intensidades $LI > LD > LC > LA$.

A fração metanólica, de modo geral, não apresentou nenhum halo de inibição detectável, se mostrou ausente de constituintes capazes de inibir a ação da AChE. O fase móvel da fração aquosa (BAW) não foi eficiente na separação dos compostos dos extratos. Outros fase móveis ou placas com outros tipos de fase móvel precisam ser testados para que a devida separação ocorra. No entanto, nenhum extrato aquoso apresentou atividade frente à enzima.

5.6.2. Ensaio quantitativo em microplaca

Uma curva de concentrações dose dependente foi realizada para verificar efetivamente o potencial dos extratos. Os extratos foram testados nas concentrações entre 25 a 600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados para cada fração de extrato são apresentados nas Figuras 17-20.

Figura 17. Porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase em diferentes concentrações dos extratos de LA.

(*) absorvância não determinada, pois ultrapassou o limite de detecção do equipamento.

Figura 18. Porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase em diferentes concentrações dos extratos de LC.

(*) absorvância não determinada, pois ultrapassou o limite de detecção do equipamento.

Figura 19. Porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase em diferentes concentrações dos extratos de LD.

Figura 20. Porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase em diferentes concentrações dos extratos de LI.

Todos os extratos testados apresentaram inibição menor que 50 % mesmo para concentrações de 600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O perfil foi muito semelhante em todos os extratos testados. Os extratos EH, EC e EM foram os mais ativos em todas as espécies. No entanto, o extrato metanólico (EM) pode ter apresentado um falso positivo. Compostos presentes nesta fração podem ter reagido com componentes do processo enzimático provocando precipitação e alteração na leitura por absorbância. Observou-se turvação nos poços que continham estes extratos e no ensaio qualitativo verificou-se a ausência de bandas demonstrando atividade nesta fração.

Já os extratos aquosos (EA) e aquosos brutos (EAB) apresentaram atividade bem baixa ou nenhuma com os resultados bem próximos a zero.

As doenças degenerativas têm merecida importância no cenário mundial, como a Doença de Alzheimer (DA), que é uma patologia progressiva que atinge a população idosa e representa 50-60% dos casos de demência em pessoas com mais de 65 anos. A base molecular dos tratamentos é inibindo os níveis de ACh no cérebro através de inibidores de acetilcolinesterase (Heinrich & Teoh, 2004). Os IChE promovem a prevenção da hidrólise da ACh pela AChE potencializando sua resposta no nervo pós sináptico (Taylor, 2006). Algumas drogas usadas hoje na terapêutica se mostraram hepatotóxicas (Knapp *et al.* 1994). Diante disso, há uma necessidade contínua por novas drogas.

Os extratos apolares dessas espécies testadas mostraram resultados interessantes, que devem ser investigados a fim de isolar as substâncias que apresentaram altos de inibição mais intensos no ensaio qualitativo e que possivelmente não pudemos verificar a efetividade da atividade em microplaca devido à baixa concentração.

5.7. Avaliação da atividade antiradicalar: método DPPH

5.7.1. Ensaio qualitativo por autografia (Cromatografia de Camada Delgada: CCD)

Figura 21. 1: Cromatograma do Extrato Hexânico, 2: Cromatograma do Extrato Clorofórmico, 3: Cromatograma do extrato Metanólico. A: Placas reveladas com solução de DPPH. Halos claros indicam atividade antiradicalar da substância. B: Placas reveladas na Luz UVC, C: Placas reveladas na Luz UVL. Catequina e quercetina foram usadas como controle positivo. Adsorvente Silicagel 60 F254.

5.7.2. Ensaio quantitativo em microplaca

Figura 22. Potencial antioxidante frente ao radical DPPH dos extratos de LA (A), LC (B), LD (C), LI (D) comparativamente com o padrão positivo *Ginkgo biloba*. (E) Porcentagem de inibição dos padrões comerciais das substâncias puras Ácido gálico e α -tocoferol.

Tabela 10. Determinação do IC₅₀ (µg.mL⁻¹) da atividade antiradicalar dos extratos de algas do gênero *Laurencia* no ensaio com o radical DPPH.

EXTRATOS	IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	±(µg.mL ⁻¹)
LA-EH	1121.52	±6.33
LA-EC	259.24	±7.23
LA-EM	6606.47*	±42.00
LC-EH	2227.03	±99.59
LC-EC	405.24	±6.71
LC-EM	4424.45*	±187.17
LD-EH	2324.92*	±102.18
LD-EC	1045.62	±34.94
LD-EM	4439.22*	±181.91
LI-EH	1770.26	±22.49
LI-EC	672.91	±30.10
LI-EM	1605.04	±40.28
<i>Ginkgo biloba</i>	45.23	±2.18
Ácido Gálico	n.d.	-
α-tocoferol	1.11	±0.18

* Valores estimados

n.d. – não determinado

Para todos os extratos testados os clorofômicos foram os que apresentaram melhores resultados frente à ação antioxidante. Este extrato concentra a maior parte da clorofila presente nos talos das algas, mas pelo ensaio qualitativo em CCD (Figura 21) pode-se perceber que pouco da ação antioxidante é devida à presença desse pigmento.

E dentre as espécies, *Laurencia aldingensis* exigiu a menor concentração de extrato (250 µg.mL⁻¹) para reduzir mais que 50 % do radical DPPH (53,8 %). Para todos os extratos clorofômicos a concentração de 2000 µg.mL⁻¹ teve uma ação maior que o padrão *Ginkgo*. Entretanto esta concentração é muito alta para ter aplicabilidade viável.

Em *L. aldingensis* o EH mostra uma curva crescente onde pode-se destacar as concentração de 1000 µg.mL⁻¹ que reduz 50,2 % do radical DPPH. LA-EM mostra uma ação bem baixa, 15,5 % para a concentração mais alta e esta porcentagem cai a nível 0 a

medida que as concentrações diminuem (Figura 22-A). Em *L. catarinensis* o EH tem ação de menos de 50 % para uma concentração de 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Entretanto, para o extrato clorofômico, 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ é capaz de reduzir 60,75 % do radical. Já o EM não passa de 15 % para a concentração mais alta (Figura 22-B).

O EH de *L. dendroidea* apresenta o menor resultado em relação aos outros EH, com menos de 40% de inibição para a concentração mais alta testada. O EC apresentou 95,44% de inibição em 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, no entanto, concentrações abaixo de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ decaem rapidamente de 50% a 0%. O EM mostra 17,5% de redução do radical com 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de extrato, para todas as outras concentrações os valores são muito baixos (Figura 22-C).

No EH de *L. intricata* só em 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a redução do radical é acima de 50%. No EC, 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ reduz 41,5 % do radical. No EM 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ reduz 64 % do radical (Figura 22-D).

O extrato de *Ginkgo biloba* é um ótimo antioxidante, apresentando em 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ mais de 90 % de redução do radical. Abaixo desta concentração, a ação diminui consideravelmente. Sendo, portanto, uma boa referência de extrato bruto vegetal em padrão comercial para comparar os extratos obtidos das algas marinhas. E, como o ácido gálico e a vitamina E são substâncias puras com comprovada atividade antioxidante, as concentrações testadas são suficientemente altas para manter a atuação do ácido gálico em torno de 95 % e da vitamina E em 96,8 % (Figura 22- E).

A busca por novos antioxidantes naturais tem se intensificado na última década quando se descobriu que a produção de EROs e o estresse oxidativo estavam envolvidos na etiologia de diversas doenças do envelhecimento. A DA está associada com processos inflamatórios, em que EROs são liberadas junto com outros componentes. As EROs são capazes de causar danos aos constituintes celulares e agir como mensageiro secundário do processo inflamatório. Dessa forma, os antioxidantes podem se tornar muito importantes por serem capazes de sequestrar EROs e atenuar as vias inflamatórias, sendo portanto, úteis no tratamento da DA principalmente quando estão agregados ao potencial de inibição da ACh (Tasdemir, 2004).

5.8. Ensaio citotóxico

A tabela 11 mostra a toxidez associada aos diferentes extratos algais testados.

Tabela 11. Efeito da toxidez dos diferentes extratos algais em relação a células MES-SA. Onde, (++) ≥ 80 % de morte celular; (+) 50-79 % de morte celular; (-) 30-50 % de morte celular; (--) 0- 30 % de morte celular. Células incubadas por 24h em presença do extrato ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de meio de cultura).

Extratos	Toxidez relativa
LA-EC	-
LA-EM	-
LC-EH	++
LC-EM	--
LD-EH	++
LD-EC	++
LD-EM	-
LI-EM	-
LT-EH	++
LT-EM	--
PF-EMB	+

O extrato metanólico fracionado foi o extrato que mostrou menor toxidez, seguido pelo extrato metanólico bruto (EMB). É razoável inferir que a maior toxidez do EMB em relação ao fracionado pode ser, em partes, pelo resultado do enriquecimento do extrato por compostos mais apolares que o metanol conseguiu extrair. Em outras palavras, alguns dos agentes citotóxicos oriundos da alga podem ter sido sequencialmente removidos durante o processo de extração com outros solventes fazendo com que o EM seja mais pobre de compostos que o EMB.

É perceptível, no entanto, que o EH de *L. catarinensis*, *L. dendroidea* e *L. translucida* mostram altos níveis de toxidez. Da mesma forma, o EC de *L. dendroidea* também se mostrou bastante tóxico, enquanto o mesmo extrato de *L. aldingensis*, não.

Os resultados do *screening* mostrados na

Tabela 11 permitiram selecionar uns extratos com alta toxidez (EH de *L. dendroidea* e *L. translucida*) e um extrato com baixa toxidez (EM de *L. translucida*) para o teste de efeito da concentração. Neste segundo estudo as células MES-SA foram expostas por 72h às várias concentrações dos extratos, e a viabilidade celular medida novamente pelo ensaio MTT. Os resultados deste teste estão amostrados na Figura 23.

n.d.= não determinado

Figura 23. Efeito citotóxico dos extratos hexânicos de *Laurencia dendroidea* e *Laurencia translucida* (LD-EH e LT-EH, respectivamente) e extrato metanólico de *Laurencia translucida* (LT-EM) sobre a linhagem celular do sarcoma uterino humano (MES-SA) no período de exposição de 72h.

A Figura 23 mostra que o extrato metanólico de *L.translucida* não é tóxico enquanto o seu respectivo extrato hexânico é muito tóxico, com um IC₅₀ de 16 µg.mL⁻¹. Já o IC₅₀ do LD-EH é de 5-6 vezes maior (91 µg.mL⁻¹) que LT-EH.

Com propósito de comparação, um experimento foi desenvolvido com doxorubicina, uma potente e clássica droga anti-cancer cujos resultados estão amostrados na Figura 24.

Figura 24. Efeito citotóxico da doxorubicina para diferentes linhagens de células tumorais. (A): células de sarcoma uterino humano (MES-SA) e sua respectiva linhagem mutante droga-dependente (MES-SA/Dx5). (B): células de adenocarcinoma cervical humano (HeLa).

Os resultados mostram que IC_{50} para células MES-SA e HeLa são bastante próximos, $0,05 \mu M$ e $0,03 \mu g.mL^{-1}$, respectivamente. Enquanto para a mutante MES-SA/Dx5 é quase duas ordens de magnitude maior, devido à sua resistência adquirida. Este tipo de resposta das células à doxorubicina já foi previamente reportada em outros trabalhos (Larroque-Lombard *et al.*, 2010).

O uso de da linhagem celular MES-SA no *screening* é, em parte, motivado pelo rápido crescimento (tempo de dobramento de ~ 24 horas) e, nos aspectos morfológicos, é grande o suficiente para facilitar a contagem e análise dos danos celulares provocados pela drogas via microscopia, são altamente suscetíveis a uma grande variedades de drogas anticâncer e apresenta facilidades para manter e manipular (Larroque-Lombard, 2010; Lacerda *et al.*, 2005; Belostotsky *et al.*, 2011).

A suscetibilidade das células MES-SA à doxorubicina é análoga à observada em células HeLa (Figura 24). HeLa tem sido extensivamente usada em estudos pré-clínicos e por esta razão a sua inclusão no *screening* pode facilitar comparação dos resultados obtidos com aqueles já realizados e disponíveis em literatura, podendo-se ter mais um parâmetro de avaliação dos possíveis novos candidatos a drogas anticâncer.

Como os ensaios de rotina não exigem o envolvimento de linhagens populares, como é o caso da HeLa, a MES-SA se torna bastante atraente em termos de desenvolvimento de protocolos uma vez que ela apresenta a linhagem mutante MES-SA/Dx5 que está disponível comercialmente e também é fácil de manter e trabalhar, e ainda mostra o clássico fenótipo de multiresistência a drogas.

A inclusão desta linhagem mutante permitirá não apenas a identificação de novas drogas anticâncer capazes de induzir a morte de células tumorais MDR com alta eficiência quando comparada com drogas comercialmente usadas, mas também proporcionará a identificação de novos inibidores de P-gp.

Com o ensaio anticâncer, o modelo biológico em desenvolvimento permitirá expandir a realizações de *screening* sistemáticos por novas drogas em espécies de algas presentes no litoral brasileiro e avaliar se os extratos tidos como citotóxicos poderão oferecer alternativas mais eficazes para o tratamento de tumores MDR (Higgins, 2007; Dawson & Locker, 2006; Lage, 2008; Perez-Tomas, 2006).

5.9. Análise qualitativa e semi-quantitativa das substâncias químicas por CG-EM presentes nos extratos das espécies de *Laurencia*

As Figura 25, Figura 26, Figura 27 e 28 comparam os cromatogramas das frações dos extratos de cada uma das quatro espécies e as Tabela 12, Tabela 13, Tabela 14 e Tabela 15 correlacionam os tempos de retenção de cada pico observado com os respectivos IK obtidos com aqueles encontrados em literatura e as substâncias identificadas, assim como o percentual de similaridade com a biblioteca utilizada. E, para cada substância mostrou-se o percentual encontrado em cada uma das frações dos extratos.

Figura 25. Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM dos extratos hexânico (EH), clorofórmico (EC), metanólico (EM), aquoso (EA) e extrato aquoso bruto (EMB) de *Laurencia aldidensis*, respectivamente nas sequências de cima para baixo.

Tabela 12. Substâncias identificadas por CG-EM dos extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato metanólico (EM), extrato aquoso (EA) e extrato aquoso bruto (EAB) da espécie *Laurencia aldingensis*.

	t_R (min)	IK_{ob}	IK_{lit}	Substância	(%)					Similaridade
					EH	EC	EM	EA	EAB	
1	4.499	903	916 ¹	4-Hidroxi-3-hexanona	-	0,04	-	-	-	86
2	6.424	979	979 ²	Fenol	-	0,12	-	-	-	85
3	9.104	1062	1067 ¹	2-Nitroetil propionato	-	-	2,33	-	-	81
4	17.269	1268	1251 ¹	“Lilac” álcool A	-	0,14	-	-	-	82
5	27.237	1511	1512 ³	Tridecanal	0,92	0,53	-	-	-	89
6	27.359	1514	Item 5.10	(-)-7- <i>epi</i> -silfiperfolan-6 β -ol	0,13	-	-	-	-	-
7	27.359	1514	Item 5.10	(-)-silfiperfolan-7 β -ol (86)	0,36	-	-	-	-	-
8	34.370	1700	1700 ⁴	Heptadecano	9,48	1,29	-	-	-	94
9	34.875	1714	1714 ⁵	Pentadecanal	4,40	2,13	0,94	-	-	95
10	36.579	1763	1762 ^{6*}	Ácido tetradecanóico	-	1,97	2,00	-	-	88
11	37.789	1797	1808 ¹	1-Octadecino	-	0,11	-	-	-	87
12	40.054	1865	1863 ¹	2-Metil-7-Octadecino	-	0,60	1,25	-	-	85
11	40.631	1882	1890 ¹	16-Heptadecenal	-	-	1,78	-	-	85
13	42.105	1927	1927 ⁷	Metil hexadecanoato	-	0,17	-	-	-	81
14	42.560	1941	1938 ⁸	Ácido 9-hexadecenóico	-	0,99	-	-	-	86
15	43.266	1961	1961 ⁹	Ácido palmítico	1,31	28,50	34,48	43,73	-	94

16	47.868	2112	2112 ¹⁰	Fitol	-	3.07	6.71	-	-	94
17	48.579	2136	2139 ¹	Ácido linoleico	-	-	4.76	-	-	84
18	48.614	2138	2137 ¹¹	Ácido oleico	-	2.56	-	-	-	85
19	51.026	2220	2027 ¹	3-Icosino	1,49	-	-	-	-	86
20	58.698	2505	2498 ¹	Glicerol 2-hexadecanoato	-	-	5.28	-	-	84
21	66.492	2827	2818 ^{12*}	Esqualeno	-	0.25	-	-	-	81
22	74.384	3093	3093 ^{13*}	Colesterol	11,21	6.82	-	-	-	85
Número de picos analisados					42	73	25	3	0	-
Número de picos identificados					8	16	9	1	0	-
Totais identificados (%)					19,0	21,9	36,0	33,3	0	-

¹ IK teórico; ² Helmig *et al*, 1996; ³ Fokialakis *et al*, 2003; ⁴ von Kováts, 1958; ⁵ Lazari *et al*, 2000; ⁶ Sing *et al*, 1992; ⁷ Boulanger *et al*, 1999; ⁸ Berdague *et al*, 1991; ⁹ Lee *et al*, 1991; ¹⁰ Kim *et al*, 2000; ¹¹ Pino *et al*, 2003; ¹² Richmond & Pombo-Villar, 1998; ¹³ Japp *et al*, 1987. * Coluna da literatura diferente daquela utilizada neste trabalho.

Figura 26. Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM dos extratos hexânico (EH), clorofórmico (EC), metanólico (EM) e aquoso (EA) de *Laurencia catarinensis*, respectivamente nas sequências de cima para baixo.

Tabela 13. Substâncias identificados por CG-EM dos extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato metanólico (EM), extrato aquoso (EA) e extrato aquoso bruto (EAB) da espécie *Laurencia catarinensis*.

Nº	t _R (min)	IK _{ob}	IK _{lit}	Substância	(%)				Similaridade
					EH	EC	EM	EA	
1	19.637	1324	1322 ²	α -Cubebeno	0,47	-	-	-	84
2	20.800	1352	**	1,4,4a,5,6,9,10,10a-octahidro-11,11-dimetil-, (1 α ,4 α ,4a α ,10a α)-1,4-Metanocicloocta[d]piridazina,	0,62	-	-	-	84
3	23.558	1419	1424 ³	Tujopseno	0,28	-	-	-	76
4	23.657	1421	1416 ¹	(-)- α -Panasinseno	0,42	-	-	-	81
5	26.656	1.496	1496 ⁵	(Z,E)- α -Farneseno	-	0,91	-	-	81
6	26.842	1.500	1500 ⁶	Pentadecano	0,57	-	-	-	89
7	27.252	1.511	1512 ⁷	Tridecanal	0,52	0,45	-	-	91
8	34.415	1.700	1700 ⁶	Heptadecano	8,74	1,11	-	-	95
9	34.883	1.714	1713 ⁸	Pentadecanal	2,36	1,32	-	-	94
11	36.542	1.762	1760 ⁹	Ácido tetradecanóico	-	1,77	2,93	-	86
12	40.061	1.865	1863 ¹	2-Metil-7-Octadecino	-	1,21	-	-	85
13	40.453	1.876	1898 ¹	1,1-Dimetoxihexadecano	2,42	-	-	-	90
14	42.110	1.927	1914 ¹	Metil 15-metilhexanodecanoato	-	0,44	-	-	83
15	42.553	1.941	1949 ¹⁰	Ácido 9-hexadecenóico	-	1,16	-	-	86
16	43.197	1961	1961 ¹¹	Ácido palmítico	25,04	65.61	27.92	-	92

17	47.871	2.112	2112 ¹²	Fitol	1,66	2,56	-	-	92
18	48.589	2.137	2137 ^{13*}	Ácido oleico	-	2,21	-	-	84
20	50.200	2191,5	Item 5.11	Elatol	0,38	-	-	-	-
21	66.497	2.827	2818 ^{15*}	Esqualeno	0,39	-	-	-	91
22	74.364	3.093	3093 ^{16*}	Colesterol	14,18	6,58	-	-	90
Número de picos analisados					49	42	5	1	-
Número de picos identificados					14	12	2	0	-
Totais identificados (%)					28,6	28,6	40	0	-

¹ IK teórico; ² Pitarokili *et al*, 2002; ³ Porta *et al*, 1999; ⁴ Buchin *et al*, 2002; ⁵ Kim, *et al*, 2000; ⁶ von Kováts, 1958; ⁷ Fokialakis *et al*, 2003; ⁸ Ansorena *et al*, 2000; ⁹ Maia *et al*, 2004; ¹⁰ Ansorena *et al*, 2001; ¹¹ Lalel *et al*, 2003; ¹² Kim *et al*, 2000; ¹³ Pino *et al*, 2003; ¹⁴ Yasuhara *et al*, 1997; ¹⁵ Richmond & Pombo-Villar, 1998; ¹⁶ Japp *et al.*, 1987. * Coluna da literatura diferente daquela utilizada neste trabalho. ** IK não presente em literatura, apenas o espectro de massas.

Figura 27. Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM dos extratos hexânico (EH), clorofórmico (EC), metanólico (EM), aquoso (EA) e extrato aquoso bruto (EMB) de *Laurencia dendroidea*, respectivamente nas sequências de cima para baixo.

Tabela 14. Substâncias identificados por CG-MS dos extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato metanólico (EM), extrato aquoso (EA) e extrato aquoso bruto (EAB) da espécie *Laurencia dendroidea*.

Nº	t _R (min)	IK _{ob}	IK _{lit}	Substância	(%)					Similaridade
					EH	EC	EM	EA	EAB	
1	27.402	1515	Item 5.10	(-)-7- <i>epi</i> -silfiperfolan-6 β -ol	5,48	3,27	2,99	-	-	-
2	27.402	1515	Item 5.10	(-)-silfiperfolan-7 β -ol	13,03	10,75	7,33	-	-	-
3	34.375	1700	1700 ²	Heptadecano	3,13	-	2,81	-	-	94
4	34.875	1714	1713 ³	Pentadecanal	0,88	-	-	-	-	93
5	36.532	1761	1760 ⁴	Ácido tetradecanóico	-	-	1,38	-	-	84
6	42.099	1927	1914 ¹	Metil 15-metilhexanodecanoato	-	-	0,55	-	-	80
7	43.255	1963	1962 ⁵	Ácido palmítico	-	13,43	34,70	32,76	-	92
8	47.864	2112	2112 ⁶	Fitol	2,05	1,77	1,96	-	-	92
9	48.577	2136	2137 ⁷	Ácido oleico	-	-	1,83	-	-	85
10	50.183	2190	Item 5.11	Elatol	7,04	6,10	5,15	-	-	-
Número de picos analisados					34	15	25	2	4	-
Número de picos identificados					6	5	9	1	0	-
Totais identificados (%)					17,6	33,3	36,0	50,0	0,0	-

¹ IK teórico; ² von Kováts, 1958; ³ Ansorena *et al*, 2000; ⁴ Maia *et al*, 2004; ⁵ Lalel *et al*, 2003; ⁶ Kim *et al*, 2000; ⁷ Pino *et al* 2003.

Figura 28. Comparação dos cromatogramas obtidos por CG-EM dos extratos hexânico (EH), clorofórmico (EC), metanólico (EM), aquoso (EA) e extrato aquoso bruto (EMB) de *Laurencia intricata*, respectivamente nas sequências de cima para baixo.

Tabela 15. Substâncias identificados por CG-EM dos extrato hexânico (EH), extrato clorofórmico (EC), extrato metanólico (EM), extrato aquoso (EA) e extrato aquoso bruto (EAB) da espécie *Laurencia intricata*.

Nº	t _R (min)	IK _{ob}	IK _{lit}	Substância	(%)					
					EH	EC	EM	EA	EAB	Similaridade
1	12,175	1144	1174 ^{2*}	Ácido 5-Clorovalérico	-	-	5,14	-	-	93
2	27,393	1514	Item 5.10	(-)-silfiperfolan-7β-ol	-	-	5,55	-	-	-
3	34,377	1700	1700 ³	Heptadecano	3,91	0,84	-	-	-	93
4	34,885	1714	1714 ⁴	Pentadecanal	-	0,10	-	-	-	82
5	36,615	1764	1763 ⁵	Ácido tetradecanóico	-	3,05	1,67	-	-	88
6	40,550	1879	1881 ⁶	Ciclohexadecano	-	0,21	-	-	-	83
7	40,645	1882	1890 ¹	16-Heptadecenal	-	0,33	-	-	-	82
8	42,106	1927	1927 ⁷	Metil hexadecanoato	0,37	0,26	0,42	-	-	84
9	42,590	1942	1949 ⁸	Ácido 9-hexadecenóico	-	2,45	-	-	-	87
10	43,397	1967	1967 ⁹	Ácido palmítico	1,51	23,27	31,51	2,11	-	92
11	46,969	2082	2075 ¹	Octadecil vinil éter	-	0,26	-	-	-	81
12	47,417	2097	2100 ¹	α-[α-Metoxi-(tetrahydrofuran-5-on-2-ilmetoxi)]-tetrahydrofuran-5-on-2-metanol	-	-	3,28	-	-	82
13	47,873	2112	2112 ¹⁰	Fitol	3,40	2,27	1,75	-	-	95
14	48,395	2130	2130 ⁶	Ácido linoleico	-	-	0,24	-	-	86
15	48,446	2132	2161 ¹	5-Nonadecen-1-ol	-	0,54	-	-	-	84

16	48,585	2137	2137 ¹¹	Ácido oleico		3,94	4,04	-	-	87
17	48,773	2143	2158 ¹	2-hidroxi-ciclopentadecanona	-	2,16	-	-	-	87
18	50,180	2190	Item 5.11	Elatol	-	-	2,22	-	-	-
19	53,435	2306		Metil éster do ácido	-	1,95	-	-	-	82
			2308 ¹	araquidônico						
20	58,688	2504	2498 ¹	Glicerol 2-hexadecanoato	-	-	1,51	-	-	81
22	63,195	2687	2679 ¹	(Z)-14-Tricosenil formato	-	0,30	-	-	-	83
23	66,502	2827	2818 ^{12*}	Esqualeno	1,90	1,37	-	-	-	89
24	74,400	3093	3093 ^{13*}	Colesterol	6,75	8,99	-	-	-	83
Número de picos analisados					37	51	27	2	1	-
Número de picos identificados					6	17	10	1	0	-
Totais identificados (%)					16,1	33,3	37,03	50,0	0	-

¹ IK teórico; ² Shashkova *et al*, 1969; ³ von Kováts, 1958; ⁴ Lazari *et al*, 2000; ⁵ Sakho *et al*, 1997; ⁶ Lalel *et al*, 2003; ⁷ Palmeira *et al*, 2004; ⁸ Ansorena *et al*, 2001; ⁹ Zoghbi *et al*, 1994; ¹⁰ Kim *et al*, 2000; ¹¹ Pino *et al*, 2003; ¹² : Richmond & Pombo-Villar, 1998; ¹³ Japp *et al.*, 1987, * Coluna da literatura diferente daquela utilizada neste trabalho.

Das espécies estudadas *Laurencia aldingensis* foi a que apresentou a maior quantidade de picos para serem analisados, 143 em todos os seus extratos. Destes picos analisados apenas 22,37% foram identificados. Dos que foram identificados pode-se destacar o ácido palmítico que foi encontrado com grandes proporções em quase todos os extratos desta espécie.

Em *Laurencia catarinensis*, dos 97 picos analisados, 28,86% deles foram identificados. O ácido palmítico e o colesterol foram as substâncias identificadas com maior percentual nos extratos.

Laurencia dendroidea apresentou um total de 80 picos, sendo deles, 21 identificados. Enquanto *Laurencia intricata* teve 118 picos sendo 34 identificados e, em ambas as espécies, o ácido palmítico e o colesterol foram as substâncias mais abundantes em relação à área total dos picos.

