



renorbio
rede nordeste de biotecnologia

RENORBIO

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**BIOPROSPECÇÃO DE EXTRATOS DE
MACROALGAS MARINHAS BENTÔNICAS DO
LITORAL DE ALAGOAS**

ÉLICA AMARA CECÍLIA GUEDES

Maceió – Alagoas

Novembro de 2011



renorbio
rede nordeste de biotecnologia

PONTO FOCAL-ALAGOAS



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**



**BIOPROSPECÇÃO DE EXTRATOS DE
MACROALGAS MARINHAS BENTÔNICAS DO
LITORAL DE ALAGOAS**

ÉLICA AMARA CECÍLIA GUEDES

Tese apresentada à Rede Nordeste de Biotecnologia como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana

Maceió – Alagoas

Novembro de 2011

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- G924b Guedes, Élica Amara Cecília.
Bioprospecção de extratos de macroalgas marinhas bentônicas do litoral de Alagoas / Élica Amara Cecília Guedes. – 2011.
75 f. : il. tabs., grafs.
- Orientador: Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana .
Tese (doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2011.
- Inclui bibliografia.
1. Bioatividade. 2. Algas marinhas. 3. Extratos de algas. 4. Citotoxicidade. 5. Células cancerígenas. 6. Dermatófitos. 7. *Candida*. 8. *Artemia salina*. 9. *Aedes aegypti*. 10. *Biomphalaria glabrata*. I. Título.

CDU: 577



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Universidade Federal de Alagoas
BR 104 Km 14, Campus A. C. Simões – Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió - AL - Telefone: (82) 3214-1384 – Homepage: www.renorbio.org.br

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: Élica Amara Cecília Guedes

TÍTULO DO PROJETO: "Bioprospecção de extratos de macroalgas marinhas bentônicas do litoral de Alagoas"

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana

| BANCA EXAMINADORA: | CONCEITO | ASSINATURA |
|--|----------|------------|
| Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana – UFAL (Presidente - Orientador) | A | |
| Prof. ^a . Dr. ^a . Fabiane Caxico de Abreu - UFAL (Examinadora) | A | |
| Prof. ^a . Dr. ^a . Mutue Toyota Fujii – IBT/SP (Examinadora) | A | |
| Prof. ^a . Dr. ^a . Flávia de Barros Prado Moura - UFAL (Examinadora) | A | |
| Prof. ^a . Dr. ^a . Fernanda Cristina de A. Maranhão – UFAL (Examinadora) | A | |

DATA DA APROVAÇÃO: 29 de novembro de 2011.

HORÁRIO: 10h00

LOCAL: Sala de Multimeios do Bloco 7 da Universidade Federal de Alagoas.

“Esperei com paciência no senhor e Ele se inclinou para mim e ouviu meu clamor” Sl.40-1.

Dedico este trabalho com muito amor e carinho aos meus pais Paulo e Graciete pelo incentivo e confiança e por darem tudo de si para um dia poder compartilhar comigo mais uma grande etapa conquistada ao longo de minha vida!

Ao meu filho Gustavo

Ao meu esposo Hernan

Aos meus irmãos(as), primos(as), sobrinhos(as) e cunhados (as)

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por estar sempre presente na minha vida, iluminando o meu caminho e me dando vitória para chegar até aqui;

À Universidade Federal de Alagoas e ao Instituto de Ciências Biológicas e da saúde na pessoa de sua diretora, Dra. Terezinha Calado, pelo afastamento concedido para realização deste curso;

À Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) e ao Instituto de Química e Biotecnologia, pelo fornecimento das condições necessárias para desenvolvimento desta pesquisa;

Ao Professor Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana, pelos ensinamentos, paciência e compreensão reveladas no decorrer da realização deste trabalho, a quem sou grata;

Aos membros da banca de qualificação e defesa pelas valiosas críticas e sugestões apresentadas.

A Dra. Maria Anilda dos Santos Araújo, anjo que Deus colocou no meu caminho, pela grande ajuda para realização deste trabalho, que mesmo na véspera de ir para maternidade e ainda de resguardo, nunca deixou de contribuir para conclusão deste trabalho;

Ao Dr. Euripedes Alves da Silva Filho pelas valorosas sugestões e colaboração indispensáveis para a realização deste trabalho;

Às Dras. Terezinha Gonçalves da Silva, Jaciana dos Santos Aguiar e a bióloga Maria Rodrigues pela grande colaboração no departamento de antibióticos da UFPE;

A minha querida amiga e “afilhada”, Rose Paula Mendonça de Omena que muito me estimulou para realizar o curso e sempre esteve comigo em todos os momentos;

A minha querida prima Anneliese por todo apoio, palavras de carinho e incentivo durante todo decorrer do curso

Ao querido e grande amigo, Manoel Messias da Silva Costa, companheiro de várias jornadas de trabalho, que sempre esteve comigo ajudando e apoiando em todos os momentos;

A Dra. Maria Raquel Ferreira de Lima, outro anjo que Deus colocou em minha vida, pois mesmo me conhecendo tão pouco, num momento bastante difícil da tese, contribuiu grandemente para conclusão da mesma;

A todos colegas do setor de botânica e do ICBS pelo constante incentivo;

A minha querida irmã em Cristo e companheira de todos os momentos, Dra. Kirley Michelly Marques da Silva pela sua grande ajuda;

A Cenira Monteiro de Carvalho, ex- aluna e amiga muito querida por toda ajuda e carinho demonstrados no decorrer do curso;

A Profa. Dra. Ana Maria Queijeiro Lopez pela grande ajuda nas correções e sugestões do trabalho e pela força nos momentos difíceis;

Às profas. Dras. Flavia Moura e Fernanda Maranhão pela grande ajuda na confecção dos artigos. Que Deus as abençoe!

A profa. Dra. Roberta Ferreira pelo apoio e constante incentivo;

Às queridas Edjane Pires e Ana Lucila pela grande ajuda no inicio dos trabalhos no laboratório de química e nas muitas dúvidas que fossem surgindo;

A minha querida estagiária Lurdiana Daise pelo carinho e grande ajuda no laboratório;

Ao amigo querido Dr. Edilson pelo companheirismo e força demonstrados durante todo tempo de convivência no laboratório;

Aos meus “pais de coração” aqui em Maceió, Deusa e Vasco que sempre me apoiaram e torceram pela vitória nessa etapa de minha vida;

Ao amigo, ex-aluno e colega Karlos Lisboa pela grande ajuda nos bioensaios com *Artemia* e *Aedes*;

Às queridas: Maria José, Luciana, Danielle, Milena, Mariana, Cristiane, Emilia, Amélia, Jaqueline, Roberta, Adriana Todaro, Fátima Lucia de Brito, por todo carinho e ajuda durante meus trabalhos no laboratório;

Ao querido Aldy pela ajuda em todos os momentos;

Aos queridos: João Xavier, João Gomes, Thiago, Daniel, Daniel Inácio, Pedro, Mikael, Jonathan, Lucio, Daniel baiano, Pedro Paulo, Benicio, Alessandro, pela ajuda e companheirismo;

Ao amigo Enoch Nichols pela ajuda na confecção dos abstracts sempre que necessário.

Aos Drs. Gaus Silvestre de Andrade Lima e Iraildes Pereira de Assunção pelo apoio sempre presente;

Às queridas Libiana Mayara e Eveline nos testes com *Artemia salina* e coleta de algas;

A Rosângela Lyra, curadora do herbário MAC do Instituto do Meio Ambiente pela ajuda no tombamento das exsicatas;

Aos amigos Joao Figueiredo, sua esposa Nerita (“*in memorian*”) e filhos pelo apoio constante em todos os momentos;

Ao Pastor Saulo Silas e todos os irmãos em Cristo da Igreja Manancial da Vida pelas constantes orações para minha vitória e pela minha família;

A todos aqueles que direta ou indiretamente estiveram comigo auxiliando no decorrer do trabalho e com palavras de força nos momentos difíceis.

Que Deus abençoe a todos vocês!

