

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO



Dissertação

Atividades Antimicrobiana e Citotóxica de Extratos de Macroalgas da Antártica

Rosiane Mastelari Martins

Pelotas, 2014

Rosiane Mastelari Martins

Atividades Antimicrobiana e Citotóxica de Extratos de Macroalgas da Antártica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientador: Prof. Dr. Rafael Guerra Lund

Co-orientador: Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

M386a Martins, Rosiane Mastelari

Atividades antimicrobiana e citotóxica de extratos de macroalgas da Antártica / Rosiane Mastelari Martins. – 64f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, 2014. – Orientador Rafael Guerra Lund ; co-orientador Claudio Martin Pereira de Pereira.

1.Produtos naturais marinhos. 2.Agentes antineoplásicos. 3.Macroalgas. 4.Antártica. 5.Agentes antibacterianos. 6.Agentes antifúngicos. I.Lund, Rafael

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

Atividades Antimicrobiana e Citotóxica de Extratos de Macroalgas da Antártica

elaborada por
Rosiane Mastelari Martins

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção)

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Rafael Guerra Lund (Orientador)

Prof^a. Dr^a. Adriana Etges

Prof. Dr. Wilson Cunico

Prof. Dr. Rogério Antônio Freitag (Suplente)

Pelotas, 2014

Agradecimentos

À Deus, pelo dom da vida e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu esposo Thiago pelo incentivo desde a escolha por entrar no mestrado, pela compreensão durante minha ausência, pelo amor e companheirismo, inclusive nos finais de semana no laboratório.

Aos meus pais, Dércio e Dulce, pelo suporte emocional, carinho, educação e apoio em todas as decisões de minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Guerra Lund pela oportunidade e confiança. Obrigada pelo crescimento profissional e pessoal.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Claudio M. P. de Pereira por ter me acolhido como aluna de seu laboratório. Obrigada pela dedicação e pela constante disposição em ajudar. Continuaremos na caminhada durante o doutorado.

Ao Prof. Dr. Pio Colepicolo, coordenador do projeto Monitoramento Antártico/PROANTAR, pela oportunidade de participar desse grande projeto.

À Dra Mutue Fujii do Instituto de Botânica de São Paulo pela coleta e identificação das algas.

À querida Fernanda Nedel pela disponibilidade e colaboração com os ensaios de citotoxicidade.

Às minhas grandes amigas do Laboratório de Microbiologia Oral, Carmen e Simone, pela convivência diária, por toda a ajuda, conhecimento, parceria, amizade e cumplicidade. Obrigada pelos vários momentos de alegria passados juntas.

Aos mestrandos, técnicos e alunos de iniciação científica do Laboratório de Heterociclos Bioativos e Bioprospecção pela parceria, ótima convivência, troca de experiências e vários momentos de lazer.

Aos professores do curso por compartilhar o vasto conhecimento.

A todos os colegas do Mestrado pela boa convivência durante as disciplinas.

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Wilson Cunico, e ao Christian M. Geisler, secretário do curso, pela atenção e presteza.

À Banca Examinadora dessa dissertação pela disponibilidade e colaboração.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pela bolsa concedida.

PARTE I

Resumo

MARTINS, Rosiane Mastelari. **Atividades Antimicrobiana e Citotóxica de Extratos de Macroalgas da Antártica**. 2014. 72f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O ambiente marinho tem sido estudado focando a descoberta de novos compostos para fins terapêuticos. Neste meio, são destacadas as macroalgas, as quais têm fornecido metabólitos com interessantes atividades biológicas e elevado potencial terapêutico. A região Antártica é caracterizada por grandes agregações de macroalgas, no entanto, até o presente momento, a literatura possui poucas informações a respeito da bioatividade dessas algas. O presente estudo avaliou as atividades antimicrobiana e citotóxica de extratos (hexânico, clorofórmico, etil acetanólico e etanólico) de quatro espécies de macroalgas originárias da Antártica: *Cystosphaera jacquinotii*, *Himantothallus grandifolius*, *Pyropia endiviifolia* e *Iridea cordata*. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo. Os extratos foram testados contra *Staphylococcus aureus* ATCC19095, *Enterococcus faecalis* ATCC4083, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, *Escherichia coli* ATCC29214, *C. albicans* ATCC62342 e isolados clínicos orais de *C. albicans* (3), *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. lipolytica* e *C. famata*. A atividade citotóxica foi avaliada em células de carcinoma epidermóide humano (A-431) e de fibroblastos de camundongos (NIH/3T3) pelo ensaio colorimétrico de redução do MTT. O extrato etil acetanólico de *H. grandifolius* exibiu notável atividade antifúngica, demonstrando atividade contra todas as cepas de fungos testados, incluindo cepas resistentes a fluconazol. O extrato etil acetanólico de *I. cordata* demonstrou forte atividade contra a linhagem tumoral A-431, aumentando a taxa de inibição a 91,1% e 95,6% na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ após 24 e 48 h de exposição, respectivamente. A maioria dos extratos exibiu baixo ou nenhum efeito citotóxico em células não-tumorais NIH/3T3. Os dados obtidos demonstram o perfil bioativo de extratos de algas da Antártica, sugerindo que algas dessa região podem ser promissoras para o isolamento de substâncias com importante potencial biológico.

Palavras-chave: Produtos Naturais Marinhos. Macroalgas. Antártica. Agentes Antibacterianos. Agentes Antifúngicos. Agentes Antineoplásicos.

Abstract

MARTINS, Rosiane Mastelari. **Antimicrobial and Cytotoxicity Activities of Seaweeds Extracts from Antarctica**. 2014. 72f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The marine environment has been studied focusing on the discovery of new compounds for therapeutic purposes. In this environment, macroalgae have provided metabolites with interesting biological activities and high therapeutic potential. Antarctica is characterized by the extremely abundant aggregations of macroalgae, however, the literature has little information about the bioactivity of these seaweeds. This study evaluated the antimicrobial potential and cytotoxic activity on tumoral and non tumoral cell lines of different extracts (hexane, chloroform, ethyl acetate and ethanol) of four seaweeds from Antarctic: *Cystosphaera jacquinotii*, *Iridaea cordata*, *Himantothallus grandifolius* and *Pyropia endiviifolia*. The antimicrobial activity was evaluated by the broth microdilution method. The extracts were assessed against *Staphylococcus aureus* ATCC 19095, *Enterococcus faecalis* ATCC 4083, *Escherichia coli* ATCC29214, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 62342 and clinical isolates from the human oral cavity of *C. albicans* (3), *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. lipolytica* e *C. famata*. Cytotoxicity was evaluated on human epidermoid carcinoma (A-431) and mouse embryonic fibroblast (NIH/3T3) cell lines by MTT colorimetric assay. Ethyl acetate extract of *H. grandifolius* showed noticeable antifungal activity against all fungal strains tested, including fluconazole resistant samples. Findings of cytotoxicity investigation on cancer cell line revealed that ethyl acetate extract of *I. cordata* shows very strong activity against A-431 cancer cell line, increasing the inhibitory ratio to 91.1% and 95.6% at the concentration of 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ after 24 and 48h of exposure, respectively. Most of algal extracts tested showed very low or no cytotoxicity effect on normal cell line. The data demonstrate the bioactive profile of seaweeds extracts from Antarctica, suggesting that seaweeds from this region may be promising for the isolation of substances with important biological potential.

Keywords: Marine Natural Products. Seaweed. Antarctic regions. Antibacterial agents. Antifungal agents. Antineoplastic agents.

Lista de Figuras

Figura 1	Número acumulativo de produtos naturais identificados nos diferentes filos de macroalgas entre o período de 1965 – 2012.....	25
Figura 2	Continente Antártico.....	30
Figura 3	Localização da estação de pesquisa antártica brasileira e outras estações de pesquisa internacionais na Ilha Rei George.....	31
Figura 4	Macroalga <i>Iridaea cordata</i>	34
Figura 5	Macroalga <i>Pyropia endiviifolium</i>	35
Figura 6	Macroalga <i>Himantothallus grandifolius</i>	36
Figura 7	Macroalga <i>Cystosphaera jacquinotii</i>	37

Lista de Tabelas

Tabela 1	Compostos derivados de fontes marinhas em fase de estudos clínicos, respectivos status clínicos e áreas terapêuticas.....	22
----------	---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMM	Concentração Microbicida Mínima
DHA	Ácido Docosahehexanólico
EMEA	<i>European Medicine Agency</i>
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
°C	Grau Celsius
h	Hora
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50% do Crescimento das Cepas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Km ²	Kilômetros quadrados
Km/h	Kilômetros por hora
m	Metros
µg/mL	Microgramas por mililitros
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNMs	Produtos Naturais Marinhos
PNs	Produtos Naturais
PROANTAR	Programa Antártico Brasileiro
TG	Triglicerídeos

Lista de Símbolos

®	Marca Registrada
%	Porcentagem
±	Mais ou menos

Sumário

1 Introdução	13
2 Objetivos	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 Revisão de literatura	16
3.1 Produtos naturais marinhos	16
3.2 Algas	22
3.2.1 Considerações Gerais	22
3.2.2 Atividades Biológicas.....	23
3.2.2.1 Atividade Antimicrobiana	23
3.2.2.2 Atividade Citotóxica.....	27
3.3 Continente Antártico	29
3.3.1 Macroalgas da Antártica	31
3.3.1.1 Caracterização e Classificação das espécies.....	32
3.3.1.1.1 Macroalga <i>Iridaea cordata</i>	32
3.3.1.1.2 Macroalga <i>Pyropia endiviifolium</i>	33
3.3.1.1.3 Macroalga <i>Himantothallus grandifolius</i>	34
3.3.1.1.4 Macroalga <i>Cystosphaera jacquinotii</i>	35
4 Artigo científico	39
5 Conclusões.....	55
6 Referências	56
Anexo A.....	63

PARTE II

1 Introdução

A natureza é uma fonte atrativa de compostos com funções terapêuticas. A grande diversidade química distribuída em milhões de espécies de plantas, animais, fungos e demais microrganismos é certamente de incontestável valor para a ciência, por suas aplicações farmacológicas diretas ou como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN e CRAGG, 2007; BUTLER, 2008; MISHA e TIWARI, 2011).

De todas as fontes naturais de fármacos, o ambiente marinho é certamente a última grande fronteira. Evitado por muito tempo, apenas recentemente o ecossistema marinho foi reconhecido como fonte de produtos naturais com potencial terapêutico, tendo os pesquisadores descoberto um ambiente de biossíntese totalmente distinto, com estruturas químicas peculiares e uma extraordinária diversidade de alvos moleculares (HU et al., 2011).

Entre os organismos marinhos, as macroalgas ocupam um importante lugar como fonte de compostos bioativos. Para sobreviver no ambiente aquático altamente competitivo, as algas têm desenvolvido estratégias de defesa que resultam em uma enorme diversidade de compostos produzidos através de diferentes vias metabólicas (MARINHO-SORIANO et al., 2011). Inúmeras publicações relataram a atividade biológica de compostos de origem algal; demonstrando a sua capacidade de produzir metabólitos, com alta complexidade e diversidade ilimitada de propriedades farmacológicas e / ou biológicas. Até a data, mais de 2.400 compostos biologicamente ativos com diferentes propriedades farmacológicas (antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antiviral, antitumoral, antiinflamatória, antidiabética, antialérgica, antiprotozoária, anticoagulante, entre outras) têm sido detectados em macroalgas verdes, vermelhas e pardas (MANILAL et al., 2009; SHU-HUA et al., 2009; BHATNAGAR e KIM, 2010; CHANDA et al., 2010; CHRISTOBEL et al., 2011; THOMAS e KIM, 2011; ROSALINE et al., 2012; KAVITA, SINGH e JHA, 2013; SATHYA et al., 2013; GÓMEZ-ORDÓÑEZ et al., 2014; LIANG et al., 2014; RABANAL et al., 2014). Além disso, considerando a sua grande diversidade taxonômica, as investigações relacionadas com a busca de novos compostos

biologicamente ativos, a partir de algas, pode ser visto como um campo quase ilimitado (CHANDA et al., 2010).

A região Antártica é caracterizada por grandes agregações de macroalgas, contrastando fortemente com a ausência de uma flora terrestre diversificada (WIENCKE et al., 2007). Nas últimas décadas, as macroalgas dessa região têm sido estudadas intensivamente no que diz respeito à ecofisiologia, biodiversidade, relações biogeográficas; distribuição geográfica; exigências de luz e profundidade do zoneamento, efeito da temperatura e salinidade, sazonalidade da reprodução e características fisiológicas dos estágios de desenvolvimento; crescimentos sazonais e fotossíntese; componentes elementares e nutricionais, defesas químicas e físicas contra herbívoros (WIENCKE et al., 2007). No entanto, embora um considerável progresso tenha sido alcançado nos últimos anos, o nosso conhecimento atual sobre a bioatividade de macroalgas dessa região ainda é fragmentado.

O ambiente natural das algas antárticas é caracterizado por condições abióticas extremas, com uma forte sazonalidade de luz e temperaturas baixas constantes (ZACHER et al., 2011). Para sobreviver nas condições ambientais extremas, as algas da Antártica têm desenvolvido estratégias de adaptação que resultam na produção de uma enorme diversidade de compostos que, como demonstrado em inúmeros estudos envolvendo diferentes espécies de algas, podem ser biologicamente ativos e possuir potencial farmacológico e terapêutico. Dessa forma, o estudo das algas marinhas antárticas na busca por compostos biologicamente ativos que possam ser aplicados na terapêutica; mais eficazes e/ou menos tóxicos, e com atividades farmacológicas semelhantes ou maiores às comercialmente disponíveis, tem se mostrado bastante interessante para a área científica.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar *in vitro* o potencial antimicrobiano e a atividade citotóxica de extratos de quatro espécies de macroalgas marinhas originárias da Antártica.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Avaliar o potencial antimicrobiano de cada extrato através da determinação da Concentração Inibitória de 50% do crescimento das cepas (IC_{50}), Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM);
- 2) Avaliar a citotoxicidade dos extratos frente à linhagem de células tumorais (A-431) e não tumorais (NIH/3T3).

3 Revisão de literatura

3.1 Produtos naturais marinhos

Produtos naturais (PNs) são substâncias produzidas por organismos vivos, derivadas do metabolismo primário ou secundário, e podem pertencer as mais diferentes classes de substâncias orgânicas. Os metabólitos secundários ou metabólitos especiais são de particular estima para o desenvolvimento de novos fármacos, ao passo que são também de fundamental importância adaptativa para um grupo de organismos e determinantes para o sucesso e aumento da biodiversidade dos ecossistemas (MISHA e TIWARI, 2011).

Os PNs têm desempenhado um papel extremamente importante na medicina, sendo este fato evidente pelo elevado número de produtos desta origem atualmente utilizados na terapêutica de diferentes patologias. De um total de aproximadamente 1200 novas substâncias químicas lançadas como fármacos nos últimos 25 anos, estima-se que 48% possuem algum tipo de relação com metabólitos isolados de organismos vivos, seja na totalidade da estrutura, como protótipo, ou mesmo relativo ao grupo farmacofórico (NEWMAN e CRAGG, 2007). No caso das drogas anticancerígenas e dos antibióticos, estima-se que esse percentual atinja cerca de 70% (MISHA e TIWARI, 2011; ZHU et al., 2011).