Algumas substâncias, em maior ou menor quantidade, estão presentes em todas as espécies estudadas. É o caso do fitol, heptadecano, pentadecanal, ácido oléico, ácido tetradecanóico. O ácido palmítico ocorreu em *L. catarinensis*, *L. dendroidea* e *L. intricata*, enquanto o ácido 9-hexadecanóico, o esqualeno e o colesterol são substâncias cuja síntese é partilhada tanto por *L. aldingensis*, *L. catarinensis* quanto por *L. intricata*.

Sreenivasa Rao & Parekh (1981) relatam os efeitos da preservação, temperatura de extração e variação sazonal na bioatividade dos extratos das algas indianas *Gracilaria corticata*, *Gelidiella acerosa* e *Enteromorpha intestinalis*. Eles avaliaram o potencial dos extratos cujas massas algais tinham sido preservadas em baixa temperatura, secas em incubadoras a 37°C e secas em forno de ar quente a 60°C e observaram que a melhor forma de evitar degradação das substâncias foi o congelamento. Quanto à temperatura de extração, trituração manual no almofariz a 20°C e usando o extrator soxhlet a 50-55°C, não houve diferenças significativas no potencial de inibição dos extratos. Entretanto foi demonstrando grande diferença sazonal na produção dos metabólitos. As algas coletadas nos períodos de Outubro a Janeiro apresentaram maior atividade, contrastando com os períodos de Março e Maio no qual se obteve os menores valores de inibição.

No entanto, Chester & Stott (1956) concluem que cada alga tem sua própria periodicidade e reportam que *Polysiphonia* apresenta atividade uniforme ao longo do ano, *Laminaria* tem o pico de atividade no inverno, *Dictyota* no verão e *Codium* na primavera.

5.10. Obtenção do padrão de (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol (SFP-1) e (-)-silfiperfolan-7 β -ol (SFP-2)

Os padrões de (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol (SFP-1) e (-)-silfiperfolan-7 β -ol (SFP-2) presentes como substâncias majoritárias no óleo essencial de *Laurencia dendroidea* foram gentilmente cedidos por Vanessa Gressler e analisados por CG-EM. A extração se deu por destilação da alga fresca em aparato de Clevenger. O isolamento e identificação foram feitos por meio de CCDP e RMN uni- e bidimensional conforme descrito em Gressler *et al* 2011.

Abaixo estão demonstrados os cromatogramas das substâncias SFP-1 (Figura 29) e SFP-2 (Figura 31) isolados do óleo essencial, analisados no mesmo método descrito no item 4.13. Ambas as substâncias apresentam o mesmo tempo de retenção ($t_R = 29.1$ min) e Índice de Kovats (IK = 1529) (Gressler *et al*, 2011). Mesmo havendo coeluição destas substâncias as Figura 31 e 32 mostram os respectivos espectros de massas que são bem distintos. E, para quantificar cada um deles no pico das amostras dos extratos foram utilizados os fragmentos 98 m/z do SFP-1 e 86 m/z do SFP-2, que são fragmentos específicos característicos de cada substância, para saber a proporção em que cada um deles se apresenta.

Figura 29. Cromatograma do (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol (SFP-1) isolado do óleo essencial da *Laurencia dendroidea*.

Figura 30. Espectro de massas de baixa resolução (EIMS) obtido de (-)-7-*epi*-silfiperfolan-6 β -ol (SFP-1).

Figura 31. Cromatograma do (-)-silfiperfolan-7 β -ol (SFP-2) isolado do óleo essencial da *Laurencia dendroidea*.

Figura 32. Espectro de massas de baixa resolução (EIMS) obtido de (-)-silfiperfolan-7 β -ol (SFP-2).

Figura 33. Sesquiterpenos da alga *Laurencia dendroidea* usados como padrão para identificação nos extratos das espécies de *Laurencia* em estudo. **a)** (-)-7-epi-silfiperfolan-6 β -ol (SFP-1) e **b)** (-)-silfiperfolan-7 β -ol (SFP-2).

As substâncias SFP-1 e SFP-2 foram encontradas em três das quatro espécies estudadas, sendo que SFP-2 encontra-se em maior quantidade em todas as amostras numa proporção de 2:1, corroborando com os resultados amostrados em Gressler *et al*, 2011. Com exceção apenas do extrato clorofórmico de *L. dendroidea* cuja proporção foi de 3:1.

Estes dois sesquiterpenos foram encontrados também nos extratos hexânicos de *L. aldingensis* e *L. dendroidea* e no extrato metanólico de *L. dendroidea*. No entanto, no extrato metanólico de *L. intricata* ocorreu apenas o SFP-2 na concentração de 5,5%.

Estas substâncias saíram nos cromatogramas com t_R de 27.4 min mostrando-se diferente daquele encontrado na literatura. Isto é justificado pelo fato da coluna ter sido trocada, o que acarretou na alteração do tempo de retenção dos compostos. Mas a análise comparativa dos espectros de massas dos picos nos extratos com a amostra padrão foi suficientemente capaz de permitir a identificação dos SFP-1 e SFP-2.

Ambos sesquiterpenos já foram isolados em outros trabalhos tanto de algas do gênero *Laurencia* (Wright *et al*, 1990) como em outras espécies de plantas (Menut *et al*, 1997). E, algumas atividades biológicas, principalmente farmacológicas, foram testadas com os mesmos como é o caso do teste antimicrobiano, que não apresentou atividade significativa. Ensaio antioxidantes também foram testados usando DPPH que mostrou 27,5 (SFP-1) e 30,3% (SFP-2) de inibição e pelo método de quimioluminescência (H_2O_2 /luminol/HRP), 34,6 (SFP-1) e 20,8% (SFP-2) em $500 \mu g.mL^{-1}$ da amostra (Gressler *et al*, 2011). Atividade antielmíntica também foi testada, mas não foi encontrada atividade (Davyt *et al*, 2006).

5.11. Obtenção do padrão de elatol (10-bromo-4-chloro-3,11,11-trimethyl-7-methylidenespiro[5.5]undec-3-en-9-ol)

O padrão de elatol foi gentilmente cedido por Daniela Bueno Sudatti da Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói/RJ, cujo método de extração está descrito em Sudatti *et al*, 2006.

Neste artigo, a obtenção do padrão de elatol se baseou na extração exaustiva com hexano ou diclorometano das frondes de *Laurencia dendroidea* (descrita como *L. obtusa* no referido trabalho). O fracionamento dos compostos se deu por cromatografia em camada delgada (CCD) (Merck Al TLC 20 x 20 cm silica gel 60 F₂₅₄) e a identificação por 1H NMR e combinando com resultados encontrados em literatura (Konig & Wrigth, 1997).

Com este padrão, a amostra foi solubilizada em metanol (grau pesticida) para obter uma concentração de $200 \mu g.mL^{-1}$, em seguida filtrada e analisada por CG-EM conforme descrito em item 4.13.

A corrida cromatográfica de 106.67 min da amostra padrão do elatol está demonstrada na Figura 34, cuja substância de interesse é o pico majoritário. A Figura 35 é o detalhe do pico do elatol com o tempo de retenção (t_R) de 50.19 min. O espectro de massas da substância em análise e sua estrutura molecular podem ser visualizados nas Figura 36 e Figura 37, respectivamente.

Figura 34. Corrida cromatográfica da amostra padrão do elatol num tempo de corrida de 106.67 min.

Figura 35. Detalhe do pico do elatol com o tempo de retenção (t_R) de 50.195 min

Figura 36. O espectro de massas do elatol em análise

Figura 37. Elatol

O elatol é uma substância conhecida por ser um metabólito secundário encontrado em grande quantidade nos espécimes de *L. dendroidea* (citados nos trabalhos muitas vezes como *L. obtusa*) exercendo uma efetiva defesa química contra herbívoros e organismos incrustantes (Da Gama *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2003).

Nas espécies de *Laurencia* estudadas no presente trabalho também foi identificado o elatol. As três frações de *L. dendroidea* (hexânica, clorofórmica e metanólica) apresentam grandes quantidades do composto, sendo que na fração hexânica ele foi encontrado com maior percentual (7,04 %) e na metanólica o menor (5,15 %), indicando que solventes mais apolares o extraem com maior eficiência.

O elatol é uma substância, em geral, associado à *Laurencia dendroidea* (seja citada como *L. obtusa*, *L. microcladia* ou *L. scoparia*) (Fujii *et al.*, 2011). No entanto, pôde-se detectar a presença dele em outras espécies do complexo, indicando que seu

papel para defesa química da alga está amplamente distribuído, como mostrado neste trabalho com sua ocorrência na fração hexânica de *L. catarinensis* (0,38 %) e na fração metanólica de *L. intricata* (2,22 %).

Outros trabalhos também relatam a ocorrência do elatol em outras algas do grupo como é o caso da *Laurencia elata* (Sims *et al.* 1974), e *Laurencia rigida* (König & Wright, 1997), sendo considerado a substância mais estudada no âmbito de atividade biológica dentro do complexo *Laurencia* no Brasil (Veiga-Santos *et al.*, 2010).

Apesar do foco dos estudos com elatol em ecologia química como os relacionados à antiherbivoria (Pereira *et al.*, 2003; Paul *et al.*, 1988) e antiincrustação (Konig & Wrigth, 1997; de Nys *et al.*, 1996), há também estudos no âmbito farmacológico como é o caso do ensaio anti-tripanosossômico em que apresentou atividade maior que a droga de referência contra as formas tripomastigota e amastigota intracelular do *T. cruzi*. Formas estas que estão presentes no hospedeiro vertebrado, e representam um desafio para o tratamento da doença de Chagas (Veiga-Santos *et al.*, 2010). Assim também para o tratamento da leishmania, uma vez que o elatol apresentou forte atividade antiproliferativa contra as formas promastigota e amastigota intracelular (Santos *et al.*, 2010). Em estudo realizado por Vairappan (2003) o elatol mostrou atividade contra *Staphylococcus epidermis*, *Klebsiella pneumonia* e *Salmonella* sp igual ou até maior que alguns antibacterianos comercialmente disponíveis como o cefaclor e a canamicina.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em consideração aos objetivos propostos, os resultados obtidos neste trabalho realizado com as espécies de *Laurencia* coletadas no litoral do Espírito Santo permitiram pontuar algumas conclusões:

1. O método de Bradford foi o mais eficiente para dosar o teor de proteínas solúveis totais presentes nas espécies de *Laurencia* dentre os métodos testados, variando entre 0,17-1,24 % de proteína por grama de alga.
2. As concentrações de pigmentos foram distintas em cada espécie estudada. No entanto, a ficoeritrina é o pigmento que mais se destaca quantitativamente dentre as ficobilinas. Este fato pode estar relacionado às diferentes condições de exposição à radiação, ação da maré, salinidade e dessecação a que estão sujeitas no ambiente em que vivem.
3. O teste antimicrobiano pelo método em microplaca foi bem sucedido para comparar a atividade das frações dos extratos das diferentes espécies. Os extratos lipossolúveis das macroalgas marinhas foram mais ativos contra os microorganismos testados enquanto os extratos aquosos não foram ativos ou estimularam o crescimento microbiano.
4. Os extratos hexânicos de *Laurencia catarinensis* e de *L. dendroidea* apresentaram menor IC_{50} contra o fitopatógeno do mamão *Colletotrichum gloesporioides*. Os constituintes destes extratos devem ser mais bem explorados para avaliar o potencial inibidor e possível utilização nos tratamentos pós-colheita.
5. Quanto ao ensaio anticolinesterásico, todas as concentrações dos extratos testados apresentaram inibição menor que 50% no teste em microplaca, porém no ensaio qualitativo em CCD mostrou halos de inibição bastante intensos. Possivelmente o potencial inibidor dos extratos frente à enzima não pôde ser medido pelo fato do composto inibidor estar em baixas concentrações.

6. No ensaio antioxidante usando o radical DPPH, os extratos clorofômicos, ricos em clorofila *a*, apresentaram os melhores resultados. Entretanto, no teste em CCD, observou-se que a atividade antioxidante pouco se deve à concentração de clorofila *a*. E, dentre as espécies estudadas, *Laurencia aldingensis* mostrou mais de 50 % de atividade com uma menor concentração de extrato (250 µg.mL⁻¹). O extrato de *Ginkgo biloba* disponível comercialmente foi uma ótima alternativa como padrão para comparar com o potencial dos extratos das algas.

7. O ensaio anticâncer utilizando as linhagens celulares MES-SA e sua mutante MES-SA/Dx5 foi bem sucedido e mostrou ser um modelo biológico que permitirá a realização de *screenings* e avaliar se os extratos e/ou substâncias considerados citotóxicos poderão oferecer alternativas mais eficazes para o tratamento de tumores MDR.

8. A porcentagem de identificação de substâncias nos extratos das algas analisadas não foi alta quando comparada com a quantidade de picos detectados no CG-EM. Isto se deve à escassez de informações de substâncias de origem marinha nas bibliotecas dos equipamentos. Portanto, o isolamento, a identificação e a inclusão deste tipo de substâncias nas bibliotecas devem incentivar para minimizar tal deficiência.

9. Por fim, este trabalho apresenta subsídios para incentivar a prospecção de novas moléculas ou grupo de moléculas menos tóxicas provenientes de algas com potencial terapêutico além de possibilitar aproveitamento com aplicações na área farmacológica, medicinal, de indústria química e agrícola, aumentando perspectivas para o desenvolvimento comercial.

RESUMO

As algas vermelhas, filo Rhodophyta, representam uma das maiores e mais antigas linhagens de organismos eucarióticos. Dentre as Rhodophyta, o gênero *Laurencia* J.V. Lamouroux (Ceramiales) é um dos mais completos do ponto de vista químico, pois consiste no maior produtor de metabólitos secundários e assim, destaca-se como uma fonte fascinante de novos produtos naturais, biologicamente ativos. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial farmacológico dos extratos das espécies de *Laurencia* frente às atividades biológicas, assim como a análise da composição bioquímica e identificação de seus constituintes químicos. As espécies utilizadas foram *L. aldingensis* (LA), *L. catarinensis* (LC), *L. dendroidea* (LD), *L. intricata* (LI). Adicionalmente *L. translucida* (LT), *Palisada flagellifera* (PF), *P. perforata* (PP) e uma variante pigmentar de LD (LDV) foram utilizadas para comparação. Para o desenvolvimento das atividades propostas foram utilizados extratos fracionados obtidos sucessivamente através dos solventes hexano (EH), clorofórmio (EC), metanol (EM), água (EA) e também extrato aquoso bruto (EAB). A análise de proteínas foi feita com os métodos de Bradford, Ácido bicinconínico (BCA) e absorção na luz UV a 280 nm. Destes, o método de Bradford mostrou-se o mais adequado. Na dosagem de ficobilinas, a ficoeritrina se apresentou em maior quantidade em todas as espécies testadas em relação à ficocianina e aloficocianina. O ensaio para avaliação da atividade antimicrobiana usando vários patógenos foi feito por microdiluição em placa seguindo a NCCLS e as concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram obtidas espectrofotometricamente. Em bactérias, LA-EH foi bactericida contra *P. aeruginosa* a uma concentração de $62,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e os extratos LA-EM e LC-EH tiveram uma ação bacteriostática forte contra *S. pneumoniae* nas concentrações de 51,1 e $85,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. No ensaio antifúngico, LA-EH e LA-EC foram fungicidas contra *C. parapsilosis* a 49,0 e $57,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. O ensaio antioxidante foi feito usando-se o método com DPPH, em que os EC apresentaram-se como os melhores extratos possuidores de moléculas capazes de doar prótons. Para o teste anticolinesterásico foi feito o ensaio qualitativo em CCD e ensaio quantitativo em microplaca pelo método de Ellman que puderam demonstrar a atividade inibidora da AChE sendo menor que 50 % , mesmo para concentrações de $600 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O perfil foi muito semelhante em todos os extratos testados no qual os EH e EC foram os mais

ativos e os EM possivelmente deram um falso positivo, enquanto os extratos EA e EAB tiveram atividades baixas. No ensaio contra o fitopatógeno causador da antracnose no mamão, *Colletotrichum gloesporioides*, os resultados mostram que LC-EH e LD-EH são os mais ativos, com IC_{50} de 70 e 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Para o ensaio citotóxico contra células de mamíferos está sendo desenvolvido um modelo em que se utilizam células MES-SA e sua correspondente mutante (MES-SA/Dx5) multiresistente a drogas. O modelo proposto é bastante promissor e, do *screening* inicial sugere-se uma investigação mais detalhada em LD-EH e LT-EH cujos IC_{50} foram de 91 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, contra MES-SA. Uma investigação química de cada uma das frações dos extratos das espécies LA, LC, LD e LI foi realizada utilizando-se o CG-EM. Para identificação das substâncias foi utilizada a biblioteca do equipamento e literatura disponível através da comparação dos espectros de massas, tempo de retenção e Índice de Kovat's. Os resultados obtidos neste estudo apresentaram potencial que justifica dar continuidade na busca de novas moléculas ou grupo de moléculas capazes de serem usadas em terapias sem a toxidez das substâncias sintetizadas quimicamente.

Palavras-chave: *Laurencia*, atividades biológicas, metabólitos secundários

ABSTRACT

The Red Algae, phylum Rhodophyta, represent one of the largest and oldest lineages of eukaryotic organism. From the chemical standpoint, the *Laurencia* J.V. Lamouroux (Ceramiales) has been identified as one of the most complete and diverse genus within this specific group. The members of this genus have been identified, for instance, as the largest producers of secondary metabolites known to the Rhodophyta. Thus, it is not surprising that these specific species are currently under intense scrutiny with regard to their potential as new sources of natural products for medical and biotechnological applications. The primary aim of this study is to start a systematic investigation on the identification and characterization of novel *Laurencia* natural products showing desirable pharmacological and biomedical properties. The species used in this research are *L. aldingensis* (LA), *L. catarinensis* (LC), *L. dendroidea* (LD), *L. intricata* (LI). In addition, *L. translucida* (LT), *Palisada flagellifera* (PF), *P. perforata* (PP) and a pigment variant of LD (LDV) were included for comparison. Specifically, algal extracts were obtained through the sequential fractionation of dried algae samples with hexane (EH), chloroform (EC), methanol (EM), water (EA), and a single, crude, aqueous extracts (EAB). Protein content was performed using the Bradford, bicinchoninic acid assay (BCA) and the 280 nm uv quantification methods. The Bradford method was identified to be more appropriate for quantification. The analysis of phycobilins revealed that phycoerythrin was the major pigment in all species tested. Extracts were assayed for antimicrobial activity following the NCCLS microdilution tests and the minimum inhibitory concentration (MICs) obtained spectrophotometrically. Antimicrobial activity was explored using a variety of model biological targets (i.e. pathogens). To this end, microdilutions were used following the classical NCCLS and a minimal inhibitory concentration (MIC) protocol was performed on basis of electronic spectroscopy measurements. With respect to our findings on antibacterial activity, the LA-EH extract was bactericidal against the *P. aeruginosa* concentration of $62.8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ extracts and LA-EM and LC-EH had a strong bacteriostatic action against *S. pneumoniae* at concentrations of 51.1 and $85.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. In the antifungal assay, LA-EH and LA-EC were fungicides against *C. parapsilosis* to 49.0 and $57.8 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. The antioxidant assay was tested using the method with DPPH, in which the EC presented them as possessing the finest

extracts of molecules capable of donating protons. And for the anticholinesterase test was done in the qualitative assay and quantitative assay on TLC plate by the Ellman method that could demonstrate the inhibitory activity of AChE less than 50 % for concentrations of $600 \mu\text{g.mL}^{-1}$. The profile was similar for all extracts in which the EH and EC were the most active and possibly EM gave a false positive, while the EA and EAB extracts had very low activity. In the trial against the pathogen *Colletotrichum gloesporioides* that causes papaya anthracnose the results show that LC-EH and LD-EH are the most active with IC_{50} of 70 and $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. To perform the cytotoxicity assay against mammalian cells a model that is under development was proposed in which use cells MES-SA and its corresponding mutant (MES-SA/Dx5) multi-drug resistant. The proposed model is quite promising and the initial screening we propose a more detailed investigation of LD-EH and LT-EH whose IC_{50} were $91 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively, against MES-SA cells. The LA, LC, LD and LI extract compounds were analyzed by GC-MS and the identification was performed using the library data and literature by comparing the mass spectra, retention time and index Kovat's. The study conducted here is likely to draw directions and help in the search for new molecules or group of molecules capable of being used in therapy without the toxicity of chemically synthesized compounds.

Keywords: *Laurencia*, biological activities, secondary metabolites

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOURRICHE, A.; CHARROUF, M.; BERRADA, M.; BENNAMARA, A.; CHAIB, N.; FRANCISCO, C. 1999. Antimicrobial activities and cytotoxicity of the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. **Fitoterapia** 70: 611-614
- ABREU, G. F.; TALAMINI, V.; STADNIK, M. J. 2008. Bioprospecção de macroalgas e plantas aquáticas para o controle da Antracnose do feijoeiro. **Summa Phytopathologica** 34: 78-82.
- ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I.; BELLO, J. 2000. Influence of the simultaneous addition of the protease flavourzyme and the lipase novozyme 677BG on dry fermented sausage compounds extracted by SDE and analyzed by GC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 48: 2395-2400.
- ANSORENA, D.; GIMENO, O.; ASTIASARÁN, I.; BELLO, J. 2001. Analysis of volatile compounds by GC-MS of a dry fermented sausage: chorizo de Pamplona. **Food Research International** 34: 67-75.
- ARAÚJO, F. F.; HENNING, A.; HUNGRIA, M. 2005. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 21: 1639-1645.
- BELOSTOTSKY, I.; DA SILVA, S. M.; PAEZ, M. G.; INDIG, G. L. 2011. Mitochondrial targeting for photochemotherapy. Can selective tumor cell kill be predicted based on *n*-octanol/water distribution coefficients? **Biotechnic and Histochemistry**, doi:10.3109/10520295.2010.483656.
- BENAMARA, A.; ABOURRICHE, A.; BERRADA, M.; CHARROUF, M.; CHAIB, N.; BOUDOUMA, M.; GARNEAU, F. X. 1999. Methoxybifurcarenone: an antifungal and antibacterial meroditerpenoid from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. **Phytochemistry** 52: 37-40.
- BENSON, A. 2005. Alzheimer's disease: A tangled issue. **Drug Discovery Today** 10: 749-751.

- BERDAGUE, J. L.; DENOYER, C.; LE QUÉRÉ, J. L.; SEMON, E. 1991. Volatile components of dry-cured ham. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 39: 1257-1261.
- BODARD, M. 1968. L'infrastructure des "corps en cerise" des *Laurencia* (Rhodomelaceés, Ceramiales). **Compte Rendu Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences. Série D** 266: 2393-2396.
- BOULANGER, R.; CHASSAGNE, D.; CROUZET, J. 1999. Free and bound flavour components of amazonian fruits. 1: Bacuri. **Flavour and Fragrance Journal** 14: 303-311.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254.
- BUCHIN, S.; SALMON, J. C.; CARNAT, A. P.; BERGER, T.; BUGAUD, C.; BOSSET, J. O. 2002. Identification de composés monoterpéniques, sesquiterpéniques et benzéniques dans un lait d'alpage très riche en ces substances. **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung and Hygiene** 93: 199-216.
- BURKHOLDER P. R. 1973. The ecology of marine antibiotics and coral reefs. In Jones, O. A.; Endean, R. (eds) **Biology and Geology of Coral Reefs**, Vol 2, Biol 1. New York: Academic Press, p 117-182.
- BURT, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology** 94: 223-253.
- CACCAMESE, S.; AZZOLINA, R.; FURNARI, G.; CORMACI, M.; GRASSO, S. 1981. Antimicrobial and antiviral activities of some marine algae from eastern Sicily. **Botanica Marina** 24: 365-367.
- CACCAMESE, S.; AZZOLINA, R.; FURNARI, G.; CORMACI, M.; GRASSO, S. 1980. Antimicrobial and antiviral activities of extracts from Mediterranean Algae. **Botanica Marina** 23: 285-288.

- CAHYANA, A. H.; SHUTO, Y.; KINOSHITA, Y. 1985. Antioxidative activity of porphyrin derivatives. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 57: 680-681.
- CHAKABOURTY, C.; HSU, C. H.; WEN, Z. H.; LIN, C. S. 2009. Anticancer drug discovery and development from marine organisms. **Current Topics in Medicinal Chemistry** 9: 1536-1545.
- CHESTER, C. G.; STOTT, J. A. **The production of antibiotic substances by seaweeds**. In: INTERNATIONAL SEAWEED SYMPOSIUM, 2., 1956. p. 49-53.
- COMPTON, S. J.; JONES, C. G. 1985. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical Biochemistry** 151: 369-374.
- COOK, R. J.; BAKER, K. F. 1983. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. American Phytopathological Society. Saint Paul: APS Press, 539p.
- DA GAMA, B. A. P.; PEREIRA, R. C.; CARVALHO, A. G. V.; COUTINHO, R.; YONESHIGUE-VALENTIM, Y. 2002. The effects of seaweed secondary metabolites on biofouling. **Biofouling** 18: 13-20.
- DA GAMA, B. A. P.; PEREIRA, R. C.; SOARES, A. R.; TEIXEIRA, V. L.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. 2003. Is the mussel test a good indicator of antifouling activity? A comparison between laboratory and field assays. **Biofouling** 19: 161-169.
- DAVYT, D.; FERNANDEZ, R.; SUESCUN L.; MOMBRÚ A.W.; SALDAÑA, J.; DOMÍNGUEZ, L. D.; FUJII, M.T.; MANTA, E. 2006. Bisabolanes from the red alga *Laurencia scoparia*. **Journal of Natural Products** 69:1113-1116.
- DAVYT, D.; FERNANDEZ, R.; SUESCUN, L.; MOMBRÚ, A.W.; SALDAÑA, J.; DOMÍNGUES, L.; COLL, J.; FUJII, M.T.; MANTA, E. 2001. New sesquiterpene derivatives from the red alga *Laurencia scoparia*. Isolation, structure determination and anthelmintic activity. **Journal of Natural Products** 64: 1552-1555.

- DAWSON, R. J. P.; LOCKER, K. P. 2006. Structure of a multidrug ABC transporter. **Nature** 443: 180-185.
- DE NYS, R.; LEYA, T.; MAXIMILIEN, R.; AFSAR A.; NAIR, P. S. R.; STEINBERG, P. D. 1996. The need for standardized broad scale bioassay testing: a case study using the red alga *Laurencia rigida*. **Biofouling** 10: 213-224.
- DIAS, M. D.; POZZA, E. A.; ABREU. M. S.; MIRANDA, E. O. 2005. Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de *Coffea arabica* L1 . **Ciência e Agrotecnologia** 29: 545-552.
- DICKMAN, M. B.; ALVAREZ, A. M. 1983. Latent infection caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Pathology** 67:748-750
- DONATO, R. 2005. **Diversidade intraespecífica em linhagens tetrasporofíticas de *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta): crescimento, caracterização pigmentar, fotossíntese e assimilação de nitrato**. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 98p.
- DRLICA, K.; XU, C.; WANG, J; BURGER, R. M.; MALIC, M. 1996. Fluoroquinolone action in mycobacteria: Similarity with effects in *Escherichia coli* and detection by cell lysate viscosity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 40: 1594-1599.
- DUKE, C. S.; LAPOINTE, B. E.; RAMUS, J. 1986. Effects of light on growth, RuBpCase activity and chemical composition of *Ulva* species (Chlorophyta). **Journal of Phycology** 22: 362-370
- EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazoles compounds. **Phytopathology** 61: 42-44.
- ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES, V. JR., FEATHERSTONE, R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology** 7: 88-95.