RESUMO

Compostos presentes em algas marinhas podem desempenhar importantes funções biológicas, entre elas: atividade antimicrobiana, antifúngica, citotóxica, larvicida, moluscicida, de forma direta “in vivo” ou indireta, ativando mecanismos de defesa dos hospedeiros. O objetivo deste trabalho foi avaliar atividade biológica de extratos de algas marinhas bentônicas. Foram testados extratos brutos e frações obtidas de algas: *Dictyota dichotoma*, *Padina gymnospora*, *Digenia simplex*, *Hypnea musciformis*, *Sargassum vulgare*, *Ulva lactuca*, *Gracilaria caudata*, *Galaxaura rugosa* e *Gellidium pusillum* coletadas na Praia de Riacho Doce, litoral norte do Estado de Alagoas. Após coleta, triagem e identificação, as algas secas (500g) e pulverizadas foram submetidas à extração com os solventes: diclorometano, clorofórmio, metanol, etanol e água. Os extratos em diclorometano de *H. musciformis* e *P. gymnospora* foram selecionados para fracionamento, por apresentarem melhores rendimentos. Foi realizada avaliação citotóxica frente a células cancerígenas humanas: NCI-H292 - câncer de pulmão humano, HEP-2-carcinoma epidermóide de laringe humana; K562 -leucemia mielocítica crônica; frente aos fungos dermatófitos: *Trichophyton rubrum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Epidermophyton floccosum*- e quatro espécies de *Candida*(*C. albicans*; *C. krusei*; *C. guilliermondi*; *C. parapsilosis*) bem como, avaliação da atividade larvicida contra larvas de *Aedes aegypti*, moluscicida contra *Biomphalaria glabrata* e toxica contra *Artemia salina*. A avaliação da citotoxicidade foi realizada pelo método colorimétrico do MTT-Metil Triazol Tetrazolio de acordo com o Protocolo do National Câncer Institute (NCI). Para atividade fungicida empregou-se a metodologia descrita no documento M27-A2 e M38A pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute* adequado para dermatófitos e pela norma M44A para *Candida*. Nos bioensaios para controle do *Aedes aegypti*, foram utilizadas larvas do quarto ínstar em duas repetições e os extratos que tiveram um percentual de mortalidade igual ou superior a 50% seguiram para estudo. Ensaio de toxicidade contra nauplius de *Artemia salina* foram realizados de acordo com a metodologia descrita na literatura com algumas modificações, para obtenção de concentrações letais médias (LC₅₀). Verificamos que os extratos das espécies *H. musciformis*, *D. simplex*, *P. gymnospora*, *S. vulgare*, *D. dichotoma* possuem maior ação anticâncer sobretudo nos extratos obtidos com diclorometano, clorofórmio e fração clorofórmica. Os resultados obtidos no ensaio com *A. salina* indicaram uma baixa toxicidade dos extratos brutos de algas marinhas testados, uma vez que, excetuando-se o extrato etanólico de *H. musciformis*, todos os extratos apresentaram LC₅₀ > 10³. Em relação a *B. glabrata*, apenas as frações em clorofórmio da espécie *H. musciformis* e *P. gymnospora* apresentaram atividade moluscicida. Em relação aos dermatófitos e *Candida*, os extratos diclorometano e etanol foram os que melhor apresentaram atividade antifúngica. Os resultados permitiram concluir que as algas do litoral alagoano possuem um potencial que até o presente momento não foi explorado sugerindo uma utilização futura bastante promissora.

Palavras-chave: bioatividade, algas marinhas, extratos de algas, citotoxicidade, células cancerígenas, dermatófitos, *Candida*, *Artemia salina*, *Aedes aegypti*, *Biomphalaria glabrata*.

ABSTRACT

BIOPROSPECTING EXTRACTS OF SEAWEEDS BENTON OF THE COAST OF ALAGOAS

Compounds present in marine algae can play important biological functions, such as: antimicrobial activity, antifungal, cytotoxicity, larvicidal, molluscicidal, direct “in vivo” or indirectly, activating the defense mechanisms of the hosts. The objective of this study was to evaluate the biological activity of marine benthic algae extracts collected from a beach located on the north coast of Alagoas called *Praia de Riacho Doce*. Extracts and fractions obtained from algae: *Dictyota dichotoma*, *Padina gymnospora*, *Digenea simplex*, *Hypnea musciformis*, *Sargassum vulgare*, *Ulva lactuca*, *Gracilaria caudata*, *Galaxaura rugosa* and *Gellidium pusillum* were all tested. After collecting, sorting and identifying the dried and powdered seaweed (500g), they were submitted to an extraction with solvents: dichloromethane, chloroform, methanol, ethanol and water. The dichloromethane extracts of *H. musciformis* and *P. gymnospora* were selected for fractioning because they presented better yielding. A cytotoxicity evaluation was done facing the human cancerous cells: NCI-H292 - human lung cancer, HEP-2 - epidermoide carcinoma of human larynx, K562 - chronic myelocytic leukemia; facing the dermatophytic fungi: *Trichophyton rubrum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Epidermophyton floccosum* - and four species of *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*) as well as the evaluation of larvicidal activity against *Aedes aegypti*, molluscicidal against *Biomphalaria glabrata* and toxic against *Artemia salina*. The cytotoxicity activity was done by colorimetric MTT-Methyl Tetrazolium Triazole according to the National Cancer Institute (NCI) protocol. For the fungicidal activity, the methodology outlined in document M27-A2 and M38A was used by the *Clinical and Laboratory Standard Institute* appropriate for dermatophytes and by M44A standards for *Candida*. In the bioassays for the control of *Aedes aegypti*, larvae from the fourth instar in two repetitions were used and extracts that had a mortality rate of less than 50% followed for the tests found. Toxicity assay against brine shrimp nauplii were performed according to the methodology given in literature with some modifications, to obtain mean lethal concentrations (LC50). We note that extracts with higher anticancer action are from species *H. musciformis*, *D. simplex*, *P. gymnospora*, *S. vulgare*, *D. dichotoma*, particularly the extracts dichloromethane, chloroform and chloroform fraction. The test results with *A. salina* showed a low toxicity of the crude extracts of marine algae tested, since, except the ethanolic extract of *H. musciformis*, all extracts showed $LC50 > 10^{-3}$. Regarding *B. glabrata*, only the chloroform fractions of the species *H. musciformis* and *P. gymnospora* showed molluscicidal activity. Regarding dermatophytes and *Candida*, dichloromethane and ethanol extracts were the best that have antifungal activity. The results showed that the algae from the coast of Alagoas have a potential that this was not explored until allowing a very promising future use.

Keywords: bioactivity, marine algae, seaweed extracts, cytotoxicity, cancer cells, dermatophytes, *Candida*, *Artemia salina*, *Aedes aegypti* *Biomphalaria glabrata*

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| Resumo | VI |
| Abstract | VII |
| 1. Introdução | 10 |
| 2. Revisão de Literatura | 13 |
| 2.1. Atividades biológicas de algas marinhas | 16 |
| 2.1.1. Citotóxica..... | 16 |
| 2.1.2. Testes com <i>Artemia salina</i> | 18 |
| 2.1.3. Microbiológica | 19 |
| 2.1.4. Larvicida e Moluscicida | 22 |
| 3. Material e método geral..... | 24 |
| 3.1. Local de Estudo | 24 |
| 3.2. Material biológico para obtenção de extratos | 25 |
| 4. Referências | 27 |
| 5. Considerações finais..... | 74 |
| 6. ANEXOS..... | 76 |

CAPÍTULO I

Cytotoxic activity of marine algae against cancerous cells

| | |
|-----------------------------------|----|
| Abstract | 40 |
| List of abbreviations | 41 |
| Introduction | 41 |
| Material and methods..... | 42 |
| Biological material..... | 42 |
| Extracts obtainment | 43 |
| Cytotoxic activity in vitro | 43 |
| Results and discussion | 44 |
| Conclusion..... | 46 |
| References | 46 |
| Tables | 49 |

CAPÍTULO II

Antifungal activities of different extracts of marine macroalgae against dermatophytes and candida species

| | |
|---|----|
| Abstract | 51 |
| Introduction | 51 |
| Metthods..... | 52 |
| Marine Alga Sampling and Isolation of Alga Extracts | 52 |
| Fungi Strains and Culture Conditions | 53 |
| Antifungal Analyses..... | 53 |
| Microdilution Assays | 54 |
| Disc Diffusion Procedure | 54 |
| Results | 55 |
| Discussion | 56 |
| References | 57 |
| Tables | 60 |

CAPÍTULO III**Biological activity of marine algae from Alagoas State, Northeast Brazil**

| | |
|--|----|
| Abstract | 65 |
| 1. Introduction | 65 |
| 2. Results and discussion..... | 66 |
| 3. Experimental section | 69 |
| 3.1. Collection of marine algae | 69 |
| 3.2. Extraction and fractionation of algae..... | 69 |
| 3.3. Mosquitos larvicidal activity | 70 |
| 3.4. Toxicity test with <i>Artemia salina</i> (non-target organisms) | 70 |
| 3.5. Molluscicidal activity | 71 |
| 4. Conclusion | 72 |
| 5. References | 72 |

1. INTRODUÇÃO

Bioprospecção pode ser entendida como a busca e coleta de material biológico para fins comerciais, como a exploração da biodiversidade e eventualmente a exploração do conhecimento indígena ou tradicional, ou ainda como a pesquisa de recursos biológicos e genéticos e seus conhecimentos associados (ASSAD, 2002; AZEVEDO, 2003).