Somente no período entre 2009-2010, dos 46 novos fármacos aprovados pela agência americana de controle de medicamentos e alimentos (*Food and Drug Administration*, FDA), 12 (26%) foram desenvolvidas a partir de produtos naturais (ZHU et al, 2011). No período entre 2005-2007, treze novos fármacos relacionados a produtos naturais foram aprovados para uso terapêutico, sendo que cinco representam novas classes de agentes terapêuticos, com mecanismos de ação não descritos anteriormente (BUTLER, 2008; HARVEY, 2008). Além disso, um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foram desenvolvidos a partir de produtos naturais. (BUTLER, 2008; MISHA e TIWARI, 2011).

O ambiente terrestre foi, durante muitos anos, o foco da indústria farmacêutica, sendo que, os organismos terrestres (principalmente microrganismos e plantas) são os responsáveis por quase a totalidade dos fármacos de origem natural;

enquanto que o ambiente marinho encontra-se praticamente inexplorado (THAKUR et al., 2008; CHANDA et al., 2010).

Os oceanos apresentam-se como o maior bioma do planeta, totalizando 361 milhões Km², uma profundidade média de 3.730 m e cobrindo cerca de 71% da superfície do planeta (CRAIG, 2005; BOOPATHY e KATHIRESAN, 2010). Pela imensa biodiversidade biológica, os oceanos mostram ser uma fonte extremamente atrativa para a descoberta de novos produtos. Cerca de 300.000 espécies de plantas e animais marinhos e milhões de microrganismos já foram descritos, no entanto, estima-se que, até o presente momento, menos de 3% do total estimado de organismos marinhos já tenha sido estudado, restando ainda uma fonte de substâncias bioativas bastante ampla com potencial terapêutico praticamente ilimitado a ser explorada (BLUNT et al., 2008; THAKUR et al., 2008; NGO et al., 2012). Nesse contexto, os mares e oceanos tornaram-se importante alvo de estudos objetivando sua bioprospecção racional.

Trabalho de Bergmann e Feeney publicado no início da década de 50 foi um dos pioneiros no estudo dos produtos naturais marinhos. Um dos exemplos históricos no desenvolvimento de fármacos marinhos teve origem no seu trabalho de isolamento dos nucleosídeos espongouridina e espongotimidina da esponja *Cryptotethya crypta*. Essa importante descoberta levou ao desenvolvimento de análogos sintéticos como adenina arabinosídeo (Ara-A) e citosina arabinosídeo (Ara-C), fármacos com ação antiviral e anticâncer respectivamente (FENICAL, 2006; WILLIAMS et al., 2008; GLASER e MAYER, 2009; MAYER et al., 2010).

No entanto, somente após a descoberta de grandes quantidades de prostaglandinas no octocoral *Plexaura homomalla*, em 1978, por Weinheimer e Spraggins, foi que o interesse e o investimento em laboratórios de pesquisa de produtos naturais de origem marinha intensificaram-se (GERWICK e MOORE, 2012). Assim, o avanço das técnicas de isolamento e caracterização química somado aos progressos e a sofisticação dos bioensaios, tornaram possível a identificação de inúmeras moléculas peculiares, trazendo estruturas complexas até então desconhecidas, além de potentes atividades biológicas e interações com alvos celulares inusitados (BLUNT et al., 2008).

A versatilidade apresentada pelos organismos marinhos resulta da dinâmica particular do ambiente marinho. Ao contrário dos organismos terrestres, os organismos marinhos necessitam de adaptar-se a condições ambientais extremas,

tais como baixas concentrações de nutrientes, pressões altas, concentrações elevadas de sal, baixo conteúdo em oxigênio e pouca luz solar (HU et al., 2011). Para minimizar estas condições os organismos marinhos possuem características únicas que os diferenciam dos organismos terrestres em muitos aspectos como o comportamento, o metabolismo e a estratégia de adaptação (HU et al., 2011). Além das pressões físicas acima referidas os organismos marinhos também estão sujeitos a pressões ecológicas como por exemplo a competição pelo espaço e a predação, levando-os a desenvolver estratégias que permitam a sua sobrevivência. Dessa forma, metabólitos secundários produzidos por organismos marinhos muitas vezes diferem fundamentalmente dos produzidos por organismos terrestres (DEMUNSHI e CHUGH, 2009).

Além de suas estruturas peculiares, produtos naturais marinhos (PNMs) possuem uma extraordinária diversidade de alvos moleculares com seletividade marcante, o que aumenta sobremaneira o potencial farmacológico e terapêutico dessas moléculas (NEWMAN e CRAGG, 2006). Dentre os alvos terapêuticos, podemos reconhecer canais iônicos, enzimas, microtúbulos, DNA, lisossomos, calmodulina, proteossomos, além de indução de estresse oxidativo e modulação do sistema imunológico (NEWMAN e CRAGG, 2006).

Além dos já citados Ara-A (Vidarabine[®]) e Ara-C (Cytosar-U[®], Depocyt[®]), outros fármacos relacionados a organismos marinhos são encontrados comercialmente: Ziconotídeo (Prialt[®]), Trabectedina (Yondelis[®]), Mesilato de Eribulina (Halaven[®]), Brentuximab vedotin (Adcetris[®]) e ésteres etílicos de ômega 3 (Lovaza[®]).

O ziconotídeo é um análogo sintético de um peptídeo natural de 25 aminoácidos que se encontra no veneno do caracol marinho *Conus magnus* com potencial analgésico mil vezes maior do que a morfina (GLASER e MAYER, 2009; MAYER et al., 2010). Trata-se de um antagonista dos canais de cálcio do tipo N que regulam a liberação de neurotransmissores em populações neuronais específicas responsáveis pelo processamento espinal da dor. A ligação a esses canais neuronais inibe a liberação de neurotransmissores e, conseqüentemente a sinalização espinal da dor. Além disso, ao contrário dos opióides, que são agonistas de receptores acoplados à proteína G e que levam à diminuição no número de receptores após tratamento continuado e a conseqüente dessensibilização, o tratamento com ziconotida não induz tolerância após uso crônico (MAYER et al.,

2010; MISHA e TIWARI, 2011). O primeiro teste clínico com ziconotida em pacientes com dor severa teve início em 1995 e, em 2004, a FDA aprovou este fármaco de administração intratecal no controle da dor severa, incluindo pacientes refratários a tratamentos com opióides. Esse medicamento é comercializado pela Eisai Pharmaceuticals (WILLIAMS et al., 2008; MAYER et al., 2010).

A Trabectedina (Ecteinascidina-743, ET-743) é um alcalóide derivado do tunicado *Ecteinascidia turbinata* produzido pela PharmaMar. Foi o primeiro fármaco a ser aprovado para uso clínico no tratamento de sarcoma de tecidos moles, tendo recebido autorização da agência EMEA (Agência Europeia de Medicamentos, *European Medicine Agency*) para a comercialização pela União Europeia em setembro de 2007 (WILLIAMS et al., 2008). Em 2009, Yondelis também foi aprovado para uso em terapia de carcinoma de ovário e atualmente encontra-se em fase 3 para tratamento de câncer de mama, pulmão e próstata (GERWICK e MOORE, 2012). Embora seu mecanismo de ação não seja completamente esclarecido, sabe-se que sua ação é resultante da ligação a guaninas em sequências específicas de bases nas fendas menores da dupla hélice induzindo uma dobra nas fitas de DNA, que tem diversas consequências como desorganização do citoesqueleto e bloqueio da divisão celular (WILLIAMS et al., 2008; MAYER et al., 2010). Outra consequência de grande importância é a interferência no reconhecimento e ligação normal de proteínas ligantes do DNA, incluindo a MDR1, proteína de resistência a múltiplas drogas, que pode estar superexpressa em células tumorais. Assim o tratamento com trabectedina pode prevenir a resistência a quimioterápicos pela inibição dessa proteína (KANZAKI et al., 2002). *Ecteinascidia turbinata* foi cultivada com sucesso, mas os testes clínicos foram realizados pelo método de síntese. Atualmente, sua produção é realizada em quatro etapas a partir da cianosafracina B, proveniente da cultura da bactéria *Pseudomonas fluorescens* (MAYER et al., 2010; GERWICK e MOORE, 2012).

O mesilato de eribulina (E-7389) é um análogo sintético, estruturalmente simplificado da halicondrina B, um produto natural isolado da esponja marinha *Halichondria okadai*. Aprovado pela FDA em novembro de 2010, mesilato de eribulina é indicado para tratamento de câncer de mama e exerce os seus efeitos através de um mecanismo antimitótico baseado na tubulina, que causa o bloqueio das fases G2/M do ciclo celular, disrupção dos fusos mitóticos e, finalmente, a

apoptose celular após bloqueio mitótico prolongado. Esse medicamento é produzido pela Eisai Pharmaceuticals (MAYER et. al., 2010; GERWICK e MOORE, 2012).

Brentuximab vedotin foi aprovado em agosto de 2011 pela FDA para tratamento de linfoma de Hodgkin e linfoma anaplásico de células grandes, um tipo de linfoma não Hodgkin e células T. Licenciado pela Seattle Genetics e comercializado como Adcetris[®], consiste em um anticorpo monoclonal conjugado à auristatina E, um análogo sintético da dolastatina 10, um peptídeo isolado do molusco marinho *Dolabella auricularia*, responsável pela inibição da polimerização da tubulina. A ligação do anticorpo específico para CD30, proteína de membrana altamente expressa nas células tumorais, permite que alta dose do fármaco citotóxico atinja as células tumorais (GERWICK e MOORE, 2012).

Lovaza[®], aprovado pela FDA em 2004, é constituído por ésteres etílicos de ácidos de ômega 3 provenientes do óleo de peixe, predominantemente éster etílico do ácido eicosapentaenóico (EPA) e do ácido docosahexanóico (DHA). Comercializado pela Reliant Pharmaceuticals, Lovaza[®] apareceu com o objetivo terapêutico específico de reduzir triacilgliceróis séricos. Seu mecanismo de ação não é completamente compreendido, mas os potenciais mecanismos de ação incluem a inibição da acil-CoA:1,2 diacilglicerol-aciltransferase, aumento da β -oxidação, diminuição da lipogênese e aumento da atividade da lipase plasmática. Lovaza pode reduzir a síntese de triglicerídeos no fígado porque EPA e DHA são substratos pobres para as enzimas responsáveis pela síntese de TG, além de EPA e DHA inibirem a esterificação de outros ácidos graxos (DAYSPRING, 2011; GERWICK E MOORE, 2012).

Apesar do reduzido número de fármacos de origem marinha, existe um número considerável de substâncias em fase de estudos clínicos para lançamento no mercado farmacêutico (**Tabela 1**).

Apesar da grande maioria dos alvos identificados apresentarem-se como relevantes no tratamento do câncer e ser exatamente no estudo e na terapêutica dessa doença que podemos visualizar o maior impacto das substâncias de origem marinha; até o presente momento, há muitas publicações demonstrando uma variedade de outras atividades farmacológicas em substâncias isoladas de organismos marinhos, como antibacterianas, anticoagulantes, antiinflamatórias, antifúngicas, antihelmínticas, antiprotozoárias e atividades antivirais; ações sobre o sistema endócrino, cardiovascular, sistemas imunológico e nervoso, e outros

diversos mecanismos de ação, reafirmando a grande capacidade de organismos marinhos de produzir substâncias, com alta complexidade e diversidade ilimitada de propriedades farmacológicas (DONIA e HAMANN, 2003; MAYER et al., 2009; VILLA e GERWICK, 2010; MAYER et al., 2011; WIJESEKARA et al., 2011; NGO et al., 2012; ROSALINE et al., 2012; KAVITA, SINGH e JHA, 2013; SATHYA et al., 2013; SHIVAKUMAR e SAFHI, 2013; LIANG et al., 2014; RABANAL et al., 2014). Além disso, considerando a grande biodiversidade do ambiente marinho, as investigações relacionadas com a busca de novos compostos com potencial terapêutico a partir de organismos marinhos pode ser visto como um campo quase ilimitado (BLUNT et al., 2008).

Tabela 1- Compostos derivados de fontes marinhas em fase de estudos clínicos, respectivos status clínicos e áreas terapêuticas.

Status Clínico	Nome do Composto	Fonte Natural Marinha	Área terapêutica
Fase III	Aplidina	Ascídia <i>Aplidium albicans</i>	Câncer
Fase III	Neovastat® (AE-941)	Cartilagem do tubarão <i>Squalus acanthias</i>	Câncer
Fase II	DMXBA	Nematodo <i>Amphiporus angulatus</i>	Esquizofrenia
Fase II	PM00104	Molusco <i>Jorunna funebris</i>	Câncer
Fase II	Kahalalide F	Molusco <i>Elysia rufescens</i>	Câncer
Fase II	Plinabulin	<i>Aspergillus sp.</i> marinho	Câncer
Fase II	ILX-651	Molusco <i>Dolabella auricularia</i>	Câncer
Fase II	KRN7000	Esponja <i>Agelas mauritanus</i>	Câncer e Hepatite C
Fase I e II	Briostatina 1	Briozoário <i>Bugula neritina</i>	Câncer
Fase I	Discodermolido	Esponja <i>Discodermia dissoluta</i>	Câncer
Fase I	Espisulosina	Molusco <i>Mactromeris polynyma</i>	Câncer
Fase I	Salinosporamida A	Actinomiceto <i>Salinospira tropica</i>	Câncer
Fase I	Pseudopterosina A	Coral <i>Pseudopteroqorgia elisabethae</i>	Dor e inflamação

Fonte: THAKUR et al., 2008; GLASER e MAYER, 2009; MAYER et. al., 2010; GERWICK e MOORE, 2012; CLINICALTRIALS, 2013.

Entre os organismos marinhos, as algas apresentam a vantagem de apresentarem uma maior facilidade de obtenção quando comparada a outros organismos marinhos, como esponjas e ascídias (SHIVAKUMAR e SAFHI, 2013). Além disso, as algas apresentam um grande potencial para cultivo, o que tem atraído o interesse dos pesquisadores para o seu estudo.

3.2 Algas

3.2.1 Considerações Gerais

Algas são seres fotossintetizantes, porém não possuem folhas, raízes ou mesmo tecidos vasculares. Pertencem ao grupo não homogêneo de organismos denominado Algae e não constituem uma categoria taxonômica definida, mas sim um amontoado de categorias díspares, tão diversas que chegam a ser classificadas em 3 reinos diferentes, tradicionalmente conhecidos como Monera, Protista e Plantae, ou ainda com diferentes denominações em outros sistemas apoiados em dados de biologia molecular (RAVEN et al., 2007).

O Reino Monera é constituído pelas algas azuis ou cianofíceas, organismos unicelulares, procariontes e autótrofos que habitam ambientes úmidos e necessitam de poucos nutrientes para sobreviver, sendo os primeiros seres vivos a aparecerem no planeta. Esses organismos habitam oceanos, águas doces, solos, rochas e superfície de outros vegetais (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

O Reino Protista é composto por organismos eucariontes, unicelulares e pluricelulares (de organização simples), autótrofos ou heterótrofos. As algas pertencentes a este Reino apresentam pigmentos (clorofilas, caroteno e xantofilas) o que permite a realização da fotossíntese (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

No Reino Plantae, os organismos são eucariontes, pluricelulares e autótrofos (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004). Este Reino é composto pelas macroalgas que são divididas em três filos principais: *Ochrophyta*, *Chlorophyta* ou *Rhodophyta*, dependendo de seus nutrientes, pigmentos e composição química (CHANDA et al., 2010; ABAD, BEDOYA e BERMEJO, 2011).