- ELOFF, J. N. 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica** 64: 711-713.
- ERICKSON K. L. 1983. Constituents of *Laurencia*. In Scheur, P. J. (ed) **Marine Natural Products: chemical and biological perspectives**, Vol 5. New York: Academic Press, p 131-257.
- FELDMAN, J. & FELDMAN, G. 1950. Les “corps en cerise” du *Laurencia obtusa* (Huds.) Lamour. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Serie D** 1335-1337.
- FELÍCIO, R.; ALBUQUERQUE, S.; YOUNG, M. C. M.; YOKOYA, N. S.; DEBONSI, H. M. 2010. Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales), **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 52:763-769.
- FENICAL, W. & NORRIS, J. N. 1975. Chemotaxonomy in marine algae: chemical separation of some *Laurencia* species (Rhodophyta) from the Gulf of California. **Journal of Phycology** 11: 104-108.
- FERNÁNDEZ J. J., SOUTO M. L., GIL L.V.; NORTE M. 2005. Isolation of naturally occurring dactylomelane metabolites as *Laurencia* constituents. **Tetrahedron** 61: 8910-8915.
- FERNÁNDEZ, J. J.; SOUTO, M. L.; GIL, L. V.; NORTE, M. 1998. Evaluation of the cytotoxic activity of the polyethers isolated from *Laurencia*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 6: 2237-2243.
- FERRERES, F.; SOUSA, C.; VRCHOVSKÁ, V.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J. A.; SEABRA, R. M.; ANDRADE, P. B. 2006. Chemical composition and antioxidant activity of tronchuda cabbage internal leaves. **European Food Research and Technology** 222: 88-98
- FLESCIM, S.; FLESCIM, M.; NITA, S.; PAVEL E.; MEGEARU, V. 2000. Free radicals mediated protein oxidation in biochemistry. **Roumanian Biotechnological Letters** 5: 479-495

- FOKIALAKIS, N.; MELLIOU, E.; MAGIATIS, P.; HARVALA, C.; MITAKU, S. 2003. Composition of the steam volatiles of six *Euphorbia* spp. from Greece. **Flavour and Fragrance Journal** 18: 39-42.
- FRUGULHETTI, I. C. P. P.; AMORIM, L. M. F.; TEIXEIRA, V. L.; PEREIRA, R. C. 2005. **Estudo da atividade antiviral e anticâncer de substâncias isoladas de algas marinhas**. Oficina de trabalho potencial biotecnológico das macroalgas marinhas. Angra dos Reis – RJ.
- FUJII, M. T. 1998. **Estudos morfológicos, quimiotaxonômicos e citogenéticos em quatro espécies selecionadas de *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) do litoral brasileiro**. Tese de Doutorado. Universidade Federal Paulista, Rio Claro, 176 p.
- FUJII, M. T.; BARATA, D.; CHIRACAVA, S.; GUIMARÃES, S. M. P. B. 2008. **Cenário brasileiro da diversidade de algas marinhas bentônicas e sua contribuição para a política de conservação dos recursos naturais e do meio ambiente**. In: 59º Congresso Nacional de Botânica, 2008, Natal. Atualidades, Desafios e Perspectivas da Botânica no Brasil. Natal: Imagem Gráfica e Editora Ltda. p. 375-377.
- FUJII, M. T.; CASSANO, V.; STEIN, E. M.; CARVALHO, L. R. 2011. Synthesis of knowledge on the taxonomy, major secondary metabolites and their biological activities related to human health in the *Laurencia* complex (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**: 21 (no prelo).
- FUJII, M. T.; SENTÍES, A., 2005. In: Taxonomia do complexo *Laurencia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) do Brasil, com ênfase nas espécies de São Paulo e Espírito Santo. **Monografias Ficológicas** 2: 69-135.
- GALVÃO, S.; STADNIK, M. J.; PERUCH, L. A. M.; BRUNA, E. D. 2006. Avaliação da eficiência de produtos alternativos para o controle do míldio e da antracnose em videira, cultivar Niágara branca. **Revista Agropecuária Catarinense** 19: 91-93.
- GARCÍA-PÉREZ. M.; ROYER, M.; DUQUE-FERNANDEZ, A.; DIOUF, P. N.; STEVANOVIC. T.; POULIOT, R. 2010. Antioxidant, toxicological and

- antiproliferative properties of Canadian polyphenolic extracts on normal and psoriatic keratinocytes. **Journal of Ethnopharmacology** 132: 251-258.
- GILANI, A.H.; ATTA-UR-RAHMAN. 2005. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology** 100: 43-49.
- GOES, A. 1995. **Queda prematura de *Citrus*: caracterização do agente causal, *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ [Senso ARX, 1957, e controle da doença]**. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Piracicaba, 16 f.
- GRESSLER V.; STEIN, E. M.; DÖRR F.; FUJII M. T.; COLEPICOLO P.; PINTO E. 2011. Sesquiterpenes from the essential oil of *Laurencia dendroidea* (Ceramiales, Rhodophyta): isolation, biological activities and distribution among seaweeds. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 21 (no prelo).
- GUIRAUD, P.; STEIMAN, R.; SEIGLE-MURANDI, F.; BUARQUE DE GUSMÃO, N. 1999. Antimicrobial e antitumor activities of mycosporulone. *J. Nat. Prod.* 62: 1222-1224.
- HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. 2003. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology** 95: 853–860.
- HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86: 985-990.
- HEINRICH. M.; TEOH, H.L. 2004. Galanthamine from snowdrop - the development of a modern drug against Alzheimer’s disease from local Caucasian knowledge. **Journal of Ethnopharmacology** 89: 261-264.
- HELMIG, D.; POLLOCK, W.; GREENBERG, J.; ZIMMERMAN, P. 1996. Gas chromatography mass spectrometry analysis of volatile organic trace gases at Mauna Loa Observatory, Hawaii. **Journal of Geophysical Research** 101: 14697-14710.

- HIGGINS, C. F. 2007. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. **Nature** 446: 749-757.
- HOLL, F. B.; CHANWAY, C. P.; TURKINGTON, R.; RADLEY, R. A. 1988. Response of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa*. **Soil Biology and Biochemistry** 20: 19-24.
- HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, M. F.; VIEIRA, P. C. 2003. Série de textos da Escola de Verão em Química, IV: **Princípios ativos de plantas superiores**. Ed. UFSCar, São Carlos. 152 p.
- JAPP, M.; GILL, R.; OSSELTON, M. D. 1987. Comparison of drug retention indices determined on packed, wide bore capillary and narrow bore capillary columns **Journal of the Forensic Science** 32: 1574-1586.
- KAMENARSKA, Z.; SERKEDJIEVA, J.; NAJDENSKI, H.; STEFAVOV, K.; TSVETKOVA, I.; DIMITROVAKONAKLIEVA, S.; POPOV, S. 2009. Antibacterial, antiviral, and cytotoxic activities of some red and brown seaweeds from the Black Sea. **Botanica Marina** 52: 80-86
- KARAMAN, I.; SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖGÜTÇÜ, H.; SENGÜL, M.; ADIGÜZEL, A. 2003. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology** 85: 231-235.
- KELECOM, A. 1997. Marine natural products in Brazil. **Ciência e Cultura**. 49(5-6): 321-330.
- KHALIQ-UZ-ZAMAN, S. M.; SIMIN, K.; SHAMEEL, M. 2001. Antimicrobial activity and phytotoxicity of sterols from *Chara wallichii* A. Br. (Charophyta). **Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research**. 44: 301-304.
- KIM, T.H.; THUY, N.T.; SHIN, J.H.; BAEK, H.H.; LEE, H.J. 2000. Aroma-active compounds of miniature beefsteakplant (*Mosla dianthera* Maxim.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 48: 2877-2881.

- KLARZYNSKI, O.; PLESSE, B.; JOUBERT, J. M.; YVIN, J. C.; KOPP, M.; KLOAREG, B. F. 2000. Linear β -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. **Plant Physiology Online** 124: 1027-1038.
- KLOEPPER, J. W. 1999. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. **Australasian Plant Pathology** 28: 21-26.
- KLOEPPER, J. W.; SCHORTH, M. N. 1981. Plant growth promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. **Phytopathology** 71: 642-644.
- KNAPP, M. J.; KNOPMAN, D. S.; SOLOMON, P. R.; PENDLEBURY, W. W.; DAVIS, C. S.; GRACON, S. I. 1994. A 30-week randomized controlled trial of high-dose Tacrine in patients with Alzheimer's disease. The Tacrine study group. **The journal of the American Medical Association** 271: 985-991.
- KONIG, G. A.; WRIGHT, A. D. 1997 Sesquiterpene content of the antibacterial dichloromethane extract of the marine red alga *Laurencia obtusa*. **Planta Medica** 63: 168-187
- KONIG, G. M.; WRIGHT, A. D. 1997. *Laurencia rigida*: chemical investigations of its antifouling dichloromethane extract. **Journal of Natural Products** 60: 967-970
- KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D.; STICHER, O.; ANGERHOFER, C. K.; PEZZUTO, J. M. 1994. Biological activities of selected marine natural products. **Planta Medica** 60: 532-537
- KURSAR, T. A.; VAN DER MEER, J.; ALBERTE, R. S. 1983. Light-harvesting system of the red algae *Gracilaria tikvahiae*. I. Biochemical analyses of pigment mutations. **Plant Physiology** 73: 353-360.
- LABANCA, E. R. G. 2002. Purificacao parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*, atividade como indutores de resistencia em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da sintese de gliceolinas em soja (*Glycine max*). Tese de doutorado. USP.

- LAGE, H. 2008. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. **Cellular and Molecular Life Sciences** 65: 3145-3167.
- LALEL, H.J.D.; SINGH, Z.; CHYE TAN, S. 2003. Glycosidically-bound aroma volatile compounds in the skin and pulp of 'Kensington Pride' mango fruit at different stages of maturity. **Postharvest Biology and Technology** 29: 205-218.
- LAPOINTE, B. E.; RYTHER, J. H. 1979. The effects of nitrogen and seawater flow rate on the growth and biochemical composition of *Gracilaria foliifera* var. *angustissima* in mass outdoor culture. **Botanica Marina** 22: 529-537.
- LARROQUE-LOMBARD, A. L.; TODOROVA, M.; GOLABI, N.; WILLIAMS, C.; JEAN-CLAUDE, B. J. 2010. Synthesis and uptake of fluorescence labeled combi-molecules by P-glycoprotein-proficient and -deficient uterine sarcoma cells MESSA and MESSA/Dx5. **Journal of Medicinal Chemistry** 53: 2104-2113.
- LAZARI, D. M.; SKALTSA, H. D.; CONSTANTINIDIS, T. 2000. Volatile constituents of *Centaurea pelia* DC., *C. thessala* Hausskn. subsp. *drakiensis* (Freyn & Sint.) Georg. and *C. zuccariniana* DC. from Greece. **Flavour and Fragrance Journal** 15: 7-11.
- LAZZARETTI, E.; BETTIOL, W. 1997. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado a base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Scientia Agricola** 54: 89-96,
- LEE, S. R.; MACKU, C.; SHIBAMOTO, T. 1991. Isolation and identification of headspace volatiles formed in heated butter. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 39: 1972-1975.
- LIMA-FILHO, J. V. M.; CARVALHO, A. F. F. U., FREITAS, S. M.; MELO, V. M. M. 2002. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern brasilian coast. **Brazilian Journal of Microbiology** 33: 311-313.
- LIZZI, Y.; COULOMB, C.; COULOMB, P.J.; COULOMB, P.O.; POLIAN, C. 1998. L'algue face au Mildiou: que avenir ? **Phytoma** 508: 29-30

- MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B. 2004. Aroma volatiles from two fruit varieties of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). **Food Chemistry** 85: 195-197.
- MARSTON, A., KISSLING, J., HOSTETTMANN, K., 2002. A Rapid TLC Bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis** 13: 51-54.
- MASUDA, M., ABE, T., SATO, S., SUZUKI, T., SUZUKI, M. 1997. Diversity of halogenated secundary metabolites in the red alga *Laurencia nipponica* (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Journal of Phycology** 33: 196-208.
- MATSUKAWA, R.; DUBINSKY, Z.; MASAKI, K.; MASUDA, Y.; TAKEUCHI, T.; CHIAARA, M.; YAMAMOTO, Y.; NIKI, E.; KARUBE, I. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. **Journal of Applied Phycology** 9: 29-35.
- MAYER, A. M. S.; GUSTAFSON, K. R. 2008. Marine Pharmacology: Antitumor and cytotoxic compounds. **European Journal of Cancer** 44: 2357-2387
- MENG, J. C.; ZHU Q. X.; THAN R. X. 2000. New antimicrobial mono and sesquiterpenes from *Soroiseris hookeriana* subsp. *erysimoides*. **Planta Medica** 66: 541-544.
- MENTEN, J. O. M.; MINUSSI, C.C.; CASTRO, C.; KIMATI, H. 1976. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial da *Macrophomina phaseolina in vitro*. **Fitopatologia Brasileira** 1: 57-66.
- MENUT, C.; LAMATY, G.; WEYERSTAH, P.; MARSCHALL, H; SEELMANN, I.; P. H. ZOLLO, P. H. A. 1997. Aromatic plants of tropical central Africa. Part XXXI. Tricyclic sesquiterpenes from the root essential oil of *Echinops giganteus* var. *lelyi* C. D. Adams. **Flavour and Fragrance Journal** 12: 415-421
- MOLINEUX, P. 2003. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science Technology** 26: 211-219.

- MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods** 65: 55-64.
- NAGUIB, Y. M. A. 2000. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 48: 1150-1154.
- National Committee for clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2003. Reference method for broth dilution antimicrobial susceptibility testing: Approved standard – second edition. NCCLS document M7-A6. USA, Wayne, Pennsylvania 22: 15.
- National Committee Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard. NCCLS document M27-A2. USA, Wayne, Pennsylvania.
- NORDBERG J, ARNÉR SJ 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine** 31: 1287-1312.
- OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 1991. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 111p.
- PALMEIRA, S. F., JR.; MOURA, F. S.; ALVES, V. L.; DE OLIVEIRA, F. M.; BENTO, E. S.; CONSERVA, L. M.; ANDRADE, E. H. A. 2004. Neutral components from hexane extracts of *Croton sellowii*. **Flavour and Fragrance Journal** 19: 69-71.
- PARADAS, W. C.; SALGADO, L. T.; SUDATTI, D. B.; CRAPEZ, M. A.; FUJII, M. T.; COUTINHO, R.; PEREIRA, R. C.; AMADO FILHO, G. M. 2010. Induction of halogenated vesicle transport in cells of the red seaweed *Laurencia obtusa*. **Biofouling** 26: 277-286.
- PAUL, V. J.; WYLIE, C. R.; SANGER, H. R. 1988. Effects of algal chemical defenses toward different coral-reef herbivorous fishes: a preliminary study. In:

- Proceedings of the 6th International Coral Reef Symposium**, 3., 1998. Australia, p. 73-78.
- PAULERT, R. **Atividade antimicrobiana e controle da antracnose do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando polissacarídeo e extratos da macroalga marinha *Ulva fasciata***. 2005. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 107p.
- PEC, M.A.; AGUIRRE, A.; MOSER-THIER, K.; FERNÁNDEZ, J.J.; SOUTO, M.L.; DORTA, J.; DIÁZ- GONZÁLEZ F.; VILLAR, J. 2003. Induction of apoptosis in estrogen dependent and independent breast cancer cells by the marine terpenoid dehydrothysiferol. **Biochemical Pharmacology** 65: 1451- 1461.
- PELLATI, F.; BENVENUTI, S.; MAGRO, L., MELEGARI, M.; SORAGNI, F. 2004. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea* spp. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 35: 289-301
- PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAN, M. C.; MUÑOZ, J. D.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. 2001. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology** 77: 37-40
- PEREIRA, R. C. 2002. Ecologia Química Marinha. In: **Biologia Marinha**. (R.C. Pereira & A. Soares-Gomes, org.). Interciência, Engenho Novo, p. 281-310.
- PEREIRA, R. C.; DA GAMA, B. A. P.; TEIXEIRA, V. L.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. 2003. Ecological roles of natural products from the brazilian red seaweed *Laurencia obtusa*. **Brazilian Journal of Biology** 63: 665-672.
- Pereira, R. C.; Teixeira, V. L. 1999. Sesquiterpenos das algas marinhas *Laurencia* Lamouroux (Ceramiales, Rhodophyta). 1. Significado ecológico. **Química Nova** 22: 369-374.
- PEREZ-TOMAS, R. 2006. Multidrug resistance. Retrospect and prospects in anti-cancer treatment. **Current Medicinal Chemistry** 13: 1859-1876.

- PERRY, S. W.; EPSTEIN, L. G.; GELBART, H. A. 1997. Simultaneous in situ detection of apoptosis and necrosis in monolayer cultures by TUNEL and trypan blue staining. **Biotechniques** 22: 1102-1106.
- Pfaller M. A., Messer S. A., Coffmann S. (1995). Comparison of visual and spectrophotometric methods of mic endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D0870. **Journal Of Clinical Microbiology** 33: 1094–1097
- PINO, J.; MARBOT, R.; ROSADO, A.; VÁZQUEZ, C. 2003. Volatile constituents of fruits of *Garcinia dulcis* Kurz. from Cuba. **Flavour and Fragrance Journal** 18: 271-274.
- PITAROKILI, D.; COULADIS, M.; PETSIKOS-PANAYOTAROU, N.; TZAKOU, O. 2002. Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Salvia sclarea* from Greece. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 50: 6688-6691.
- PLAZA, M.; SANTOYO, S.; JAIME, L.; REINA, G. G.; HERRERO, M.; SEÑORÁS, F. J.; IBÁLNEZ, E. 2010. Screening for bioactive compounds from alga. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 51: 450-455.
- PORTA, G. D.; PORCEDDA, S.; MARONGIU, B.; REVERCHON, E. 1999. Isolation of eucalyptus oil by supercritical fluid extraction. **Flavour and Fragrance Journal** 14: 214-218.
- RAHMAN, A. U.; CHOUDHARY, M. I.; MAJEED, A.; SHABBIR, M.; GHANI, U.; SHAMEEL, M. 1997. A succinylanthranilic acid ester and other bioactive constituents of *Jolyna laminarioides*. **Phytochemistry** 46: 1215-1218.
- RAYMUNDO, M. S.; HORTA, P.; FETT, R. 2004. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** 40: 495-503.

- REDDY, M. S.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; KENNEY, D.S.; RYU, C. M.; ZHANG, S.; KLOPPER, J. W. 1999. Growth promotion and induced systemic resistance (ISR) mediated by biological preparation. **Phytopathology** 89: 65.
- REICHELT, J. L.; BOROWITZKA, M. A. 1984. Antimicrobial activity from marine algae: Results of a large-scale screening programme. **Hydrobiologia** 116/117: 158-168
- RICHMOND, R.; POMBO-VILLAR, E. 1998. Short communication. Use of persistent trace gas chromatography artifacts for the calculation of pseudo-Sadtler retention indices. **Journal of Chromatography A** 811: 241-245.
- ROBLES-CENTENO, P. O.; BALLANTINE, D. L.; GERWICK, W. H.; 1996. Dynamics of antibacterial activity in three species of Caribbean marine algae as a function of habitat and life history. **Hydrobiologia** 326: 457-462.
- ROMANOS, M. T. V. 2005. **Potencial antiviral de Macroalgas marinhas**. Oficina de trabalho potencial biotecnológico das macroalgas marinhas. Angra dos Reis, RJ. p.15.
- RYU, G.; PARK, S. H.; KIM, E. S.; CHOI, B. W., RYU, S. Y.; LEE, B. H. 2003. Cholinesterase inhibitory activity of two farnesylacetone derivatives from the brown alga *Sargassum sagamianum*. **Archives of Pharmacal Research** 26: 96-799.
- SADIQUE, J.; CHANDRA, T.; THENMOZHI, T. 1987. Biochemicals modes of action of *Cassia occidentalis* and *Cardiospermum halicatum* in inflamantion. **Journal of Ethnopharmacology** 19: 213-219.
- SAKHO, M.; CHASSAGNE, D.; CROUZET, J. 1997. African mango glycosidically bound volatile compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 45: 883-888.
- SALGADO, L. T.; VIANA, N.; ANDRADE, L.; LEAL, R.; DA GAMA, B.; ATTIAS, M.; PEREIRA, R.; AMADO FILHO, G. M. 2008. Intra-cellular storage, transport

- and exocytosis of halogenated compounds in marine red alga *Laurencia obtusa*. **Journal of Structural Biology** 162: 345-355.
- SANTOS, A. O.; VEIGA-SANTOS, P.; UEDA-NAKAMURA T.; DIAS FILHO B. P.; SUDATTI D. B., BIANCO E. M.; PEREIRA R.C.; NAKAMURA C.V. 2010. Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea* on *Leishmania amazonensis*. **Marine Drugs** 8: 2733-2743.
- SASIDHARAN, S.; DARAH, I.; NOORDIN, M. K. M. J. 2010. In vitro antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* and acute oral toxicity of marine algae *Gracilaria changii*. **New biotechnology** 27:390-396.
- SHASHKOVA, A. A.; ZNAMENSKAIA, A. P.; PAS'KO, L. Y. A. 1969. Investigation of esters of odd series halogenated acids with Kovats indices. **Gas Chromatography** 9: 4047.
- SIEBURTH, J. M. 1964. Antibacterial substances produced by marine algae. **Developments in Industrial Microbiology** 5: 124-134.
- SILVA, M. 2005. **Megadiversidade de Abrolhos**. Vol 1, nº 2. Disponível em: www.conservation.org.br. Acesso em Agosto 2008.
- SILVEIRA, C. S.; PESSANHA, C. M.; LOUREÇO, M. C. S.; NEVES JUNIOR, I.; MENEZES, F. S.; KAPLAN, M. A. C. 2005. Atividade antimicrobiana dos frutos de *Syagrus oleracea* e *Mauritia vinifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 15: 143-148.
- SIMS J. J.; LIN, G. H. Y.; WING, R. M. 1974. Marine natural products X. Elatol, a halogenated sesquiterpene alcohol from the red alga *Laurencia elata*. **Tetrahedron Letters** 39: 3487-3490.
- SING, A.S.C.; SMADJA, J.; BREVARD, H.; MAIGNIAL, L.; CHAINTREAU, A.; MARION, J. P. 1992. Volatile constituents of faham (*Jumellea fragrans* (Thou.) Schltr.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 40: 642-646.

- SITE: Globo.com. Cultivo do mamão é um dos principais no Espírito Santo. Acessível em: <http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2011/02/cultivo-do-mamao-e-um-dos-principais-no-espírito-santo.html>. Acesso em: 27/04/2011.
- SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N, M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry** 150: 76-85
- SREENIVASA, R. P.; PAREKH, K. S. 1981. Antibacterial activity of Indian seaweed extracts. **Botanica Marina** 24: 577-582.
- STADNIK, M. J. 2003. **Uso potencial de algas no controle de doenças de plantas**. In: VIII Reunião de controle biológico de fitopatógenos, Cepec, Ilhéus, p.70-74.
- STEINBERG, P. D.; DE NYS, R. 2002. Chemical mediation of colonization of seaweed surfaces. **Journal of Phycology** 38: 62-629
- STOSCHECK, C. M. Quantitation of Protein. In: Deutscher, M. P. (ed). **Methods in Enzymology**. San Diego: Academic Press Inc, 1990. Vol 182, p 50-67.
- SUDATTI, D. B.; RODRIGUES S. V.; PEREIRA R. C. 2006. Quantitative GC-ECD analysis of halogenated metabolites: determination of surface and within-thallus elatol of *Laurencia obtusa*. **Journal of Chemical Ecology** 32: 835-843.
- TALAMINI, V.; ABREU. G.F.; ZEFERINO, S.A.D.B.; STADNIK, M.J. 2005. Potencial de extratos vegetais e de macroalgas marinhas para controlar *Colletotrichum lindemuthianum* e o oídio do feijoeiro. **Summa Phytopathologica** 31 (Suplemento): 180.
- TALAMINI, V.; VICENETE, E. C.; STADNIK, M. J. 2004. Eficiência de extratos vegetais no controle de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Summa Phytopathologica** 30: 79.

- TALAMINI, V.; STADNIK, M. J. 2004. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis, SC: CCA/ UFSC. 2004. p 45-62.
- TASDEMIR, D.; DÜNNERZ, A. A.; CALIS, I.; RÜEDI, P. 2004. Evaluation of biological activity of Turkish Plants. Rapid screening for the antimicrobial, antioxidant, and acetylcholinesterase inhibitory potential by TLC bioautographic methods. **Pharmaceutical Biology**. 42: 374-383.
- TAVARES, G. M.; DE SOUZA, P. E. 2005. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum Gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Ciência e Agrotecnologia** 29: 52-59
- TAYLOR, P. 2006. Agentes anticolinesterásicos. In: Goldman e Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11^a edição. Rio de Janeiro: Ed McGraw-Hill Interamericana do Brasil.
- TEIXEIRA, V. L. 2002. Produtos Naturais Marinhos. In: **Biologia Marinha**. (R.C. Pereira & A. Soares-Gomes, org.). Engenho Novo: Interciência, p. 249-279.
- VAIRAPPAN, C. S. 2003. Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae *Laurencia majuscula* (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Biomolecular Engineering** 20: 255-259.
- VASCONCELOS, I. M.; TRENTIN, A.; GUIMARÃES, J. A.; CARLINI, C. R. 1994. Purification and physicochemical characterization of soyatoxin, a novel toxic protein isolated from soybeans *Glycine max*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 312: 357-366.
- VEIGA-SANTOS, P.; PELIZZARO-ROCHA K. J.; SANTOS, A. O. UEDA-NAKAMURA, T; DIAS FILHO, B. P.; SILVA, S. O.; SUDATTI, D. B.; BIANCO, E. M.; PEREIRA, R. C.; NAKAMURA, C. V. 2010. In vitro anti-trypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. **Parasitology** 137: 1661-1670.

- VENTURA, J. A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. S. 2003. Manejo das doenças do mamoeiro. In: **A cultura do mamoeiro: tecnologias de produção**. Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural, p. 231-267.
- VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. 2004. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de alzheimer. **Química Nova** 27: 655-660.
- VLACHOS, V.; CRITCHLEY, A. T.; HOLY, A. 1997. Antimicrobial activity of extracts from selected southern african marine macroalgae. **South African Journal of Science** 93: 328-332
- VON KOVÁTS, E. 1958. Gas-chromatographische charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. **Helvetica Chimica Acta** 41: 1915-1932.
- WRIGHT, A. D.; COLL, J. C.; PRICE, I. R. 1990. Tropical marine algae, VII. The chemical composition of marine algae from north queensland waters. **Journal of Natural Products** 33: 845-861.
- YASUHARA, A.; SHIRAISHI, H.; NISHIKAWA, M.; YAMAMOTO, T.; UEHIRO, T.; NAKASUGI, O.; OKUMURA, T.; KENMOTSU, K.; FUKUI, H.; NAGASE, M.; ONO, Y.; KAWAGOSHI, Y.; BABA, K.; NOMA, Y. 1997. Determination of organic components in leachates from hazardous waste disposal sites in Japan by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** 774: 321-332.
- YOSHIKAWA, M. 1993. Succinic and lactic acids as plant growth promoting compounds produced by rhizosphere *Pseudomonas putida*. **Canadian Journal of Microbiology** 39: 1150-1154.
- ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. 1998. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova** 21: 787-793.

- ZEMAN, M. S.; PHILLIPS, D. R.; CROTHERS, D. M. 1998. Characterization of covalent Adiamycin-DNA adducts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 95: 11561-11565
- ZGODA, J. R.; PORTER, J. R. 2001. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. **International Journal of Pharmacognosy** 39: 221-225.
- ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. 1999. Volatile constituents from leaves and flowers of *Alpinia speciosa* K. Schum. and *A. purpurata* (Viell.) Schum. **Flavour and Fragrance Journal** 14: 411-414.

ANEXO A

Artigo Publicado:

Search for citotoxic agents in multiple *Laurencia* complex seaweed species (Ceramiales, Rhodophyta) harvested from the Atlantic Ocean zone that bates the Brazilian State of Espírito Santo.

Keywords:

macroalgae
Laurencia complex
anti-cancer activity
MES-SA
MES-SA/Dx5
Hela

Search for cytotoxic agents in multiple *Laurencia* complex seaweed species (Ceramiales, Rhodophyta) harvested from the Atlantic Ocean with emphasis on the Brazilian State of Espírito Santo

Erika M. Stein,^{1,2} Daniel X. Andregueti,¹ Cleidiane S. Rocha,¹ Mutue T. Fujii,^{2,3} Mauricio S. Baptista,¹ Pio Colepicolo,¹ Guilherme L. Indig^{*,4}

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Brazil,

²Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo, Brazil,

³Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, Brazil,

⁴Department of Chemistry and Biochemistry, University of Wisconsin, USA.