Segundo várias estatísticas e estudos amplamente publicados na imprensa em geral, cerca de 25% dos medicamentos existentes foram elaborados com ingredientes ativos extraídos de plantas, devendo ser registrada a relação de 119 substâncias químicas usadas regularmente na medicina em todo o mundo referida por Farnsworth (1997), o que mostra a importância do uso da variedade da flora. Na agricultura a biotecnologia tem se destacado cada vez mais, conseguindo excelentes sucessos na reprodução tanto de plantas quanto na melhoria de produção animal, com importantíssima colaboração de genes de plantas e animais etc. (TRIGUEIRO, 2009).

Dessa forma, a matéria prima, passou a ter maior valor de mercado e conseqüentemente mais atenção dos países detentores, o que aliado a crescente consciência da valoração da biodiversidade fez com que se buscassem regras para a sua exploração. Assim, surgiu em âmbito planetário uma nova forma de exploração de produtos, a exploração dos recursos naturais biológicos, ou seja, a exploração da biodiversidade, surgindo então a bioprospecção (TRIGUEIRO, 2009).

As algas são talofitas, desprovidas de raiz, vasos e folhas e estão incluídas no Reino Protista I e II, sendo organismos fotossintetizantes, com clorofila **a** e estruturas reprodutivas simples, ou seja, sem a proteção de células estéreis. Elas estão distribuídas em diferentes “habitats”: oceanos, corpos de água doce, solos, rochas, superfície de vegetais, estando disposta em onze divisões segundo critérios químicos, citológicos e morfológicos, tipos e combinações de pigmentos fotossensibilizantes, natureza química das substâncias de reserva e das paredes celulares, ausência ou presença de flagelos, padrão e curso da mitose e citocinese, presença ou ausência de membrana no retículo endoplasmático, tipo e complexidade de ciclo de vida (BARSANTI e GUALTIERI, 2006; RAVEN et al., 2007; LEE, 2008)

As algas marinhas bentônicas estão divididas em três grandes grupos: verdes, vermelhas e pardas, pertencem respectivamente às divisões Chlorophyta, Rhodophyta e Phaeophyta. Algumas características morfológicas, como aspecto geral, tamanho e dureza do talo e determinadas características bioquímicas, como a produção de defesas químicas estão

relacionadas com o sucesso das algas nas relações com os herbívoros, de comprovada importância evolucionária e ecológica (GAINES e LUBCHENCO, 1982; PADILLA, 1985, HAY, 1984).

As algas “*in natura*” apresentam cerca de 75 a 85% de água e 15 a 25% de componentes orgânicos e sais minerais. Da matéria seca, cerca de 70 a 80% correspondem a substâncias orgânicas e os 25 a 35% restantes, a cinzas (HALPERIN, 1971). Os elementos minerais essenciais desses organismos são nitrogênio, fósforo, potássio, enxofre, magnésio, ferro, manganês, zinco, cobre, cálcio, cloro, sódio e boro; (HAY e FENICAL, 1996). Entre os microelementos, o nitrogênio e o fósforo são os mais estudados e em geral são considerados essenciais para o seu crescimento e desenvolvimento (RYTHER e DUSTAN, 1971). As algas são ricas em iodo tanto na forma mineral como na forma orgânica e seu conteúdo varia de 0,03 a 1,5% na matéria seca (RUPÉREZ, 2002).

Algumas espécies de algas pardas e vermelhas participam de maneira bastante abrangente na vida cotidiana do homem, através dos colóides extraídos dos seus talos. Existem alguns produtos de importância econômica, como os ácidos algínicos (alginatos), as agaranas e as carragenanas, os quais são usados como matéria prima em vários segmentos da indústria alimentícia, farmacêutica, cosmético, têxtil, bebidas, etc., como também na biotecnologia (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

Desde 1.500 a.C. as macroalgas marinhas já eram utilizadas como fonte de fármacos para o tratamento de gota, fístulas e de algumas formas de câncer. Entretanto, somente a partir de 1970 é que vários grupos de pesquisadores iniciaram a triagem sistemática de extratos de algas com intuito de encontrar produtos com atividade biológica. Como resultado, foram encontradas substâncias com atividade antiviral, antifúngica, antibacteriana e anticâncer, mostrando que as algas são uma fonte muito rica de produtos potencialmente utilizáveis como fármacos (BONGIORNI e PIETRA, 1996).

Embora alguns trabalhos científicos relatem diversos compostos bioativos em extratos de algas, entre os quais, aqueles capazes de inibir o crescimento de bactérias e fungos, estimularem o crescimento e/ou fortalecer as suas defesas contra o ataque de patógenos, somente na última década produtos à base desses organismos despertaram um maior interesse da comunidade científica e da iniciativa privada (KELECOM, 1997).

No Brasil, estudos com algas marinhas estão gerando conhecimento científico útil em diversas áreas, tais como na farmacologia, identificando compostos com atividade antiviral e anticâncer (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004; FRUGULHETTI et al., 2005;

ROMANOS, 2006) na área ambiental, como formadoras de fluxo biológico através de corredores ecológicos marinhos (ALVES, 2005), para o monitoramento e previsão de impactos ambientais (PUPO, 2005) na área sócio-econômica, implementando a produção de algas para gerar renda adicional em atividades maricultoras (REIS, 2006), na agricultura, utilizando extratos de macroalgas para proteção de plantas contra patógenos (STADNIK et al., 2005), entre outras linhas de pesquisa relevantes.

Apesar da comprovada eficiência terapêutica de muitos vegetais, os prováveis efeitos tóxicos que as mesmas podem apresentar quando usados inadequadamente ainda são desconhecidos ou muitas vezes, ignorados. De acordo com a utilização, modo de preparo e tempo de tratamento, um determinado vegetal pode apresentar, segundo Gomes et al. (2001), tanto uma ação terapêutica, quanto tóxica, sendo de suma importância o controle dos possíveis efeitos adversos que o uso agudo pode acarretar no organismo. Para tanto, os testes de toxicidade aguda são elaborados com o objetivo de prever os efeitos tóxicos ou de averiguar a toxicidade relativa das substâncias (FORBES e FORBES, 1994).

O presente estudo foi realizado com objetivo de avaliar a atividade biológica de extratos brutos e frações obtidas de espécies de algas marinhas do litoral alagoano, frente a fungos dermatófitos, *Candida*, células cancerígenas humanas, como bioinseticida natural no combate a larvas de *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 no controle da esquistossomose frente ao molusco *Biomphalaria glabrata* Say1818 e em testes de toxicidade com larvas de *Artemia salina* Leach, uma vez que, o uso desses extratos mostra-se uma alternativa de maior eficácia, com baixo custo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O termo “alga” foi proposto oficialmente como uma categoria taxonômica em 1753 por Lineu, no clássico *Species Plantarum*, cujo plural *Algae* nomeia uma das quatro ordens de criptógamos e incluem 14 gêneros e 214 espécies dos quais, apenas cinco gêneros e 48 espécies constituem o que hoje entendemos por algas. Os demais são representantes de líquens e algumas hepáticas (BICUDO e MENEZES, 2006).

São classificadas como talófitas por apresentarem uma estrutura simples não vascularizada com ausência de raiz, caule e folhas, não apresentam proteção das células reprodutivas (criptogâmicas), são produtoras de esporos e desprovidas de sementes e flores. Podem ser procarióticas ou eucarióticas, pluricelulares ou unicelulares, apresentando similaridade em muitos aspectos comuns com as plantas superiores como, por exemplo, a composição de seus carboidratos de reserva, proteínas e pigmentos fotossintetizantes. Possuem a clorofila “a” como seu pigmento fotossintetizante primário sendo responsável pela alta taxa de fotossíntese do bioma marinho. Outros tipos de clorofila, como os carotenóides, fundamentais na captação de fótons e estabilização de membrana, (β -caroteno e fucoxantina), a ficocianina e a ficoeritrina apresentam uma distribuição mais limitada nas algas, funcionando como pigmentos acessórios (RAVEN et al, 2007; LEE, 2008).

As algas sintetizam vitaminas, antioxidantes, vários ácidos graxos saturados e poli insaturados (importantes para a maturação de diversas larvas de peixes), aminoácidos, bases nitrogenadas, além de grande diversidade de polissacarídeos, tais como a carragenana, proteoglicanos e ágar (CARDOZO et al., 2006).

Segundo Cardozo et al. (2006), elas ainda são os biossintetizadores de moléculas sofisticadas capazes de absorver altas intensidades de radiação ultravioleta, permitindo assim a sobrevivência de outros organismos simbiotes em regiões tropicais. Estas moléculas são chamadas, genericamente, de *mycosporine-like amino acids* (MAAs).