O Filo *Ochrophyta*, composto pelas algas pardas, é quase exclusivamente marinho (exceto por três gêneros raros de água doce) e predomina nos mares das regiões temperadas frias e polares. Cerca de 1500 espécies são conhecidas atualmente nesse grupo vivendo fixadas em um substrato ou flutuando, formando

imensas florestas submersas. As algas pardas são as maiores existentes, podendo atingir mais de 25m. Nesses organismos são encontrados os pigmentos fucoxantina, clorofilas *a* e *c* e carotenóides e, como substâncias de reserva, óleos e polissacarídeo (RAVEN et al., 2007).

O Filo *Chlorophyta*, composto pelas algas verdes, é extremamente abundante nos ambientes aquáticos, onde é um dos mais importantes componentes do fitoplâncton. As algas verdes são responsáveis pela maior parte da produção de oxigênio molecular disponível no planeta a partir da fotossíntese. Pelo menos 17000 espécies pertencentes a esse filo já foram descritas. Elas acumulam amido no interior de suas células e contêm os pigmentos clorofilas *a* e *b*, carotenos e xantofilas (RAVEN et al., 2007).

O Filo *Rhodophyta*, composto pelas algas vermelhas, é quase que exclusivamente pluricelular e marinho, sendo mais comum em águas quentes. A principal característica desse grupo é a presença do pigmento ficoeritina em suas células, responsável pela coloração avermelhada desses organismos. As algas vermelhas possuem clorofilas *a* e *d* e carotenóides, e armazenam amido como material de reserva (RAVEN et al., 2007).

3.2.2 Atividades Biológicas

Para sobreviver no ambiente aquático altamente competitivo, as algas têm desenvolvido estratégias de defesa que resultam em uma enorme diversidade de compostos produzidos através de diferentes vias metabólicas (MARINHO-SORIANO et al., 2011).

A pesquisa na área de bioprodutos de origem algal emergiu na década de 1970 e, desde então, tem crescido substancialmente (**Figura 1**). Um total de 3129 PNMs foi detectado em macroalgas entre o período de 1965 - 2012 (*Rhodophyta*, 1658 PNs ou 53% do total; *Ochrophyta*, 1213 PNs; 39%; *Chlorophyta*, 258 PNs; 8%), sendo o filo *Rhodophyta* responsável pela maioria dos produtos identificados (LEAL et al., 2013).

A aplicabilidade dos compostos químicos isolados das diferentes classes de algas é muito ampla. Mais de 2.400 compostos biologicamente ativos com diferentes propriedades farmacológicas (antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antiviral, antitumoral, antiinflamatória, antidiabética, antialérgica, antiprotozoária, anticoagulante, entre outras) têm sido detectados em macroalgas verdes, vermelhas

e pardas (MANILAL et al., 2009; SHU-HUA et al., 2009; BHATNAGAR e KIM, 2010; CHANDA et al., 2010; CHRISTOBEL et al., 2011; THOMAS e KIM, 2011; ROSALINE et al., 2012; KAVITA, SINGH e JHA, 2013; SATHYA et al., 2013; SHIVAKUMAR e SAFHI, 2013; LIANG et al., 2014; RABANAL et al., 2014). Além disso, considerando a sua grande diversidade taxonômica, as investigações relacionadas com a busca de novos compostos biologicamente ativos a partir de algas pode ser visto como um campo quase ilimitado (CHANDA et al., 2010).

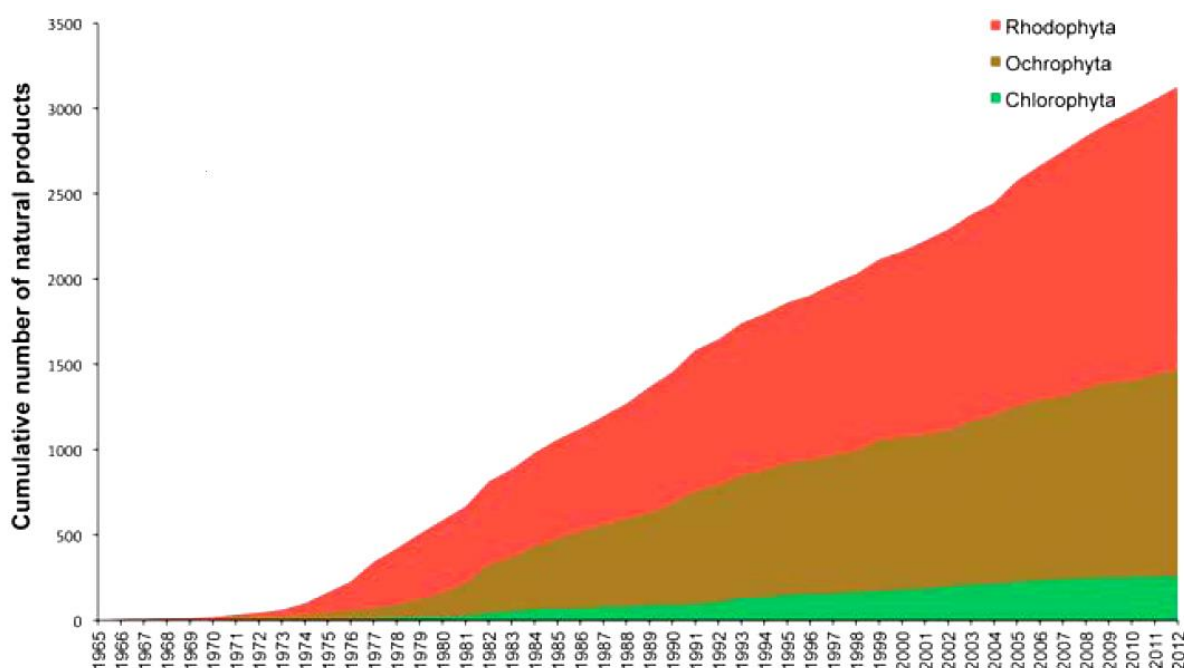


Figura 1 – Número acumulativo de produtos naturais identificados nos diferentes filos de macroalgas entre o período de 1965 – 2012.
Fonte: LEAL et al., 2013.

3.2.2.1 Atividade Antimicrobiana

Infecções fúngicas e bacterianas representam hoje um grande problema de saúde pública. Apesar da enorme gama de fármacos antimicrobianos disponíveis, assim como de sua evolução química-medicinal, o uso indiscriminado destes medicamentos resultou no aparecimento de patógenos resistentes (SHIVAKUMAR e SAFHI, 2013). O fenômeno da resistência microbiana impõe sérias limitações às opções para o tratamento e tem causado grandes prejuízos a saúde pública, uma vez que é a causa primária de morte nas unidades de cuidados intensivos nos hospitais em todo mundo (LIVERMORE, 2005). Estima-se que mais de 70% das

bactérias patogênicas apresentem resistência a pelo menos um antibiótico disponível para uso clínico (KATZ et al., 2006).

Desta maneira, a necessidade permanente do desenvolvimento de novos fármacos a serem utilizados no combate e/ou controle dos processos infecciosos causados por estes microrganismos permanece muito relevante no contexto científico mundial.

Na busca por novos antimicrobianos provenientes de produtos naturais, há um interesse crescente pela biodiversidade ainda inexplorada proveniente dos oceanos. Nesse contexto, as algas marinhas têm se mostrado uma rica fonte de substâncias com potencial biológico e aplicação terapêutica. A literatura tem relatado a atividade antimicrobiana de uma grande variedade de macroalgas pertencentes aos três grandes grupos (algas vermelhas, pardas e verdes), demonstrando que a capacidade de síntese de compostos antimicrobianos não se restringe a apenas um grupo de algas (SALVADOR et al., 2007; RAJASULOCHANA et al., 2009; GUPTA, RAJAURIA e ABU-GHANNAM, 2010; RHIMOU et al., 2010; CHRISTOBEL et al., 2011; KAVITA, SINGH e JHA, 2013; SHIVAKUMAR e SAFHI, 2013; TAN et al., 2013).

As estruturas exibidas pelos compostos antimicrobianos de origem algal variam de acíclicas a moléculas complexas policíclicas e inclui terpenóides, esteróides, compostos fenólicos, alcalóides, polissacarídeos e ácidos graxos; muitos desses compostos são halogenados (PATRA et al., 2009; CABRITA, VALE e RAUTER, 2010; ABAD, BEDOYA e BERMEJO, 2011; KAVITA, SINGH e JHA, 2013).

Rhimou e colaboradores (2010) estudaram a atividade antibacteriana de extratos de 26 espécies de algas vermelhas contra três bactérias gram-positivas e duas gram-negativas. Entre todos as algas analisadas, 96% dos extratos foram ativos contra pelo menos um dos cinco microrganismos testados.

O extrato de éter de petróleo da alga *Chaetomorpha antennina* demonstrou forte atividade antibacteriana sobre cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* a concentração de 50 µg/mL. No entanto, cepas de *B. cereus* e *K. pneumoniae* mostraram-se resistentes àquele extrato (SHIVAKUMAR e SAFHI, 2013).

Gupta, Rajauria e Abu-Ghannam (2010) relataram a inibição de 100% da degradação de alimentos comuns por bactérias, utilizando extratos das algas pardas *H. elongata*, *Laminaria saccharina* e *Laminaria digitata*. Ainda na área alimentícia,

Kanjana e colaboradores (2011) estudaram o efeito do extrato etanólico da alga vermelha *Gracilaria fisheri* como uma possível alternativa para a prevenção e tratamento da vibriose de camarão causada por *Vibrio harveyi*. O extrato apresentou atividade antimicrobiana contra uma cepa virulenta de *V. harveyi* com CIM entre 90 e 190 µg/mL, equivalente ao antibiótico norfloxacino, o que poderia proteger o camarão da infecção por esse microrganismo.

A partir do extrato metanólico da alga *Rhodomela confervoides* foram isolados bromofenóis. Um desses compostos foi identificado, através de análises espectroscópicas, como 3-bromo-4-[2,3-dibromo-4,5-dihidroxifenil]metil-5-(hidroximetil)1,2-benzenediol e mostrou-se um eficiente agente antibacteriano, apresentando CIM de 35 µg/mL para *S. epidermidis* ATCC 12228 e CIM de 70 µg/mL para *S. aureus* ATCC 29213 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 (XU et al., 2003).

Diterpenos bromados tetracíclicos isolados do extrato orgânico de *Sphaerococcus coronopifolius* apresentaram CIM entre 16 e 128 µg/mL contra uma variedade de bactérias, incluindo bactérias multirresistentes (SMYRNIOTOPOULOS et al., 2010).

Vairappan e colaboradores (2004) demonstraram a atividade antibacteriana de oito compostos halogenados isolados de cinco espécies da alga vermelha *Laurência*. Estes compostos apresentaram amplo espectro de ação contra bactérias gram-positivas, inclusive cepas resistentes aos antibióticos vigentes mais utilizados como penicilina e vancomicina.

Alguns autores têm sugerido que a produção de substâncias antimicrobianas varia dentro de uma mesma espécie e esta variabilidade intraespécie na produção de metabólitos secundários pode ser devido a variações sazonais, distribuição geográfica, a fase de crescimento ou maturidade sexual (DEL VAL et al., 2001; SALVADOR et al., 2007; CHRISTOBEL et al., 2011).

Salvador e colaboradores (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana de 82 espécies de algas marinhas coletadas durante as quatro estações. Dentre as macroalgas analisadas, 67% foram ativas contra pelo menos um dos seis microorganismos testados por eles. As algas vermelhas e marrons demonstraram uma maior atividade no período do outono, enquanto as algas verdes apresentaram um aumento da atividade no período do verão.

3.2.2.2 Atividade Citotóxica

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2012, estimaram-se 14,1 milhões de novos casos de câncer e 8,2 milhões de mortes causadas por esta doença. Números mais elevados quando comparados com os dados de 2008, onde estimaram-se 12,7 milhões de novos casos e 7,6 milhões de mortes.

No Brasil, o câncer é a segunda causa de morte, sendo somente ultrapassado pelas doenças cardiovasculares. Além disso, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima 580 mil novos casos de câncer no Brasil para 2014.

Apesar do considerável arsenal de fármacos já existente para o tratamento de neoplasias malignas e o sucesso terapêutico em vários tipos de tratamentos, ainda não se chegou a um composto ideal. A maior parte dos fármacos antineoplásicos disponíveis atualmente são tóxicos para as células normais e causam imunotoxicidade, o que afeta não só o desenvolvimento do tumor, mas também agrava a recuperação do paciente (MARY, VINOTHA e PRADEEP, 2012). Dessa forma, a busca por novos compostos mais seletivos, com menos efeitos colaterais, maior potência terapêutica e menor índice de resistência ainda é de extrema relevância no contexto científico mundial.

Produtos naturais originários de algas têm demonstrado atividades promissoras contra a incidência de tumores. O extrato metanólico da alga *Padina pavonia* demonstrou alta citotoxicidade contra linhagens de células de câncer de cérvix (HeLa) e mama (MDA-MB-453), com IC₅₀ de 86,45 µg/mL e 74,59 µg/mL, respectivamente. Além disso, esse extrato não exibiu nenhuma citotoxicidade significativa sobre células normais de fibroblastos de pulmão fetal humano (MRC-5), demonstrando sua seletividade para células cancerosas. Em adição, os resultados do estudo demonstraram que a atividade observada estava relacionada ao dano ao DNA e indução do processo de apoptose celular provocados pelo extrato (STANOJKOVI et al., 2013).

Stein e colaboradores (2011) avaliaram o efeito de extratos (hexânico, metanólico e clorofórmico) de diferentes espécies de algas do gênero *Laurencia* sobre células de sarcoma uterino humano (MES-AS). Os extratos hexânicos de *L. dendoidea* e de *L. translucida* exibiram forte ação antitumoral com IC₅₀ de 91 µg/mL e 16 µg/mL, respectivamente.

Extratos metanólicos das espécies *Scytosiphon lomentaria*, *Padina pavonica*, *Cystoseira mediterranea*, *Hypnea musciformis* e *Spyridia filamentosa* foram investigadas quanto ao potencial antitumoral em células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e de carcinoma de próstata (DU-145). *S. filamentosa* exibiu forte atividade, inibindo a viabilidade das células DU-145 em 90% e das células MCF-7 em 80% na concentração de 100 µg/mL. Além disso, *C. mediterrânea* inibiu 55% da viabilidade das células MCF-7 na mesma concentração de *S. filamentosa* (TASKIN et al., 2010).

A atividade citotóxica do extrato etanólico de *Sargassum sp.* foi avaliada sobre células MCF-7 e de câncer de fígado (Hep-2). O extrato demonstrou atividade antitumoral com IC₅₀ de 200 µg/mL e 250 µg/mL contra Hep-2 e MCF-7, respectivamente. O extrato foi capaz de induzir o encolhimento das células, a vesicularização na membrana celular e a formação de corpos apoptóticos (MARY, VINOTHA e PRADEEP, 2012).

O extrato lipídico de *Laurencia intricata* apresentou atividade inibidora do fator transcricional HIF-1. O fracionamento guiado por bioensaio deste extrato levou ao isolamento do diterpeno laurediterpineol que, em células T47D (linhagem de células tumorais de mama), foi capaz de inibir os fatores HIF-1 e o angiogênico VEGF induzidos por hipóxia e suprimir a sobrevivência de células tumorais nestas condições. Ainda não existem fármacos que atuem especificamente neste tipo de célula, desta forma, inibidores de HIF-1 podem representar uma potencial classe de agentes antitumorais (DIXON et al., 2007).