Abstract: The development of new anti-cancer drugs of algal origin represents one of the least explored frontiers in medicinal chemistry. In this regard, the diversity of micro- and macroalgae found in Brazilian coastal waters can be viewed as a largely untapped natural resource. In this report, we describe a comparative study on the cytotoxic properties of extracts obtained from the *Laurencia* complex: *Laurencia aldingensis*, *L. catarinensis*, *L. dendroidea*, *L. intricata*, *L. translucida*, *L. sp.*, and *Palisada flagellifera*. All of these species were collected in the coastal waters of the State of Espírito Santo, Brazil. Four out of the twelve samples initially investigated were found to show significant levels of toxicity towards a model tumor cell line (human uterine sarcoma, MES-SA). The highest levels of cytotoxicity were typically associated with non-polar (hexane) algal extracts, while the lowest levels of cytotoxicity were found with the corresponding polar (methanol) extracts. In this report, we also describe a biological model currently in development that will not only facilitate the search for new anti-cancer drug candidates of algal origin, but also permit the identification of compounds capable of inducing the destruction of multi-drug resistant tumors with greater efficiency than the pharmaceuticals currently in clinical use.

Introduction

Out of the more than 25,000 known species of algae, only about fifteen are currently grown on a large-scale for biotechnological applications (Raja et al., 2008). Algae are considered to be a largely untapped natural resource and investigations involving them are one of the least explored frontiers of biotechnology and natural products chemistry (Pinto et al. 2000; Cardozo et al., 2007; Chakabourty et al., 2009). Significant advances in the discovery and development of new anti-cancer drugs of algal origin have been recently reported in the literature. Newly identified algal drug candidates include representatives of the terpene, steroid, and polyketide families (Mayer & Gustafson, 2008). Drug-induced over-expression of the multi-drug efflux pump

P-glycoprotein (P-gp) is thought to be one of the leading causes of chemotherapy failure in clinical oncology (Higgins, 2007; Dawson & Locker, 2006; Lage, 2008; Perez-Thomas, 2006). Because P-gp can remove many unrelated chemotherapeutic agents from the target cells, including agents to which the tumor had not been previously exposed (Higgins, 2007; Dawson & Locker, 2006), these cells are referred to as multi-drug resistant (MDR) mutants.

One of the most gratifying findings that can arise from any drug screening program is the identification of new drug candidates that are capable of eliminating MDR tumor cells more efficiently than the drugs currently in clinical use. The discovery of new, more benign inhibitors of such drug efflux pumps can also be facilitated by the biological model currently in development in our

laboratories.

In this report, we describe our initial results on the search for novel anti-cancer agents in marine algae found on the coast of the Brazilian State of Espírito Santo. We also outline a biological model currently in development to guide our screening efforts. This model aids in the identification of potential new anti-cancer candidates and, at the same time, of those that should be less susceptible to the action of promiscuous therapy-induced drug-efflux pumps such as P-gp.

Materials and Methods

Reagents and cell culture media

McCoy’s 5A modified medium, Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM), doxorubicin hydrochloride, fungizone (amphotericin B), penicillin, streptomycin, thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA; disodium salt), trypsin, and Trypan Blue were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Fetal bovine serum (FBS) from Vitrocell Embriolife (Campinas, Brazil). NaCl from Synth (Diadema, Brazil), sodium bicarbonate from Merck (Darmstadt, Germany), D-glucose from Becto Chemical (São Paulo, Brazil), KCl from Cetus (São Paulo, Brazil), Dulbecco’s phosphate buffered saline (DPBS) from Gibco BRL (Grand Island, USA), and dimethylsulfoxide (DMSO) from Vetec Química Fina Ltda. (Duque de Caxias, Brazil) were all of high-purity grade and used as received. Water was distilled, deionized and filtered prior to use (Millipore Milli-Q system; resistivity, 18 MΩ cm).

Instruments and methods

Stock solutions of doxorubicin were prepared in water and their respective concentrations determined by absorption spectroscopy on a Shimadzu (Kyoto, Japan) Model UV-1650 PC spectrophotometer employing a molar extinction coefficient of 11,500 M⁻¹ cm⁻¹ at 480 nm (Zeman et al., 1998).

Algal extracts were prepared via initial sonication (30 min) of approximately 30 g of the respective powdered and dried biomass with 300 mL of hexane. After standing overnight, the mixture was filtered and the solid mass subjected to two more cycles of extraction with hexane. The hexane-extracted biomass was then further processed by performing three extraction cycles with chloroform followed by three cycles of methanol extraction. The solvent was evaporated from the filtrates on a rotary evaporator to obtain three distinct classes of algal extracts, namely the hexane extract, the chloroform extract, and the methanol extract. In selected experiments, we extracted the original algal dry powder

sample only with methanol; these extracts are referred to here as “crude” methanol extracts. Stock solutions of the final algal extracts were prepared in either DMSO or ethanol and subsequently diluted in the cell growth media in order to maintain the final concentration of organic solvent in the medium below 0.5% (by volume). The species of algae investigated are listed in Table 1.

Table 1. Species of *Laurencia* complex seaweed investigated in this study. Voucher specimens were deposited in the Herbarium Maria Eneida P. Kauffman Fidalgo at the Instituto de Botânica, São Paulo, SP, Brazil.

Algae species	Collect information	Voucher number
<i>Laurencia aldingensis</i> Saito & Womersley	ES, Anchieta, Ponta dos Castelhanos 01/07/2007	SP 399.933
<i>Laurencia catarinensis</i> Cord-Mar & M.T. Fujii	ES, Anchieta, Ponta dos Castelhanos 01/07/2007	SP 400.209
<i>Laurencia dendroidea</i> J. Agardh	ES, Anchieta, Praia de Parati 30/06/2007	SP 400.198
<i>Laurencia intricata</i> J.V. Lamour	ES, Guarapari, Praia de Meaípe 04/06/2008	SP 400.793
<i>Laurencia</i> sp.	ES, Anchieta, Ilhote de Ubu 04/06/2008	SP 399.936
<i>Laurencia translucida</i> M.T. Fujii & Cord-Mar	ES, Anchieta, Praia de Parati 30/06/2007	SP 400.213
<i>Palisada flagellifera</i> (J. Agardh) K.W. Nam	ES, Anchieta, Ponta dos Castelhanos 03/06/2008	SP 400.203

The trypan blue dye exclusion assay (Perry et al., 1997) was routinely employed to assess the quality of our original cell cultures; in all experiments performed with cell cultures, cell viability was at least 95%. All experiments were carried out with cells in the exponential growth phase. Cell viability assays were carried out using the MTT assay (Mosmann, 1983; Garcia-Peres et al., 2010). For this purpose, 96-well flat-bottomed microtiter plates were seeded at a cell density of 5,000 cells per well (100 µL of growth medium per well) and the cells allowed to attach and grow for 24 h. The sub-culturing protocols used in this study were always in accord with the respective ATCC recommendations. The cells were subsequently exposed to growth medium containing either the standard drug (doxorubicin) or the algal extracts for a period of time that typically varied from 24 to 72 h prior to MTT analysis. The MTT assays were performed on a Model Infinite M200 multi-well plate reader from Tecan (Männedorf, Switzerland). Cells exposed to the growth medium alone or to the growth medium plus the drug/extract vehicle (DMSO or ethanol) served as the controls. Under our experimental conditions, no significant cytotoxicity was observed for the vehicle (organic solvent used to prepare the stock solutions). Cell mortality was expressed as the viability of cells treated with the drug or extract relative to that of the corresponding controls.

Cell Lines

The MES-SA human uterine sarcoma cell line (ATCC CRL-1976TM) and the corresponding doxorubicin-resistant mutant (MES-SA/Dx5, ATCC CRL-1977TM) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA). These cells were grown in modified McCoy's 5A medium supplemented with 10% FBS, amphotericin B (0.63 µg/mL), penicillin (100 units/mL) and streptomycin (100 µg/mL). The medium used to grow the MES-SA/Dx5 mutants also contained doxorubicin (0.5 µM), as required for the maintenance of the drug-resistance phenotype (Harker, 1983; Harker & Sikic, 1985; Larroque-Lombard et al., 2010). HeLa (CCL-2TM) human cervix adenocarcinoma cells were kindly provided by Dr. Mari Cleide Sogayar (Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo) and grown in DMEM medium, supplemented as described above for the McCoy's medium used to grow the MES-SA cells. Cells were grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.

Results and Discussion

In this initial screening, we explored the extent to which the chemical agents extracted from a variety of *Laurencia* complex seaweed species exhibited cytotoxicity effects toward our primary model tumor cell line (MES-SA). For this purpose, we initially exposed cultures of MES-SA cells to mixtures containing substantial amounts of the algal extracts (*i.e.*, 500 µg of algal extract/mL of cell culture media), subsequently measuring the cell survival rates after 24 h of continuous exposure to the extract. Table 2 shows that substantial cytotoxicity was associated with some, but not all, of these algal extracts. The methanol extracts obtained by our sequential extraction protocol (*i.e.*, hexane/chloroform/methanol) showed the lowest levels of toxicity, even lower than that of the crude methanol extracts obtained via direct methanol extraction of the original algae dry powder samples. The somewhat higher toxicity of the crude methanol extracts relative to the sequential methanol extracts is presumably the result of the presence of less polar chemical entities in the former that are absent in the latter extract because of removal during the prior extractions with the less polar solvents. Indeed, the hexane extracts of *Laurencia catarinensis* Cord.-Mar. & M.T. Fujii, *L. dendroidea* J. Agardh, and *L. translucida* M.T. Fujii & Cord.-Mar all show high levels of cytotoxicity. Likewise, the chloroform extract of *L. dendroidea* also exhibits a high degree of cytotoxicity, but the corresponding extract of *L. aldingensis* does not (Table 2).

Table 2. Relative cytotoxic effects of algal extracts toward MES-SA cells.

Algae species	Extracts	Relative toxicity
<i>L. aldingensis</i>	chloroform	-
<i>L. aldingensis</i>	methanol	-
<i>L. catarinensis</i>	hexane	++
<i>L. catarinensis</i>	methanol	--
<i>L. dendroidea</i>	hexane	++
<i>L. dendroidea</i>	chloroform	++
<i>L. dendroidea</i>	methanol	-
<i>L. intricata</i>	methanol	-
<i>L. translucida</i>	hexane	++
<i>L. translucida</i>	methanol	--
<i>L. sp</i>	methanol (crude)*	+
<i>P. flagellifera</i>	methanol (crude)*	+

Key: (++) ≥ 80% cell mortality; (+) 50-79% cell mortality; (-) 30-50% cell mortality; (--) <30% cell mortality. Cells were incubated for 24 h in the presence of algal extracts (500 µg/mL of growth medium). * See Materials and Methods.

The overall trends observed in Table 2 were further confirmed by a subsequent experiment employing the highly cytotoxic hexane extracts of *L. dendroidea* and *L. translucida* and the methanol extract of *L. translucida*. In this second study, MES-SA cells were exposed for 72 h to variable concentrations of the extracts and cell viability again measured by the MTT assay. Figure 1 confirms that the methanol extract of *L. translucida* is virtually non-toxic, while the corresponding hexane extract of the same alga is highly toxic, with an apparent IC₅₀ of about 16 µg/mL. The IC₅₀ associated with the hexane extract of *L. dendroidea* was ca. 5-fold higher (*i.e.*, 91 µg/mL) than that of the hexane extract of *L. translucida*. For comparative purposes, an analogous experiment carried out with doxorubicin (a classical and potent anti-cancer drug) gave an ID₅₀ of 0.05 µM (*i.e.*, 0.03 µg/mL) for MES-SA cells (Figure 2).

The use of MES-SA cells for this screening was motivated in part by the fact that these cells grow quickly (doubling time of *ca.* 24 h), show desirable morphology, are large enough to facilitate counting/analysis of drug-induced mechanisms of damage via microscopic analysis, are highly susceptible to a large variety of anti-cancer drugs (*i.e.*, relatively easy to perform *in vitro* assays of mortality), and are also easy to manipulate and maintain (Larroque-Lombard, 2010; Lacerda et al., 2005; Belostotsky et al., 2011). The susceptibility of MES-SA cells to doxorubicin is analogous to that observed for HeLa cells (compare panels A and B in Figure 2). HeLa cells have been extensively used in pre-clinical studies and, for this reason, the inclusion of this cell line in selected screening experiments may facilitate the comparison of the

potency associated with putative new drug candidates with that of previous candidates studied with HeLa cells. On the other hand, the MES-SA line has a feature that is quite attractive in terms of the development of novel screening protocols: the existence of a commercially-available MES-SA mutant (namely the MES-SA/Dx5 line) that is also easy to work with and maintain and shows the classical multi-drug resistance phenotype (*i.e.*, over-expression of the drug efflux pump, P-gp). Therefore, the inclusion of this mutant cell line in any screening protocol permits the identification not only of novel anti-cancer agents capable of inducing the mortality of MDR tumor cells, but also of novel inhibitors of P-gp. For comparative purposes, the ID₅₀ for doxorubicin was 0.05 μ M for the wild type cell

line (MES-SA), but almost two orders of magnitude higher (*i.e.*, 3.4 μ M; see Figure 2, panel A) for the MDR mutant (MES-SA/Dx5). Analogous differences in the response of these cell lines to doxorubicin have been reported by others authors (Larroque-Lombard et al., 2010).

Conclusions

Our initial studies indicate that four of the twelve extracts of the *Laurencia* complex seaweeds currently under investigation exhibit significant cytotoxicity towards MES-SA cells. We are cautiously optimistic with respect to these preliminary findings and further investigations designed to isolate and identify

Figure 1. Cytotoxic effects of algal extracts toward human uterine sarcoma (MES-SA) cells. From the top, at 100 μ g extract/ml of growth medium: Lt-ME, methanol extract of *Laurencia translucida*; Ld-HE, hexane extract of *Laurencia dendroidea*; Lt-HE, hexane extract of *Laurencia translucida*. The cell cultures were incubated for 72 h in the presence of the algal extracts.

Figure 2. Cytotoxic effects of doxorubicin on the three tumor cell lines. Panel A: human uterine sarcoma (MES-SA) and its corresponding multi-drug resistant mutant (MES-SA/Dx5). Panel B: human cervix adenocarcinoma (HeLa) cells.

novel and potent anti-cancer drug candidates from these extracts are already in progress. The biological model under development here is currently being used for a wider systematic screening of algal species present in waters along the Brazilian seashore. This should expand our knowledge of the presence of cytotoxic compounds in Brazilian algal species and may identify novel candidate compounds for the more effective treatment of multidrug resistant tumors (Higgins, 2007; Dawson & Locker, 2006; Lage, 2008; Perez-Tomas, 2006). In addition, we envision that our biological model should also facilitate the search for novel chemical inhibitors of P-gp that show positive synergism with classical anti-cancer drugs. Thus, any enhancement in MES-SA/Dx5 cell mortality (e.g., at ID20) in the presence of doxorubicin plus a non-toxic extract relative to that of doxorubicin alone would suggest the possible presence of P-gp inhibitors or other agents (e.g., pro-apoptotic factors) in the extract. Hence, in our future screening studies, even algal extracts that do not show cytotoxic properties will be tested for synergy with the standard drug doxorubicin.

Acknowledgment

This work was supported by the Brazilian research funding agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Ministério da Saúde, Ministério de Ciência e Tecnologia and CNPq-INCT-Redoxoma.

References

Belostotsky I, da Silva SM, Paez MG, Indig GL 2011. Mitochondrial targeting for photochemotherapy. can selective tumor cell kill be predicted based on *n*-octanol/water distribution coefficients? *Biotech Histochem*, doi :10.3109/10520295.2010.483656.

Cardozo KHM, Guaratini T, Barros MP, Falcao VR, Tonon AP, Lopes NP, Campos S, Torres MA, Souza AO, Colepicolo P, Pinto E 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comp Biochem Physiol C-Toxicol Pharmacol* 146: 60-78.

Chakabourty C, Hsu CH, Wen ZH, Lin CS 2009. Anticancer drug discovery and development from marine organisms. *Curr Top Med Chem* 9: 1536-1545.

Dawson RJP, Locker KP 2006. Structure of a multidrug ABC transporter. *Nature* 443: 180-185.

García-Pérez M, Royer M, Duque-Fernandez A, Diouf PN, Stevanovic T, Pouliot R 2010. Antioxidant, toxicological and antiproliferative properties of Canadian polyphenolic extracts on normal and psoriatic keratinocytes. *J Ethnopharmacol* 132: 251-258.

Harker WG 1983. Development and characterization of a human

sarcoma cell line, MES-SA, sensitive to multiple drugs. *Cancer Res* 43: 4943-4950.

Harker WG, Sikic BI 1985. Multidrug (Pleiotropic) resistance in doxorubicin-select variants of the human sarcoma cell line MES-SA. *Cancer Res* 45: 4091-4096

Higgins CF 2007. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* 446: 749-757.

Lacerda SHD, Abraham B, Stringfellow TC, Indig GL 2005. Photophysical, photochemical, and tumor-selectivity properties of bromine derivatives of triarylmethanes and rhodamine-123. *Photochem Photobiol* 81: 1430-1438.

Lage H 2008. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem. *Cell Mol Life Sci* 65: 3145-3167.

Larroque-Lombard AL, Todorova M, Golabi N, Williams C, Jean-Claude BJ 2010. Synthesis and uptake of fluorescence-labeled combi-molecules by P-glycoprotein-proficient and -deficient uterine sarcoma cells MES-SA and MES-SA/Dx5. *J Med Chem* 53: 2104-2113.

Mayer AMS, Gustafson KR 2008. Marine Pharmacology: Antitumor and cytotoxic compounds. *Eur J Can* 44: 2357-2387.

Mosmann T 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunol Meth* 65: 55-64.

Perez-Tomas R 2006. Multidrug resistance. Retrospect and prospects in anti-cancer treatment. *Cur Med Chem* 13: 1859-1876.

Perry SW, Epstein LG, Gelbart HA 1997. Simultaneous in situ detection of apoptosis and necrosis in monolayer cultures by TUNEL and trypan blue staining. *Biotechniques* 22: 1102-1106.

Pinto E, Catalani LH, Lopes NP, Di Mascio, P, Colepicolo P 2000. Isolation of peridinin from chloroplasts of *Gonyaulax polyedra*. *Biochem Biophys Res Comm* 268: 496-500.

Raja R, Hemeaiswarya S, Kumar NA, Shidhar S, Rengasamy R 2008. A perspective on the biotechnological potential of algae. *Crit Rev Microbiol* 34: 77-88.

Zeman MS, Phillips DR, Crothers DM 1998. Characterization of covalent Adriamycin-DNA adducts. *Proc Nat Acad Sci USA* 95: 11561-11565.

*Correspondence

Erika M. Stein
Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo
Av. Prof. Lineu Prestes, 748, Bloco 03 superior, Cidade Universitária, 05508-900 São Paulo-SP, Brazil
glindig@uwm.ed
Tel: +1 414 229 5034
Fax: +1 414 229 5530

ANEXO B

Artigo Publicado:

Screening for antifungal activities of extracts from Brazilian seaweed genus *Laurencia*
(Ceramiales, Rhodophyta).

Screening for antifungal activities of extracts of the Brazilian seaweed genus *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta)

Erika M. Stein,^{*,1} Pio Colepicolo,² Felipe A. K. Afonso,² Mutue T. Fujii³

¹Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Programa de Pós-graduação, Universidade de São Paulo, Brazil,

²Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Brazil,

³Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto de Botânica, Brazil.

Abstract: The resistance of pathogens to commonly used antibiotics has enhanced morbidity and mortality and has triggered the search for new drugs. Several species of the red alga genus *Laurencia* are very interesting candidates as potential sources of natural products with pharmaceutical activity because they are known to produce a wide range of chemically interesting halogenated secondary metabolites. This is an initial report of the antifungal activities of the secondary metabolites of five species of *Laurencia*, collected in the state of Espírito Santo, against three strains of pathogenic fungi: *Candida albicans* (CA), *Candida parapsilosis* (CP), and *Cryptococcus neoformans* (CN). Minimum inhibitory concentrations (MIC) of the algal extracts were determined by serial dilution method in RPMI 1640 Medium in 96-well plates according to the NCCLS and microbial growth was determined by absorbance at 492nm. A result showing maintenance or reduction of the inoculum was defined as fungistatic, while fungicidal action was no observed growth in the 10 µL fungistatic samples subcultured in Sabouraud Agar. Our results indicate that apolar extracts of *Laurencia* species possess antifungal properties and encourage continued research to find new drugs for therapy of infectious diseases in these algae.

Keywords:

Antifungal activities
Brazilian seaweeds
Candida
Cryptococcus
infectious diseases
Laurencia

ISSN 0102-695X

Introduction

Currently, multiple drug resistance of human pathogenic microorganisms is due to the indiscriminate use of the commercial antimicrobials commonly used for the treatment of infectious diseases (Karaman et al., 2003). The search for new, more specific and better adapted antimicrobial agents has been further stimulated by the occurrence of fatal opportunistic infections associated with AIDS, antineoplastic chemotherapy and transplants (Penna et al., 2001).

As a consequence of the increasing demand for biodiversity in screening programs for potential therapeutic activities of natural products, there is an increased interest in marine fauna and flora throughout the world (Sasidharan et al., 2010). In this context, tropical marine algae have proven to be a rich source of bioactive compounds of potential biomedical interest (Sieburth, 1964; Burkholder, 1973; Caccamese et al., 1981; Reichelt & Borowitzka, 1984; Robles-Centeno et al., 1996; Plaza et al., 2010).

Brazil occupies a prominent position as an interesting source of natural products due to the richness of its biodiversity, including the red seaweed genus *Laurencia* (Fujii & Senties, 2005), which is known to produce numerous biologically active halogenated secondary metabolites with a diversity of structural features (Erickson, 1983), predominantly sesquiterpenes, diterpenes, and acetylenes (Blunt et al., 2005). Many of these metabolites have been isolated and their structures determined, but their biological activity needs to be investigated in more detail (Ireland et al., 2000).

There are numerous studies testing inhibition against bacteria, some viruses and marine fungi, but there are few studies of the activity of compounds or extracts of *Laurencia* against human pathogenic fungi. Ballantine et al. (1987) collected *Laurencia obtusa* (Huds.) J.V. Lamour., *Yuzurua poiteaui* (J.V. Lamour.) Martin-Lescanne (as *Laurencia poitei*) and *Laurencia* sp. from Puerto Rico and evaluated the antifungal properties of chloroform/methanol (2:1) extracts against *Candida albicans*. The

L. obtusa extract showed a 0.5 mm inhibition using the disc-agar method.

Most authors use agar diffusion assays to determine the antimicrobial activity of algal extracts. The technique works adequately with well-defined inhibitors (Hewitt & Vincent, 1989), but with extracts that contain unknown components there are problems with false positive and false negative results (Eloff, 1998). The type of agar, the salt concentration, the incubation temperature, and the molecular size of the antimicrobial components can all influence the results obtained with agar diffusion assays (Marsh & Goode, 1994). Furthermore, this technique also cannot distinguish between fungicidal (the lowest concentration of the agent that results in no growth) and fungistatic (the lowest concentration of the agent that results in the maintenance or reduction of the inoculum) effects (Hammer et al., 2003) and does not permit determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) (Eloff, 1998).

The present study is an initial report of the results of screening assays for a variety of biological activities with extracts of *Laurencia* species, with the aim of identifying novel and interesting potentially useful therapeutic activities. In this paper, we describe the antifungal activities of extracts of five *Laurencia* species collected in the state of Espírito Santo, Southeastern Brazil, measured by using a sensitive and rapid serial dilution technique in 96-well microplates.

Materials and Methods

Algae and preparation of the extracts

The red seaweeds *Laurencia aldingensis* Saito & Womersley (LA), *Laurencia catarinensis* Cord.-Mar. & M.T. Fujii (LC), *Laurencia dendroidea* J. Agardh (LD), *Laurencia intricata* J.V. Lamour. (LI) and *Laurencia translucida* M.T. Fujii & Cord.-Mar. (LT) were collected in two counties of Espírito Santo State, Southeastern Brazil (Table 1). Vouchers of representative specimens were deposited in the Maria Eneyda P. Kauffmann Fidalgo Herbarium (SP) at the Instituto de Botânica in São Paulo.

After collection, the fresh algae were washed thoroughly with seawater, followed by fresh water to remove sand particles and epiphytes. The cleaned material was stored frozen at -20 °C until preparation of the extracts. For that purpose, approximately 30 g of dried and powdered alga was added to 300 mL of hexane and allowed to soak overnight. To ensure complete extraction, this procedure was repeated on three subsequent days. The extract was filtered and concentrated on a rotary evaporator. The same procedure was repeated using chloroform, methanol

and water, generating the hexane, chloroform, methanol and aqueous extracts. In addition, a crude water extract was prepared from 30 g of fresh alga in water to obtain a clean, non-toxic extract preparation that was then concentrated on a Speed Vac. The dried extracts were re-dissolved in 10% ethanol (by volume) or water to yield a solution containing 4 mg of extract per mL of growth medium.

Microorganisms

The test organisms included three American Type Culture Collection (ATCC) fungal strains: *Candida albicans* ATCC 10231 (CA), *Candida parapsilosis* ATCC 29212 (CP) and *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112 (CN).

Antifungal Drug and microdilution tray

Fluconazole was obtained as a reagent-grade powder from Sigma. Microdilution trays containing serial dilutions of the antifungal agent in RPMI 1640 medium (Sigma) were prepared in a single lot and stored frozen at -20 °C until used in the study.

Broth microdilution assay

Broth microdilution assays were performed according to National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) for the establishment of quality control and referenced strain, using the methods (NCCLS, 2002) with minor modifications.

Yeast inocula were prepared by growing isolates on Sabouraud dextrose agar (SDA) for 24-48 h at 35 °C and then suspending growth in 5 mL of saline (0.145 mol.L⁻¹) prepared in sterile distilled water. The optical density of this suspension was adjusted to 0.5 McFarland standard turbidity in a Shimadzu UV-1650 PC spectrophotometer (Kyoto, Japan) to obtain a concentration of 1 x 10⁶ to 5 x 10⁶ UFC.mL⁻¹ and then diluted 1:100 followed by 1:20 in RPMI 1640 medium to obtain a final inoculum concentration of 5.0 x 10² to 2.5 x 10³ UFC.mL⁻¹. Serial dilutions were prepared in 96-well microplates with 50 µL of RPMI 1640 Medium in each well as described (Zgoda & Porter, 2001) with the following modifications. A 50 µL aliquot of initially prepared extract at the concentration of 4mg/ml was added into the first well. Then, 50 µL aliquots of the corresponding serial dilutions were transferred into six consecutive wells to obtain final concentrations ranging from 1,000 to 31.25 µg.mL⁻¹ (50 µL). The last well contained just 50 µL of nutrient broth plus an aliquot of the extract vehicle (10% ethanol or water), used as the negative control. After serial dilution, 50 µL of the inoculum were added to the wells. The final volume

in each well was 100 µL. Fluconazole was prepared in water at concentrations ranging from 64 to 2 µg.mL⁻¹ and used as the standard for the positive control.

Spectrophotometric determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

For yeasts, the MIC value was determined as the lowest concentration of the extract in the broth medium that resulted in maintenance or reduction of the inoculum (Hammer et al., 2003). Spectrophotometric readings on each well were performed with a Tecan M200 automated plate reader (Männedorf, Switzerland) set at 492 nm after the well had been agitated. MIC endpoints were determined as the first concentration of the antifungal agent at which turbidity in the well was ≥50% less than that in the control well (Pfaller et al., 1995).

Determination of Concentration Effects (CE)

The concentration effects were determined by subculturing 10 µL from each well of the microtiter tray that showed inhibition, carried out by spot inoculating onto SDA and incubating aerobically at 35 °C. Any inoculum growth on agar plates corresponds to a fungistatic effect, while a fungicidal effect is characterized by no observed growth of the 10 µL fungistatic samples subcultured in Sabouraud Agar (Hammer et al, 2003).