Apresentam uma ampla distribuição geográfica, podendo ser encontradas em praticamente todas as condições ambientais da Terra, desde solos férteis a desertos quentes e frios. Entretanto, é nos ambientes aquáticos, tanto marinhos quanto em águas continentais, que é encontrado maior prevalência das microalgas (LEE, 2008). Nos ambientes aquáticos as algas desempenham um papel central na base da cadeia alimentar na alimentação de moluscos em todos os estágios de crescimento, para zooplâncton e para diferentes estágios de alguns crustáceos e espécies de peixes, na qual funcionam como produtores primários, produzindo matéria orgânica e dióxido de carbono, além de servirem como fonte de oxigênio, necessários

para o metabolismo dos consumidores (LEE, 2008). A presença das algas induz também a um aumento na biodiversidade marinha, pois além da fonte de alimentos e transferência nutricional de micronutrientes, elas servem de abrigo e esconderijo para diversos organismos pequenos (FALCÃO, 2006).

O valor nutricional de uma espécie de alga depende de diferentes características, tais como, tamanho, digestibilidade e toxicidade, mas o que parece ser determinante para estabelecer a qualidade de alimento transferido para outro nível trófico da cadeia é a sua composição química e bioquímica (níveis de ácidos graxos, esteróides, carotenóides, aminoácidos, açúcares, minerais e vitaminas). A importância das algas marinhas vai além do seu valor nutricional, pois também são responsáveis pela produção de aproximadamente 50% do O₂ e a maior parte de dimetil sulfeto liberado para a atmosfera é aquela que induz a formação de nuvens (RUPÉREZ, 2002).

As macroalgas pertencem aos reinos Protista I e II, onde se encontram os organismos pluricelulares, eucariontes e autótrofos e de acordo com suas características, estas são agrupadas em três filos Chlorophyta, Rhodophyta e Phaeophyta. Chlorophyta é composto pelas algas verdes, extremamente abundantes nos ambientes aquáticos, são capazes de acumular amido no interior de suas células, e contêm os pigmentos clorofilas “a” e “b”, carotenos e xantofilas, sendo estas duas características as principais para sustentar a idéia de que as algas verdes tenham sido as ancestrais das plantas superiores, por possuírem tais pigmentos. Rhodophyta, composta pelas algas vermelhas, quase que exclusivamente pluricelulares e marinhas, comuns em águas tropicais, geralmente vivem fixadas às rochas ou outras algas, mas existem algumas flutuantes. A principal característica é a presença do pigmento ficoeritrina em suas células, responsável pela coloração avermelhada destes organismos. Phaeophyta é composta pelas algas marrons com organismos pluricelulares predominantemente marinhos. As algas pardas são as maiores existentes, podendo atingir mais de 40 metros de comprimento. Nesses organismos são encontrados os pigmentos fucoxantina e como substância de reserva, óleos e polissacarídeos do tipo laminarina (BARSANTI e GUALTIERI, 2006; RAVEN et al, 2007; LEE, 2008).

Cerca de 4 milhões de toneladas de macroalgas são colhidas anualmente em todo o mundo, sendo os principais produtores a China e o Japão, seguidos pelos Estados Unidos e Noruega. A partir das algas são obtidos produtos imprescindíveis para a vida do homem moderno, com valores que ultrapassam alguns bilhões de dólares anuais (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004). Mais de 250 espécies de algas são exploradas comercialmente, onde 145 espécies são utilizadas na alimentação e 101 espécies para produção de ficocolóides

(ZEMKE-WHITE e OHNO, 1999). Os gêneros de macroalgas mais cultivados para exploração comercial incluem: *Porphyra*, *Laminaria*, *Monostroma*, *Enteromorpha* e *Gracilaria* (MOLL e DEIKMAN, 1995).

Diversas rodofíceas são utilizadas comercialmente na extração de ficocolóides, como o ágar, utilizados na fabricação de gomas, laxantes ou como meio de cultura para uso em laboratórios de microbiologia. Outro aspecto importante é a extração e utilização da carragenana, um hidrocolóide utilizado na fabricação de alimentos, como iogurtes, flans, sorvetes, achocolatados, embutidos, gelatinas e geléias. Esta também é utilizada como emulsificantes e estabilizantes, sendo substitutas do amido e da gordura na preparação de certos produtos alimentícios, com a vantagem de não ser energética, não tem cheiro, cor nem sabor. Também são encontradas diversas aplicações em indústrias não alimentícias (tintas, têxteis e cosméticas) e farmacêuticas (RUDOLPH, 2000, SMIT, 2004; BLUNT et al., 2006)

As algas marrons e verdes são bastante utilizadas na alimentação humana e de animais e ainda são utilizadas como fertilizantes na agricultura (CRITCHLEY e OHNO, 1998; SANTELICES, 1999; FLEURENCE, 1999).

Algumas características morfológicas, como a forma geral, o tamanho e a dureza do talo, e determinadas características bioquímicas, como a produção de defesas químicas estão relacionadas com o sucesso das algas nas relações com os herbívoros, de comprovada importância evolucionária e ecológica (BOUARAB et al., 2001).

As paredes celulares das algas marinhas, assim como de plantas superiores, podem ser entendidas como um sistema de duas fases: a *fase cristalina* (o esqueleto) que se encontra embebida em uma *fase amorfa* (a matriz). Elas diferem das plantas terrestres por apresentarem maior abundância de componentes da matriz quando comparados com os componentes do esqueleto e pela prevalência de polissacarídeos polianiônicos sobre os neutros. Além disso, paredes celulares de algas e plantas marinhas contêm polissacarídeos sulfatados, não observados em plantas terrestres e algas de água doce. Isto sugere que os polissacarídeos sulfatados da matriz extracelular têm funções específicas em relação ao ambiente marinho, sendo postulado que os mesmos estão relacionados com a regulação mecânica, osmótica ou iônica (KLOAREG e QUATRANO, 1988).

Como defesas químicas, as macroalgas marinhas produzem terpenos, acetogeninas, derivados de aminoácidos, fenóis simples e polifenóis, que diferem dos produtos de plantas fanerógamas por serem, halogenados. Os alcalóides, importantes defesas nas plantas superiores, parecem ser raros ou inexistentes nas macroalgas marinhas, a julgar pela ausência de citações na literatura (HAY e FENICAL, 1996).

2.1. Atividades biológicas de algas marinhas

2.1.1. Citotóxica

O câncer é uma das maiores causas de morte em muitos países. De acordo com Instituto Nacional do câncer (INCA-2009), no Brasil, as estimativas para o ano de 2010, válidas também para o ano de 2011, apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, são os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina.

A incidência desta enfermidade vem aumentando e se constituindo um desafio enorme para as instituições de saúde que necessitam de uma maior atenção médica e consequentemente aumenta consideravelmente os gastos para o tratamento. A quimioterapia do câncer tem sido enfraquecida porque os fármacos usados atualmente não só causam danos ao DNA das células tumorais como também afetam as células normais ou a certo ponto são ineficazes pelo aumento da resistência (WANG et al., 2008; MOO-PUC et al., 2009). Os mecanismos moleculares da resistência a drogas podem implicar em uma variedade de fatores tais como mutação dos genes alvos e a diminuição da concentração dos fármacos nas células devido à toxicidade renal (GOTTESMAN; PASTAN 1993; SMITH et al., 1998; ISNARD-BAGNIS et al., 2005).

Em virtude da necessidade de se ter um tratamento mais eficaz, existe uma prioridade em descobrir novos compostos terapêuticos para o tratamento do câncer. Os recursos naturais têm sido considerados uma das fontes mais promissoras para obtenção desses fármacos tais como o taxol, a camptotecina, a vincristina e a vinblastina (CRAGG e NEWMAN, 1999), principalmente a partir de plantas superiores devido a sua acessibilidade. Entretanto, atualmente alguns fármacos obtidos de organismos marinhos têm mostrado resultados promissores em diversas fases da doença (MOO-PUC et al., 2009).

As capacidades metabólicas e fisiológicas que os organismos marinhos possuem para sobreviverem em um habitat complexo promovem um enorme potencial para a produção de metabólitos exclusivos que não é observado no ambiente terrestre. Assim os organismos marinhos e particularmente os invertebrados sésseis tem sido reconhecido como uma fonte atrativa de potenciais compostos farmacêuticos (FAULKNER, 2002). Entre estes organismos, as algas também têm sido reconhecidas como uma das fontes mais ricas em novos compostos bioativos que estão publicados em revisões sobre atividade biológica de compostos derivados

(BLUNT et al., 2006). Estudos mostram que as algas produzem uma ampla variedade de metabólitos químicos secundários em seu ambiente como um auxílio para proteção contra outros organismos.

Estes metabólitos ativos também conhecidos como compostos halogenados, alcoóis, aldeídos, terpenóides e polissacarídeos sulfatados são produzidos por diversas espécies de macro e microalgas que possuem diversas propriedades entre elas a anticarcinogênica (BHADURY e WRIGHT, 2004; SMIT, 2004). Ainda a consumação de algas na alimentação é um tratamento químico preventivo contra agentes cancerígenos segundo TASKIN et al. (2010).