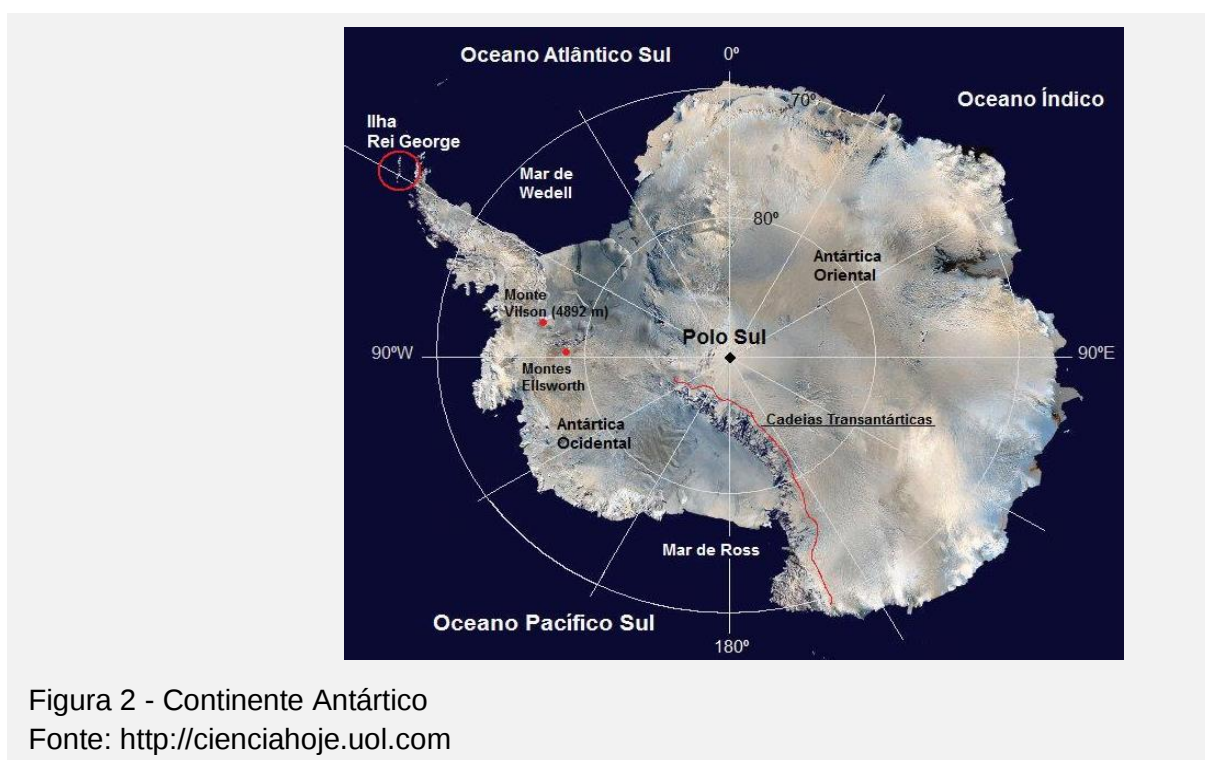
Extratos metanólico e aquoso de *Ulva fascinata* foram avaliados quanto ao potencial antitumoral em ratos portadores de linfoma ascítico de Dalton. Os ratos foram tratados com 200mg/Kg dos extratos por 14 dias. Os extratos foram capazes de diminuir o número de células tumorais e aumentar a sobrevida dos ratos tratados. Além disso, as alterações hematológicas e bioquímicas, observadas em animais controle com tumor, diminuíram significativamente nos animais tratados com os extratos da alga (ABIRAMI e KOWSALYA, 2012).

Guedes e colaboradores (2013) avaliaram o efeito antitumoral de extratos (diclorometânicos, clorofórmicos, metanólicos, etanólicos, hexânicos e aquosos) de diferentes espécies de algas verdes, pardas e vermelhas originárias da Costa Norte de Alagoas. O efeitos dos extratos foi avaliado sobre células de leucemia mielóide crônica (K562), carcinoma epidermóide de laringe (HEp-2) e carcinoma

mucoepidermóide de pulmão (NCI-H292). Extratos diclorometânico e clorofórmico da alga *Hypnea musciformis* exibiram os melhores resultados contra K562 com IC₅₀ de $3,8 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ e $6,4 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. O extrato diclorometânico de *D. dichotoma* ($16,3 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$), clorofórmico de *H. musciformis* ($6,0 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$) e clorofórmico de *P. gymnospora* ($8,2 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$) foram os mais ativos contra HEP-2; enquanto os extratos etanólico de *P. gymnospora* ($15,9 \pm 2,8 \mu\text{g/mL}$) e clorofórmico de *H. musciformis* ($15,0 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$) demonstraram-se mais ativos contra NCI-H292.

3.3 Continente Antártico

O continente antártico está localizado na região polar austral dentro do círculo polar com uma área aproximada de 14 milhões de km² banhado pelos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico conhecido como Confluência Antártica (**Figura 2**). Aproximadamente 95% do território são cobertos por gelo com camadas que chegam a 2700m de espessura. Esta região está dividida em duas partes importantes em relação ao meridiano de Greenwich, a Antártica Oriental, onde ocorrem paredões de gelo e a Antártica Ocidental formada principalmente por arquipélagos de ilhas, unidas entre si por grandes extensões de gelo (VIEIRA, 2006).



As temperaturas baixas, normalmente negativas, associadas a ventos em média de 100 km/h fazem surgir nesta região ecossistemas terrestres e aquáticos únicos deste local, muitas vezes com espécies endêmicas que suportam as mais adversas variações climáticas. O clima nesta região é caracterizado por temperaturas extremamente baixas, ficando em média nos -10°C . Já foram registradas temperaturas de -89°C nas proximidades da base russa de Vostok a uma altitude de 3400 m. (WIENCKE et al., 2007; WIENCKE e BISHOF, 2012).

O continente antártico apresenta inúmeras perspectivas de estudos ambientais servindo de estação de pesquisa em diversas áreas, principalmente na geológica, meteorológica, fauna e flora (ZACHER et al., 2009; RIBEIRO et al., 2011; RYAN et al., 2012). O Brasil aderiu ao Protocolo do Tratado da Antártica em 1975, começando suas pesquisas entre os anos de 1982 e 1983 com o surgimento do Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR). A base brasileira foi instalada em 1984, sendo denominada de Estação Antártica Comandante Ferraz, localizada na Península Keller, na parte interna da Bahia do Almirantado, na Ilha Rei George (Figura 3) (PROANTAR, 2014).



Figura 3 - Localização da estação de pesquisa antártica brasileira e outras estações de pesquisa internacionais na Ilha Rei George.

Fonte: <http://cienciahoje.uol.com.br/galeria>

3.3.1 Macroalgas da Antártica

As modificações abruptas no clima da Antártica associada a condições rigorosas de baixas temperaturas, exposição fotossintética limitada pelas estações, altos índices de salinidade e locais profundos no mar fazem com que esta região não apresente grandes diversidades de macroalgas como as encontradas em regiões tropicais, no entanto, a pouca diversidade é superada pela grande quantidade de biomassa formada pelas algas (WIENCKE et al., 2007).

Na Antártica, 35% das espécies de algas são endêmicas: 44% das algas pardas, 36% das algas vermelhas e 18% das algas verdes; e esse número é continuamente crescente. Só recentemente, Hommersand e colaboradores (2011) descreveram quatro novos gêneros e cinco novas espécies endêmicas de algas vermelhas.

Espécies endêmicas ecologicamente importantes incluem as algas pardas *Himantothallus grandifolius*, *Desmarestia anceps*, *D. menziesii*, *Cystosphaera jacquinotii*, *Ascoseira mirabilis*, as algas vermelhas *Myriogramme manginii*, *Georgiella confluens*, *Phycodrys antarctica*, *Trematocarpus antarcticus*, *Palmaria decipiens*, *Iridaea cordata*, *Pyropia endiviifolia*, entre outras (WIENCKE e BISHOF, 2012).

Nas últimas décadas, as macroalgas da Antártica têm sido estudadas intensivamente no que diz respeito à ecofisiologia, biodiversidade, relações biogeográficas, distribuição geográfica, exigências de luz e profundidade do zoneamento, efeito da temperatura e salinidade, sazonalidade da reprodução e características fisiológicas dos estágios de desenvolvimento, crescimentos sazonais e fotossíntese, componentes elementares e nutricionais, defesas químicas e físicas contra herbívoros (WIENCKE et al., 2007; WIENCKE e BISHOF, 2012). No entanto, embora um considerável progresso tenha sido alcançado nos últimos anos, o nosso conhecimento atual sobre a bioatividade de macroalgas da região Antártica ainda é fragmentado.

O ambiente natural das algas antárticas é caracterizado por condições abióticas extremas, como temperaturas baixas constantes, longos períodos sob cobertura de gelo e neve e forte sazonalidade do regime de luz (ZACHER et al., 2011). Em latitudes mais baixas, como por exemplo, na Ilha Rei George, o período de dia varia entre 20 h no verão e 5 h no inverno. Além disso, as macroalgas dessa

região são expostas ao escuro ou baixas irradiâncias por cerca de 10 meses e à dessecação e altas irradiâncias no verão (WIENCKE e BISHOF, 2012). Com relação a variações de temperatura, já foram observadas temperaturas de 14 °C em poças de maré durante o verão, sendo que no inverno a temperatura pode chegar a – 27 °C (WIENCKE e BISHOF, 2012).

Para sobreviver nas condições ambientais extremas, as algas da Antártica têm desenvolvido estratégias de sobrevivência e adaptação. O aparato fotossintético é eficiente e adaptado e toda a maquinaria bioquímica metabólica é versátil e tem máxima eficiência a baixas temperaturas (WIENCKE e BISHOF, 2012). Essas estratégias de adaptação resultam na produção de uma enorme diversidade de compostos que, como demonstrado em inúmeros estudos envolvendo diferentes espécies de algas, podem ser biologicamente ativos e possuir potencial farmacológico e terapêutico. Dessa forma, o estudo das algas marinhas antárticas na busca por compostos biologicamente ativos que possam ser aplicados na terapêutica, mais eficazes e/ou menos tóxicas, e com atividades farmacológicas semelhantes ou maiores às comercialmente disponíveis, tem se mostrado bastante interessante para a área científica.

3.3.1.1 Características e Classificação das espécies *Iridaea cordata*, *Pyropia endiviifolia*, *Himantothallus grandifolius* e *Cystosphaera jacquinotii*

3.3.1.1.1 Macroalga *Iridaea cordata* (Turner) Bory de Saint-Vincent

A macroalga *I. cordata* (**Figura 4**) apresenta talo lamelar irregular, lâmina lisa e plana em formato de coração (cordata) ou lanceolada. Atinge comprimento de 15cm individualmente ou em torno de 30 cm quando agrupada. Essa espécie corre em toda extensão na Baía do Almirantado, podendo ser encontrada em locais entre 10m e 60m de profundidade (ZIELINSKI, 1990).



Figura 4 – Macroalga *Iridaea cordata*

Fonte: Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto Botânico de São Paulo

Foto: Prof. Dra. Mutue Toyota

Classificação:	Filo:	Rhodophyta
	Classe:	Florideophyceae
	Ordem:	Gigartinales
	Família:	Gigartinaceae
	Gênero:	Iridaea

3.3.1.1.2 Macroalga *Pyropia endiviifolia* (A.Gepp & E.Gepp) H.G.Choi & M.S.Hwang

A espécie *P. endiviifolia* (**Figura 5**) apresenta talo lamelar sésil, com coloração verde oliva escura ficando acastanhado ao secar. Lâmina brilhante com bordas finas, membranosas e onduladas, podendo ser inteira ou dividida em vários lobos, tendo de 2 cm a 20 cm de diâmetro e espessura entre 60 μ e 70 μ . São macroalgas encontradas em paredões ou fendas rochosas, ocorrendo principalmente na parte central da Baía do Almirantado (ZIELINSKI, 1990; WIENCKE; CLAYTON, 1998).



Figura 5 – Macroalga *Pyropia endiviifolium*

Fonte: Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto Botânico de São Paulo

Foto: Prof. Dra. Mutue Toyota

Classificação:	Filo:	Rhodophyta
	Classe:	Bangiophyceae
	Ordem:	Bangiales
	Família:	Bangiaceae
	Gênero:	Pyropia

3.3.1.1.3 Macroalga *Himantothallus grandifolius* (A.Gepp & E.S.Gepp) Zinova

Himantothallus grandifolius (**Figura 6**) apresenta talo em forma de banda e folha tipo filóide com bordas irregulares. Os talos se estreitam a medida que se aproximam da porção final, formando um curto e achatado caulóide, geralmente helicoidal. Os talos dessa espécie podem atingir 1 m de largura e 15-25 m de comprimento. *H. grandifolius* geralmente está aderida a rochas e pedras como um rizoide, sendo encontrada em profundidades de 10 a 100 m. Comum em toda a Baía do Almirantado.



Figura 6 – Macroalga *Himantothallus grandifolius*

Fonte: Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto Botânico de São Paulo

Foto: Prof. Dra. Mutue Toyota

Classificação:	Filo:	<i>Ochrophyta</i>
	Classe:	Phaeophyceae
	Ordem:	Desmarestiales
	Família:	Desmarestiaceae
	Gênero:	<i>Himantothallus</i>

3.3.1.1.4 Macroalga *Cystosphaera jacquinotii* (Montagne) Skottsberg

A macroalga *C. jacquinotii* (**Figura 7**) apresenta talo de morfologia diversificada, desde rizóide sem apêndices até caulóide dicotomicamente simétrico. Possui pneumatócitos na porção inferior do talo na base dos filóides e órgãos reprodutores localizados na porção superior do talo também na base dos filóides. Os talos chegam a alguns metros de comprimento e ocorrem nas profundidades de 20-50 m. Essa espécie ocorre somente na porção central da Baía do Almirantado.



Figura 7 – Macroalga *Cystosphaera jacquinotii*

Fonte: Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto Botânico de São Paulo

Foto: Prof. Dra. Mutue Toyota

Classificação:	Filo:	<i>Ochrophyta</i>
	Classe:	Phaeophyceae
	Ordem:	Fucales
	Família:	Seirococcaceae
	Gênero:	<i>Cystosphaera</i>

PARTE III

Capítulo 1

ARTIGO CIENTÍFICO

Todos os resultados dessa dissertação serão apresentados na forma de artigo científico, a ser submetido ao periódico internacional *Polar Biology*.

Antimicrobial potential and cytotoxic activity on cancer and non-cancer cell lines of seaweeds extracts from Antarctica

Rosiane Mastelari Martins¹, Fernanda Nedel², Adriana Piva², Pio Colepicolo³, Claudio M. P. de Pereira¹, Rafael Guerra Lund^{1,2}.

¹ Post-graduate Program in Biochemistry and Bioprospection, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

² School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

³ State University of São Paulo, SP, Brazil.