Statistical analysis

The extract fractions were prepared in triplicate and measured for their antifungal activity, expressed as the percentage of activity (%AE) with the formula adapted from Felício et al. (2008):

$$\%AE = 100 - \frac{AE - AEB}{AC - ACB} \times 100$$

Where AE represents the “absorbance of the test plates after the incubation time”; AEB is the “absorbance of plates containing medium, sample and inoculum at t=0 of incubation”; AC is the “absorbance of plates containing negative control (with or without vehicle) (100% of inoculum growth)”; and ACB is the “absorbance of plates containing culture medium”. All of the MIC values were calculated by nonlinear regression.

Results and discussion

The data obtained by the microdilution technique are collected in Table 2. The MIC of the

chloroform and methanol extracts of *L. dendroidea* were <31.25 µg.mL⁻¹ against CA with a fungistatic effect; the chloroform extract of *L. catarinensis* showed the same results against CP. A fungistatic effect was observed for the methanol extract of *L. aldingensis* against CP (MIC<31.25 µg.mL⁻¹), CN (33.9 µg.mL⁻¹) and CA (65.2 µg.mL⁻¹). The fungicidal effects of the hexane and chloroform extracts of *L. aldingensis* against CP were indicated by MIC values of 49.0 and 57.8 µg.mL⁻¹, respectively; the same extracts were fungistatic against CA and CN between the concentrations of 85.3 and 130.8 µg.mL⁻¹. Moreover, the chloroform extract of *L. catarinensis* was fungicidal against CA and CN at 303.8 and 600.4 µg.mL⁻¹, respectively. Of all of the extracts of *L. intricata*, the chloroform extract was the most active, with a MIC higher than 220 µg.mL⁻¹. The *Laurencia translucida* extracts showed no activity against CA, while between 177 and 743 µg.mL⁻¹ were required to observe a fungistatic effect against CP or CN. Comparison of the three different fungal strains indicates that *C. albicans* was the most susceptible to maintenance or reduction of growth by the extracts, while *C. parapsilosis* was the most susceptible to the fungicidal effects of the algal extracts. *L. aldingensis* appears to be a particularly interesting alga, showing activity against all three fungal strains tested.

In general, the results show that the aqueous extracts stimulate cells growth, except for the crude water extracts of *L. aldingensis* and *L. dendroidea*, which show a reasonable percentage of inhibition (110 µg.mL⁻¹ and 100 µg.mL⁻¹, respectively) against CN.

The MIC values of the positive control fluconazole were in agreement with those reported by NCCLS (MIC≤2 µg.mL⁻¹) for the reference antifungal agent.

Of the known algal secondary metabolites with biological activities, approximately 90% are lipid-soluble (Norris & Fenical, 1985). The survey reported here was undertaken to assess the occurrence of lipid-soluble bioactive materials in these macroalgal species and to evaluate them more thoroughly as sources of potentially useful bioactive substances.

The present technique using 96-well microplates and spectrophotometric detection of the MIC was successfully applied to compare the antifungal activities of extracts from different species of *Laurencia*. The method is robust, inexpensive, relatively quick and 30-fold more sensitive than other methods commonly used in the literature; in addition, it requires only a small quantity of sample, can be applied to a large number of samples (very useful for screening), and provides a permanent record of the results (Ellof, 1998).

The importance of investigating the activity of crude extracts lies in identifying promising candidates for additional investigation. In addition, the activity of

an extract may be due synergy between two or more components and other beneficial pharmacological or medicinal properties can be explored. For extracts that show activity, subsequent fractionation or isolation of the individual components is necessary to obtain an understanding of the activity of each individual component and of the contribution of each component to the overall activity of the extract as a whole. In conclusion, this study suggests that apolar extracts of several species of *Laurencia* possess interesting antifungal properties, which should encourage the continued search for new drugs for therapy of infectious diseases derived from marine algae.

Acknowledgment

This work was supported by the Brazilian research funding agencies Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Ministério da Saúde, Ministério de Ciência e Tecnologia and CNPq-INCT-Redoxoma.

Table 1. List of the species used in the experiments, with collection information and voucher number.

Species	Collection data	Voucher
<i>Laurencia aldingensis</i> Saito & Womersley (LA)	Espírito Santo State, Anchieta, Praia dos Castelhanos, <i>col.</i> E.M. Stein, 01 Jul. 2007	SP 399.933
<i>Laurencia catarinensis</i> Cord.-Mar. & M.T. Fujii (LC)	Espírito Santo State, Anchieta, Praia dos Castelhanos, <i>col.</i> E.M. Stein, 01 Jul. 2007	SP 400.209
<i>Laurencia dendroidea</i> J. Agardh (LD)	Espírito Santo State, Anchieta, Praia de Parati, <i>col.</i> E.M. Stein, 30 Jun. 2007	SP 400.198
<i>Laurencia intricata</i> J.V.Lamour. (LI)	Espírito Santo State, Guarapari, Praia de Meaípe, <i>col.</i> E.M. Stein, 09 Apr. 2009	SP 400.207
<i>Laurencia translucida</i> M.T. Fujii & Cord.- Mar. (LT)	Espírito Santo State, Anchieta, Praia dos Castelhanos, <i>col.</i> E.M. Stein, 09 Apr. 2009	SP 400.830

Table 2. Spectrophotometric Minimal Inhibitory Concentration endpoints ($\leq 50\%$ less than that in the control well), expressed in $\mu\text{g/mL}$, of *Laurencia aldingensis*, *L. catarinensis*, *L. intricata*, *L. dendroidea*, *L. translucida* extracts against the reference strains *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*. End points were measured at 492 nm.

Extract		<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 29212)	<i>C. neoformans</i> (ATCC 90112)
LA-HE	MIC	100.6	49.0	130.8
	Concentration effect	Fungistatic	Fungicidal	Fungistatic
LA-CE	MIC	85.3	57.8	100.2
	Concentration effect	Fungistatic	Fungicidal	Fungistatic
LA-ME	MIC	65.2	<31.25	33.9
	Concentration effect	Fungistatic	Fungistatic	Fungistatic
LA-AE	MIC	n.d.	n.d.	n.d.
	Concentration effect	-	-	-
LA-CW	MIC	n.d.	n.d.	110.0
	Concentration effect	-	-	Fungistatic
LC-HE	MIC	n.d.	403.4	n.d.
	Concentration effect	-	Fungistatic	-
LC-CE	MIC	303.8	< 31.25	600.4
	Concentration effect	Fungicidal	Fungistatic	Fungicidal
LC-ME	MIC	n.d.	n.d.	n.d.
	Concentration effect	-	-	-
LC-AE	MIC	n.d.	n.d.	n.d.
	Concentration effect	-	-	-
LD-HE	MIC	183.6	812.50	542.1
	Concentration effect	Fungistatic	Fungistatic	Fungistatic
LD-CE	MIC	<31.25	176.6	176.0
	Concentration effect	Fungistatic	Fungistatic	Fungistatic
LD-ME	MIC	< 31.25	n.d.	159.0
	Concentration effect	Fungistatic	-	Fungistatic

LD-AE	MIC	n.d.	n.d.	n.d.
	Concentration effect	-	-	-
LD-CW	MIC	n.d.	n.d.	100.0
	Concentration effect	-	-	Fungistatic
LI-HE	MIC	n.d.	n.d.	n.d.
	Concentration effect	-	-	-
LI-CE	MIC	258.0	222.7	268.6
	Concentration effect	Fungistatic	Fungistatic	Fungistatic
LI-ME	MIC	n.d.	n.d.	n.d.
	Concentration effect	-	-	-
LI-AE	MIC	n.d.	n.d.	n.d.
	Concentration effect	-	-	-
LI-CW	MIC	367.6	725.4	444.4
	Concentration effect	Fungistatic	Fungistatic	Fungistatic
LT-HE	MIC	n.d.	177.8	648.2
	Concentration effect	-	Fungistatic	Fungistatic
LT-CE	MIC	n.d.	302.0	n.d.
	Concentration effect	-	Fungistatic	-
LT-ME	MIC	n.d.	193.7	n.d.
	Concentration effect	-	Fungistatic	-
LT-AE	MIC	n.d.	189.2	274.7
	Concentration effect	-	Fungistatic	Fungistatic
LT-CW	MIC	n.d.	n.d.	743.7
	Concentration effect	-	-	Fungistatic
Fluconazole	MIC	<2	<2	2.4
	Concentration effect	Fungicidal	Fungicidal	Fungicidal

n.d: not determined; MIC: minimal inhibitory concentration (µg/mL).

References

- Ballantine DL, Gerwick WH, Velez SM, Alexander E, Guevara P 1987. Antibiotic activity of lipid-soluble extracts from Caribbean marine algae. *Hydrobiologia* 151/152: 463-469.
- Blunt JW, Copp BR, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR 2005. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 22: 15-61.
- Burkholder PR 1973. The ecology of marine antibiotics and coral reefs. In Jones OA, Endean R (eds.) *Biology and Geology of Coral Reefs*, vol 2, biol 1. New York: Academic Press, p 117-182.
- Caccamese S, Azzolina R, Furnari G, Cormaci M, Grasso S 1981. Antimicrobial and antiviral activities of some marine algae from eastern Sicily. *Bot Mar* 24: 365-367.
- Ellof JN 1998. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *J Ethnopharmacol* 60: 1-6.
- Erickson KL 1983. Constituents of *Laurencia*. vol 5. In PJ Scheur (ed.) *Marine Natural Products*. New York: Academic Press, p 131-257.
- Felício R, Albuquerque S, Young MCM, Yokoya NS, Debonisi H M 2008. Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). *J Pharm Biom Anal* 52: 763-769.
- Fujii MT, Senties A 2005. Taxonomia do complexo *Laurencia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) do Brasil, com ênfase nas espécies dos estados de São Paulo e do Espírito Santo. In Senties A, Dreckmann KM (eds.) *Monografias Ficológicas II*. Iztapalapa: Universidad Autónoma Metropolitana, p. 69-135.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV 2003. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J Appl Microbiol* 95: 853-860.
- Hewitt W, Vincent S 1989. Theory and application of microbiological assay. London: Academic Press.
- Karaman I, Şahin F, Güllüce M, Ögütçü H, Sengül M, Adigüzel A 2003. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J Ethnopharmacol* 85: 231-235.
- Marsh J, Goode J A 1994. Antimicrobial peptides. *Ciba Foundation Symposium*. Chichester, Inglaterra.
- Ireland CM, Copp BR, Foster MP, McDonald LA, Radisky

- DC, Swersey JC 2000. Bioactive compounds from the sea. In: Martin RE, Carter EP, Davis LM, Flick, Jr GJ (eds). *Marine and Freshwater Products Handbook*. Lancaster: Martin Technomic Publishing, p.641-661.
- National Committee Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard. NCCLS document M27-A2, Wayne, PA.
- Norris JN, Fenical WH 1985. Natural products chemistry: uses in ecology and systematics. In Littler MM, Littler DS (eds.) *Handbook of Phycological Methods. Ecological Field Methods: Macroalgae*. New York: Cambridge Univ. Press, p.121-145.
- Penna C, Marino S, Vivot E, Cruan MC, Muñoz JD, Cruañes J, Ferraro G, Gutkind G, Martino V 2001. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. *J Ethnopharmacol* 77: 37-40
- Pfaller MA, Messer SA, Coffmann S 1995. Comparison of visual and spectrophotometric methods of mic endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D0870. *J Clin Microbiol* 33: 1094-1097
- Plaza M, Santoyo S, Jaime L, Reina GG, Herrero M, Señorás FJ, Ibálñez E 2010. Screening for bioactive compounds from alga. *J Pharm Biomed Anal* 51: 450-455.
- Reichelt JL, Borowitzka MA 1984. Antimicrobial activity from marine algae: Results of a large-scale screening programme. *Hydrobiologia* 116/117: 158-168
- Robles-Centeno PO, Ballantine DL, Gerwick WH 1996. Dynamics of antibacterial activity in three species of Caribbean marine algae as a function of habitat and life history. *Hydrobiologia*, 326: 457-462.
- Sasidharan S, Darah I, Noordin MKMJ 2010. In vitro antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* and acute oral toxicity of marine algae *Gracilaria changii*. *New biotechnol* 27: 390-396.
- Sieburth JM 1964. Antibacterial substances produced by marine algae. *Developments Industr Microbiol* 5:124-134.
- Zgoda, JR, Porter, JR 2001. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharm Biol* 39: 221-225.

*Correspondence

Erika M. Stein
Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Programa de Pós-graduação, Universidade de São Paulo
Rua do Matão, 277, 05422-970 São Paulo-SP, Brazil
erikamstein@usp.br
Tel. +55 11 3091-3810 r:248
Fax: +55 11 3091-2170

ANEXO C

Artigo Publicado em colaboração:

Sesquiterpenes from the essential oil of *Laurencia dendroidea* (Ceramiales, Rhodophyta): isolation, biological activities and distribution among seaweeds.

Keywords:

Seaweeds
Laurencia dendroidea
sesquiterpenes
essential oil
antioxidant activity
antimicrobial activity

ISSN 0102-695X

Sesquiterpenes from the essential oil of *Laurencia dendroidea* (Ceramiales, Rhodophyta): isolation, biological activities and distribution among seaweeds

Vanessa Gressler,^{*1} Érika M. Stein,² Fabiane Dörr,¹ Mutue T. Fujii,³ Pio Colepicolo,¹ Ernani Pinto¹

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 17, 05508-900 São Paulo-SP, Brazil,

²Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, 277, 05422-970 São Paulo-SP, Brazil,

³Núcleo de Pesquisas em Ficologia, Instituto de Botânica, Av. Miguel Estéfano, 3687, 04301-902 São Paulo-SP, Brazil.

Abstract: Two known sesquiterpenes (1*R**,2*S**,3*R**,5*S**,8*S**,9*R**)-2,3,5,9-tetramethyltricyclo[6.3.0.0^{1,5}]undecan-2-ol and (1*S**,2*S**,3*S**,5*S**,8*S**,9*S**)-2,3,5,9-tetramethyltricyclo[6.3.0.0^{1,5}]undecan-2-ol were isolated for the first time from the essential oil of the red seaweed *Laurencia dendroidea* collected in the Brazilian coast. These compounds were not active against eight bacteria strains and the yeast *Candida albicans*, but showed some antioxidant activity. Both compounds were also found in other seaweed species showing that they are not exclusive taxonomic markers to the genus *Laurencia*.

Introduction

Species of algae from the genus *Laurencia* J.V. Lamour. (Ceramiales, Rhodomelaceae) have been a subject of intensive research since an earlier study of marine natural products (Faulkner, 2000). The genus *Laurencia* is a rich source of secondary metabolites of diverse structures with biological activity (Rashid et al., 1995), which can vary significantly with species and location.

The volatile organic compounds which comprise the essential oil are molecules with low molecular weight, low to moderate hydrophilicity and high vapor pressure. Since these compounds can cross the membrane and be released in the atmosphere, they play an important role as chemical communications for algae in marine ecosystems (Fink, 2007; Gressler et al., 2009; Gressler et al., 2011).

A wide range of volatile secondary metabolites such as halogenated and sulfur compounds (Kladi et al., 2004; Karabay-Yavasoglu et al., 2007), hydrocarbons, alcohols, phenols, aldehydes, ketones, acids, esters, terpenes and other compounds (Gressler et al., 2009), are distributed among the seaweeds. However, few works reported the essential oil composition of seaweeds.

This study describe, for the first time, the isolation of two triquinane alcohols (1*R**,2*S**,3*R**,5*S**,8*S**,9*R**)-

2,3,5,9-tetramethyltricyclo[6.3.0.0^{1,5}]undecan-2-ol (SPF-1), also known as 7-*epi*-silphiperfolan-6β-ol (1), and (1*S**,2*S**,3*S**,5*S**,8*S**,9*S**)-2,3,5,9-tetramethyltricyclo[6.3.0.0^{1,5}]undecan-2-ol (SPF-2), also known as silphiperfolan-7β-ol (2), from the essential oil of *Laurencia dendroidea*.

In addition, this paper describes a screening of these two compounds in a range of 21 species of seaweeds collected in different places and dates, and their antimicrobial and antioxidant properties.

Materials and Methods

Seaweed samples

The red macroalga *Laurencia dendroidea* was collected at Parati beach in Anchieta, Espírito Santo State, Brazil, in October, 2006 and identified by Dr.

Mutue Toyota Fujii. An exsiccate (SP 399.947) is deposited on Herbário do Estado (SP) “Maria Eneyda P. K. Fidalgo” at Instituto de Botânica de São Paulo.

Other 21 algae species distributed in 41 samples were used for analyses. Their description is shown in Table 1.

Table 1. Description of algae species used in the distribution analysis of (-)-7-*epi*-silphiperfolan-6 β -ol (**1**) and (-)-silphiperfolan-7 β -ol (**2**).

Alga specie	Abbreviation	Place of collection	Date of collection	Herbarium number
<i>Laurencia aldingensis</i> Saito & Womersley	LA1	ES, Anchieta, Castelhanos	11/10/2007	SP 400.907
<i>Laurencia aldingensis</i> Saito & Womersley	LA2	ES, Anchieta, Ubú	04/06/2008	SP 400.211
<i>Laurencia aldingensis</i> Saito & Womersley	LA3	ES, Anchieta, Ubú	08/04/2009	SP 400.210
<i>Laurencia dendroidea</i> J. Agardh	LD1	ES, Anchieta, Parati	03/10/2006	SP 399.947
<i>Laurencia dendroidea</i> J. Agardh	LD2	ES, Anchieta, Castelhanos	01/07/2007	SP 399.945
<i>Laurencia dendroidea</i> J. Agardh	LD3	SP, Ubatuba, Praia Brava	25/10/2007	SP 401.375
<i>Laurencia dendroidea</i> J. Agardh	LD4	ES, Anchieta, Castelhanos	03/06/2008	SP 399.806
<i>Laurencia dendroidea</i> J. Agardh	LD5	ES, Anchieta, Castelhanos	08/04/2009	SP 400.905
<i>Laurencia dendroidea</i> J. Agardh	LD6	ES, Anchieta, Castelhanos	11/10/2007	SP 400.906
<i>Laurencia dendroidea</i> J. Agardh	LD7	RN, Natal, Praia Rio do Fogo	03/12/2009	n.i.
<i>Laurencia</i> sp.1	Lsp1A	ES, Anchieta, Ubú	30/06/2007	SP 400.206
<i>Laurencia</i> sp.1	Lsp1B	ES, Guarapari, Meaípe	04/06/2008	SP 400.793
<i>Laurencia</i> sp.2	Lsp2	ES, Anchieta, Ubú	04/06/2008	SP 399.936
<i>Laurencia translucida</i> Fujii & Cordeiro-Marino	LT1	ES, Anchieta, Parati	30/06/2007	SP 400.213
<i>Laurencia translucida</i> Fujii & Cordeiro-Marino	LT2	ES, Anchieta, Castelhanos	09/04/2009	SP 400.830
<i>Palisada flagellifera</i> (J. Agardh) K.W. Nam	PF1	ES, Anchieta, Castelhanos	03/06/2008	SP 400.203
<i>Palisada flagellifera</i> (J. Agardh) K.W. Nam	PF2	ES, Anchieta, Castelhanos	08/04/2009	SP 401.376
<i>Palisada perforata</i> (C. Agardh) K.W. Nam	PP1	ES, Anchieta, Castelhanos	11/10/2007	SP 400.908
<i>Palisada perforata</i> (C. Agardh) K.W. Nam	PP2	ES, Anchieta, Castelhanos	03/06/2008	SP 400.204
<i>Palisada perforata</i> (C. Agardh) K.W. Nam	PP3	ES, Anchieta, Castelhanos	08/04/2009	SP 401.377
<i>Ceramium</i> sp.	Csp	n.i.	n.i.	n.i.
<i>Chondria littoralis</i> Harvey	CL1	ES, Anchieta, Parati	04/06/2008	SP 401.378
<i>Chondria littoralis</i> Harvey	CL2	ES, Anchieta, Castelhanos	09/04/2009	SP 401.379
<i>Gracilaria birdiae</i> Palastino & Oliveira	GB	ES, Anchieta, Parati	03/10/2006	SP 400.901
<i>Gracilaria domingensis</i> (Kützinger) Sonder ex Dickie	GD1	ES, Anchieta, Parati	03/10/2006	n.i.
<i>Gracilaria domingensis</i> (Kützinger) Sonder ex Dickie	GD2	RN, Natal	n.i.	n.i.
<i>Plocamium brasiliense</i> (Greville) M.A. Howe & W.R. Taylor	PB	ES, Anchieta, Ubú	03/10/2006	SP 399.944
<i>Pterosiphonia pennata</i> (C. Agardh) Sauvageau	PT	SP, Ubatuba, Praia Brava	27/10/2007	SP 400.898
<i>Spyridia aculeata</i> (C. Agardh ex Decaisne) Kützinger	SA1	ES, Anchieta, Parati	05/10/2006	SP 400.903
<i>Spyridia aculeata</i> (C. Agardh ex Decaisne) Kützinger	SA2	ES, Anchieta, Parati	04/06/2008	SP 400.899
<i>Wrangelia penicillata</i> (C. Agardh) C. Agardh	WP	ES, Anchieta, Parati	03/10/2006	n.i.
<i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen) J.V.Lamoureux	HM1	SP, Ubatuba	26/10/2006	n.i.
<i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen) J.V.Lamoureux	HM2	SP, Ubatuba	26/10/2006	n.i.
<i>Hypnea nigrescens</i> Greville ex J. Agardh	HN	SP, Ubatuba, Praia Dura	13/09/2008	SP 400.895
<i>Octodes secundiramea</i> (Mont.) M. Howe	OS1	ES, Serra, Manguinhos	06/10/2006	SP 400.748
<i>Octodes secundiramea</i> (Mont.) M. Howe	OS2	ES, Anchieta, Castelhanos	03/06/2008	SP 400.201
<i>Octodes secundiramea</i> (Mont.) M. Howe	OS3	ES, Anchieta, Castelhanos	08/04/2009	SP 400.894
<i>Solieria filiformis</i> (Kützinger) P.W. Gabrielson	SF	ES, Serra, Manguinhos	04/10/2006	SP 400.900
<i>Pterocladia capillacea</i> (S.G.Gmelin) Santelices & Hommersand	PC	SP, Ubatuba, Praia Dura	10/12/2007	SP 400.902
<i>Sargassum</i> sp C. Agardh	Ssp	SP, Ubatuba, Ilha do Mar Virado	30/06/2007	SP 400.896
<i>Ulva</i> sp.	Usp	SP, Ubatuba	10/12/2007	n.i.

ES – Espírito Santo State; SP – São Paulo State; RN – Rio Grande do Norte State; n.i.- not informed.

Distillation of the volatile components

Four hours of steam distillation of 200 g of fresh material was done in a Clevenger-type apparatus. The obtained distillate was removed from the apparatus with ethyl ether and the water residue was removed with sodium sulfate. The samples were concentrated by rota-evaporation and then diluted 100 times with ethyl acetate prior to analysis by GC/MS.

Isolation and identification of the compounds

The two major compounds of the essential oil were separated by preparative TLC (Silica Gel 60 F₂₅₄ 0.5 mm Merck) eluted twice with hexane:ethyl acetate (95:5). The compounds SPF-1 and SPF-2 were analyzed by GC/MS and uni- and bidimensional NMR.

Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analysis

The essential oil and the isolated compounds were analyzed in a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu, Japan). The chromatographic separation was achieved with a Rtx-5MS capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.1 µm) and helium was used as carrier gas (with a flow rate of 1 mL.min⁻¹). Oven temperature was increased at a rate of 3 °C.min⁻¹ from 60 to 260 °C, and hold for 40 min. Injection and transfer line temperatures were 220 and 240 °C. The detection was performed in the full scan mode, with a mass range of 50-650 *m/z*. Electron impact ionization was employed with collision energy of 70 eV, and the mass spectrometer ion source was maintained at 240 °C. The target compounds were identified by GC retention times and from their mass spectra. The relative concentration (%) was determined by the integration of all peaks obtained in the total ion chromatogram (TIC) mode. The proportion between the compounds SPF-1 and SPF-2 in different marine seaweed species was obtained using the extraction of specific fragments, characteristic of each compound (*m/z* 98 for SPF-1 and *m/z* 86 for SPF-2).

NMR spectra

¹H and ¹³C uni- and bi-dimensional NMR spectra were recorded using a DPX 500 (Bruker, Germany) spectrometer with CDCl₃ as solvent and TMS as internal standard.

HS-SPME extraction and analysis

The lyophilized algae material (50 mg) were kept in a 10 mL vial. After the equilibration time (15

min at 60 °C) the SPME fiber (PDMS, 100 µm) was exposed during 15 min. The volatile organic compounds composition of the species were analyzed by GC/MS at the same conditions described for the essential oil and isolated compounds.

Test microorganisms

In vitro antimicrobial studies were carried out against eight bacterial strains (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), and one yeast strain (*Candida albicans* ATCC 10231).

Antimicrobial testing

The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determined in 96-well culture plates by a micro-dilution method using a microorganism suspension with a density of 10⁵ CFU.mL⁻¹ in Mueller Hinton Broth (MHB) for bacteria, and Sabouraud Broth (SB) for yeast, as recommended by NCCLS (NCCLS M100-S15 and M38-A). The bacterial suspension was incubated for 24 h at 35±1 °C and the yeast suspension for 72 h at 35±1 °C. Proper blanks were assayed simultaneously with samples tested in triplicate. The concentrations tested were 500, 250, 125, 62.5, 31.25 and 16.125 µg.mL⁻¹.

Antioxidant testing

DPPH radical scavenging assay

Radical scavenging activity of *L. dendroidea* essential oil and isolated compounds against stable DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) was determined spectrophotometrically according to Yen & Chan (1995) with some modifications. The absorbance decrease was measured at 517 nm on a UV-visible light spectrophotometer (Spectrum Power Wave_x 340, Bio-Tec Instruments, INC). Sample solutions were prepared by dissolving the essential oil or the isolated compounds in methanol. The solution of DPPH in methanol (1 mM) was prepared daily, before UV measurements. Ten µL of this solution were mixed with 100 µL sample solution of final concentrations of 500, 250, 100, 50 and 5 µg.mL⁻¹ in a 96-well plate. The samples were kept in the dark for 20 min at room temperature and then the decrease in absorption was measured. Absorption of blank sample containing the same amount of methanol and DPPH solution was prepared and measured daily. Vitamin E was used as a positive control. The experiment was carried out

in triplicate. Radical scavenging activity was calculated by the following formula:

$$\%Inhibition = \frac{(Abs_{DPPH} - Abs_{sample}) \times 100}{Abs_{DPPH}}$$

where Abs_{DPPH} is the absorption of blank sample (MeOH+DPPH) and Abs_{sample} is the absorption of tested solution+DPPH.

Chemiluminescence determination in the presence of HRP

This method is based on light emission and, for antioxidant determination, solutions of 1 mg.mL⁻¹ of the test sample in phosphate buffer 5% DMSO were mixed with H₂O₂, yielding a final concentration of 5 x 10⁻⁵ mol.L⁻¹. Then luminol (5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione, in DMSO) was added to a final concentration of 1.13 x 10⁻⁴ mol.L⁻¹. The 96-well plate was incubated for 3 min at 30 °C and then HRP at a final concentration of 0.2 IU.mL⁻¹ was added to initiate the chemiluminescence reaction (Krol et al., 1994). Phosphate buffer/5% DMSO was used as a blank for the maximum luminescence and *N*-acetyl-L-cysteine was used as the positive control. Chemiluminescence was measured for 15 min at 25 °C with a microplate reader (Tecan Infinite®M200). Final concentrations of 500, 250, 100, 50 and 5 mg.mL⁻¹ of the solutions were analyzed and the experiment was carried out in triplicate. The antioxidant activity was calculated by the following formula:

$$\%Inhibition = \frac{(A_{control} - A_{sample}) \times 100}{A_{control}}$$

where $A_{control}$ is the area under the curve of the blank (phosphate buffer/5% DMSO+H₂O₂+luminol+HRP) during 15 min and A_{sample} is the area under the curve of the sample (sample+H₂O₂+luminol+HRP) during 15 min.