Estudos demonstram que as algas podem apresentar polissacarídeos característicos com atividade citotóxica tais como galactanas sulfatadas em algas vermelhas e as ramananas sulfatadas em Chlorophyta (PAINTER, 1983). Entre os principais polissacarídeos produzidos pelas algas pardas estão os ácidos algínicos, as laminaranas e as fucanas sulfatadas (ZVYAGINTSEVA et al., 2000). Os polissacarídeos manitol, fucose, laminarina e ácido algínico foram isolados das macroalgas pardas *Padina pavonica* e *Hydroclathrus clathratus* que apresentaram atividade citotóxica às células da linhagem HepG2 “in vitro”. As frações testadas exibiram alta atividade citotóxica quando comparadas com a substância referência doxorubicina (AWAD et al., 2009). Em contrapartida, Queiroz et al. (2006), isolaram três diferentes classes de polissacarídeos algais contra células HL60, os galactofucanos, fucoidano e glucano sendo este último um composto neutro que não apresentou citotoxicidade às células testadas.

Wang et al. (2008) relataram que o extrato aquoso de *Hydroclathrus clathratus* e *Padina arborescens* apresentaram um alto efeito inibitório em outros câncer testados, HL-60 e MCF-7 ‘in vitro’. Nesse estudo ainda, os autores obtiveram resultados promissores com algumas frações isoladas de *H. clathratus* em teste antitumoral ‘in vivo’.

Outro aspecto que deve ser considerado em um agente citotóxico é a seletividade que ele deve possuir em só causar danos às células cancerígenas, não apresentando nenhum efeito danoso às células saudáveis. Segundo Harada e Kamei (1997), o extrato da partição metanólica da alga vermelha *Amphiroa zonata* apresentou atividade citotóxica seletiva proeminente. Este extrato algal apresentou forte citotoxicidade a todas as linhagens celulares leucêmicas incluindo células leucêmicas murinas L1210 a $20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, enquanto não foi observado nenhuma atividade citotóxica em células murinas normais (NIH-3T3).

Segundo Wang et al. (2008), testes de citotoxicidade e antiproliferativo com extratos algais, mostraram que estes apresentam baixo efeito tóxico sobre as células normais,

mostrando ainda que as diferentes células cancerígenas testadas tiveram efeitos distintos. Uma possível razão desta seletividade é que provavelmente as substâncias ativas presentes nos extratos testados interagem com moléculas especiais presentes apenas nas células doentes e que desencadeia um mecanismo específico que causa a morte das células ou até mesmo pela capacidade relacionada com o rompimento da membrana celular.

2.1.2. Testes com *Artemia salina*

Teste de letalidade para larvas de *A. salina* tem sido introduzido na rotina de muitos grupos de pesquisas envolvidos com isolamento, purificação e elucidação estrutural, já que muitos laboratórios de fitoquímica não estão preparados para a realização de ensaios biológicos. São caracterizados pela curta duração da exposição (usualmente 2 a 4 dias) e por terem delineamentos experimentais menos elaborados, nos quais a letalidade e a imobilização de organismos jovens são os indicadores de efeito mais comumente avaliados (MCLAUGHLIN, 1991; FALKENBERG et al., 1999; MACIEL et al., 2002; RUIZ et al., 2005). Os cistos de *A. salina* são de baixo custo e facilmente encontrados no comércio, além de permanecerem viáveis por anos nos estado seco. Essas vantagens contribuíram para a popularização do bioensaio, sobretudo a partir da década de 90 (MEYER et al., 1982).

O ensaio foi proposto inicialmente por Michael et al. (1956) e posteriormente desenvolvido por Vanhaecke et al. (1981), bem como por Sleet e Brendel (1983), baseando-se na possibilidade de imobilizar náuplios de *A. salina* em culturas laboratoriais. Essa metodologia admite variações, como propostas por Solis et al. (1993) com a realização deste ensaio em microplacas ao invés de tubos bem como sua utilização na triagem de novos fármacos antiespasmódicos e antimaláricos.

Esta metodologia tem sido empregada ainda para detectar toxicidade preliminar de algas marinhas (ARA et al., 1999), realizar triagem de toxinas fúngicas (HARWIG; SCOTT, 1971), avaliar efeitos de exposição a metais pesados (MARTINEZ et al., 1999) e pesticidas (BARAHOMA; SÁNCHEZ-FORTÚN, 1999) e para testes de toxicidade em materiais dentários (PELKA et al., 2000).

Segundo Lhullier et al. (2006), que realizaram trabalho com 19 espécies de algas coletadas no litoral catarinense, os resultados mostraram que dos 26 extratos testados, 25 apresentaram toxicidade significativa no teste com *Artemia salina* em pelo menos uma das três concentrações testadas. O grupo de algas vermelhas foi o que obteve maior porcentagem de extratos com resultados estatisticamente significativos pelo método qui-quadrado e

também menores valores de LC_{50} , com destaque para *Acanthophora spicifera*, *Hypnea musciformis* e *Pterocladia capillacea*.

Carballo et al. (2002) compararam extratos de produtos marinhos com o ensaio de letalidade em 2 linhagens de células humanas. Segundo os autores, os resultados apresentam uma boa correlação, tal como já estabelecido para extratos de plantas (MCLAUGHLIN, 1991), sugerindo a utilização deste bioensaio para testar produtos naturais marinhos com potencial atividade farmacológica. Ainda segundo este mesmo autor, a utilização de *A. salina* para realizar um pré-screening de compostos bioativos com ação tumoral, é uma forma eficaz para escolher os extratos mais promissores.

Neste trabalho foi proposta a realização de um screening inicial com macroalgas bentônicas do estado de Alagoas, biomonitorado por ensaio de letalidade utilizando larvas de *Artemia salina*.

2.1.3. Microbiológica

Um agente microbiano é qualquer substância produzida, sintética ou naturalmente, utilizada para matar ou inibir o crescimento de microrganismos e protozoários (HEMINGWAY e RANSON, 2000; COELHO et al., 2004). A utilização de agentes antimicrobianos contribuiu grandemente para melhoramento na saúde, agricultura, indústria, mas sua utilização é acompanhada de uma crescente resistência a microrganismos e a um ou mais desses agentes. Esta resistência constitui uma ameaça para a saúde pública, pode prolongar o sofrimento dos doentes, aumenta os custos dos cuidados de saúde e tem repercussões econômicas para a sociedade (SANTOS JR. et al., 2005; STAMMLER et al., 2006; PARREIRA et al., 2009).

As algas marinhas têm demonstrado ser uma fonte rica em substâncias com ampla atividade contra fungos, bactérias e vírus (KHALIQU-UZ-AMAN et al., 2001; GONZALES DEL VAL et al., 2001; SELVIN e LIPTON, 2004). Estas atividades podem estar ligadas aos diversos metabolitos primários e secundários produzidos pelas algas. Segundo alguns autores, o potencial antimicrobiano destes organismos se deve à capacidade de sintetizar, entre outros compostos, os terpenóides, muito desses halogenados (MAGALLANES et al., 2003; SMIT, 2004). Além destes, os esteróis, compostos fenólicos e heterocíclicos são também encontrados nas algas e podem apresentar alguma atividade microbiológica (SMIT, 2004).

Segundo Túney et al. (2006), a atividade antibacteriana depende de dois fatores: a espécie algal e a eficiência do método de extração dos compostos. Entretanto, estudos têm

demonstrado que a variação dos metabólitos secundários é controlada genética e ambientalmente. Isto sugere que as condições ambientais, como sazonalidade e localização geográfica, são hábeis para alterar a concentração dos metabólitos secundários, embora os tipos de compostos sejam geneticamente fixos (FREILE-PELEGRIN e MORALES, 2004). Fatores bióticos como estágio reprodutivo e diferentes regiões do talo também podem influenciar a bioatividade do extrato algal (ROBLES-CENTENO et al., 1996; VLACHOS et al., 1999).

Diversos compostos antimicrobianos estão presentes em diferentes algas marinhas. Vlachos et al. (1997) realizaram uma bioprospecção antibiótica em 56 espécies de algas coletadas nas costas leste e oeste da África do Sul, verificando que, entre os extratos etanólicos testados, os da alga parda *Zonaria ubarticulata* mostraram mais amplo e intenso espectro de atividade antimicrobiana.

Em um estudo com diferentes algas provenientes da costa de Yucatan, no México, Freile-Pelegrin e Morales (2004), observaram que diferentes porções do talo de espécies da clorofícea *Caulerpa* demonstraram diferentes atividades contra *Bacillus subtilis*. Nesse trabalho, o extrato etanólico do estolão de *C. paspaloides* apresentou 18% mais atividade que os extratos da região basal e apical.