Corresponding Author: Rafael Guerra Lund, School of Dentistry, Federal University of Pelotas (UFPel) – Rua Gonçalves Chaves, 457/504, Zip code: 96015-000, Pelotas RS Brazil, Tel/Fax: + 00 55 53 3222-6690; E-mail: rafael.lund@gmail.com

Abstract

Seaweeds are considered as a source of bioactive compounds as they are able to produce a great variety of secondary metabolites characterised by a broad spectrum of biological activities. Antarctica is characterized by the extremely abundant aggregations of macroalgae, however, our current knowledge about the macroalgae of that region is still fragmented. This study aimed to evaluate the antimicrobial activity and cytotoxic activity on cancer and non-cancer cell lines of different extracts (hexane, chloroform, ethyl acetate and ethanol) of four seaweeds from Antarctic: *Cystosphaera jacquinotii*, *Iridaea cordata*, *Himantothallus grandifolius* and *Pyropia endiviifolia*. The antimicrobial activity was evaluated by the broth microdilution method. The extracts were assessed against *Staphylococcus aureus* ATCC 19095, *Enterococcus faecalis* ATCC 4083, *Escherichia coli* ATCC29214, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 62342 and clinical isolates from the human oral cavity of *C. albicans* (3), *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. lipolytica* e *C. famata*. Cytotoxicity was evaluated on human epidermoid carcinoma (A-431) and mouse embryonic fibroblast (NIH/3T3) cell lines by MTT colorimetric assay. Ethyl acetate extract of *H. grandifolius* showed noticeable antifungal activity against all fungal strains tested, including fluconazole resistant samples. Findings of cytotoxicity investigation on cancer cell line revealed that ethyl acetate extract of *I. cordata* shows very strong activity against A-431 cancer cell line, increasing the inhibitory ratio to 91.1% and 95.6% at the concentration of 500 µg mL⁻¹ after 24 and 48h of exposure, respectively. Most of algal extracts tested showed very low or no cytotoxicity effect on normal cell line.

Keywords: Marine Natural Products. Seaweed. Antarctic regions. Antibacterial agents. Antifungal agents. Antineoplastic agents.

1. Introduction

Nature is an amazing source of chemical diversity and, as a consequence, naturally-derived compounds have unique pharmacological properties. This is easily observed if we consider that nearly 60% of all drugs introduced in therapy between 1981 and 2006 are based on natural products. This number rises to 75% if we only consider cancer drugs (Newman and Cragg 2007; Harley 2008).

As a consequence of an increasing demand in screening for new therapeutic drugs from natural products, there is a greater interest towards marine organisms. Although the diversity of life in the terrestrial environment is extraordinary, the greatest biodiversity is in the world's oceans, with 34 of the 36 phyla of life represented (Donia and Hamann 2003; Fenical 2006). The oceans cover more than 70% of the earth's surface and contain an extraordinary diversity of life, representing an enormous resource for the discovery of potential therapeutic agents (Thakur et al. 2008; Ngo et al. 2012).

Products from marine origin have been increasingly used in human health, a trend that is likely to grow in the future. Due to the harsh conditions that challenge marine organisms, such as low temperatures and light availability and high pressure, among others, marine organisms respond by synthesizing a number of secondary metabolites, some of them with potent pharmacological properties (Mayer et al. 2009; El Gamal 2010; Villa and Gerwick 2010; Mayer et al. 2011).

Algae are a heterogeneous group of marine organisms that are commonly divided based on size: microalgae and macroalgae. Macroalgae, also known as seaweeds, display a complex and dynamic taxonomy. The three main algal phyla are Rhodophyta (red algae), Ochrophyta (brown algae) and Chlorophyta (green algae) (Leal et al. 2013).

Macroalgae have been referenced for producing molecules with amazing chemical diversity and, consequently, have interesting effects in human health. There are numerous reports of compounds derived from macroalgae with a broad range of biological activities, such as antibacterial, antifungal, antiviral, antitumoral, anticoagulant and antioxidant (Kumaran et al. 2010; Bouhlal et al. 2011; Pereira et al. 2011; Shalaby 2011; Omar et al. 2012; Vijayabaskar and Shiyamala 2012; Kavita, Singh and Jha 2013; Sathya et al. 2013; Shivakumar and Safhi 2013; Liang et al. 2014; Rabanal et al. 2014). Compounds with biological activities have been detected in green, brown and red algae. Thus, there is a growing interest in the area of research on the positive effect of algae on human health and other benefits.

Antarctic region is characterized by the extremely abundant aggregations of macroalgae, strongly contrasting with the absence of a diversified terrestrial flora (Wiencke et al. 2007). However, although considerable progress has been achieved in recent years, our current knowledge about the macroalgae of that region is still fragmented. So far reports of pharmacological investigation about seaweeds from Antarctica are poorly described in the literature. On the basis of these considerations, the purpose of the present study was to evaluate the antimicrobial potential and cytotoxic activity on cancer and non-cancer cell lines of seaweeds extracts from Antarctica.

2. Materials and Methods

2.1 Macroalgae samples

Specimens of macroalgae were collected during January and February 2012, in the Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. Macroalgae investigated and collect information are listed in **Table 1**. The seaweeds were washed with local sea water to remove all the extraneous matter such as epiphytes, sand particles, pebbles and shells and brought to the laboratory in plastic bags.

Table 1- List of the species used in the experiments and collection information.

Species	Collection Data
<i>Cystosphaera jacquinioti</i> (Montagne) Skottsberg	Punta Henrequinn (62°7'32.77" x 58°23'38.03") 16 th January, 2012
<i>Iridaea cordata</i> (Turner) Bory de Saint-Vincent	Arctowski (62°7'32.77" x 58°23'38.03") 3 rd February, 2012
<i>Himantothallus grandifolius</i> (A.Gepp & E.S.Gepp) Zinova	Punta Plaza (62°5'34.82" x 58°24'15.27") 29 th January, 2012
<i>Pyropia endiviifolia</i> (A.Gepp & E.Gepp) H.G.Choi & M.S.Hwang	Demay (62°13'21.01" x 58°26'36.59") 27 th January, 2012

2.2 Preparation of extracts

The lyophilized biomass (5g) of each macroalgae were extracted sequentially with 150mL of different solvents (*i.e.*, hexane/ chloroform/ ethyl acetate/ ethanol) using a Soxhlet apparatus for 6h at a temperature not exceeding the boiling point of the solvent. This procedure was repeated 2 to 3 times to obtain a sizable quantity of extract. The solvent was removed from each extract under reduced pressure at 20 to 25 °C. Final drying was carried out under a stream of N₂. These extracts were weighed and stored at -20°C until use.

2.3 Antimicrobial activity

2.3.1 Microorganisms

Antimicrobial activity of algal extracts [hexane (HE), chloroform (CE), ethyl acetate (AE) and ethanol (EE) extracts] was determined against two representatives of human Gram-positive bacteria, *Staphylococcus aureus* ATCC19095 and *Enterococcus faecalis* ATCC4083; two Gram-negative bacteria *Escherichia coli* ATCC29214 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 and eight strains representing five different species of yeasts: *Candida albicans* ATCC62342 and clinical isolates from the human oral cavity of the *C. albicans* (3), *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. lipolytica* e *C. famata*. The microorganisms were maintained on mueller-hinton agar and sabouraud dextrose agar to bacteria and fungi, respectively, at 4°C and reactivated before use.

2.3.2 Broth Microdilution test

The antimicrobial assay was carried by the Broth Microdilution method according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) for yeasts (M27-A3) and for bacteria (M7-A7).

Microbial strains were primarily inoculated for overnight growth. A number of colonies were directly suspended in saline solution until an equivalent turbidity to a 0.5 Mc Farland standard. This suspension was then adjusted to obtain a working concentration of 5×10^5 colony forming units (CFU) mL⁻¹. Mueller-Hinton broth (BD, Sparks, MD, USA) and RPMI-1640 (Sigma, St Louis, MO, USA) buffered to pH 7.0 with MOPS were applied for growing and diluting the bacteria and fungi suspensions, respectively. Dilutions of the tetracycline, chloramphenicol and fluconazole were used as reference compounds for comparison of data between independent experiments and as indicators for assessing the relative level of inhibition of the samples tested. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as diluent to obtain desired concentration of the extracts and reference drugs.

Diluted samples were serially transferred in duplicate to 96-well microplates and 100 µL of microbial inoculum were added to achieve a final volume of 200 µL and concentrations ranging from 1 to 500 µg mL⁻¹. The final concentration of DMSO in the assay did not exceed 0.5%, a concentration which is nontoxic to cells (Li et al. 2007). Controls of the microbial viability, sterility of the medium and sterility the extract were also carried out. The plates were incubated at 37°C for 24 h for bacteria and 48h for fungi. Plates were read at 630 nm for bacteria or 590nm for fungi, before and after incubation. The antimicrobial effect was characterized by IC₅₀ values, the concentration that affords 50% inhibition of bacterial/fungal growth relative to the growth control; and MIC values, the lowest concentration of substance required for a complete inhibition of the bacterial and fungal growth after incubation time. IC₅₀ values were determined from logarithmic graphs of growth inhibition versus concentration. Tests were carried out in duplicate.

2.3.3 Determination of MMC

After determining the MIC, the minimal microbicidal concentration (MMC) was done. Aliquots of 20 µL of the wells were plated on Mueller Hinton Agar for bacteria or Sabouraud Dextrose Agar for fungi and incubated at 37°C for 24 hours. MMC was defined as the lowest concentration of each extract that resulted in no cell growth on the surface of the plates.

2.4 Determination of Cytotoxicity

2.4.1 Cell culture

Cytotoxicity was evaluated using the human epidermoid carcinoma (A-431), and mouse embryonic fibroblast (NIH/3T3) cell lines. The cells were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (PABCAM, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium, supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), purchased from Cultilab (Campinas, Brazil) and Gibco (Grand Island, NY, USA), respectively. Cells were grown at 37 °C in an atmosphere of 95% humidified air and 5% CO₂, as described previously (Santana et al. 2012; Nedel et al. 2012). The experiments were performed with cells in the logarithmic phase of growth.

2.4.2 MTT assay

The viability of cells was determined by measuring the reduction of soluble MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] to water insoluble formazan (Henn et al. 2011). Briefly, cells were seeded at a density of 2×10^4 cell per well in a volume of 100 μL in 96-well plates and grown at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 /95% air for 24 h before being used in the MTT assay. Cells were incubated with different concentration of extracts (31.25 – $500\mu\text{g mL}^{-1}$) for 24 and 48h. These compounds were dissolved in DMSO and added to the DMEM supplemented with 10% FBS to the desired concentrations. The final DMSO concentration in the culture medium never exceeded 0.5% and a control group exposed to an equivalent concentration of DMSO was evaluated. After incubation the media was removed and 180 μL of DMEM and 20 μL MTT (5 mg MTT/mL solution) was added to each well. The plates were incubated for an additional 3 h and the medium was discarded. 200 μL of DMSO was added to each well, and the formazan was solubilised on a shaker for 5 min at $100 \times g$. The absorbance of each well was read on a microplate reader (MR-96A, Mindray Shenzhen, China) at a wavelength of 492 nm. The percentage inhibition of cell growth was determined as follows: inhibitory rate = $(1 - \text{Abs}_{492\text{treated cells}} / \text{Abs}_{492\text{control cells}}) \times 100$ (Nedel et al. 2012). All observations were validated by at least two independent experiments.

3. Results

The results of antimicrobial screening of the extracts and standards drugs (characterized by IC_{50} , MIC and MMC values, $\mu\text{g mL}^{-1}$) against a panel of selected microbial strains are reported in the **Table 2**. Regarding antibacterial activity of the different extracts, the AE of *C. jacquinotii* was the most active one, with IC_{50} $46.75\mu\text{g mL}^{-1}$ and MIC $500\mu\text{g mL}^{-1}$ against *E. faecalis*. None of others extracts showed *in vitro* antibacterial activity against tested bacterial strains at concentration up to $500\mu\text{g mL}^{-1}$.

As regards the antifungal activity, AE of *H. grandifolius* gave notable antifungal activity amongst all the extracts studied and, in addition, it has shown to possess not only fungistatic but also fungicidal capacity. The antifungal results of ethyl acetate extract of *H. grandifolius* have shown IC_{50} values ranging from 4.94 to $49.50\mu\text{g mL}^{-1}$ and MIC and MMC values ranging from 31.25 to $500\mu\text{g mL}^{-1}$. The others extracts showed only low or no activity against fungal strains of the panel at concentration up to $500\mu\text{g mL}^{-1}$.

The AE of *H. grandifolius* was active against fluconazole resistant strains, *C. albicans* ATCC62342 and *C. albicans* clinical isolate 1. Although the IC_{50} values are lower comparable to those of fluconazole; MIC and MMC are better, with values of 500 and $250\mu\text{g mL}^{-1}$ against *C. albicans* ATCC62342 and *C. albicans* clinical isolate 1 respectively; while these values are $>500\mu\text{g mL}^{-1}$ for fluconazole. This extract exhibited activity equal to fluconazole against *C. albicans* clinical isolate 3 (MMC $62.5\mu\text{g mL}^{-1}$) and *C. albicans* clinical isolate 4 (MIC and MMC $31.25\mu\text{g mL}^{-1}$). Furthermore, AE showed equal MIC ($125\mu\text{g mL}^{-1}$) and better MMC ($125\mu\text{g mL}^{-1}$) value than did fluconazole (MMC $250\mu\text{g mL}^{-1}$) against *C. glabrata*.

The results for cytotoxicity screening of the extracts against NIH/3T3 cell line are shown in **Figure 1**. In general, the extracts presented very low or no cytotoxicity effect, with an inhibitory ratio lower than 50%. Exception was the CE of *H. grandifolius*. As shown in Figure 1, in the concentration of 250 and $500\mu\text{g mL}^{-1}$ of CE of *H. grandifolius* the cytotoxicity was increased to $48.3/57.1\%$ (24/48h) and $64.5/82.5\%$ (24/48h), respectively.