Results and Discussion

The extraction of the essential oil of *L. dendroidea* yielded 0.066% of fresh weight. The chromatogram of the essential oil obtained showed one major peak at 29.5 min (61.67%). Since this peak was not identified by the available libraries (NIST 08 and NIST 08S), the essential oil was submitted to TLC analysis and it was possible to see two strong spots, which were further isolated by preparative TLC. The two isolated compounds were analyzed by GC/MS and NMR techniques and both showed the same retention time (29.5 min) and a 1529 Kovats index.

The ¹H-NMR spectrum of the compound SPF-1 showed that all proton resonances are between δ 0.87 and 1.86 ppm. Only four signals were useful to structure determination (doublets at δ 0.87 and 0.97, singlets at δ 1.07 and 1.10) with integration equivalent for three hydrogen atoms. Similarly as SPF-1, in the ¹H-NMR spectrum of the compound SPF-2 all proton resonances were between δ 0.89 and 1.69 ppm. Four methyl resonances at δ 0.89 (d), 0.92 (d), 1.11 (s) and 1.17 (s) with integration equivalent for three hydrogen atoms were also seen.

Table 2 shows the ¹H and the ¹³C NMR data of both non-halogenated sesquiterpenes. A comparison between the values obtained in this study and literature data showed that the compounds are SPF-1 and SPF-2, previously isolated from *Laurencia majuscula* Saito & Womersley and *L. dendroidea* J. agardh (as *L. scoparia*) (Coll & Wright, 1989; Wright et al., 1990; Davyt et al., 2006). However, the ¹³C-NMR data published by Wright et al. (1990) have one incorrect signal-carbon number attribution. The authors indicated that the δ 27.8 ¹³C-NMR signal is the ethylene group bonded to C3 (δ 81.1 ppm) to SPF-1, but our HMBC-NMR correlation indicates that δ 27.8 ppm signal is bounded to C5. The ¹H-¹³C long range correlations are also given in Table 2.

Both triquinane alcohols smell camphoraceous and woody and have oil aspect.

To verify if the isolated compounds are molecules that could represent taxonomic markers, the presence of the mixture of these compounds was verified in 21 seaweed species which grow in Brazilian coast by HS-SPME-GC/MS analysis.

As previously informed, both sesquiterpenes have the same retention time (probably because of the similarity in their structure), but different mass spectra (Figure 1). To analyze the proportion of each compound in the peak of a crude sample, *m/z* 98 and *m/z* 86 were chosen as characteristic fragments to identify SPF-1 and SPF-2, respectively. The Table 3 shows the species tested and the relative amount of the mixture.

Figure 1. Mass spectra of (a) (-)-7-*epi*-silphiperfolan-6β-ol (1) and (b) (-)-silphiperfolan-7β-ol (2).

Table 2. Chemical shifts obtained by NMR analysis of SPF-1 and SPF-2 in CDCl₃ at 500 MHz.

n° C	(-)-7- <i>epi</i> -silphiperfolan-6 β -ol (SPF-1)		(-)-silphiperfolan-7 β -ol (SPF-2)	
	δ ¹ H ppm	δ ¹³ C ppm	δ ¹ H ppm	δ ¹³ C ppm
1	-	65.9	-	69.9
2	1.53 (q, <i>J</i> = 7.5 Hz)	53.9	-	85.3
3	-	81.2	1.63 (m)	41.0
4	1.55 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz), 1.62 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz)	55.7	1.34 (m), 1.61 (m)	47.3
5	-	50.2	-	49.7
6	1.48 (m), 1.59 (m)	42.7	1.47 (m)	41.8
7	1.46 (m) and/or 1.55 (m) and/or 1.69 (m)	26.9	1.29 (m), 1.51 (m)	29.0
8	1.43 (m)	63.1	1.51 (m)	57.7
9	1.39 (m)	38.4	1.52 (m)	42.5
10	1.11 (m), 1.76 (m)	37.1	1.70 (t, d <i>J</i> = 5.5 Hz, <i>J</i> = 2 Hz)	36.4
11	1.46 (m) and/or 1.55 (m) and/or 1.69 (m)	26.9	1.86 (q, d, <i>J</i> = 7 Hz, <i>J</i> = 2.5 Hz)	27.9
12	0.89 (d, 3H, <i>J</i> = 7.0 Hz)	8.3	1.10 (s, 3H)	22.3
13	1.17 (s, 3H)	26.3	0.87 (d, 3H, <i>J</i> = 6.0 Hz)	12.5
14	1.11 (s, 3H)	27.8	1.07 (s, 3H)	26.8
15	0.92 (d, 3H, <i>J</i> = 6.5 Hz)	19.7	0.97 (d, 3H, <i>J</i> = 6.5 Hz)	19.6
n° C	¹ H- ¹³ C NMR (HMBC)			
12	1,2,3		1,2,3	
13	2,3,4		2,3,4	
14	1,4,5,6		1,4,5,6	
15	8,9,10		8,9,10	

As can be seen in Table 3, both compounds SPF-1 and SPF-2 were observed in different seaweed species, in amounts ranging from 1.12±0.37 to 53.25± 0.21%.

Regarding the proportion of the fragments analyzed, most of the species that have the sesquiterpenes SPF-1 and SPF-2 in his composition showed higher percentage of the *m/z* 86 (in a proportion of 2:1), indicating that the compound SPF-2 is twofold higher. On the other hand, the proportion found between *m/z* 86 and *m/z* 98 was 1.5:1 for *Palisada perforata* (Bory) K.W. Nam (PP3).

Even though both fragments were seen in the *Pterosiphonia pennata* (C. Agardh) Sauvageau (PT) samples, it was not possible to obtain the total amount of SPF-1 and SPF-2 because there was another compound (with a different mass spectra) in the same retention time.

The sesquiterpenes evaluation also showed large occurrence in the Ceramiales group, which is known to have high potential of secondary metabolites production (Fenical & Norris 1975). In the *Laurencia dendroidea*, samples collected in different places at different dates showed that both compounds represented around 50% of composition (53.25±3.21 and 48.67±0.32% for LD3 and LD4, respectively). Among the Gigartinales, only *O. secundiramea*, a known producer of secondary metabolites with various activities (Paul et al.,

1988), is capable to produce the referred compound. Sesquiterpenes were not found in *Sargassum* sp., *Ulva* sp. species (Heteroconthophyta and Chlorophyta group representatives, respectively). Green seaweeds produce mainly acyclic sesqui- and diterpenes while brown seaweeds are known by polyphenols, terpenoids, volatile hydrocarbons and sulfur compounds production (Pereira, 2002). The non occurrence of SPF-1 and SPF-2 might be an indication that these compounds are only observed in red algae.

For some species, like *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonder ex Dickie and *Gracilaria birdiae* Plastino & Oliveira, the presence of the sesquiterpenes was not expected, since no previous evidence of this metabolite class was found in the literature. The very small amount found in GB and GD2 might be explained by the sampling method used. HS-SPME integrates extraction and concentration of volatile compounds into a single step, leading to a high sensitivity (Gressler et al., 2009), not achieved with other extraction methods (like hydrodistillation and solvent extract). In *Palisada perforata* (Bory) K.W. Nam, previous called as *Laurencia papillosa*, the SPF-1 and SPF-2 production was seen in our study, which is consistent with other terpenes already identified by Kamenarska et al. (2006).

Table 3. Relative proportion of (-)-7-*epi*-silphiperfolan-6 β -ol (1) (*m/z* 86) and (-)-silphiperfolan-7 β -ol (2) (*m/z* 98) in different marine macroalgae species samples obtained by HS-SPME-GC/MS analysis.

Samples	Amount (% $\pm$ SD)	Fragment (%)		
		<i>m/z</i> 98	<i>m/z</i> 86	SD
LA1	1.12 $\pm$ 0.37	21.57	78.43	3.68
LA2	-	n.d.	n.d.	n.d.
LA3	-	n.d.	n.d.	n.d.
LD1	4.43 $\pm$ 1.95	30.77	69.23	1.87
LD2	1.93 $\pm$ 0.32	37.86	62.14	1.64
LD3	53.25 $\pm$ 3.21	30.68	69.32	0.41
LD4	48.67 $\pm$ 1.97	32.71	67.29	0.81
LD5	1.88 $\pm$ 1.30	30.49	69.51	1.65
LD6	3.74 $\pm$ 1.17	30.26	69.74	8.39
LD7	5.60 $\pm$ 0.60	27.65	72.35	0.58
Lsp1A	6.38 $\pm$ 0.32	35.96	64.04	2.06
Lsp1B	-	n.d.	n.d.	n.d.
Lsp2	13.29 $\pm$ 8.44	26.68	73.32	0.71
LT1	-	n.d.	n.d.	n.d.
LT2	-	n.d.	n.d.	n.d.
PF1	-	n.d.	n.d.	n.d.
PF2	-	n.d.	n.d.	n.d.
PP1	22.18 $\pm$ 8.48	32.17	67.83	2.19
PP2	11.38 $\pm$ 1.26	31.03	68.97	2.04
PP3	-	n.d.	n.d.	n.d.
Csp	5.18 $\pm$ 1.61	28.08	71.92	1.05
CL1	-	n.d.	n.d.	n.d.
CL2	-	n.d.	n.d.	n.d.
GB	3.80 $\pm$ 1.14	30.27	69.73	0.27
GD1	-	n.d.	n.d.	n.d.
GD2	1.88 $\pm$ 0.35	30.43	69.57	0.60
PB	-	n.d.	n.d.	n.d.
PT	n.q.	34.24	65.76	1.88
SA1	5.42 $\pm$ 0.75	28.60	71.40	1.25
SA2	12.95 $\pm$ 1.03	34.97	65.03	3.77
WP	2.26 $\pm$ 0.27	35.71	64.29	0.47
HM1	-	n.d.	n.d.	n.d.
HN2	-	n.d.	n.d.	n.d.
HN	-	n.d.	n.d.	n.d.
OS1	1.21 $\pm$ 0.47	31.57	68.43	1.25
OS2	1.27 $\pm$ 0.04	28.58	71.42	0.52
OS3	-	n.d.	n.d.	n.d.
PC	3.89 $\pm$ 0.32	30.69	69.31	0.21
SF	-	n.d.	n.d.	n.d.
Ssp	-	n.d.	n.d.	n.d.
Usp	-	n.d.	n.d.	n.d.

SD: standard deviation; n.d.: not detected; n.q.: not quantified.

The essential oil and the two isolated compounds (SPF-1 and SPF-2) were tested to verify their antimicrobial and antioxidant activities. No significant antimicrobial inhibition was observed to the microorganism in the concentration tested. The essential oil of *L. dendroidea* J. Agardh did not show good antioxidant activity (8.10% at 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), however, the isolated compounds SPF-1 and SPF-2 showed higher potencies 27.5 and 30.3% at 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively when analyzed by the DPPH method, Figure 3(a). The antioxidant activity observed by the chemiluminescence method was 14.9, 34.6 and 20.8% at 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for the essential oil, SPF-1 and SPF-2, respectively, Figure 3(b).

Overall, DPPH assay was fairly consistent with the chemiluminescence assay. The small difference between the results could be consequence of the differential sample solubility in the reactions media (organic medium for DPPH assay and aqueous medium for chemiluminescence assay), difference in sensitivity among both methods (according to Hirayama et al., 1997, chemiluminescence method is more sensitive because of the high light emission produced by the H_2O_2 /luminol/HRP system) and/or different mechanisms of radical scavenging.

Conclusions

Both tricyclic sesquiterpenes (SPF-1 and SPF-2) have never been reported in Brazilian seaweed species. Although they were observed in variable quantities in different seaweed samples, they showed to be very common between distinct species. However, more systematic studies (considering environmental physicochemical parameters) should be done to allow a better comprehension of SPF-1 and SPF-2 algae synthesis and seasonal distribution.

Based on the results obtained, it can be inferred that these compounds do not act as taxonomic markers to the genus *Laurencia*.

It was also seen that the isolated compounds were not active against the bacteria and yeast strains tested up to 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. On the other hand, these compounds showed some antioxidant properties.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian research funding agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Ministério da Saúde, Ministério de Ciência e Tecnologia and CNPq-INCT-Redoxoma.

Figure 3. Comparative graphs of the antioxidant activity.

References

- Coll JC, Wright AD 1989. Tropical marine algae. III New sesquiterpenes from *Laurencia majuscula* (Rhodophyta, Rhodophyceae, Ceramiales, Rhodomelaceae). *Aust J Chem* 42: 1591-1603.
- Davyt D, Fernandez R, Suescun L, Mombrú AW, Saldaña J, Domínguez LD, Fujii MT, Manta E 2006. Bisabolanes from the red alga *Laurencia scoparia*. *J Nat Prod* 69: 1113-1116.
- Faulkner DJ 2000. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 17: 7-55.
- Fenical W, Norris JN 1975. Chemotaxonomy in marine algae: chemical separation of some *Laurencia* species (Rhodophyta) from the Gulf of California. *J Phycol* 11: 104-108.
- Fink P 2007. Ecological functions of volatile organic compounds in aquatic systems. *Mar Freshw Behav Phy* 40: 155-168.
- Gressler V, Colepicolo P, Pinto P 2009. Useful strategies for algal volatile analysis. *Curr Anal Chem* 5: 271-292.
- Gressler V, Fujii MT, Martins AP, Colepicolo P, Pinto P 2011. Biochemical composition of two seaweed species grown on the Brazilian coast. *J Sci Food Agric*, in press.
- Hirayama O, Takagi M, Hukamoto K, Katoh S 1997. Evaluation of antioxidant activity by chemiluminescence. *Anal Biochem* 247: 237-241.
- Kamenarska Z, Ivanova A, Stancheva R, Stoyneva M, Stefanov K, Dimitrova-Konaklieva S, Popov, S 2006. Volatile compounds from some Black Sea red algae and their chemotaxonomic application. *Bot Mar* 49: 47-56.
- Karabay-Yavasoglu NU, Sukatar A, Ozdemir G, Horzum Z 2007. Antimicrobial activity of volatile components and various extracts of the red alga *Jania rubens*. *Phytother Res* 21: 153-156.
- Kladi M, Vagias C, Roussis V 2004. Volatile halogenated metabolites from marine red algae. *Phytochem Rev* 3: 337-366.
- Krol W, Czuba Z, Schellara S, Paradowski Z, Shanitb J 1994. Structure-activity relationship in the ability of flavonols to inhibit chemiluminescence. *J Ethnopharmacol* 41: 121-126.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards 1998. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards 2005. Antimicrobial Susceptibility Testing. Proposed standard M100-S15. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, USA.
- Paul VJ, Hay ME, Duffy JE, Fenical W, Gustafson K 1988. Chemical defense in the seaweed *Ochtodes secundiramea* (Montagne) Howe (Rhodophyta): effects of its monoterpenoid components upon diverse coral-reef herbivores. *J Exp Mar Biol Ecol* 114: 249-260.
- Pereira RC 2002. Ecologia Química Marinha. In: Pereira RC & Soares-Gomes A (org.) *Biologia Marinha* 1. ed. Engenho Novo: Interciência, p. 281-310.
- Rashid MA, Gustafson KR, Cardellina JH, Boyd MR 1995. Brominated chamigrane sesquiterpenes produce a novel profile of differential cytotoxicity in the NCI *in vitro* screen. *Nat Prod Lett* 6: 255-259.
- Wright AD, Coll JC, Price IR 1990. Tropical marine algae, VII The chemical composition of marine algae from north queensland waters. *J Nat Prod* 33: 845-861.
- Yen G-C, Chen H-Y 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agr Food Chem* 43: 27-32.

ANEXO D

Artigo Publicado em colaboração:

Overview of the taxonomy and of the major secondary metabolites and their biological activities related to human health of the *Laurencia* complex (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil.

Keywords:

biodiversity
biological activities
Laurencia complex
seaweeds
taxonomy
terpenoids

ISSN 0102-695X

Overview of the taxonomy and of the major secondary metabolites and their biological activities related to human health of the *Laurencia* complex (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil

Mutue T. Fujii,^{*1} Valéria Cassano,² Érika M. Stein,³ Luciana R. Carvalho¹

¹Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto de Botânica, Brazil,

²Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo, Brazil,

³Programa de Pós-graduação, Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo, Brazil.

Abstract: In Brazil, the *Laurencia* complex is represented by twenty taxa: *Laurencia* s.s. with twelve species, *Palisada* with four species (including *Chondrophycus furcatus* now that the proposal of its transference to *Palisada* is in process), and *Osmundea* and *Yuzurua* with two species each. The majority of the Brazilian species of the *Laurencia* complex have been phylogenetically analyzed by 54 *rbcL* sequences, including five other Rhodomelacean species as outgroups. The analysis showed that the *Laurencia* complex is monophyletic with high posterior probability value. The complex was separated into five clades, corresponding to the genera: *Chondrophycus*, *Laurencia*, *Osmundea*, *Palisada*, and *Yuzurua*. A bibliographical survey of the terpenoids produced by Brazilian species showed that only six species of *Laurencia* and five of *Palisada* (including *C. furcatus*) have been submitted to chemical analysis with 48 terpenoids (47 sesquiterpenes and one triterpene) isolated. No diterpenes were found. Of the total, 23 sesquiterpenes belong to the bisabolane class and eighteen to the chamigrene type, whose biochemical precursor is bisabolane, two are derived from lauranes and four are triquinols. Despite the considerable number of known terpenes and their ecological and pharmacological importance, few experimental biological studies have been performed. In this review, only bioactivities related to human health were considered.

Introduction

The red algae of the *Laurencia* complex comprehend 430 species (and infraspecific taxa) listed in the database at present, of which 134 have been flagged as currently accepted taxonomically. They are reported worldwide from the temperate to tropical shores of the world, occurring from the intertidal to the subtidal zone up to 65 m in depth (Guiry & Guiry, 2010). *Laurencia sensu lato* is an extremely rich source of halogenated secondary metabolites with diverse structural features (Fenical, 1975; Erickson, 1983) that can be divided into two groups according to their biogenetic origin. The first one is the nonterpenoid group, which contains the acetogenins derived from the metabolism of fatty acids. The other one is the terpenoid group, in which the sesquiterpenes are the most abundant, but also containing diterpenes and triterpenes (Fernández et al.,

2005).

The taxonomy of the *Laurencia* complex has undergone several changes based on the use of new vegetative morpho-anatomical and reproductive features, cladistic analyses of morphological characters and molecular approaches based on the plastidial *rbcL* gene (Nam et al., 1994; Garbary & Harper, 1998; Nam, 1999, 2006, 2007; Martin-Lescanne et al., 2010). These changes include the resurrection of the genus *Osmundea* Stackhouse (Nam et al., 1994), the elevation of the subgenus *Chondrophycus* Tokida & Saito (in Saito, 1967) to the generic rank (Garbary & Harper, 1998), the new delineations of the genera *Chondrophycus*, *Laurencia* and *Osmundea* (Nam, 1999), the definition of the proposal of the genus *Palisada* (Yamada) K.W. Nam based on Yamada's (1931) section *Palisadae* (Nam, 2006) and its later validation (Nam, 2007), and the establishment of the genus *Yuzurua* (K.W. Nam

*E-mail: mutue.fujii@pq.cnpq.br; Tel. +55 11 5067 6123; Fax: +55 11 5073 3678.

Martin-Lescanne based on Nam's (1999) subgenus *Yuzurua* (Martin-Lescanne et al., 2010). Thus, five genera are currently assigned to the *Laurencia* complex: *Laurencia* J.V. Lamouroux itself, *Osmundea*, *Chondrophycus*, *Palisada* and *Yuzurua*. Several morpho-anatomical and reproductive characters used in the taxonomy of the complex have been shown to have diagnostic value at the generic level only (Saito, 1967; Nam et al., 1994; Garbary & Harper, 1998; Nam, 1999, 2006). Many species have no defined taxonomic boundaries and present extensive morphological plasticity, making their taxonomic delimitation difficult. In this context, the use of molecular markers has proven to be useful for delimiting the taxa and inferring their phylogenetic relationships and has corroborated the current classification system (Nam et al., 2000; McIvor et al., 2002; Abe et al., 2006; Fujii et al., 2006; Díaz-Larrea et al., 2007; Cassano et al., 2009; Gil-Rodríguez et al., 2009; Martin-Lescanne et al., 2010; Rocha-Jorge et al., 2010).

The genera are distinguished by a combination of both vegetative and reproductive characteristics: number of pericentral cells per vegetative axis, position of the first pericentral cell relative to the trichoblast, origin of the tetrasporangia, absence or presence of fertility of the second pericentral cell, number of sterile pericentral cells in the tetrasporangial axis, origin of the spermatangial branches, formation pattern of the spermatangial branches on trichoblasts, the number of pericentral cells in procarp-bearing segments of female trichoblasts, and probably post-fertilization features associated with the formation time of the auxiliary cell. Many of these characters overlap among the genera. Effectively, the genus *Laurencia* is distinct from the other four genera by the presence of four pericentral cells per axial segment; two pericentral cells occur in *Osmundea*, *Chondrophycus*, *Palisada* and *Yuzurua* (Nam et al., 1994; Garbary & Harper, 1998; Nam, 1999, 2006; Martin-Lescanne et al., 2010). The genus *Osmundea* is distinct from the other genera by the tetrasporangial production from random cortical cells rather than from particular pericentral cells and filament-type rather than trichoblast-type spermatangial development (Nam et al., 1994). The genus *Chondrophycus* is characterized by spermatangial branches produced from two laterals on the suprabasal cell of trichoblasts, but remaining partly sterile, and a tetrasporangial axis with the first and second pericentral cells never fertile (Nam, 1999). In the genus *Palisada*, the spermatangial branches are produced from one of two laterals on the suprabasal cells of trichoblasts and the second pericentral cell in the tetrasporangial axis is always fertile; the resulting axis has one sterile pericentral cell (Nam, 2006). The genus *Yuzurua* shares the majority of the morphological characters of *Palisada*, from which it was recently

segregated, but differs by not having palisade-like cells, by the presence of secondary pit-connections between cortical cells, and by procarp-bearing segments with five pericentral cells rather than four (Fujii et al., 1996).

The species of the *Laurencia* complex are widely distributed along the Brazilian coast from Ceará (Pinheiro-Joventino et al., 1998) to Rio Grande do Sul (Baptista, 1977), growing in different types of habitats (Fujii & Senties, 2005) and constituting an important element of Brazilian phycological flora (Oliveira Filho, 1977).

The members of this complex, in particular *Laurencia* s.s., are prolific synthesizers of structurally elaborate halogenated secondary metabolites and have been reported to produce a numerous diversity of unique compounds, especially terpenes (Martín & Darias, 1978; Erickson, 1983; Pereira & Teixeira, 1999). Although the function of these secondary metabolites has not yet been clearly defined, it has been suggested that these metabolites play a major role in mediating ecological interactions such as algae/herbivore interactions (Hay et al., 1987, Hay & Steinberg, 1992), with these compounds acting as a defense against being eaten or as a deterrent against epibiota, i.e., an antifouling activity (da Gama et al., 2002; Cassano et al., 2008; Lhullier et al., 2009), or protection against pathogens (König & Wright, 1997). Thus, ecological pressures such as competition for space, fouling of the surface, predation, and successful reproduction have led to the evolution of unique secondary metabolites with various biological activities (Ireland et al., 2000). The prominent biological activity of marine terpenes is evident in their ecological role in the marine environment and makes them interesting as potential drugs. Many of these natural products are pharmacologically active and marine algae, especially those from tropical and subtropical seas, are able to produce a wide range of compounds, many of which exhibit at least some degree of bioactivity (Fernández et al., 1998, 2005; da Gama et al., 2002; Cassano et al., 2008; Lhullier et al., 2009; Machado et al., 2010; Santos et al., 2010). In fact, the marine environment represents a treasure trove of useful products awaiting discovery for the treatment of infectious and parasitic diseases (Vairappan et al., 2004; Morales et al., 2006), cancer (Mohammed et al., 2004; Stein et al., 2011), cognitive diseases, inflammatory processes, and viral infections (Sakemi et al., 1986). Despite the many structures known and their ecological and pharmacological importance, only a few biosynthetic studies have been performed on marine terpenoid compounds (Gross & König, 2006). In this paper, the current status of the taxonomy of the *Laurencia* complex in Brazil is outlined, together with the diversity of secondary metabolites produced

and their biological activities of relevance to human health.

Materials and Methods

The present work is a compilation of the data on the *Laurencia* complex from Brazil, including the current results on the taxonomy and phylogeny of the group, secondary metabolites and their biological activities related to human health.

We performed a phylogenetic analysis using 54 *rbcL* sequences, with seventeen samples from Brazil (Table 1). Multiple alignments for sequences were constructed using the computer program BioEdit 7.0.4.1 (Hall, 1999). A total of 250 nucleotides were removed from all *rbcL* sequences at the beginning and end of the sequences because many sequences from the GenBank

were incomplete, producing a data set of 1217 base pairs. Phylogenetic relationships were inferred with MrBayes v.3.0 beta 4 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). The model used in the Bayesian analysis was selected based on maximum likelihood ratio tests implemented by the software Modeltest version 3.06 (Posada & Crandall, 1998) with a significance level of 0.01 by the Akaike information criterion. For the Bayesian analysis, four chains of the Markov chain Monte Carlo (one hot and three cold) were used, sampling one tree every ten generations for 1,000,000 generations starting with a random tree. The 50,000 generations were discarded as 'burn in'. The model used in the Bayesian analysis for *rbcL* sequences was the general-time-reversible model of nucleotide substitution with invariant sites and gamma distributed rates for the variable sites (GTR+I+G).

Table 1. Taxa used in this study for phylogenetic analysis.