Os metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas em algas podem funcionar como mecanismo de defesa contra epífitos no ambiente marinho bem como manter a capacidade de uma rápida recuperação e regeneração após uma predação ou danos abrasivos (PESANDO, 1990; ABARZUA e JACUBOWSKI, 1995; VLACHOS et al., 1997).

Magallanes et al. (2003) demonstraram que de 12 diferentes extratos de algas, apenas os das espécies *Grateloupia doryphora*, *Prionitis decipiens*, *Ahnfeltiopsis durvillaei*, *Petalonia fascia* e *Bryopsis plumosa* foram efetivas contra bactérias gram-positivas.

Essa diferença na efetividade entre bactérias Gram positivas e Gram negativas têm sido observada em diversos trabalhos utilizando algas marinhas. A atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos e lipossolúveis de 21 espécies algais foram testadas em nove espécies bacterianas e uma fúngica, e apenas três bactérias gram-positivas foram suscetíveis aos extratos testados (FREILE-PELEGRIN e MORALES, 2004).

Da alga vermelha *Delisea pulchra* foi obtida uma lactona furanona halogenada conhecida como fimbrolídeos, um agente antimicrobiano promissor. É uma substância com perspectivas de uso para tratamento de infecções crônicas por *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria caracterizada pela produção de alginatos e pela formação de biofilmes em pulmão de pacientes portadores de fibrose cística (HOIBY, 2002), semelhantemente inibindo também a

sinalização célula-a-célula das espécies *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epideridise* *Streptococcus* ssp. (RICE et al., 2005; JANSSENS et al., 2008). Ensaios realizados com compostos análogos aos fimbrolídeos mostraram sua capacidade de inibição ao crescimento de diversas bactérias Gram negativas e Gram positivas (JANSSENS et al., 2008; ZHANG et al, 2009).

Em relação à atividade antifúngica, os extratos de algas têm demonstrado ser promissores para algumas espécies de fungos fitopatogênicos. ZHENG et al. (2001), mostraram que extratos de 23 espécies de macroalgas apresentaram atividade biológica, dos quais 17 foram eficientes contra o *Penicillium citrinum*, 13 contra *Fusarium oxysporum*, nove contra *Alternaria dianthi* e dois contra *Aspergillus niger*. Segundo os autores a atividade antifúngica foi maior no extrato etanólico de *Gelidium amansii* que inibiu fortemente o crescimento de *F. oxysporum*.

Gonzales Del Val et al. (2001) também observaram que os extratos das algas *Caulerpa prolifera*, *Cymopolia barbata*, *Enteromorpha muscoides*, *Dictyota* sp., e *Asparagopsis taxiformis* apresentaram atividades contra *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus fumigatus*, sendo os extratos de *A. taxiformis* e *C. barbata* as que apresentaram maior atividade antifúngica. Moléculas do tipo triterpeno sulfatado, denominada Capisterona, isoladas de uma alga verde *Penicillus capitatus* mostrou-se efetiva contra um fungo marinho patogênico, *Lindra thallasiae* “in vitro” (PUGLISI et al., 2004).

O mecanismo de ação antimicrobiana dos terpenos não foi ainda completamente elucidado, porém supõe-se que envolve uma disrupção da membrana por meio dos compostos lipofílicos. De acordo com Mendoza et al. (1997), aumentando a hidroflicidade de diterepenodo grupo caurenico, diminui drasticamente a atividade antimicrobiana. Terpenos lipofílicos são solúveis em biomembranas. Em altas concentrações, eles podem interagir com canais iônicos, transportadores e receptores presentes nas membranas e assim mudar a conformação e bioatividade.

Como antiviral os extratos de *Meristiella gelidium* apresentou atividade biológica contra herpesvirus e vírus da dengue (FARIA-TISCHER et al. 2006). Ainda com ação antiviral, o composto isolado a alga *Halimeda tuna*, halitunal, apresentou atividade antiviral contra coronavírus (KOEHN et al., 1991).

Polissacarídeos isolado de *Ulva lactuca* contendo arabinose, xilose, ramnose, galactose, manose e glicose, além de outro açúcar não identificado, mostrou atividade antiviral contra o vírus da influenza humana e de aves. Esta propriedade mostrou-se dose-dependente, espécie-específica e seletiva (IVANOVA et al., 1994). Outro polissacarídeo

sulfatado e uma fucana sulfatada, ambos extraídos das algas *Monostroma latissimum* e *Sargassum horneri*, respectivamente, inibiram a replicação do vírus HSV-1 (LEE et al., 1998; HOSHINO et al., 1999).

2.1.4.Larvicida e Moluscicida

Mosquitos são os mais importantes artrópodes sugadores de sangue, capazes de transmitir doenças como malária, dengue, febre amarela, encefalitis, filarioses entre outros. Milhões de pessoas em todo o mundo, particularmente no sul e sudeste Asiático sofrem de doenças transmitidas por mosquitos do gênero *Anopheles*, *Aedes* e *Culex*. Devido a isso, o controle do mosquito é um passo importante para a prevenção de infecções que prejudicam a população. A pressão de seleção dos inseticidas convencionais tem levado ao aumento da resistência da população de mosquitos em um ritmo alarmante (BROWN, 1986).

Existem limitações para programa de controle do mosquito, devido ao aumento do custo de inseticidas sintéticos e também o problema dos riscos ambientais. Neste contexto, o uso de produtos naturais para o controle populacional do mosquito é uma grande promessa, e inseticidas de origem vegetal têm recebido uma atenção especial nas últimas décadas (MUTHUKRISHNAN et al., 1997; PUSHPALATHA; MUTHUKRISHNAN, 1999).

Várias moléculas biologicamente ativas têm sido isoladas da fauna e flora marinha, que estão sendo aplicadas nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, cosméticas, agroquímicas, químicas entre outros (FAULKNER, 2002).

Algumas fontes marinhas relatadas com atividade inseticida são plantas de mangues, algas marinhas e tunicados (KABARU; GICHIA, 2001; ZETI et al., 2001). Estudos mostraram que extratos obtidos de organismos marinhos apresentaram-se letais às larvas de organismos incrustantes, incluindo cracas (artrópode) (THAKUR et al, 2004).

Segundo Ahmad et al. (2004), houve mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* quando estas foram submetidas a tratamento com 10 diferentes tipos de algas verdes. Ainda segundo este mesmo autor, a porcentagem de mortalidade de larvas do mosquito foi de 100% quando estes se alimentaram com microalgas das espécies *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus quadricauda*.

A esquistosomose é uma das maiores fontes de mortalidade e mobilidade na África, Ásia, América do Sul e Caribe. O número de espécies de *Schistosoma* pode causar doenças sistêmicas nos seres humanos, mas o principal agente da esquistosomose humana é causada pela espécie *S. mansoni*. O desenvolvimento das larvas desta espécie ocorre em diversas

espécies de caramujos do gênero *Biomphalaria*. Assim, o tratamento com moluscidas nas massas de água, que é o sítio de transmissão, é um importante procedimento para o controle da doença (KATZ e PEIXOTO, 2000).

A demanda por moluscidas baratos têm levado a estudos massivos utilizando fontes naturais para isolar compostos bioativos (LARDANS e DISSOUS, 1998; LAHLOU, 2004).

Estudos utilizando 60 tipos de algas marinhas foram testados como agente moluscida contra *B. glabrata*. A maioria dos extratos testados foram inativos nas concentrações utilizadas, mas as algas das espécies *Fucus serratus*, *F. vesiculosus*, *Pelvetia canaliculata*, *Ascophyllum nodosum*, *Halidrys siliquosa*, *Bifurcaria bifurcata*, *Dictyota dichotoma* e *Halopithys incurva* apresentaram significativa atividade moluscida (PATEL et al. (2006).

O extrato metanólico *A. nodosum* obteve 45% de morte desses organismos na concentração de 100ppm (PATEL et al., 2006). Segundo estes mesmos autores os extratos de todas as espécies que mostraram atividade moluscida foram dialisada com água destilada para separá-lo em alto e baixo peso molecular e a atividade moluscida foi encontrada na fração de alto peso molecular em todas as espécies de Fucaceae testadas, mas a fração de baixo peso molecular de todas as espécies testadas, com exceção da espécie *H. incurva*, foi inativa. Uma das possíveis ações moluscida destes extratos são os polifenóis presentes nas espécies de Fucaceae. Estes compostos já foram descritos previamente nas espécies de *F. vesiculosus* e *A. nodosum* contra *Littorina littorea*, um caramujo herbívoro marinho (GEISELMAN; McCONNELL, 1981).

Polifenóis de alto peso molecular apresentam também atividades de hemaglutinação (BLUNDEN et al., 1986) e de inibidor enzimático (BARWEL et al., 1989). As feofíceas, em particular as Fucales, demonstraram conter grande quantidade de polifenóis, que são constituídos essencialmente de unidades de floroglucinol, e que pode ocorrer como estrutura ramificada. A atividade moluscida dos polifenóis (taninos) em plantas superiores tem sido relatada (SCHAUFELBERGER; HOSTERTTMAN, 1991).