196 Table 2 - *In vitro* antimicrobial activities of extracts and reference drugs against human pathogens.

Species (Extract)	Assay	Microbial strains												
		(µg mL ⁻¹)	<i>C.a</i>	<i>C.a1</i>	<i>C.a2</i>	<i>C.a3</i>	<i>C.p</i>	<i>C.g</i>	<i>C.l</i>	<i>C.f</i>	<i>S.a</i>	<i>E.c</i>	<i>P.a</i>	<i>E.f</i>
<i>Cystosphaera jacquinotii</i> (HE)	IC ₅₀	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	MIC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	MMC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Cystosphaera jacquinotii</i> (CE)	IC ₅₀	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	MIC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	MMC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Cystosphaera jacquinotii</i> (AE)	IC ₅₀	—	—	—	—	174.4	—	—	—	—	—	—	—	46.75
	MIC	—	—	—	—	500	—	—	—	—	—	—	—	500
	MMC	nd	nd	nd	nd	500	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	—
<i>Cystosphaera jacquinotii</i> (EE)	IC ₅₀	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	MIC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	MMC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Iridea cordata</i> (HE)	IC ₅₀	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	MIC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	MMC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Iridea cordata</i> (CE)	IC ₅₀	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	MIC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	MMC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Iridea cordata</i> (AE)	IC ₅₀	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	MIC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	MMC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Iridea cordata</i> (EE)	IC ₅₀	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	MIC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	MMC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Himantothallus grandifolius</i> (HE)	IC ₅₀	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	MIC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	MMC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Himantothallus grandifolius</i> (CE)	IC ₅₀	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	MIC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

(continue on next page)

<i>Himantothallus grandifolius</i> (AE)	MMC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	IC ₅₀	49.59	46.75	17.40	4.94	19.68	29.96	13.63	25.84	–	–	–	–
	MIC	500	250	62.5	31.25	250	125	62.5	125	–	–	–	–
<i>Himantothallus grandifolius</i> (EE)	MMC	500	250	62.5	31.25	250	125	62.5	125	nd	nd	nd	nd
	IC ₅₀	334.40	172.60	101.60	39.30	136.30	295.51	269.60	29.96	–	–	–	–
	MIC	–	–	–	500	–	–	–	125	–	–	–	–
<i>Pyropia endiviifolia</i> (HE)	MMC	nd	nd	nd	500	nd	nd	nd	125	nd	nd	nd	nd
	IC ₅₀	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	MIC	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Pyropia endiviifolia</i> (CE)	MMC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	IC ₅₀	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	MIC	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Pyropia endiviifolia</i> (AE)	MMC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	IC ₅₀	–	402.91	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	MIC	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Pyropia endiviifolia</i> (EE)	MMC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	IC ₅₀	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	MIC	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Reference drugs	MMC	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	IC ₅₀	5.34	21.21	<1	<1	<1	14,58	<1	<1	nt	nt	nt	nt
	MIC	–	–	1.95	31.25	3.9	125	3.9	3.9	nt	nt	nt	nt
Fluconazole	MMC	nd	nd	62.5	31.25	7.8	250	7.8	3.9	nt	nt	nt	nt
	IC ₅₀	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	2.1	148.7	1.92	1.94
	MIC	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	3.9	250	3.9	3.9
Chloramphenicol	MMC	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	62.5	500	31.25	31.25
	IC ₅₀	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	<1	36.39	<1	<1
	MIC	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	<1	62.5	<1	<1
Tetracycline	MMC	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	3.9	500	3.9	15.62

197 (–): > 500 µg mL⁻¹; nd: not determined as MIC was greater than 500 µg mL⁻¹; nt: not tested.

198 HE: Hexane extract; CE: Chloroform extract; AE: Ethyl acetate extract; EE: Ethanol extract.

199 Microbial strains: Ca: *Candida albicans* ATCC62342, Ca1: *Candida albicans* clinical isolate 1, Ca2: *Candida albicans* clinical isolate 2, Ca3: *Candida albicans* clinical
200 isolate 3, Cp: *Candida parapsilosis* clinical isolate, Cg: *Candida glabrata* clinical isolate, Cl: *Candida lipolytica* clinical isolate, Cf: *Candida famata* clinical isolate, Sa:
201 *Staphylococcus aureus* ATCC19095, Ec: *Escherichia coli* ATCC29214, Pa: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, Ef: *Enterococcus faecalis* ATCC4083.

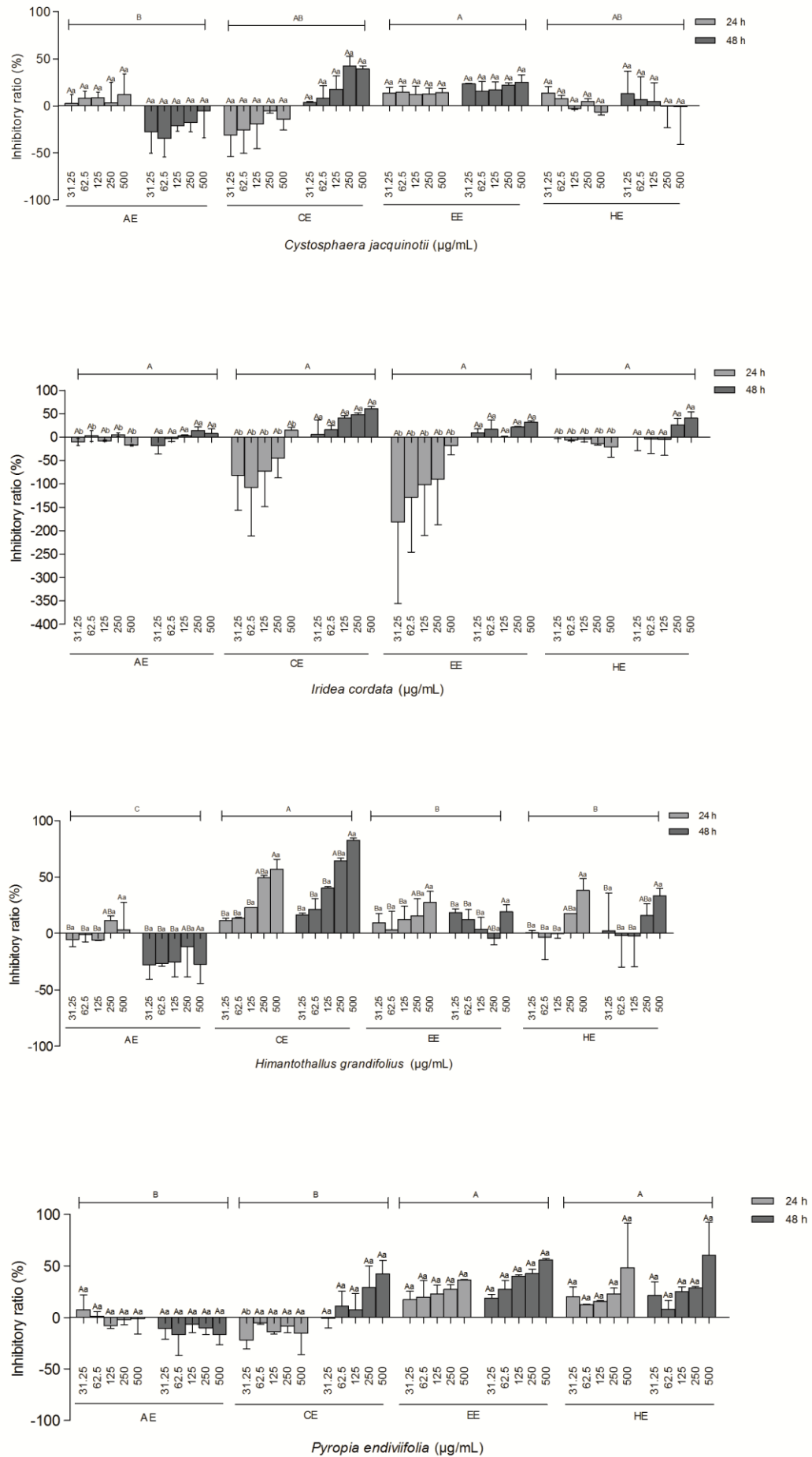


Figure 1. Effect of different types and concentrations of algal extracts following exposure for 24 and 48 h on the inhibition of NIH/3T3 cell line. Data are expressed as means $\pm$ SEM. Uppercase letters indicate significant differences between concentrations and lowercase letters indicate significant differences between times of exposure. () indicates significant differences between the types of extracts. A p-value < 0.05 was considered significant (Tukey test).

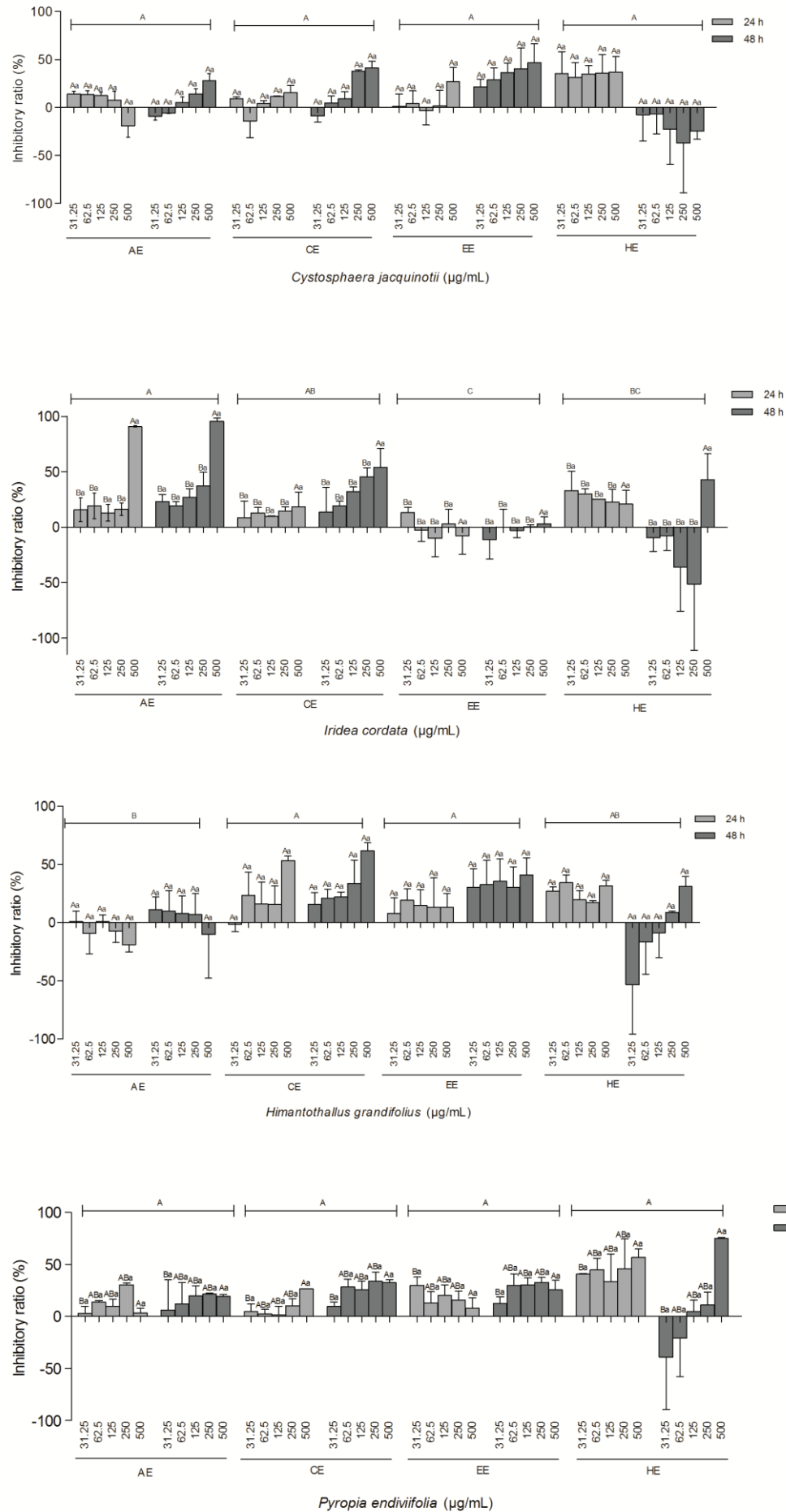


Figure 2. Effect of different types and concentrations of algal extracts following exposure for 24 and 48 h on the inhibition of A431 cell line. Data are expressed as means $\pm$ SEM. Uppercase letters indicate significant differences between concentrations and lowercase letters indicate significant differences between times of exposure. () indicates significant differences between the types of extracts. A p-value < 0.05 was considered significant (Tukey test).

The cytotoxicity of the algal extracts on cancer cell line (A-431) is shown in **Figure 2**. Regarding the cytotoxic effect of *C. jacquiniotii*, extracts presented low cytotoxicity effect on A-431 cell line, with an inhibitory ratio lower than 50%. No statistical difference was found between different types and concentrations of algal extracts and times of exposure (24 and 48h). The AE of *I. cordata* displayed the highest cytotoxic activity between all extracts tested on A-431 cell, increasing the inhibitory ratio to 91.1% and 95.6% at the concentration of 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ after 24 and 48h of exposure, respectively. Statistical difference was not found between the times of exposure (24 and 48h) of *I. cordata* against A-431 cells.

With regards to *H. grandifolius* extracts, CE and EE showed the highest inhibitory ratio against A-431 cells. Concentration of 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of CE increased cytotoxicity to 53.3% and 61.6% after 24 and 48h of exposure, while the same concentration of EE was able to increase the cytotoxicity to 41% after 48h of exposure. However, no statistical difference was found between both extracts.

The HE of *P. endiviifolia* increased the inhibitory ratios to 56.6% and 74.9% at concentration of 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ after exposure to extract for 24 and 48h, respectively. However, no statistical differences were found between all extracts of *P. endiviifolia*.

4. Discussion

Seaweeds are considered as a source of bioactive compounds as they are able to produce a great variety of secondary metabolites characterised by a broad spectrum of biological activities. 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.

The bioactivity of seaweeds may be influenced by some factors such as extraction protocols and extraction capacity of the solvents used, specie of macroalgae, habitat and the season of algal collection, different growth stages of plant, experimental methods, etc.

Although a variety of solvents have been employed in screening seaweeds for biological activity, it is still uncertain what kind of solvent is the most effective and suitable for extraction of seaweeds. Some studies concerning the effectiveness of extraction methods highlight that methanol extraction yields higher antimicrobial activity than ethyl acetate (Manilal et al. 2009; Galal, Salem and El-deen 2011), whereas others report that ethyl acetate and chloroform are better than ethanol and methanol (Patra et al. 2009). According to our experimental results of antimicrobial and anti-cancer investigation, ethyl acetate expressed better results than hexane, chloroform and ethanol. This result could be related to the presence of bioactive metabolites which are soluble in ethyl acetate but not or little soluble in the others solvents used. The structure of bioactive metabolites of the species will be examined in our next investigation.

There are also reports with different results for the same species of algae. Some authors have suggested that the production of antimicrobial substances varies within a species and this variability in the production of secondary metabolites may be due to seasonal variations, geographic distribution, stage of growth or sexual maturation (Del Val et al. 2001, Salvador et al. 2007; Christobel et al. 2011). Salvador et al. (2007) collected samples of 82 species of marine algae during all four seasons and tested their antimicrobial activities. Our results could be different if our seaweeds samples had been collected during others seasons or stage of growth and sexual maturation.

Studies have reported that dried extracts have less or no effect on microorganisms in comparison to the fresh extracts (Tuney et al. 2006; Kolanjinathan and Stella 2009). They suggested that this result can be related to loss of active compounds in the samples, such as peroxide, terpenoid, bromo-ether compounds or volatile fatty acids, during the drying process. This could explain our results, since most of extracts did not show any *in vitro* activity against tested microbial strains at concentration up to 500 µg mL⁻¹.

Most authors use agar diffusion assays to determine the antimicrobial activity of algal extracts. The technique works adequately with well-defined inhibitors, but with extracts that contain unknown components there are problems with false positive and false negative results. 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. Furthermore, this technique also cannot distinguish between bactericidal/fungicidal (the lowest concentration of the agent that results in no growth) and bacteriostatic/fungistatic (the lowest concentration of the agent that results in the maintenance or reduction of the inoculum) effects and does not permit determination of the minimum inhibitory concentration (MIC).

The choice of the broth microdilution test to determine the sensibility of the strains to seaweeds extracts, as recommended by CLSI, was based on the advantages of easy reproducibility, inexpensive, relatively quick and 30-fold more sensitive than other methods commonly used in the literature (Arthington-Skaggs et al. 2002; Ostrosky et al. 2008; Stein et al. 2011). In addition, it requires only a small quantity of sample, can be applied to a large number of samples, very useful for screening (Stein et al. 2011).