Samples	Collection data	GenBank accession numbers (if available)
<i>Bostrychia radicans</i> (Montagne) Montagne in Orbigny	USA, Mississippi, St. Louis Bay, 11 Feb. 1998, C.F.D. Gurgel	AF259497
<i>Polysiphonia muelleriana</i> J. Agardh	New Zealand, Deas Cove, Thompson Sound, Fiordland, 03 Oct. 2000, S. Wing and N. Goebel	AY588412
<i>Bryocladia cuspidata</i> (J. Agardh) De Toni	USA, Texas, Port Aransas, 17 May 1998, S. Fredericq and C.F.D. Gurgel	AF259498
<i>Chondria collinsiana</i> M.A. Howe	Brazil, Rio de Janeiro, Armação dos Búzios, Praia Rasa, 13 Jan. 2005, V. Cassano and J.C. De-Paula	GU330225
<i>C. dasyphylla</i> (Woodward) C. Agardh	USA, North Carolina, New Hanover Co., Wrightsville Beach	U04021
<i>Chondrophycus furcatus</i> (Cordeiro-Marino & M.T. Fujii) Senties & M.T. Fujii	Brazil, Paraíba, Praia de Tambaú, 24 Feb. 2004, M.T. Fujii	GU330226
<i>C. cf. undulatus</i>	New Caledonia, Loyalty Is., Maré, 22 Mar. 2005, C. Payri	FJ785307
<i>Chondrophycus</i> sp. 1	New Caledonia, Loyalty Is., Lifou, 26 Mar. 2005, C. Payri	FJ785309
<i>Chondrophycus</i> sp. 2	New Caledonia, Loyalty Is., Maré, 21 Mar. 2005, C. Payri	FJ785310
<i>Chondrophycus</i> sp. 3	New Caledonia, Loyalty Is., Beaufort/ Beaufort, 06 Apr. 2005, C. Payri	FJ785311
<i>Laurencia aldingensis</i> Saito & Womersley	Brazil, Espírito Santo, Anchieta, Ilhote de Ubu, 30 Jun. 2007, E. Stein	-
<i>L. aldingensis</i>	Brazil, Rio de Janeiro, Armação dos Búzios, Praia Rasa, 13 Jan. 2005, V. Cassano and J.C. De-Paula	-
<i>L. cf. brongniartii</i> J. Agardh	Australia, Tarcoola Beach, S. Fredericq, 1993	EF061654
<i>L. cf. brongniartii</i>	Taiwan, Makang Harbour, S. Fredericq, 11 Jul. 1993	AF465814
<i>L. caduciramulosa</i> Masuda & Kawaguchi	Brazil, Rio de Janeiro, Angra dos Reis, Praia do Velho, 19 Apr. 2006, V. Cassano and J.C. De-Paula	-
<i>L. caduciramulosa</i>	Spain, Canary Islands, Tenerife, Punta del Hidalgo, 06 May 2008, M.C. Gil-Rodríguez, M.T. Fujii, V. Cassano and J. Díaz-Larrea	-
<i>L. caraibica</i> P.C. Silva	Mexico, Quintana Roo, Cancún, Isla Mujeres, 23 Feb. 2006, A. Senties	EF658642
<i>L. catarinensis</i> Cordeiro-Marino & M.T. Fujii	Brazil, Santa Catarina, Florianópolis, Prainha da Barra da Lagoa, 16 Jul. 2008, P.A. Horta	-
<i>L. catarinensis</i> (as <i>L. intricata</i>)	Brazil, Espírito Santo, Anchieta, Ponta dos Castelhanos, 05 Oct. 2006, M.T. Fujii and V. Cassano	-
<i>L. catarinensis</i> (as <i>L. intricata</i>)	Brazil, Rio Grande do Norte, Maracajaú, 24 Jun. 2006, M.T. Fujii and I.B. Silva	-
<i>L. dendroidea</i> J. Agardh [as <i>L. majuscula</i> (Harvey) A.H.S. Lucas]	Brazil, Rio de Janeiro, Angra dos Reis, Praia do Velho, 20 Jul. 2006, V. Cassano and J.C. De-Paula	GU330232

<i>L. dendroidea</i> (as <i>L. arbuscula</i>)	Brazil, São Paulo, Ubatuba, Praia do Felix, 31 Aug. 2000, M.T. Fujii	AF465810
<i>L. dendroidea</i> (as <i>L. majuscula</i>)	Spain, Canary Islands, Tenerife, Puerto de la Cruz, 13 Jul. 2006, M.C. Gil-Rodríguez, M.T. Fujii and A. Senties	EF686000
<i>L. flexuosa</i> Kützing	South Africa, S. KwaZulu-Natal, Palm Beach, 07 Feb. 2001, S. Fredericq	AF465815
<i>L. intricata</i> J.V. Lamouroux	Mexico, Yucatan, Campeche Bay, 14 Feb. 1999, C.F.D. Gurgel	AF465809
<i>L. intricata</i>	USA, Florida, Long Key, Channel 5, 10 Dec. 1998, B. Wysor and T. Frankovich	AY588410
<i>L. intricata</i>	Cuba, Ciego de Ávila, Cayo Coco, 25 Sep. 2005, M.T. Fujii	GU330238
<i>L. marilzae</i> Gil-Rodríguez, Senties, Díaz-Larrea, Cassano & M.T. Fujii	Spain, Canary Islands, Tenerife, Punta del Hidalgo, M.C. Gil-Rodríguez, 12 Jul. 2006	EF686002
<i>L. marilzae</i>	Brazil, São Paulo, Laje de Santos Marine State Park, Parcel do Sul, 25 Mar. 2007, R. Rocha-Jorge	GU938189
<i>L. obtusa</i> (Hudson) J.V. Lamouroux	Ireland, County Donegal, Fanad Head, 06 Jul. 1998, C.A. Maggs	AF281881
<i>L. oliveirana</i> Yoneshigue	Brazil, Rio de Janeiro, Arraial do Cabo, Ponta da Cabeça, 07 Jul. 2008, V. Cassano and J.C. De-Paula	-
<i>L. translucida</i> M.T. Fujii & Cordeiro-Marino	Brazil, Espírito Santo, Marataízes, 15 Sep. 2001, M.T. Fujii	AY588408
<i>L. venusta</i> Yamada	Mexico, Quintana Roo, Puerto Morelos, Punta Brava, J. D. Larrea and A. Senties, 18.04.2004	EF061655
<i>L. viridis</i> Gil-Rodríguez & Haroun	Spain, Canary Islands, Tenerife, Punta del Hidalgo, Roca Negra, 06 Oct. 2005, M.C. Gil-Rodríguez	EF685999
<i>Laurencia</i> sp. 1	Brazil, Rio de Janeiro, Armação dos Búzios, Praia Rasa, 13 Jan. 2005, V. Cassano and J.C. De-Paula	-
<i>Osmundea blinksi</i> (Hollenberg & Abbott) K.W. Nam	USA, California, San Mateo Co., Año Nuevo, Greyhound Rock, 17 Jul. 1996, M.H. Hommersand	AY172575
<i>O. oederi</i> (Gunnerus) G. Furnari [as <i>O. ramosissima</i> (Oeder) Athanasiadis]	Ireland, Co. Donegal, St. John's Point, 12 Oct. 1999, C.A. Maggs	AF281880
<i>O. osmunda</i> (S.G. Gmelin) K.W. Nam	Ireland, County Donegal, St. John's Point, 12 Oct. 1999, C.A. Maggs	AF281877
<i>O. pinnatifida</i>	France, Brittany, Penmarch	AF259495
<i>O. sinicola</i> (Setchell & Gardner) K.W. Nam	USA, California, Orange Co., Crescent Beach, 28 May 2002, S. Murray	AY588407
<i>O. spectabilis</i> (Postels & Ruprecht) K.W. Nam var. <i>spectabilis</i>	Mexico, Baja California, Punta Santo Thomas, 2 Jul. 1996, M.H. Hommersand	AY172574
<i>O. splendens</i> (Hollenberg) K.W. Nam	Mexico, Baja California, Bahia Colnett, Drift, 2 Jul. 1996, M.H. Hommersand and J. Hughey	AY172576
<i>O. truncata</i> (Kützing) K.W. Nam & Maggs	Ireland, Lough Hyne, Co. Cork, 11 Nov. 1999, C.A. Maggs	AF281879
<i>Palisada corallopsis</i> (Montagne) Senties, M.T. Fujii & Díaz-Larrea	Mexico, Quintana Roo, Cancún, Chaac-Mol Beach, 21 Aug. 2005, J. Díaz-Larrea and A. Senties	EF061646
<i>P. flagellifera</i> (J. Agardh) K.W. Nam	Brazil, Rio de Janeiro, Rio das Ostras, Areias Negras, 03 Aug. 2005, V. Cassano and M.B. Barros-Barreto	GU330221
<i>P. pateniramea</i> (Montagne) Cassano, Senties, Gil-Rodríguez & M.T. Fujii	Philippines	AF489862
<i>P. perforata</i> (Bory) K.W. Nam	Brazil, Rio de Janeiro, Parati, Praia Vermelha, 30 Dec. 2005, V. Cassano	EU256331
<i>P. perforata</i>	Brazil, Rio de Janeiro, Areias Negras, Rio das Ostras, 03 Aug. 2005, V. Cassano and M.B. Barros-Barreto	EU256330
<i>Palisada</i> cf. <i>robusta</i>	New Caledonia, Lifou, 23 Mar. 2005, C. Payri	FJ785321
<i>P. thuyoides</i> (Kützing) Cassano, Senties, Gil-Rodríguez & M.T. Fujii	Philippines	AF489863
<i>Yuzurua poiteaui</i> (J.V. Lamouroux) Martin-Lescanne var. <i>gemmifera</i> (Harvey) Senties, M.T. Fujii & Díaz-Larrea	Mexico, Quintana Roo, Puerto Morelos, Ojo de Agua, 16 Apr. 2004, J. Díaz-Larrea and A. Senties	EF061648
<i>Y. poiteaui</i> var. <i>gemmifera</i>	Cuba, La Habana, Rincon de Guanabo, 29 Jul. 2005, J. Díaz-Larrea and A. A. Mallea	EF061650
<i>Y. poiteaui</i> var. <i>poiteaui</i>	USA, Florida, Long Key, Ocean Side, 1998, S. Fredericq	EF061652
<i>Y. poiteaui</i> var. <i>poiteaui</i>	Mexico, Quintana Roo, Playa del Carmen, 15 Mar 2005, J. Díaz-Larrea and A. Senties	EF061653

Table 2. Species of the *Laurencia* complex referred from Brazil and their regional geographic distribution.

Taxa	Regional distribution along the Brazilian coast	References
<i>Laurencia aldingensis</i> Saito & Womersley	Northeastern and Southeastern	Carvalho et al., 2003; 2006; Guimarães, 2006; Cassano, 2009; Torrano Silva, 2010; Silva, 2010.
<i>L. caduciramulosa</i> Masuda & Kawaguchi	Northeastern and Southeastern	Cassano et al., 2006; Torrano Silva, 2010.
<i>L. caraibica</i> P.C. Silva	Northeastern	Oliveira Filho & Ugadim, 1974; 1976) and Oliveira Filho, 1977 as <i>L. pygmaea</i> Weber-van Bosse; Fujii & Villaça, 2003; Silva, 2010.
<i>L. catarinensis</i> Cordeiro-Marino & M.T. Fujii	Northeastern, Southeastern, and South	Baptista, 1977 as <i>L. nana</i> Howe; Cordeiro-Marino & Fujii, 1985; Fujii & Senties, 2005; Széchy et al., 2005 as <i>L. intricata</i> J.V. Lamouroux; Guimarães, 2006; Silva, 2010.
<i>L. dendroidea</i> J. Agardh	Northeastern, Southeastern, and South	Joly, 1965; Oliveira Filho, 1969; Cordeiro-Marino, 1978; Pinheiro-Joventino et al., 1998; Figueiredo et al., 2004 as <i>L. microcladia</i> Kützing; Joly, 1965; Oliveira Filho, 1969; Pedrini, 1980; Paes e Mello & Pereira, 1990; Figueiredo-Creed & Yoneshigue-Valentin, 1997; Pinheiro-Joventino et al., 1998 as <i>L. obtusa</i> (Hudson) J.V. Lamouroux; Oliveira Filho, 1969 as <i>L. composita</i> Yamada <i>pro parte</i> ; Oliveira Filho, 1969 as <i>L. heteroclada</i> Harvey; Oliveira Filho, 1977, Fujii, 1990; Széchy & Nassar, 2005; Amado Filho et al., 2006 as <i>L. scoparia</i> J. Agardh; Fujii, 1990; Figueiredo-Creed & Yoneshigue-Valentin, 1997 as <i>L. catarinensis pro parte</i> , Nunes, 1998; Széchy & Nassar, 2005 as <i>Laurencia arbuscula</i> Sonder; Fujii, 1998; Pinheiro-Joventino et al., 1998; Pereira et al., 2002; 2005 as <i>L. filiformis</i> (C. Agardh) Montagne; Széchy & Nassar, 2005 as <i>L. majuscula</i> (Harvey) A.H.S. Lucas; Cassano, 2009; Rocha-Jorge, 2010; Torrano Silva, 2010; Silva, 2010.
<i>L. marilzae</i> Gil-Rodríguez, Senties, Díaz-Larrea, Cassano & M.T. Fujii	Southeastern	Rocha-Jorge et al., 2010.
<i>L. oliveirana</i> Yoneshigue	Southeastern and South	Joly, 1965 as <i>Laurencia</i> sp.; Baptista, 1977 as <i>Laurencia</i> sp.; Yoneshigue, 1985; Fujii, 1990; Nunes, 1998; Amado Filho et al., 2006; Cassano 2009.
<i>L. translucida</i> M.T. Fujii & Cordeiro-Marino	Northeastern and Southeastern	Oliveira Filho, 1969 as <i>L. composita</i> Yamada <i>pro parte</i> ; Fujii, 1990 as <i>Laurencia</i> sp.1; Fujii & Cordeiro-Marino, 1996; Fujii, 1998; Nunes, 1998; Pereira et al., 2002; Fujii & Senties, 2005 as <i>Chondrophycus translucidus</i> ; Silva, 2010.
<i>L. venusta</i> Yamada	Southeastern	Fujii et al., 2005.
<i>Laurencia</i> sp. 1	Southeastern	Oliveira Filho, 1969 as <i>L. clavata</i> Sonder; Cassano, 2009.
<i>Laurencia</i> sp. 2 (taxon previously identified as <i>L. intricata</i>)	Northeastern and Southeastern	Oliveira Filho, 1969 as <i>Laurencia</i> sp.; Nunes, 1998, Guimarães, 2006; Fujii & Senties, 2005 as <i>L. intricata</i> .
<i>Laurencia</i> sp. 3 (previously misidentified as <i>L. implicata</i> / <i>L. intricata</i>)	Northeastern and Southeastern	Fujii, 1990; Széchy & Paula, 1997 as <i>L. implicata</i> J. Agardh; Amado Filho et al., 2006 as <i>L. intricata</i> .
<i>*Osmundea hybrida</i> (A.P. de Candole) K.W. Nam		Oliveira Filho, 1977 as <i>Laurencia hybrida</i> .
<i>O. lata</i> (M. Howe & W.R. Taylor) Yoneshigue-Valentin, M.T. Fujii & Gurgel	Northeastern and Southeastern	Howe & Taylor, 1931; Horta, 2000 as <i>Laurencia lata</i> ; Yoneshigue-Valentin et al., 2003; Fujii & Senties, 2005; Nunes, 2005.
<i>*O. pinnatifida</i> (Hudson) Stackhouse	Southeastern	Oliveira Filho, 1977 as <i>Laurencia pinnatifida</i> .
<i>Osmundea</i> sp.	Southeastern	Rocha-Jorge, 2010.
<i>Palisada corallopsis</i> (Montagne) Senties, M.T. Fujii & Díaz-Larrea	Northeastern and Southeastern	Fujii, 1990; Nunes, 1998 as <i>Laurencia corallopsis</i> .
<i>P. flagellifera</i> (J. Agardh) K.W. Nam	Northeastern, Southeastern, and South	Joly, 1965 as <i>Laurencia scoparia</i> ; Oliveira Filho, 1969; Cordeiro-Marino, 1978; Pedrini, 1980, Pedrini et al., 1989; Széchy et al., 1989, Fujii, 1990; 1998; Paes e Mello & Pereira, 1990; Cocentino, 1994; Nunes, 1998; Pinheiro-Joventino et al., 1998; Pereira et al., 2002; Széchy & Nassar, 2005 as <i>Laurencia flgellifera</i> ; Fujii et al., 2006 as <i>Chondrophycus flagelliferus</i> ; Cassano, 2009.

<i>P. perforata</i> (Bory) K.W. Nam	Northeastern, Southeastern, and South	Joly, 1965; Oliveira Filho, 1969; Pedrini, 1980; Pedrini et al., 1989; Széchy et al., 1989; Fujii, 1990; Paes e Mello & Pereira, 1990; Cocentino, 1994; Figueiredo-Creed & Yoneshigue-Valentin, 1997 as <i>L. catarinensis pro parte</i> , Nunes, 1998; Pinheiro-Joventino et al., 1998; Brito et al., 2002; Pereira et al., 2002; Széchy & Nassar, 2005 as <i>Laurencia papillosa</i> (C. Agardh) K.W. Nam; Széchy et al., 1989, Nunes, 1998; Pereira et al., 2002 as <i>Laurencia perforata</i> ; Torrano Silva, 2010 as <i>Chondrophycus papillosus</i> ; Cassano et al., 2009.
<i>Chondrophycus furcatus</i> (Cordeiro-Marino & M.T. Fujii) M.T. Fujii & Senties (the proposal for transference to <i>Palisada</i> is in process)	Northeastern and Southeastern	Cordeiro-Marino et al., 1994; Fujii, 1998; Nunes, 1998, Pinheiro-Joventino et al., 1998; Pereira et al., 2002 as <i>Laurencia furcata</i> ; Fujii & Senties, 2005; Silva, 2010.
* <i>Yuzurua poiteaui</i> (J.V. Lamouroux) Martin-Lescanne var. <i>poiteaui</i>	Southeastern	Oliveira Filho, 1977 as <i>Laurencia poitei</i> .
<i>Y. poiteaui</i> var. <i>gemmifera</i> (Harvey) Senties, M.T. Fujii & Díaz-Larrea	Northeastern	Taylor, 1960 as <i>Laurencia gemmifera</i> ; Cocentino et al., 2006 as <i>Chondrophycus gemmiferus</i> .

Northeastern: from State of Ceará to Bahia, Southeastern: from State of Espírito Santo to São Paulo, and South: from State of Paraná to Rio Grande do Sul. * need to be confirmed.

Results and Discussion

In Brazil, the red algae of the *Laurencia* complex are represented by four of the five genera that integrate the complex: *Laurencia* itself, *Palisada*, *Osmundea*, and *Yuzurua*. The first is the most diverse with twelve species, followed by *Palisada* (including *Chondrophycus furcatus*) with four species and *Osmundea* and *Yuzurua* with two species each (Table 2). The habit of several representatives of the *Laurencia* complex from Brazil and some generic morphological diagnostic characters are displayed in Figures 1-25.

The topology of the Bayesian tree with corresponding Bayesian posterior probabilities values (PP) is shown in Figure 26. The phylogenetic analysis shows a monophyletic *Laurencia* complex with high PP support (100%) in relation to the members of the outgroup, corroborating the previous results verified for the group (Abe et al., 2006; Fujii et al., 2006; Martin-Lescanne et al., 2010). The *Laurencia* complex was separated into five clades, corresponding to the genera: *Laurencia*, *Osmundea*, *Palisada*, *Chondrophycus*, and *Yuzurua*. The earliest diverging clade was the genus *Palisada* with six species and high support (100% PP), which included also *Chondrophycus furcatus*, an endemic species from Brazil. This result shows clearly that *C. furcatus* must be transferred to the genus *Palisada* and, with its future nomenclatural change, there will be no more representatives of *Chondrophycus* in Brazil. The monophyletic genera *Chondrophycus* and *Osmundea* were sister groups with a posterior probability of 86%. The monophyletic clade that corresponds to the genus *Yuzurua* showed higher molecular affinity with *Laurencia* than *Palisada*, from which it was recently segregated. The genus *Laurencia* included fifteen

taxa with a posterior probability of 80%. *Laurencia marilzae* formed a monophyletic clade with high support (100% PP) and was separated from all other *Laurencia* s.s., forming a distinct lineage, suggesting that *L. marilzae* represents a new genus within the *Laurencia* complex.

The bibliographical survey on the terpenoids produced by species of the *Laurencia* complex from the Brazilian coast shows that only five species of *Laurencia* and three of *Palisada* (including *C. furcatus*) have been submitted to chemical analysis and that, so far, 48 terpenoids have been isolated: 47 sesquiterpenes and one triterpene. Diterpenes have not been found in Brazilian species (Table 3).

The compounds isolated from the native algae include 21 sesquiterpenes belonging to the bisabolane class, seventeen belonging to the chamigrane type, whose biochemical precursor is bisabolane, and four triquinols, that possess a rare structure but are derived from the same biogenetic origin as the bisabolane- and chamigrane-derived terpenoids [2E,6E-farnesylpyrophosphate (FPP)]. Besides bisabolane and chamigrane terpenoids, the introduced seaweed *Laurencia caduciramulosa* produces two laurane-type compounds not found in Brazilian native algae (Table 3).

With respect to *Palisada perforata* and *P. flagellifera*, they generally do not produce sesquiterpenoids or acetogenins, classical metabolites produced by *Laurencia*. Although the presence of sesquiterpenes was not expected in this group, triquinane alcohols (compounds 47 and 26) were found in *P. perforata* by using a high sensitivity extraction method (HS-SPME) (Gressler et al., 2011). These compounds were not active against bacterial strains or the yeast *Candida albicans*,

but showed some antioxidant activity. *Chondrophycus furcatus* is distinct from the other members of *Palisada* by producing only triterpenoids (Rodríguez-Concepción, 2006) that are synthesized via the same precursor (FPP) as the sesquiterpenoids from Brazilian *Laurencia* species. However, on the basis of morphology, it does not fit perfectly into either *Laurencia* or *Palisada* due to the presence of secondary pit-connections between adjacent cortical cells, a characteristic more related to *Laurencia*, and to the production of two pericentral cells, instead of four per each axial segment, a characteristic shared by *Chondrophycus*, *Palisada*, *Yuzurua* and *Osmundea* (Fujii & Senties, 2005).

Most of the metabolites (15) that have been isolated from *Laurencia dendroidea*, *L. scoparia*, *L. microcladia*, and *L. obtusa* [denominations that, in Brazil, refer to the same botanical species (Cassano, 2009)] are derived from chamigrane, with very similar or even identical structures, such as elatol found in *L. dendroidea* and *L. microcladia*; *L. scoparia* produces five sesquiterpenoids from bisabolane and two triquinols. Both *L. aldingensis* and *L. catarinensis* synthesize metabolites whose precursor is bisabolane, exhibiting a high degree of similarity between them, as can be seen in Figure 26.

Although species of the *Laurencia* complex are known to produce interesting active metabolites that

Figures 1-12. Habits of plants. 1. *Osmundea lata*. 2. *Chondrophycus furcatus*. 3. *Laurencia aldingensis*. 4. *L. caduciramulosa*. 5. *L. catarinensis*. 6. *L. oliveirana*. 7. *L. dendroidea*. 8. *L. translucida*. 9. *L. marilzae*. 10. *Laurencia* sp. 1. 11. *Palisada flagellifera*. 12. *P. perforata*.

Figures 13-25. Vegetative and reproductive characteristics of the *Laurencia* complex. 13-19. Characteristics of *Laurencia*. 20-23. Characteristics of *Palisada*. 24-25. Characteristics of *Osmundea*. 13. Transverse section of a thallus of *Laurencia*. Note the lenticular thickenings (arrow). 14. Transverse section of a thallus showing four pericentral cells (p) and an axial cell (a), typical of the genus *Laurencia*. 15. Transverse section near the apex of a branchlet of *Laurencia* showing the tetrasporangial axial segment formed by four pericentral cells: the first and the second pericentral cells remain vegetative (p1 and p2), the third and fourth become fertile (p3 and p4, arrows), axial cell (a). 16. Procarp-bearing segment with five pericentral cells, the fifth becoming the supporting cell (SU) of the carpogonial branch, central cell of procarp-bearing segment (c), lateral sterile group initial (lsi). 17. Longitudinal section through an apical portion of a tetrasporangial branchlet showing the origin of the tetrasporangia (te) from the axial cell (arrow), fertile pericentral cells (fp) and pre-sporangial cover cells (pr). 18. Longitudinal section through a male branchlet showing trichoblast-type spermatangial branches in cup-shaped tips. 19. Detail of trichoblast-type spermatangial branches; spermatangial branches on trichoblast (bt) with two laterals, sterile (arrow) and fertile (arrowhead) branches on its suprabasal cell (sbt). 20. Transverse section of a thallus of *Palisada*. 21. Transverse section of a thallus showing two pericentral cells (p) and an axial cell (a). 22. Transverse section near the apex of a branchlet of *Palisada* showing the tetrasporangial axial segment formed by two pericentral cells: the first (p1) remains vegetative, the second (p2) becomes fertile, and two additional fertile pericentral cells are formed in the opposite position (arrows). 23. Procarp-bearing segment with four pericentral cells, the fourth becoming the supporting cell (SU) of the carpogonial branch, central cell of procarp-bearing segment (c), lateral sterile group initial (lsi). 24. Longitudinal section through a male branchlet showing filament-type spermatangial branches in cup-shaped tips. 25. Detail of filament-type spermatangial branches, typical of *Osmundea*.

2006), antileishmanial activity against the insect-stage promastigotes of *Leishmania amazonensis* (Machado et al., 2010), human pathogenic antifungal properties (Stein et al., 2011), and significant levels of toxicity towards a model tumor cell line (human uterine sarcoma, MES-SA) (Stein et al., 2011). Thus, studies on the biological activities of the secondary metabolites isolated from the *Laurencia* complex should be encouraged with the goal of finding new sources with pharmaceutical applications.

Table 3. Structural formulas, names and origin of terpenoids isolated from Brazilian species of the *Laurencia* complex, and biological activities related to human health.

Species	Structural formula	Name	Structural class	Human health related activity tests	References
<i>Laurencia aldingensis</i>		1 Aldingenin A 2 Aldingenin B 3 Aldingenin C 4 Aldingenin D	1-4 α -Bisabolane	Polar and non-polar extracts showed no cytotoxic effects toward primary model tumor cell line (MES-SA)	Carvalho et al., 2003; 2006; Stein et al., 2011
<i>L. caduciramulosa</i> *		5 Filiformin 6 Debromofiliformin 7 Allolaurinterol 8 Debromoallo-laurinterol 9 Pacifenol	5, 6 δ -Bisabolene 7, 8 Laurane 9 Chamigrane	NB	Cassano et al., 2008
<i>L. catarinensis</i>		10 R ₁ =OAc, R ₂ =OH 11 R ₁ =OH, R ₂ =OAc 12 R ₁ =OAc, R ₂ =OAc 13 R ₁ =OAc, R ₂ =H 17 R ₁ =H, R ₂ =OH 18 R ₁ =H, R ₂ =OAc 19 R ₁ =R ₂ =H 15 R ₁ =Me, R ₂ =OMe 16 R ₁ =OMe, R ₂ =Me 22 R ₁ =Me, R ₂ =OH 20 R=OH 21 R=H	10-23 Bisabolane	<i>in vitro</i> cytotoxicity using HT29, MCF7, and A431 cell lines: 17 = IC ₅₀ < 10 μ M; 10, 18, 19 and 23 = IC ₅₀ < 20 μ M for all cell lines Non-polar extracts showed high level ($\geq 80\%$ of cell kill) of cytotoxic effects toward primary model tumor cell line (MES-SA)	Lhullier et al., 2010 Stein et al., 2011
<i>L. dendroidea</i>		24 Elatol 25 Obtusane 26 Triquinane 27 Obtusol 28 Cartilagineol 24 Elatol 29 31, 32	24, 25, 27, 28 Chamigrane 24 Chamigrane 29-39 Chamigrane	Antileishmanial test 24, 25 =IC ₅₀ ranging from 3.9 to 9.7 μ g/mL ¹ 24 =IC ₅₀ of 4.0 μ M and 0.45 μ M ² for promastigote and the amastigote forms Non-polar extracts showed high level ($\geq 80\%$ of cell kill) of cytotoxic effects toward primary model tumor cell line (MES-SA)	1) Santos et al., 2010 Machado et al., 2010 Stein et al., 2011 2) Lhullier et al., 2009
1) as <i>L. obtusa</i>					
2) as <i>L. microcladia</i>					

3) as <i>L. scoparia</i>	<div> <p>33, 34</p></div> <div> <p>35</p></div> <div> <p>36</p></div> <div> <p>37</p></div> <div> <p>38, 39</p></div> <div> <p>41</p></div> <div> <p>40</p></div> <div> <p>42</p></div> <div> <p>43</p></div> <div> <p>45</p></div> <div> <p>46</p></div>	<p>30, 33, 34, 35, 36, 37 and 11 - moderate activity (lower than 100 μM), 31 and 33 demonstrated higher activity than 32 and 34</p>		
		<p>40-42 β-bisabolane</p>	<p>Compounds 40-42, 44, and 46 were tested <i>in vitro</i> using <i>Nippostrongylus brasiliensis</i></p>	<p>3) Davyt et al., 2001; 2006</p>
		<p>43, 44, oxa-bicyclic stereoisomers</p>	<p>Compound 40 EC₅₀=0.11 mM</p>	
		<p>45, 46, triquinanes</p>		
<i>L. translucida</i>	Absence of terpenes and acetogenins	<p>Non-polar extracts showed high level ($\geq 80\%$ of cell kill) of cytotoxic effects toward primary model tumor cell line (MES-SA)</p>	<p>Fistarol & Carvalho, 2002; Stein et al., 2011</p>	
<i>Chondrophycus furcatus</i>	Triterpenes	NB	<p>Estevam & Carvalho, 2002 as <i>Laurencia furcata</i></p>	
<i>Palisada perforata</i>	<p>1. Absence of terpenes and acetogenins</p> <p>2.</p> <div> <p>47</p></div>	<p>NB</p> <p>Human pathogenic antimicrobial properties absent</p>	<p>1) Estevam & Carvalho, 2001 as <i>Chondrophycus papillosus</i></p> <p>2) Gressler et al., 2011</p>	
<i>P. flagellifera</i>	Absence of terpenes and acetogenins	<p>“Crude” methanol extracts showed moderate level (50-79% of cell kill) of cytotoxic effects toward primary model tumor cell line (MES-SA)</p>	<p>Carvalho et al., 2000 as <i>C. flagelliferus</i>; Stein et al., 2011</p>	

NB: none biological activity essay was performed; *introduced algae.