3. MATERIAL E MÉTODO GERAL

3.1. Local de Estudo

A praia escolhida para coleta de macroalgas foi Riacho Doce, com as seguintes coordenadas geográficas: 9°34'0" S e 35°39'0" W (Fig. 1). Localiza-se em plena zona tropical banhada pelo Oceano Atlântico, apresenta clima quente e úmido, que segundo a classificação climática de Köppen corresponde ao tipo As', caracterizado por apresentar-se sem grandes diferenciações térmicas e precipitação concentrada no outono e inverno. As temperaturas médias mensais oscilam em torno de 25,1°C. A máxima mensal atinge 29,9°C e a mínima 20,8°C, apresentando uma amplitude térmica anual de 9°C. A umidade relativa do ar é em média de 79,2%, sendo julho o mês mais úmido e novembro o mais seco. O índice pluviométrico é sempre superior a 1.410mm/ano (<http://www.semarh.al.gov.br/temp/clima>).

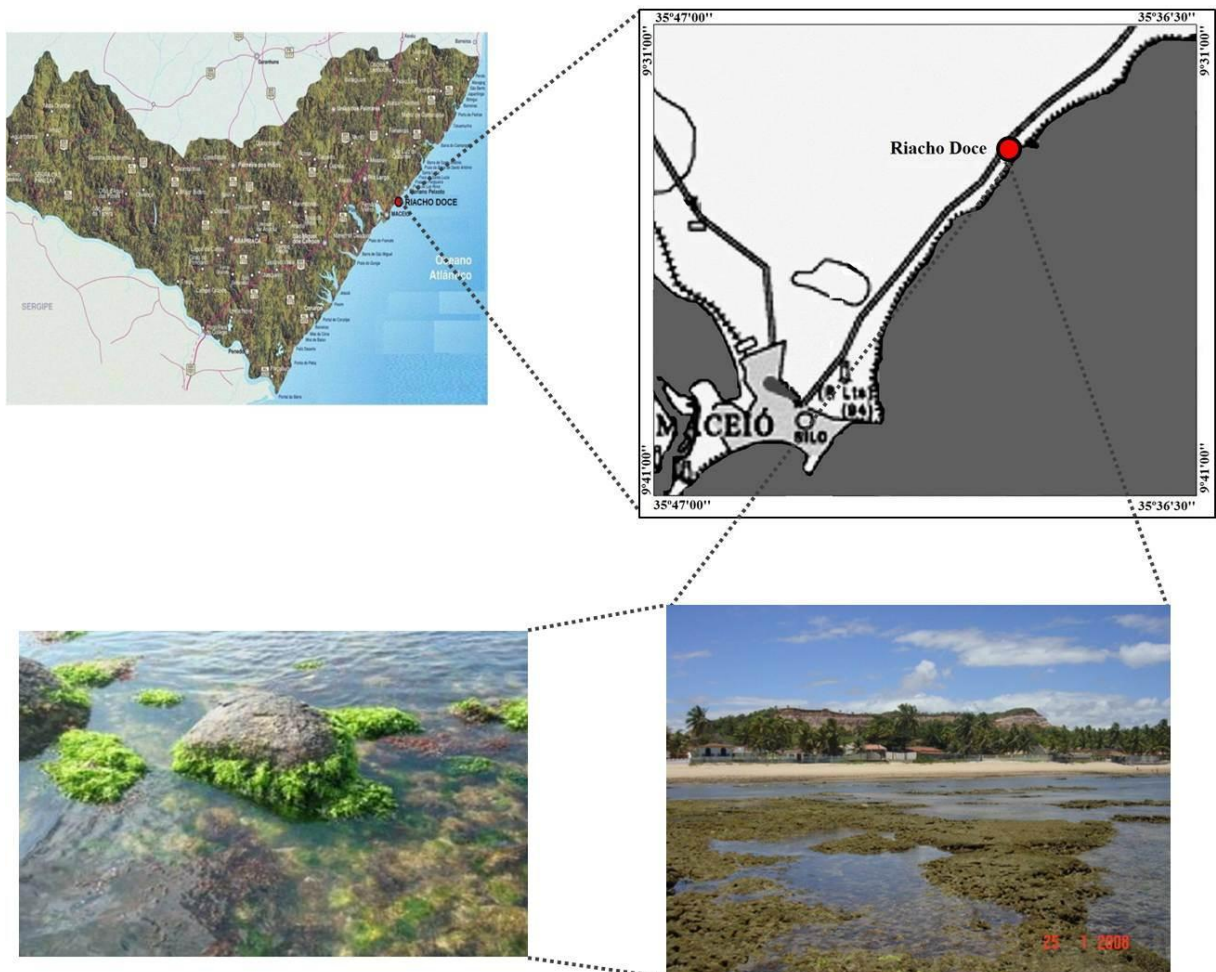


Figura 1. Localização do Estado de Alagoas com destaque para praia de Riacho Doce onde foram realizadas as coletas (ponto vermelho).

3.2. Material biológico para obtenção de extratos

As algas marinhas utilizadas para o presente estudo foram coletadas na baixa-mar durante o período de julho de 2008 a outubro de 2010 e estão listadas na tabela 1. Alguns exemplares foram separados para servir de testemunha e as exsiccatas estão depositadas no Herbário MAC do Instituto do Meio Ambiente da cidade de Maceió, AL.

Tabela 1. Relação do material coletado para preparação dos extratos com respectivos numero de acesso das exsiccatas depositadas no Herbário MAC do IMA, Maceió -AL.

| Espécies de algas | Numero de acesso |
|--|------------------|
| <i>Ulva lactuca</i> Linnaeus | MAC51238 |
| <i>Dictyota dichotoma</i> (Hudson) Lamouroux | MAC51230 |
| <i>Padina gymnospora</i> (Kutzing) Sonder | MAC51235 |
| <i>Sargassum vulgare</i> C. Agardh | MAC51236 |
| <i>Digena simplex</i> (Wulfen) C. Agardh | MAC51231 |
| <i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen) Lamouroux | MAC51234 |
| <i>Galaxaura rugosa</i> (J.Ellis & Solander) J.V.Lamouroux | MAC51239 |
| <i>Gellidium pusillum</i> (Stackhouse) Le Jolis | MAC51233 |
| <i>Gracilaria caudata</i> J. Agardh | MAC51232 |

As algas foram lavadas com água destilada, secas em estufas de ar circulante (BLUE MOD1401440SC,USA) a temperatura de 45^oC por cinco horas e trituradas em liquidificador industrial (modelo METVISA tipo TA-2,Brasil). Para obtenção dos extratos brutos, amostras de 500g de alga seca foram suspensas em 1000 mL de diclorometano, clorofórmio, metanol, etanol e água e maceradas por 72 horas, sendo esse processo repetido três vezes. Os extratos orgânicos foram filtrados e rotoevaporados (Rotevaporador Buchii Heating Bath-B490,Switzerland) a 25^oC a 40^oC, exceto o extrato aquoso que foi liofilizado (Liofilizaodor Edwards Alto vácuo, ModE2MB,Brasil). Os extratos em diclorometano de *H. musciformis* e *P. gymnospora* foram selecionados para fracionamento, pois apresentaram melhores rendimentos: 11,86g (2.588%) e 13,96g (3,04%), respectivamente. Para o fracionamento por partição líquido-líquido, os extratos brutos de *H. musciformis* (2,73g) e *P. gymnospora* (1,90g) foram suspensos em metanol: água (3:1) e extraídos respectivamente com hexano e clorofórmio, obtendo-se as frações hexânicas e clorofórmica para realização dos testes.

Todos os solventes utilizados foram da VETEC-Química Fina (RJ-Brasil). O esquema representativo está ilustrado na figura 2.