Candida species are important pathogens correlated with 8 to 10% of opportunistic infections can affect the skin, oral cavity, esophagus, gastrointestinal tract, vagina and vascular system (Mishra et al. 2007; Martins et al. 2009). In the last few decades, the incidence of opportunistic fungal infections especially invasive has increased (Sundriyal et al. 2006, Kunzler et al. 2013). The fundamental reason for this is, in part, the increasing number of patients at risk, such as those under advanced age, major surgery, immunosuppressive therapy, AIDS and cancer treatment, solid-organ and haematopoietic stem cell transplantation, among others (Nucci and Marr 2005; Martins et al. 2009). The *C. albicans* is regarded as the main agent of these infections, but non-albicans species has also been correlated with increased fungal infections (Oliveira et al. 2013).

Despite being widely used, antifungal agents have certain limitations due to side effects such as toxicity and the emergence of resistant strains, especially resistance to fluconazole via efflux pumps mechanism (Kunzler et al. 2013; Shivakumar and Safhi 2013; Souza et al. 2013). The growing of antifungal resistance to the commercially drugs associated with an increase on the incidence of fungal infections causes serious problems to the public health, thus there is an urgent need for the development of new compounds with low cytotoxicity and potential for treatment of mycoses.

H. grandifolius appears to be a particularly interesting alga, showing activity against all fungal strains tested, including fluconazole resistant samples. According to Sufian et al. (2013), plant extracts having MIC values below 1000 µg mL⁻¹ are considered noteworthy while isolated compounds are considered active with MICs ≤ 100 µg mL⁻¹. Therefore, on the basis of this criterion, AE was clearly the most active extract, demonstrating equal or better values than fluconazole, the reference drug. Moreover, MIC/MMC values >69 µg mL⁻¹ are considered toxics for fluconazole (CLSI 2008), while AE did not display any cytotoxic effects at concentration up to 500 µg mL⁻¹.

Comparison of the all different fungal strains indicates that *C. albicans* clinical isolate 4 was the most susceptible, while *C. albicans* ATCC62342 was the most resistant one. These results demonstrate that the sensitivity of *Candida* to seaweed extracts varies according to the different strains and species of the genus *Candida*.

AE of *H. grandifolius* was found to have no cytotoxicity effect on normal cell line, demonstrating a possible ability to selectively kill yeast cell but do little damage to normal cell. Furthermore, most of algal extracts tested showed very low or no cytotoxicity effect on normal cell line, this could open possibilities to investigate other important biological activities that these algal extract could present. Some extracts, such as CE and EE of *I. cordata*, were able to stimulate the growth of normal cell line. This data may be useful to others investigations, such as studies concerning healing processes.

Oral cancer constitute major worldwide public health problem, with more than 260 000 new cases reported annually over the world (Museedi and Younis 2014). In spite of advances in diagnosis and oncological treatment, the 5-year survival rate is approximately 50% and has remained more or less fixed for the last 50 years (Stefanuto et al. 2014). Epidermoid carcinoma is the most common malignant neoplasm of the oral cavity, representing over 90 percent of these tumors (Museedi and Younis 2014).

In the present study, findings of cytotoxicity investigation on epidermoid carcinoma cell line revealed that AE of *I. cordata* showed very strong activity against A-431 cell at concentration of 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$. However, the cytotoxicity assay used in the present study could only provide preliminary data to help identify compounds with potential anticancer properties. Furthermore, subsequent fractionation or isolation of the individual components of extracts that showed antimicrobial and antitumor activities 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. Further research need to be explored to study the bioactive compounds of studied seaweeds and for the successful implication of them as a potent therapeutic tool.

In conclusion, the present study indicated that ethyl acetate extract of *H. grandifolius* was the most active extract against fungal samples. The ethyl acetate extract of *I. cordata* was the most cytotoxic on cancer cell line. In general, the algal extracts tested were not cytotoxic on non-cancer cell line.

Acknowledgements

To Brazilian Antarctic Program (ProAntar) and Botanical Institute of São Paulo by collection and identification of the algae species, and to Brazilian research funding agencies FAPERGS, FAPESP, CAPES and CNPq.

References

Arthington-Skaggs BA, Lee-Yang W, Ciblak MA, Frade JP, Brandt ME, Hajjeh RA, Harrison LH, Sofair AN, Warnock DW (2002) Comparison of visual and spectrophotometric methods of broth microdilution MIC end point determination and evaluation of a sterol quantitation method for in vitro susceptibility testing of fluconazole and itraconazole against trailing and nontrailing *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 2477-2481

- Bouhlal R, Haslin C, Chermann JC, Collicec-Jouault S, Siquin C, Simon G, Cerantola S, Riadi H, Bourgougnon N (2011) Antiviral Activities of Sulfated Polysaccharides Isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta, Gigartinales) and *Boergeseniella thuyoides* (Rhodophyta, Ceramiales). *Mar Drugs* 9: 1187-1209
- Christobel GJ, Lipton AP, Aishwarya MS, Sarika AR, Udayakumar A (2011) Antibacterial activity of aqueous extract from selected macroalgae of southwest coast of India. *Seaweed Res Utiln* 33 (1&2): 67 – 75
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Document M27-A3, Approved Standard, 3th ed.: Wayne, PA, USA, 2008. Volume 28, N° 14, p. 25.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically. Document M7-A7, Approved Standard, 7th ed: Wayne, PA, USA, 2006, Volume 26, N° 2, p. 16.
- Del Val AG, Platas G, Basilio A, Cabello A, Gorrochategui J, Suay I, Vicente F, Portillo E, Del Rio MJ, Reina GG, Peláez F (2001) Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Int Microbiol* 4: 35-40
- Donia M, Hamann MT (2003) Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet Infect Dis* 3: 338–48
- El Gamal AA (2010) Biological importance of marine algae. *Saudi Pharm J* 18: 1-25
- Fenical W (2006) Marine Pharmaceuticals: past, present and future. *Oceanography* 19: 110-119
- Galal HRM, Salem WM, Nasr El-Deen F (2011) Biological Control of Some Pathogenic Fungi using Marine Algae Extracts. *Res J Microbiol* 6(8):645-657
- Harvey AL (2008) Natural Products in drug discovery. *Drug Discov Today* 13:894-901
- Henn S, NedeL F, De Carvalho RV, Lund RG, Cenci MS, Pereira-Cenci T, Demarco FF, Piva E (2011) Characterization of an antimicrobial dental resin adhesive containing zinc methacrylate. *J Mater Sci* 22(8):1797-1802
- Kavita K, Singh VK, Jha B. (2013) 24-Branched Δ^5 sterols from *Laurencia papillosa* red seaweed with antibacterial activity against human pathogenic bacteria. *Microbiol Res*. doi: 10.1016/j.micres.2013.07.002
- Kolanjinathan K, Stella D (2009) Antibacterial activity of marine macro algae against human pathogens. *Rec Res Sci Technol* 1(1): 20–22
- Kumaran S, Deivasigamani B, Alagappan K, Sakthivel, M.; Karthikeyan, R (2010) Antibiotic resistant *Escherichia coli* strains from seafood and its susceptibility to seaweed extracts. *Asian Pac J Trop Med* 3: 977-981
- Kunzler A, Neuenfeldt PD, das Neves AM, Pereira CMP, Marques GHM, Nascente PS, Fernandes MHV, Hübner SO, Cunico W (2013) Synthesis, antifungal and cytotoxic activities of 2-aryl-3-((piperidin-1-yl)ethyl)thiazolidinones. *Eur J Med Chem* 64: 74-80
- Leal MC, Munro MHG, Blunt, JW, Puga J, Jesus B, Calado R, Rosa R, Madeira C (2013) Biogeography and biodiscovery hotspots of macroalgal marine natural products. *Nat Prod Rep* 30:1380-1390
- Liang W, Mao XM, Peng X, Tang S. (2014) Effects of sulfate group in red seaweed polysaccharides on anticoagulant activity and cytotoxicity. *Carbohydr Polym* 101:776-785
- Manilal A, Sujith S, Selvin J, Shakir, C, Kiran GS (2009) Antibacterial activity of *Falkenbergia hillebrandii* (Born) from the Indian coast against human pathogens. *Phyton, Int J Exp Bot* 78:161-166

- Martins CVB, de Resende MA, da Silva DL, Magalhães TFF, Modolo LV, Pilli RA, de Fátima Â (2009) *In vitro* studies of anticandidal activity of goniotalamin enantiomers. *J Appl Microbiol* 107(4):1279-1286
- Mayer AMS, Rodríguez AD, Berlinck RGS, Hamann MT (2009) Marine pharmacology in 2005–6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta* 1790:283–308
- Mayer AMS, Rodríguez AD, Berlinck RGS, Fusetani N (2011) Marine pharmacology in 2007–8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp Biochem Physiol* 153:191–222
- Museedi OS, Younis WH (2014) Oral Cancer trends in Iraq from 2000 to 2008. *Saudi J Dent Res* 5:41-47
- Nedel F, Begnini KR, Carvalho PH, Lund RG, Beira FTA, Del Pino FAB (2012) Antiproliferative Activity of Flower Hexane Extract Obtained from Associated with Against the MCF7, KB, and NIH/3T3 Cell Lines. *J Med Food* 15:955-958
- Newman DJ, Cragg GM (2007) Natural Products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 70:461-477
- Ngo DH, Vo TS, Ngo DN, Wijesekara I, Kim SK (2012) Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. *Int J Biol Macromol* 51:378– 383
- Nucci M, Marr KA (2005) Emerging fungal diseases. *Clin Infect Dis* 41:521–526
- Oliveira SGD, Nascente PS, Escareño JJH, Carvalho RV, Piva E, Lund Rg (2013) Evaluation of anti-Candida activity and cytotoxicity of *Jatropha dioica* Cerv. Extracts. *Afr J Microbiol Res* 7(30):3903-3907
- Omar HH, Gumgumji NM, Shiek HM, El-Kazan MM, El-Gendy AM (2012) Inhibition of the development of pathogenic fungi by extracts of some marine algae from the red sea of Jeddah, Saudi Arabia. *Afr J Biotechnol* 11(72):13697-13704
- Ostrosky EA, Mizumoto MK., Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR (2008) Methods for evaluation of the antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of plant extracts. *Braz J Pharm Sci* 18: 301-307.
- Patra JK, Patra AP, Mahapatra NK, Thatoi HN, Das S, Sahu RK, Swain GC (2009) Antimicrobial activity of organic solvent extracts of three marine macroalgae from Chilika Lake, Orissa, India. *Malaysian J Microbiol* 5(2):128-131
- Pereira DM, Cheel J, Areche C, San-Martin A, Rovirosa J, Silva LR, Valentao P, Andrade PB (2011) Anti-Proliferative Activity of Meroditerpenoids Isolated from the Brown Alga *Styopodium flabelliforme* against Several Cancer Cell Lines. *Mar Drugs* 9:852-862
- Rabanal M, Ponce NMA, Navarro DA, Gómez RM, Stortz CA (2014) The system of fucoidans from the brown seaweed *Dictyota dichotoma*: Chemical analysis and antiviral activity. *Carbohydr Polym* 101:804-81
- Salvador N, Garreta AG, Lavelli L, Ribera MA (2007) Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. *Sci Mar* 71(1):101-113
- Santana BP, Dos Reis P, Francesco G, Nedel F, Piva E, De Carvalho RV, Nör JE, Demarco FF, Villarreal Carreño NL (2012) Nano-/microfiber scaffold for tissue engineering: Physical and biological properties. *J Biomed Mater Res Part A* 00A:1-8

- Sathya R, Kanaga N, Sankar P, Jeeva S. (2013) Antioxidant properties of phlorotannins from brown seaweed *Cystoseira trinodis* (Forsskål) C. Agardh. *Arabian J Chem*. doi: 10.1016/j.arabjc.2013.09.039
- Shalaby EA (2011) Algae as promising organisms for environment and health. *Plant Signal Behav* 6(9):1338-1350
- Sivakumar SM, Safhi MM. (2013) Isolation and screening of bioactive principle from *Chaetomorpha antennina* against certain bacterial strains. *Saudi Pharm J* 21 (1):119-121
- Souza JLS, Nedel F, Ritter M, Carvalho PHA, Pereira CMP, Lund RG (2013) Antifungal susceptibility, exoenzyme production, and cytotoxicity of novel oximes against *Candida*, *Mycopathol* 176:201-210
- Stein EM, Colepicolo P, Afonso FAK, Fujii MT (2011) Screening for antifungal activities of extracts of the brazilian seaweed genus *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta). *Braz J Pharmacog* 21 (2):290-295
- Stefanuto P, Doucet J-C, Robertson C (2014) Delays in Treatment of Oral Cancer- A review of the current literature. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. doi: 10.1016/j.oooo.2013.12.407.
- Sufian AS, Ramasamy K, Ahmat N, Zakaria ZA, Yusof MIM (2013) Isolation and identification of antibacterial and cytotoxic compounds from the leaves of *Muntingia calabura* L. *J Ethnopharmacol* 146:198–204
- Sundriyal S, Sharma RK, Jain R (2006) Current advances in antifungal targets and drug development. *Curr Med Chem* 13:1321–1335
- Thakur NL, Jain R, Natalio F, Hamer B, Thakur AN, Müller WEG (2008) Marine molecular biology: An emerging field of biological sciences. *Biotechnol Adv* 26:233–245
- Tuney I, Çadirci BH, Unal D, Sukatar A (2006) Antimicrobial Activities of the Extracts of Marine Algae from the Coast of Urla (Üzmir, Turkey). *Turk J Biol* 30:171-175
- Vijayabaskar P, Shiyamala V (2012) Antioxidant properties of seaweed polyphenol from *Turbinaria ornate* (Turner) J. Agardh, 1848. *Asian Pac J Trop Biomed* 2: S90-S98
- Villa FA, Gerwick L (2010) Marine natural product drug discovery: Leads for treatment of inflammation, cancer, infections, and neurological disorders. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 32(2): 228–237
- Wiencke C, Clayton MN, Gómez I, Iken K, Luder UH, Amsler CD, Karsten U, Hanelt D, Bischof K, Dunton K (2007) Life strategy, ecophysiology and ecology of seaweeds in polar Waters. *Rev Environ Sci Biotechnol* 6: 95-126

PARTE IV

5 Conclusões

Com base nas metodologias empregadas, conclui-se que:

- 1) O extrato acetanólico da espécie *Himantothallus grandifolius* foi o mais fungicida, com resultados equipotentes ou superiores ao fluconazol;
- 2) O extrato acetanólico da espécie *Iridea cordata* foi o mais citotóxico contra células tumorais A-431;
- 3) Em geral, os extratos não foram tóxicos contra as células não tumorais NIH/3T3.

6 Referências

ABAD, M. J.; BEDOYA, L. M.; BERMEJO, P. Marine Compounds and their Antimicrobial Activities. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, p.1293-1306, 2011.

ABIRAMI, R.G.; KOWSALYA, S. Anticancer activity of methanolic and aqueous extract of *Ulva fasciata* in albino mice. **Internacional Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4(2), p.681-684, 2012.

BHATNAGAR, I.; KIM, S. K. Immense Essence of Excellence: Marine Microbial Bioactive Compounds. **Marine Drugs**, v. 8; p. 2673- 2701, 2010.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, W. P.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine Natural Products. **Natural Products Reports**, v. 25, p. 35-94, 2008.

BOOPATHY, N.S.; KATHIRESAN, K. Anticancer drugs from Marine Flora: An Overview. **Journal of Oncology**, Article ID 214186, 18 pages, 2010.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. **Natural Products Reports**, v. 25, p. 475-516, 2008.

CABRITA; M.T.; VALE, C.; RAUTER, A. P. Halogenated Compounds from Marine Algae. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2301-2317, 2010.