Acknowledgements

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

(Proc. 473322/2008-0), and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. 10/50193-1, Proc. 10/52244-2). Additional support was provided by the Ministerio de Ciencia e Innovación of the Spanish

Government (CGL 2010-14881). MT Fujii thanks the CNPq for a Research Productivity Fellowship (Proc. 301438/2009-9) and EM Stein thanks FAPESP for a Master's Student Fellowship (Proc. 2008/07775-0). Beneficiary of financial support from CAPES-Brazil.

References

- Abe T, Kurihara A, Kawaguchi S, Terada R, Masuda M 2006. Preliminary report on the molecular phylogeny of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae). *Coast Mar Sci* 30: 209-213.
- Amado Filho GM, Horta PA, Brasileiro PS, Barros-Barreto MB, Fujii MT 2006. Subtidal benthic marine algae of the Marine State Park of Laje de Santos (São Paulo, Brazil). *Braz J Oceanogr* 54: 225-234.
- Baptista LRM 1977. Flora marinha de Torres (Chlorophyta, Xanthophyta, Phaeophyta, Rhodophyta). *Bol Inst Biociências, Univ Federal do Rio Grande do Sul (Bot)* 37: 1-244.
- Brito LVR, Széchy MTM, Cassano V 2002. Levantamento taxonômico das macroalgas da zona das marés de costões rochosos adjacentes ao Terminal Marítimo Almirante Maximiano Fonseca, Baía da Ilha Grande, RJ. *Atlântica* 24: 17-26.
- Carvalho LR, Fujii MT, Barbizan DS 2000. Estudo químico dos metabólitos de *Laurencia flagellifera* (Ceramiales, Rhodophyta) como subsídio à quimiosistemática In XIII Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo. São Paulo, Brazil. p. 184.
- Carvalho LR, Fujii MT, Roque NF, Kato MJ, Lago JHG 2003. Aldingenin A, new brominated sesquiterpene from red algae *Laurencia aldingensis*. *Tetrahedron Lett* 44: 2637-2640.
- Carvalho LR, Fujii MT, Roque NF, Lago JHG 2006. Aldingenin derivatives from the red alga *Laurencia aldingensis*. *Phytochemistry* 67: 1331-1335.
- Cassano V 2009. *Taxonomia e filogenia do complexo Laurencia (Ceramiales, Rhodophyta), com ênfase no estado do Rio de Janeiro, Brasil*. São Paulo, 328 p. Tese de Doutorado, Instituto de Botânica de São Paulo.
- Cassano V, Széchy MTM, Fujii MT 2006. *Laurencia caduciramulosa* (Ceramiales, Rhodophyta) from Ilha Grande Bay, Rio de Janeiro, Brazil: a recently introduced species into the Atlantic Ocean? *Cryptogamie, Algol* 27: 265-277.
- Cassano V, De-Paula JC, Fujii MT, Teixeira VL 2008. Sesquiterpenes from the introduced red seaweed *Laurencia caduciramulosa* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Biochem Syst Ecol* 36: 223-226.
- Cassano V, Díaz-Larrea J, Senties A, Oliveira MC, Gil-Rodriguez MC, Fujii MT 2009. Evidence for the conspecificity of *Palisada papillosa* with *P. perforata* (Ceramiales, Rhodophyta) from the western and eastern Atlantic Ocean on the basis of morphological and molecular analyses. *Phycologia* 48: 86-100.
- Cocentino ALM. 1994. *Família Rhodomelaceae (Ceramiales, Rhodophyta) na Praia de Serrambi – Ipojuca-PE - Brasil*. Recife, 193 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- Cocentino ALM, Fujii MT, Guimarães NCL 2006. A descoberta de *Chondrophycus gemmiferus* (Ceramiales, Rhodophyta) na Plataforma continental da bacia potiguar, RN, confirma a ocorrência da espécie na flora ficológica brasileira. *XI congresso Brasileiro de Ficologia & Simpósio Latino-americano sobre algas nocivas*. Itajaí, Brazil.
- Cordeiro-Marino M 1978. Rodofíceas bentônicas marinhas do estado de Santa Catarina. *Rickia* 7: 1-243.
- Cordeiro-Marino M, Fujii MT 1985. *Laurencia catarinensis* (Rhodomelaceae, Rhodophyta), a new species from Ilha de Santa Catarina, Brazil. *Rev Bras Bot* 8: 47-53.
- Cordeiro-Marino M, Fujii MT, Pinheiro-Joventino F 1994. Morphological and cytological studies of *Laurencia furcata* Cordeiro-Marino and Fujii (Rhodophyta, Rhodomelaceae): a new species from Brazil. *Cryptogamic Bot* 4: 373-380.
- Da Gama BAP, Pereira RC, Carvalho AGV, Coutinho R, Yoneshigue-Valentin Y 2002. The effects of seaweed secondary metabolites on biofouling. *Biofouling* 18: 13-20.
- Davyt D, Fernandez R, Suescun L, Mombrú AW, Saldaña J, Dominguez L, Coll J, Fujii M T, Manta E 2001. New sesquiterpene derivatives from the red alga *Laurencia scoparia*. Isolation, structure determination, and anthelmintic activity. *J Nat Prod* 64: 1552-1555.
- Davyt D, Fernandez R, Suescun L, Mombrú AW, Saldaña J, Dominguez L, Coll J, Fujii M T, Manta E 2006. Bisabolanes from the red alga *Laurencia scoparia*. *J Nat Prod* 69: 1113-1116.
- Díaz-Larrea J, Senties A, Fujii MT, Pedroche FF, Oliveira MC 2007. Molecular evidence for *Chondrophycus poiteau* var. *gemmiferus* comb. et stat. nov. (Ceramiales, Rhodophyta) from the Mexican Caribbean Sea: implications for the taxonomy of the *Laurencia* complex. *Bot Mar* 50: 250-256.
- Erickson KL 1983. *Constituents of Laurencia*. In Scheuer PJ (ed.) *Marine natural products: chemical and biological perspectives* vol. 5. New York: Academic Press, p. 131-257.
- Estevam C, Carvalho LR, Fujii MT 2001. Estudos morfológicos e quimiotaxômicos comparativos em *Laurencia papillosa* e *L. perforata* (Ceramiales, Rhodophyta) do litoral brasileiro. *V Encontro de Iniciação Científica do Instituto de Botânica*. São Paulo, Brazil, p. 31.
- Estevam C, Carvalho LR 2002. Estudo químico dos metabólitos secundários de *Laurencia furcata*

- Cord.-Marino et Fujii (Ceramiales, Rhodophyta). *VI Encontro de Iniciação Científica do Instituto de Botânica*. São Paulo, Brazil, p. 32.
- Fenical W 1975. Halogenation in the Rhodophyta, a review. *J Phycol* 11: 245-259.
- Fernández JJ, Souto ML, Gil LV, Norte M 1998. Evaluation of the cytotoxic activity of the polyethers isolated from *Laurencia*. *Bioorg Med Chem* 6: 2237-2243.
- Fernández JJ, Souto ML, Gil LV, Norte M 2005. Isolation of naturally occurring dactylomelane metabolites as *Laurencia* constituents. *Tetrahedron* 61: 8910-8915.
- Figueiredo-Creed MA de O, Yoneshigue-Valentin Y 1997. Chlorophyta, Phaeophyta e Rhodophyta. In Marques MCM (ed.). *Mapeamento da cobertura vegetal e listagens das espécies ocorrentes na Área de Proteção Ambiental de Cairuçu, Município de Parati, RJ*. Série Estudos e Contribuições, Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, p. 30-36.
- Figueiredo MA de O, Barros-Barreto MBB, Reis RP 2004. Caracterização das macroalgas nas comunidades marinhas da Área de Proteção Ambiental de Cairuçu, RJ - subsídios para futuros monitoramentos. *Rev Bras Bot* 27: 11-17.
- Fistarol Z, Carvalho LR 2002. *Estudos químicos de Laurencia translúcida (Ceramiales, Rhodophyta)*. São Paulo, 48 p. Monografia de Conclusão de Curso, Faculdade de Ciências da Saúde de São Paulo.
- Fujii MT 1990. *Gênero Laurencia (Rhodomelaceae, Rhodophyta) no Estado de São Paulo: aspectos biológicos e taxonômicos*. Rio Claro, 145 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista.
- Fujii MT 1998. *Estudos morfológicos, quimiotaxonômicos e citogenéticos em quatro espécies selecionadas de Laurencia (Ceramiales, Rhodophyta) do litoral brasileiro*. Rio Claro, 176 p. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista.
- Fujii MT, Cordeiro-Marino M 1996. *Laurencia translúcida* sp. nov. (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil. *Phycologia* 35: 542-549.
- Fujii MT, Senties A 2005. Taxonomia do complexo *Laurencia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) do Brasil, com ênfase nas espécies dos estados de São Paulo e do Espírito Santo. In Senties A, Dreckmann KM (eds) *Monografias Ficológicas. II*. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México e Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil, p. 69-135.
- Fujii MT, Villaza R 2003. On the occurrence of *Laurencia caraibica* (Ceramiales, Rhodophyta) in Atol das Rocas, Brazil. *Hidrobiológica* 13: 33-38.
- Fujii MT, Collado-Vides L, Cordeiro-Marino M 1996. Morphological studies of *Laurencia gemmifera* and *Laurencia poiteau* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) from the Nichupté Lagoon System, Quintana Roo, Mexico. *Bot Mar* 39: 317-326.
- Fujii MT, Guimarães SMPB, Alves JP 2005. Ocorrência de *Laurencia venusta* (Ceramiales, Rhodophyta) no Espírito Santo, Brasil: distribuição biogeográfica disjunta ou introdução recente? In Pereira RC et al. (orgs). *Formação de Ficólogos: um compromisso com a sustentabilidade dos recursos aquáticos*. Rio de Janeiro: Museu Nacional, p. 527-536.
- Fujii MT, Guimarães SMPB, Gurgel CF, Fredericq S 2006. Characterization and phylogenetic affinities of the red alga *Chondrophycus flagelliferus* (Rhodomelaceae, Ceramiales) from Brazil on the basis of morphological and molecular evidence. *Phycologia* 45: 432-441.
- Garbary DJ, Harper JT 1998. A phylogenetic analysis of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae) of the red algae. *Cryptogamie, Algol* 19: 185-200.
- Gil-Rodríguez MC, Senties A, Díaz-Larrea J, Cassano V, Fujii MT 2009. *Laurencia marilzae* sp. nov. (Ceramiales, Rhodophyta) from the Canary Islands, Spain, based on morphological and molecular evidence. *J Phycol* 45: 264-271.
- Gressler V, Stein EM, Dörr F, Fujii MT, Colepicolo P, Pinto E 2011. Sesquiterpenes from the essential oil of *Laurencia dendroidea* (Ceramiales, Rhodophyta): isolation, biological activities and distribution among seaweeds. *Rev Bras Farmacogn* 21: ____-____.
- Gross H, König GM 2006. Terpenoids from marine organisms: unique structures and their pharmacological potential. *Phytochem Rev* 5: 115-141.
- Guimarães SMPB 2006. Checklist of Rhodophyta from the State of Espírito Santo. *Bolm Inst Bot* 17: 143-194.
- Guiry MD, Guiry GM 2010. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>, access December 2010.
- Hall TA 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Hay ME, Fenical W, Gustafson K 1987. Chemical defense against diverse coral-reef herbivores. *Ecology* 68: 1581-1591.
- Hay ME, Steinberg PD 1992. The chemical ecology of plant-herbivore interactions in marine versus terrestrial communities. In Rosenthal J, Berenbaum M (eds) *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*, vol. II, Evolutionary and Ecological Processes. New York: Academic Press, p. 371-413.
- Horta PA 2000. *Macroalgas do infralitoral do sul e sudeste do Brasil: taxonomia e biogeografia*. São Paulo, 301 p. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo.
- Howe MA, Taylor WR. 1931. Notes on new or little-known marine algae from Brazil. *Brittonia* 1: 7-33.
- Huelsenbeck JP, Ronquist FR 2001. MrBayes. Bayesian inference of phylogeny. *Biometrics* 17: 754-755.
- Ireland CM, Copp BR, Foster MP, McDonald LA, Radisky

- DC, Swersey JC 2000. Bioactive compounds from the sea. In Martin RE, Carter EP, Davis LM (eds.) *Marine and freshwater products handbook*. Lancaster: Technomic Publishing, p. 641-661.
- Joly AB 1965. Flora marinha do litoral norte do estado de São Paulo e regiões circunvizinhas *Fac Fil Ciênc Letr Univ S Paulo (Bot)* 21: 1-393.
- König GM, Wright AD 1997. Sesquiterpene content of the antibacterial dichloromethane extract of the marine red alga *Laurencia obtusa*. *Planta Med* 63: 186-187.
- Lhullier C, Donnangelo A, Caro M, Palermo JA, Horta PA, Falkenberg M, Schenkel EP 2009. Isolation of elatol from *Laurencia microcladia* and its palatability to the sea urchin *Echinometra lucunter*. *Biochem Syst Ecol* 37: 254-259.
- Lhullier C, Falkenberg M, Ioannou E, Quesada A, Papazafiri P, Horta PA, Schenkel EP, Vagias C, Roussis V 2010. Cytotoxic halogenated metabolites from the Brazilian red alga *Laurencia catarinensis*. *J Nat Prod* 73: 27-32.
- Machado FL, Pacienza-Lima Wallace, Rossi-Bergmann B, Gustinari LMS, Fujii MT, De-Paula JC, Costa SS, Lopes NP, Kaiser CR, Soares AR 2010. Antileishmanial sesquiterpenes from the Brazilian red alga *Laurencia dendroidea*. *Planta Med* 76: DOI: 10.1055/s-0030-1250526.
- Martín JD, Darias J 1978. Algal sesquiterpenoids. In Schevev PJ (ed.). *Marine Natural Products* vol 1. New York: Academic Press, p. 125-173.
- Martin-Lescanne J, Rousseau F, De Reviers B, Payri C, Couloux A, Cruaud C, Le Gall L 2010. Phylogenetic analyses of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae, Ceramiales) support recognition of five genera: *Chondrophycus*, *Laurencia*, *Osmundea*, *Palisada* and *Yuzurua* stat. nov. *Eur J Phycol* 45: 51-61.
- McIvor L, Maggs CA, Guiry MD, Hommersand MH 2002. Phylogenetic analysis of the geographically disjunct genus *Osmundea* Stackhouse (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Constancea* 83.9 [online publication of the Jepson Herbarium, UC, Berkeley: http://ucjeps.berkeley.edu/constancea/83/mcivor_etal/osmundea.html].
- Mohammed KA, Hossain CF, Zhang L, Bruick RK, Zhou YD 2004. Laurediterpineol, a new diterpene from the tropical marine alga *Laurencia intricata* that potently inhibits HIF-1 mediated hypoxic signaling in breast tumor cells. *J Nat Prod* 67: 2002-2007.
- Morales JL, Cantillo-Ciau ZO, Sanchez-Molina I, Mena-Rejon GJ. 2006. Screening of antibacterial and antifungal activities of six marine macroalgae from coasts of Yucatan peninsula. *Pharm Biol* 44: 632-635.
- Nam KW 1999. Morphology of *Chondrophycus undulata* and *C. parvipapillata* and its implications for the taxonomy of the *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) complex. *Eur J Phycol* 34: 455-68.
- Nam KW 2006. Phylogenetic re-evaluation of the *Laurencia* complex (Rhodophyta) with a description of *L. succulenta* sp. nov from Korea. *J Appl Phycol* 18: 679-697.
- Nam KW 2007. Validation of the generic name *Palisada* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Algae* 22: 53-55.
- Nam KW, Maggs CA, Garbary DJ 1994. Resurrection of the genus *Osmundea* with an emendation of the generic delineation of *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta). *Phycologia* 33: 384-395.
- Nam KW, Maggs CA, McIvor L, Stanhope MJ 2000. Taxonomy and phylogeny of *Osmundea* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) in Atlantic Europe. *J Phycol* 36: 759-772.
- Nunes JMC 1998. Catálogo de algas marinhas bentônicas do estado da Bahia, Brasil. *Acta Bot Malac* 23: 5-21.
- Nunes JMC 2005. *Rodofíceas marinhas bentônicas do estado da Bahia, Brasil*. São Paulo, 410 p. Tese de doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- Oliveira Filho EC 1969. Algas marinhas do sul do estado do Espírito Santo (Brasil). I. Ceramiales. *Bolm Fac Fil Ciênc Letr Univ S Paulo (Bot)* 26: 1-277.
- Oliveira Filho E C 1977. *Algas marinhas bentônicas do Brasil*. São Paulo, 407 p. Tese de Livre Docência, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- Oliveira Filho EC, Ugadim Y 1974. New references of benthic marine algae to Brazilian flora. *Bol Bot Univ São Paulo* 2: 71-91.
- Oliveira Filho EC, Ugadim Y 1976. A survey of the marine algae of Atol das Rocas (Brazil). *Phycologia* 15: 41-44.
- Paes e Mello LB, Pereira SMB 1990. Estudos taxonômicos sobre a Família Rhodomelaceae (Rhodophyta - Ceramiales) no litoral Oriental do Estado do Rio Grande do Norte. I. Gênero *Laurencia* Lamouroux. *Trab Oceanogr, Univ. Federal de Pernambuco* 21: 165-185.
- Pedrini AG. 1980. *Algas marinhas bentônicas da Baía de Sepetiba e arredores*. Rio de Janeiro, 379 p. Dissertação de Mestrado, Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Pedrini AG de, Gonçalves JEA, Fonseca MCS, Zaú AS, Lacorte CC 1989. A survey of the marine algae of Trindade Island, Brazil. *Bot Mar* 32: 97-99.
- Pereira RC, Teixeira VL 1999. Sesquiterpenos das algas marinhas *Laurencia* Lamouroux (Ceramiales, Rhodophyta). 1. Significado ecológico. *Quim Nova* 22: 369-374.
- Pereira SMB, Carvalho MFO, Angeiras JA, Pedrosa MEB, Oliveira NMB, Torres J, Gustinari LMS, Concentino AM, Santos MD, Nascimento PRF, Cavalcanti DR 2002. Algas marinhas bentônicas do estado de Pernambuco. In Tabarelli M, Silva JMC (orgs). *Diagnóstico da biodiversidade de Pernambuco*. Recife: Secretaria de Ciência, Tecnologia e Meio

- Ambiente, Editora Massangana, v. 1, p. 97-124.
- Pereira SMB, Bandeira-Pedrosa ME, Burgos DC 2005. Macroalgae from the Saint Peter's and Saint Paul's Archipelago (Brazil). *Phycologia suppl* 36: 80.
- Pinheiro-Joventino F, Dantas NP, Maraschin CDH 1998. Distribuição de algas marinhas no litoral de Fortaleza, Ceará, Brasil. *Arq Cien Mar* 31: 29-40.
- Posada D, Crandall KA 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Rocha-Jorge R 2010. *Diversidade de macroalgas do Parque Estadual Marinho da Laje de Santos, SP, Brasil*. São Paulo, 176 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica.
- Rocha-Jorge R, Cassano V, Oliveira MC, Fujii MT 2010. The occurrence of *Laurencia marilzae* (Ceramiales, Rhodophyta) in Brazil based on morphological and molecular data. *Bot Mar* 53: 143-162.
- Rodriguez-Concepción M 2006. Early steps in isoprenoid biosynthesis: multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. *Phytochem Rev* 5: 1-15.
- Saito Y 1967. Studies on Japanese species of *Laurencia*, with special reference to their comparative morphology. *Mem Fac Fish Hokkaido Univ* 15: 1-81.
- Sakemi S, Higa T, Jefford CW, Bernardinelli G. Venustatriol 1986. A new, antiviral, triterpene tetracyclic ether from *Laurencia venusta*. *Tetrahedron Lett* 27: 4287-4290.
- Santos AO, Veiga-Santos P, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Sudatti DB, Bianco EM, Pereira RC, Nakamura CV 2010. Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea* on *Leishmania amazonensis*. *Mar Drugs* 8: 2733-2743.
- Silva IB 2010. *Diversidade de algas marinhas bentônicas dos recifes e ambientes adjacentes de Maracajaú, APA dos Recifes de Corais, RN, Brasil*. São Paulo, 334 p. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica.
- Stein EM, Andregueti DX, Sousa C, Fujii MT, Baptista M, Colepicolo P, Indig GL 2011. Search for cytotoxic agents in multiple *Laurencia sensu lato* seaweed species (Ceramiales, Rhodophyta) harvested from the Atlantic Ocean zone that bates the Brazilian State of Espírito Santo. *Rev Bras Farmacogn* 21: in press.
- Széchy MTM, Paula EJ de 1997. Macroalgas epifitas em *Sargassum* (Phaeophyta – Fucales) do litoral dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, Brasil. *Leandra* 12: 1-10.
- Széchy MTM, Nassar CAG 2005. Flora ficológica bentônica da Baía da Ribeira, sul do estado do Rio de Janeiro: Avaliação após duas décadas de operação da Central Nuclear Almirante Álvaro Alberto. In Pereira RC et al. (orgs). *Formação de Ficólogos: um compromisso com a sustentabilidade dos recursos aquáticos*. Rio de Janeiro: Museu Nacional, p. 373-397.
- Széchy MTM, Nassar CAG, Falcão C, Maurat MCS 1989. Contribuição ao inventário das algas marinhas bentônicas de Fernando de Noronha. *Rodriguésia* 67: 53-61.
- Széchy MTM, Amado Filho GM, Cassano V, De-Paula JC, Barros-Barreto MBB, Reis RP, Marins-Rosa BV, Moreira FM 2005. Levantamento florístico das macroalgas da Baía de Sepetiba e adjacências, RJ: ponto de partida para o Programa GloBallast no Brasil. *Acta Bot Bras* 19: 587-596.
- Taylor WR 1960. *Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas*. Michigan: Ann Arbor, The University of Michigan Press.
- Torrano Silva BN 2010. *Flora de macrófitas marinhas do Arquipélago de Abrolhos e do Recife Sebastião Gomes (BA)*. São Paulo, 422 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade de São Paulo.
- Vairappan CS, Kawamoto T, Miwa H, Suzuki M 2004. Potent antibacterial activity of halogenated compounds against antibiotic-resistant bacteria. *Planta Med* 70: 1087-1090.
- Yamada Y 1931. Notes on *Laurencia*, with special reference to the Japanese species. *Univ Calif Publ Bot* 16: 185-310.
- Yoneshigue Y 1985. *Taxonomie et ecologie des algues marines dans la region de Cabo Frio, (Rio de Janeiro), Brésil*. Marseille, France, 466 p. Tese de Doutorado, Faculte des Sciences de Luminy, Univerisité d' Aix-Marseille II.
- Yoneshigue-Valentin Y, Fujii MT, Gurgel F D 2003. *Osmundea lata* (Howe & Taylor) comb. nov. (Ceramiales, Rhodophyta) from southeastern Brazilian continental shelf. *Phycologia* 42: 301-307.

BIOGRAFIA

Erika Mattos Sein

Endereço para acessar CV Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5273017067954893>

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2006- Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Espírito Santo - UFES

Grau: Bacharelado. Período: 2002/1 – 2006/1

Monografia: Levantamento taxonômico e dos povoamentos da comunidade bentônica da região entremarés das praias dos portos de Ponta de Ubu e Tubarão, ES.

Orientadora: Dra. Ana Paula Valentim Pereira

Grau: Licenciatura. Período: 2002/1 – 2006/2

ATIVIDADES ACADÊMICAS

2010 – Universidade de São Paulo

2010/1 – Monitoria PAE (Programa de Aperfeiçoamento do Ensino)

Disciplina: Instrumentação para o Ensino de Ciências Biológicas (carga horária: 90h)

2010/2 - Monitoria PAE (Programa de Aperfeiçoamento do Ensino)

Disciplina: O Laboratório para o Ensino de Botânica (carga horária: 30h)

2008 – Universidade de São Paulo

Período: Janeiro – Dezembro, 40 horas/semana.

Projeto: “Ensaio de atividades biológicas de algas do gênero *Laurencia* (Rhodomelaceae, Ceramiales) dos estados do Espírito Santo e São Paulo”.

Estágio em nível de aperfeiçoamento, Bolsista DTI Nível 1E / CNPq

Projeto institucional: “Algas marinhas da costa brasileira: Isolamento e caracterização de micosporinas e de substâncias com atividade antiinflamatória, antioxidante e antibacteriana”. Inscrito no Edital MCT/CNPq/MS-SCTIE-DECIT/CT-Saúde nº 010/2006

2007 – Instituto de Botânica de São Paulo

Período: Maio – Dezembro, 40 horas/semana.

Projeto: “Caracterização taxonômica das algas marinhas bentônicas do complexo *Laurencia* (Rhodomelaceae, Ceramiales) dos estados do Espírito Santo e São Paulo”.

Estágio em nível de aperfeiçoamento, Bolsista DTI Nível 1E / CNPq

Projeto institucional: “Sistemática de algas marinhas bentônicas com potencial biotecnológico e conservação da biodiversidade”.

2007 – Universidade Federal do Espírito Santo Botânica – Setor Botânica

Período: Janeiro – Abril, 20 horas/semana. Desenvolvimento Científico: Fisiologia pós-colheita de frutos (FAPES)

- “Desenvolvimento de Biofilmes Associados a Substâncias Naturais Biologicamente Ativas Visando Prolongamento da Comercialização do Mamão”;
- “Processamento Mínimo de Mamão e Abacaxi: Alternativa Lucrativa e Estudos Metabólicos”.

2006 – Companhia Siderúrgica Tubarão - CST Arcelor Mittal Brasil

Período: Janeiro – Dezembro, 20 horas/semana. Bolsa concedida pela empresa

Estágio no Centro de Educação Ambiental - CEAM / Laboratório Entomológico do Borboletário Conservacionista

2003 - 2006 – Universidade Federal do Espírito Santo - Setor Botânica

Período: 2003/1 – 2006/1, 15 horas semanais. Iniciação Científica em Taxonomia e Ecologia da Flora Marinha Bentônica

Monografia defendida: “Levantamento taxonômico e dos povoamentos da comunidade bentônica da região entre-marés das praias dos Portos de Ponta de Ubu e Tubarão”.

Projeto de Pesquisa aprovado pela PRPPG – Recebimento de bolsa pelo PIBIC/Petrobrás 2005. Orientadora: Dra. Ana Paula Valentim Pereira

ARTIGOS PUBLICADOS

STEIN E.M., ANDREGUETTI D.X., ROCHA C.S., FUJII M.T., BAPTISTA M.S., COLEPICOLO P. & INDIG G.L. Search for citotoxic agents in multiple *Laurencia* complex seaweed species (Ceramiales, Rhodophyta) harvested from the Atlantic Ocean zone that bates the Brazilian State of Espírito Santo. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 21 (no prelo).

STEIN E.M., COLEPICOLO P., AFONSO F.A.K. & FUJII M.T. Screening for antifungal activities of extracts from Brazilian seaweed genus *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta). **Revista Brasileira de Farmacognosia** 21 (no prelo).

GRESSLER V., STEIN E.M., DÖRR F., FUJII M.T., COLEPICOLO PIO & PINTO E. Sesquiterpenes from the essential oil of *Laurencia dendroidea* (Ceramiales, Rhodophyta): isolation, biological activities and distribution among seaweeds. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 21 (no prelo).

FUJII M.T., CASSANO V., STEIN E.M. & CARVALHO L.R. Overview of the taxonomy and of the major secondary metabolites and their biological activities related to human health of the *Laurencia* complex (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 21 (no prelo).

ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO:

REVISTA BRASILEIRA DE ARMAZENAMENTO certifica que o Trabalho (34/2007): “Avaliação do potencial de diferentes agentes sanitizantes para o processamento mínimo para abacaxi 'pérola’”, de autoria de Viviane Lucas Silva Mansur Xavier, Luiz Fernando Ganassali de Oliveira Junior, Rodrigo Max Berger, Wilka Messner da Silva Bispo, Érika Mattos Stein, Reginaldo Bezerra dos Santos, Silvia Tamie Matsumoto, foi aceito para publicação e se encontra em fase final de editoração para a sua divulgação no próximo volume 34 - Nº 1 - 2009.
(www.centreinar.org.br)