CHANDA; S.; DAVE, R.; KANERIA, M.; NAGANI, K. Seaweeds: A novel, untapped source of drugs from sea to combat Infectious diseases. **Current Research**, p.473-480, 2010.

CHRISTOBEL, G. J.; LIPTON, A. P.; AISHWARYA, M. S.; SARIKA, A. R.; UDAYAKUMAR, A. Antibacterial activity of aqueous extract from selected macroalgae of southwest coast of India. **Seaweed Research Utiln**, v. 33 (1&2), p. 67-75, 2011.

CLINICALTRIALS. National Institute of Health. Disponível em <http://www.clinicaltrials.gov/>. Acesso em 23/10/2013, 24/10/2013, 27/10/2013.

CRAIG, K. R. Protecting international marine biodiversity: International treaties and national systems of marine protected areas. **Journal of Land Use**, v.20(2), p. 337-373, 2005.

DAYSRING, T. D. Understanding hypertriglyceridemia in women: clinical impact and management with prescription omega-3-acid ethyl esters. **International Journal of Women's Health**, v. 3, p. 87–97, 2011.

DEL VAL, A.G.; PLATAS, G.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; GORROCHATEGUI, J.; SUAY, I.; VICENTE, F.; PORTILLO, E.; DEL RIO, M.J.; REINA, G.G.; PELÁEZ, F. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain), **Internacional Microbiology**, v.4, p35-40, 2001.

DEMUNSHI, Y., CHUGH, A. Patenting Trends in Marine Bioprospecting based Pharmaceutical Sector. **Journal of Intellectual Property Rights**, v.14, p. 122-130, 2009.

DIXON, N.; WONG L.S.; GEERLINGS, T.H.; MICKLEFIELD, J. Cellular targets of natural products. **Natural Products Reports**, v. 24, p. 1288-1310, 2007.

DONIA, M.; HAMANN, M.T. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. **The Lancet Infectious Disease**, v.3, p. 338–48, 2003.

FENICAL, W. Marine Pharmaceuticals: past, present and future. **Oceanography**, v.19, p. 110-119, 2006.

GERWICK, W. H.; MOORE, B. S. Lessons from the Past and Charting the Future of Marine Natural Products Drug Discovery and Chemical Biology. **Chemistry & Biology**, v. 19, p.85-98, 2012.

GLASER, K. B; MAYER, A. M. S. A renaissance in marine pharmacology: From preclinical curiosity to clinical reality. **Biochemical Pharmacology**, v.78, p 440–448, 2009.

GÓMEZ-ORDÓÑEZ, E.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; RUPÉREZ, P. Bioactivity of sulfated polysaccharides from the edible red seaweed *Mastocarpus stellatus*. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, *In Press, Accepted Manuscript*, Available online 16 January 2014.

GUEDES, E.A.C.; DA SILVA, T.G.; AGUIAR, J.S.; DE BARROS, L.D.; PINOTTI, L.M.; SANT'ANA, A.E.G. Cytotoxic activity of marine algae against cancerous cells. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23(4), p 668-673, 2013.

GUPTA, S., RAJAURIA, G., ABU-GHANNAM, N. Study of the microbial diversity and antimicrobial properties of Irish edible brown seaweeds. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 482–489, 2010.

HARVEY, A. L. Natural Products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.13, p. 894-901, 2008.

HU, G. P., YUAN, J., SUN, L., WU, Z. G., LAN, X. J., ZHU, X., LIN, Y. C., CHEN, S. P. Statistical Research on Marine Natural Products Based on data Obtained Between 1985 and 2008. **Marine Drugs**, v.9(4), p. 514 – 525, 2011.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Disponível em <http://www.inca.gov.br/>. Acesso em 24/12/2013.

KANZAKI, A.; TAKEBAYASHI, Y.; REN, X. Q.; MIYASHITA, H.; MORI, S.; AKIYAMA, S.; POMMIER, Y. Overcoming multidrug resistance in P- glycoprotein/ MDR1-overexpressing cell lines by ecteinascidin 743. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.1, 1327-1334, 2002.

KANJANA, K., RADTANATIP, T., ASUVAPONGPATANA, S., WITHYACHUMNARNKUL, B., WONGPRASERT, K. Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 30, p. 389–396, 2011.

KATZ, M.L; MUELLER, L.V.; POLYAKOV, M.; WEINSTOCK, S.F. Where have all the antibiotic patents gone? **Natural Biotechnology**; v. 24, p.1529–1531, 2006.

KAVITA, K.; SINGH, V.K.; JHA, B. 24-Branched Δ^5 sterols from *Laurencia papillosa* red seaweed with antibacterial activity against human pathogenic bacteria. **Microbiological Research**, *In Press, Corrected Proof*, Available online 31 July 2013.

LEAL, M.C., MUNRO, M.H.G.; BLUNT, J.W.; PUGA, J.; JESUS, B.; CALADO, R.; ROSA, R.; MADEIRA, C. Biogeography and biodiscovery hotspots of macroalgal marine natural products. **Natural Products Reports**, v. 30,1380-1390, 2013.

LIANG, W.; MAO, X.M.; PENG, X.; TANG, S. Effects of sulfate group in red seaweed polysaccharides on anticoagulant activity and cytotoxicity. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p.776-785, 2014.

LIVERMORE, D. M. Minimising antibiotic resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, p. 450-459, 2005.

MANILAL, A.; SUJITH, S.; SELVIN, J.; SHAKIR, C.; KIRAN, G.S. Antibacterial activity of *Falkenbergia hillebrandii* (Born) from the Indian coast against human pathogens. **International Journal of Experimental Botany**, v.78, p.161-166, 2009.

MARINHO-SORIANO, E.; PINTO, E.; YOKOYA, N. S.; COLEPICOLO, P.; TEIXEIRA, V. L.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. Frontiers on algae bioactive compounds. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, p. 200-201, 2011.

MARY, J. S.; VINOTHA, P.; PRADEEP, A. M. Screening for *in vitro* Cytotoxic Activity of Seaweed, *Sargassum sp.* Against Hep-2 and MCF-7 Cancer Cell Lines. **Asian Pacific Journal Cancer Prevention**, v. 13 (12), p. 6073-6076, 2012.

MAYER, A. M. S.; RODRÍGUEZ, A. D., BERLINCK, R. G. S.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2005–6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, p.283–308, 2009.

MAYER, A. M. S.; GLASER, K. B.; CUEVAS, C.; JACOBS, R. S.; KEM, W.; LITTLE, R. D.; MCINTOSH, J. M.; NEWMAN, D. J., POTTS, B. C.; SHUSTER, D. E. The

odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, p. 255–265, 2010.

MAYER, A.M.S.; RODRÍGUEZ, A.D.; BERLINCK, R.G.S.; FUSELANI, N. Marine pharmacology in 2007–8: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C v.153, p.191–222, 2011.

MISHRA, B.B.; TIWARI, V.K. Natural products: An evolving role in future drug Discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4769-4807, 2011.

NEWMAN, D.J; CRAGG, G.M. Natural Products from marine invertebrates and microbes as modelators of antitumor targets. **Current Drug Targets**, v.7, p.279-304, 2006.

NEWMAN, D.J; CRAGG, G.M. Natural Products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v.70, p.461-477, 2007.

NGO, D.H.; VO, T.S.; NGO, D. N.; WIJESEKARA, I.; KIM, S.K. Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p.378– 383, 2012.

PATRA, J. K.; PATRA, A. P.; MAHAPATRA, N. K.; THATOI, H. N.; DAS, S.; SAHU, R. K.; SWAIN, G. C. Antimicrobial activity of organic solvent extracts of three marine macroalgae from Chilika Lake, Orissa, India. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 5(2), p. 128-131, 2009.

PROGRAMA ANTÁRTICO BRASILEIRO (PROANTAR). Disponível em <http://www.mar.mil.br/secirm/proantar.htm> Acesso em 28/12/ 2013.

RABANAL, M.; PONCE, N.M.A.; NAVARRO, D.A.; GÓMEZ, R.M.; STORTZ, C.A. The system of fucoidans from the brown seaweed *Dictyota dichotoma*: Chemical analysis and antiviral activity. **Carbohydrate Polymers**, v.101, p. 804-81, 2014.

RAJASULOCHANA, P.; DHAMOTHARAN, R. KRISHNAMOORTHY, P.; MURUGESAN, S. Antibacterial Activity of the Extracts of Marine Red and Brown Algae. **Journal of American Science**, v. 5(3), p. 20-25, 2009.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. *Biologia Vegetal* 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2007. 906p.

RHIMOU, B., HASSANE, R., JOSÉ, M., NATHALIE, B. The antibacterial potential of the seaweeds (Rhodophyceae) of the Strait of Gibraltar and the Mediterranean coast of Morocco. **African Journal of Biotechnology**, 9, 6365–6372, 2010.

RIBEIRO, A. P.; FIGUEIRA, B. C. L.; MARTINS, C.C.; SILVA, C. R. A.; FRANÇA, E. J.; BÍCEGO, M. C.; MAHIQUES, M. M.; MONTONE, R. C. Arsenic and trace metal contents in sediment profiles from the Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, v.62, p.192–196, 2011.

ROSALINE, X.D.; SAKTHIVELKUMAR, S.; RAJENDRAN, K.; JANARTHANAN, S. Screening of selected marine algae from the coastal Tamil Nadu, South India for antibacterial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S140-S146, 2012.

RYAN, K. G.; MCMINN, A.; HEGSETH, E. N.; DAVY, S. K. The effects of ultraviolet-b radiation on antarctic sea-ice algae. **Journal Phycology**, v. 48, 74–84, 2012.

SALVADOR, N.; GARRETA, A.G.; LAVELLI, L.; RIBERA, M.A. Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. **Scientia Marina**, v. 71(1), 101-113, 2007.

SATHYA, R.; KANAGA, N.; SANKAR, P.; JEEVA, S. Antioxidant properties of phlorotannins from brown seaweed *Cystoseira trinodis* (Forsskål) C. Agardh. **Arabian Journal of Chemistry**, *In Press, Corrected Proof, Available online 4 October 2013*.

SHU-HUA, Q.; YING, X.; HAI-RONG, X.; PEI-YUAN, Q.; SI, Z. Antifouling and antibacterial compounds from a marine fungus *Cladosporium* sp. F14. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.25, p.399–406, 2009.

SIVAKUMAR, S.M.; SAFHI, M.M. Isolation and screening of bioactive principle from *Chaetomorpha antennina* against certain bacterial strains. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21 (1), p. 119-121, 2013.

SMYRNIOTOPOULOS, V., VAGIAS, C., RAHMAN, M. M., GIBBONS, S., ROUSSIS, V. Structure and antibacterial activity of brominated diterpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 7, p. 186–195, 2010.

STANOJKOVIĆ, T.P., ŠAVIKIN, K., ZDUNIĆ, G., KLJAJIĆ, Z., GROZDANIĆ, N., ANTIĆ, J. *In vitro* antitumoral activities of *Padina pavonia* on human cervix and breast cancer cell lines. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7(8), p. 419-424, 2013.

TAN, S. P.; MCLOUGHLIN, P.; O'SULLIVAN, L.; PRIETO, M.L.; GARDINER, G.E.; LAWLOR, P.G.; HUGHES, H. Development of a novel antimicrobial seaweed extract-based hydrogel wound dressing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 456(1), p. 10-20, 2013.

TASKIN, E.; CAKI, Z.; OZTURK, M.; TASKIN, E. Assessment of *in vitro* antitumoral and antimicrobial activities of marine algae harvested from the eastern Mediterranean sea. **African Journal of Biotechnology**, v. 9(27), p. 4272-4277, 2010.

THAKUR, N.L.; JAIN, R.; NATALIO, F.; HAMER, B.; THAKUR, A.N.;MÜLLER, W.E.G. Marine molecular biology: An emerging field of biological sciences. **Biotechnology Advances**, v.26, p. 233–245, 2008.

THOMAS, N. V.; KIM, S.K. Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 325–335, 2011.

VAIRAPPAN, C.S.; KAWAMOTO, T.; MIWA, H.; SUZUKI, M. Potent antibacterial activity halogenated compounds against resistant bacteria. **Planta Medica**, v.70, p.1087-1090, 2004.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. do C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, p. 139-145, 2004.

VIEIRA, F. B. O Tratado da Antártica: perspectivas territorialista e internacionalista. **Cadernos PROLAM/USP**, v.2, n.5, p. 49 – 82, 2006.

VILLA, F.A.; GERWICK, L. Marine natural product drug discovery: Leads for treatment of inflammation, cancer, infections, and neurological disorders. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 32(2), p. 228–237, 2010.

XU, N.; FAN, X. A.; YAN, X.; LI, X.; NIU, R.; TSENG, C. K. Antibacterial bromophenols from the marine red alga *Rhodomela confervoides*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 1221–1224, 2003.

WIENCKE, C.; CLAYTON, M. N. The life history of *Porphyra endiviifolium* from the South Shetland Islands, Antarctica. **Polar Biology**, v.19, 257-263, 1998.

WIENCKE, C.; CLAYTON, M.N.; GÓMEZ, I.; IKEN, K.; LUDER, U.H.; AMSLER, C.D.; KARSTEN, U.; HANELT, D.; BISCHOF, K.; DUNTON, K. Life strategy, ecophysiology and ecology of seaweeds in polar waters. **Reviews in Environmental Science & Biotechnology**, v.6, p.95-126, 2007.

WIENCKE, C.; AMSLER, C. D. Seaweeds and their communities in polar regions. *Seaweed Biology*, p.265-291, 2012.

WIJESEKARA, I., PANGESTUTI, R., KIM, S.K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**, v.84, p. 14–21, 2011.

WILLIAMS, J.A.; DAY, M.; HEAVNER, J.E. Ziconotide: an update and review. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v.9; p.1575-1583, 2008.

World Health Organization (WHO). Disponível em <http://www.who.int/en/>. Acesso em 24/12/2013.

ZACHER, K.; ROLEDA, M. Y.; WULFF, A.; HANELT, D.; WIENCKE, C. Responses of Antarctic *Iridaea cordata* (Rhodophyta) tetraspores exposed to ultraviolet radiation. **Phycological Research**, v.57, p.186–193, 2009.

ZACHER, K., RAUTENBERGER, R., HANELT, D., WULFF, A., WIENCKE, C. The abiotic environment of polar benthic algae. **Biology of polar benthic algae**, p. 9–22, 2011.

ZANDI, K., TAJBAKHSH, S., NABIPOUR, I., RASTIAN, Z., YOUSEFI, F., SHARAFIAN, S., SARTAVI, K. *In vitro* antitumor activity of *Gracilaria corticata* (a red

alga) against Jurkat and molt-4 human cancer cell lines. **African Journal of Biotechnology**, v. 9(40), p. 6787-6790, 2010.

ZIELINSKI, K. Bottom macroalgae of the Admiralty Bay (King George Island, South Shetlands, Antarctica). **Polish Polar Research**, v.11, n.1-2, p.95-131, 1990.

ZHU, F.; QIN, C.; TAO, L.; LIU, X.; SHI, Z.; MA, X.; JIA, J.; TAN, Y.; CUI, C.; LIN, J.; TAN, C.; JIANG, Y.; CHEN, Y. Clustered patterns of species origins of nature-derived drugs and clues for future bioprospecting. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.108, p. 12943–12948, 2011.

ANEXO A

Atestado de Depósito de Patente