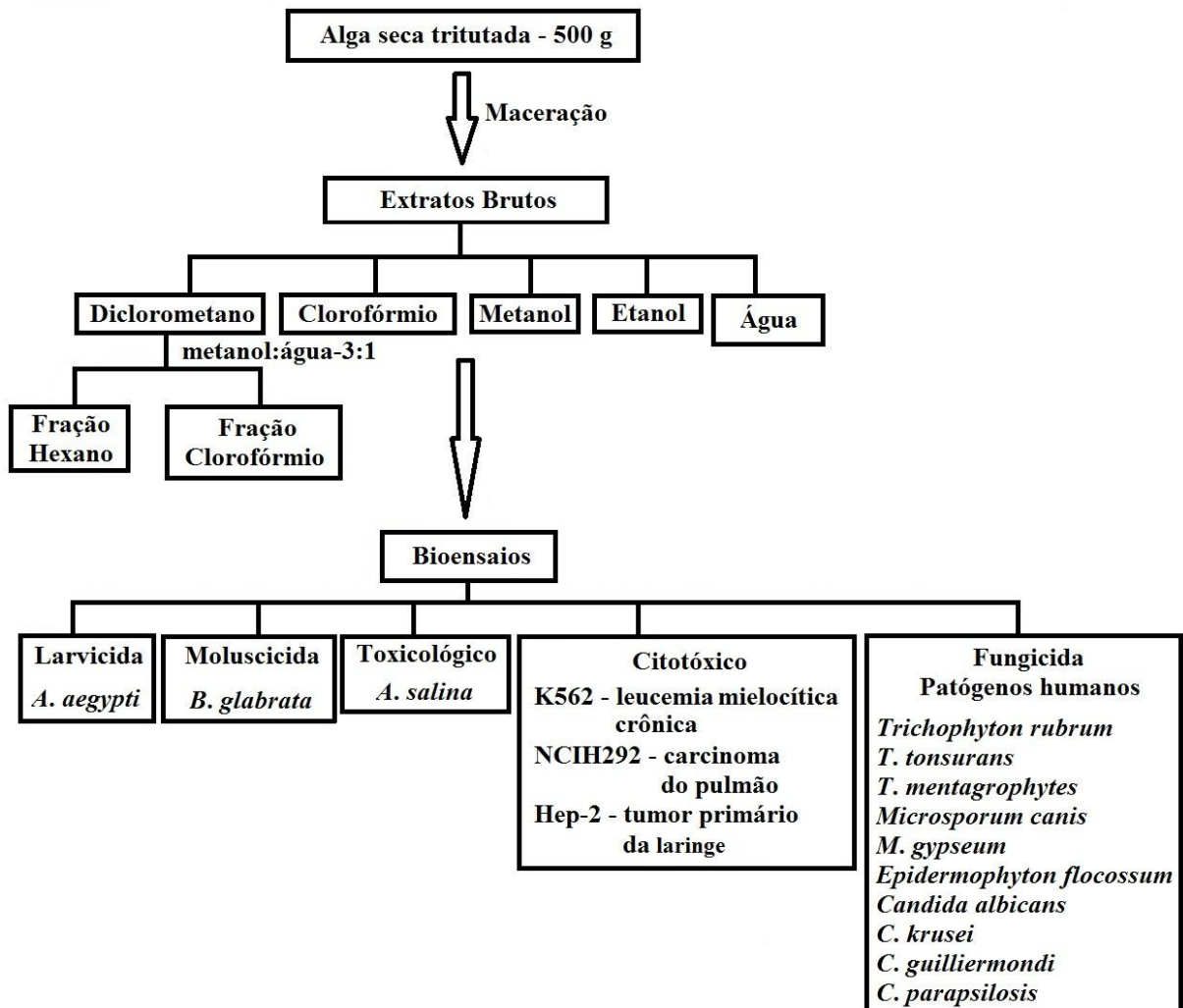


Figura 2. Esquema representativo do processo de extração para obtenção dos extratos brutos e frações provenientes das algas para realização dos bioensaios.

4. REFERÊNCIAS

ABARZUA, S.; JAKUBOWSKI, S. Biotechnological investigation for prevention of biofouling. I. Biological and biochemical principles for the prevention of biofouling. **Marine Ecology Progress Series**, v.123, p.301-312, 1995.

ALVES, J.P. As macroalgas no contexto dos corredores ecológicos marinhos. **Summa Phytopathologica**, v.31, n.24, 2005.

AHMAD, R.; CHU, W.L.; ISMAIL, Z.; LEE, H.L.; PHANG, S.M.. Effect of ten chlorophytes on larval survival, development and adult body size of the mosquito *Aedes aegypti*. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.35, p.79-87, 2004

ARA, J.; SULTANA, V.; EHTESHAMUL-HAQUE, S.; QASIM, R.; AHMAD, V.U. Cytotoxic activity of marine macro-algae on *Artemia salina* (brine shrimp). **Phytotherapy Research**.v.13, p. 304-307, 1999.

ASSAD, A.L.D. In: SANT'ANA, P.J.P. **A Bioprospecção no Brasil**. Brasília. 2002.220p.

AWAD, N.E.; MOTAWA, H.M.; SELIM, M.A.; MATLOUB, A. A. Antitumorigenic polysaccharides isolated from the brown algae, *Padina pavonia* (L.) Gaill. and *Hydroclathrus clathratus* (C. Agardh) Howe. **Medical and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v. 3, p. 6-11, 2009.

AZEVEDO, C.M.A. Bioprospecção – Coleta de materiais biológicos com a finalidade de explorar os recursos genéticos. **Série Cadernos da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica**. Caderno nº17, 2ª edição revisada. São Paulo. 2003.

BARAHONA, M.V.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S. Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. **Environmental Pollution**,v.104, p. 469-476, 1999

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Algae: **Anatomy, Biochemistry and Biotechnology**. Eds. Taylor and Francis Group, Florida. 2006.301p.

BARWELL, C.J.; BLUNDEN, G.; MANANDHAR, P.D. Isolation and characterization of brown algal polyphenols as inhibitors of α -amylase, lipase and trypsin. **Journal Applied Phycology**, v.1, p. 319-323, 1989.

BHADURY, P.; WRIGHT, P.C. Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications. **Planta**, v. 219, p. 561-578, 2004.

BICUDO, C.E.M.; MENEZES, M. **Generos de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições**. 2^aEd. RIMA, 2006, 502p.

BONGIORNI, L.; PIETRA, F. Marine natural products for industrial applications. **Chemical Industry**, p.54-57, 1996.

BOUARAB, K.; KLOAREG, B.; POTIN, P.H; CORREA, J.A. Ecological and biochemical aspects in algal infectious diseases. **Cahiers Biologie Marine**,v.42, n.1-2, p.91-100, 2001.

BLUNDEN, G.; ROGERS, D.J.; LOVELESS, R.W.; PATEL, A.V. **Haemagglutinins in marine algae - lectins or phenols?** In: Bog-Hansen, T.C., van Driessche, E. (eds.), *Lectins*, vol. 5. Walter de Gruyter, Berlin, p. 139-145, 1986.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.; NOTHCOTE, P.T.; PRINSET, M.R. Marine Natural products. **Natural Product Reports**, v.23, n.1, p.26-78, 2006.

BROWN, A.W.A. Insecticide resistance in mosquitoes: A pragmatic review, **Journal American Mosquitoes Control Association**,v.2, p.123-139, 1986.

CARBALLO, J.L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z.L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M.D. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology**, v.2, p. 1-5, 2002.

CARDOZO, K.H.M.; CARVALHO, V.M.; PINTO, E.;COLEPICOLO, P. Fragmentation of mycosporine-like aminoacids by hydrogen/deuterium exchange electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrum**,v.20, n.2, p.253-258, 2006.

COELHO, M.H.M.; TOSTI, S.C.; FIGUEIREDO, L.C. de; CORTELLI, S.C.; COLOMBO, A.P.; FERES, M.G. Ação antimicrobiana in vitro de extratos vegetais e da própolis em amostras de saliva. **Revista Brasileira de Odontologia**, v 61, p.12-15, 2004.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Discovery and development of antineoplastic agentes from natural sources. **Cancer Investigation**, v.17, p.153-163, 1999.

CRITCHLEY, A.T.; OHNO, M. Seaweed resources of the world. **Japan International Cooperation Agency**, Yokosuka, 1998.431p.

FALCÃO, V.R. **Aspectos moleculares de nitrato redutase da macroalga marinha *Gracilaria tenuistipitata* (Rodophyta): sequenciamento do gene e estudo da expressão do RNA mensageiro**, São Paulo, Brasil, 132 folhas (Tese de Doutorado). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2006.

FALKENBERG. M.; BAUMGARTEN, D.; SIMIONATO, C. Screening of some Brazilian medicinal plants with the brine shrimp assay. **Acta Horticulturae**. v.502, p. 401-404, 1999.

FARIA-TISCHER, P.C.S.; TALARICO, L.B.; NOSEDA, M.D.; GUIMARAES, S M.P.B.; DAMONTE, E.B.; DUARTE, M.E.R. Chemical structure and antiviral activity of carrageenans from *Meristiella gelidium* against herpes simplex and dengue virus. **Carbohydrate Polymers**, v.63, p.459-465, 2006.

FARNSWORTH, N. Testando plantas para novos remédios. In: **Biodiversidade**. Editado e org. por E. O.Wilson. Editora Nova Fronteira, p. 107, 1977.

FAULKNER, D.J., Marine natural products. **Natural Products Reports**, v.19, p. 1-48, 2002.

FREILE-PELEGRIN, Y.; MORALES, J.L. Antibacterial activity in marine algae from the coast of Yucatan, Mexico. **Botanica Marina**, v.47, n.2, p.240-246, 2004.

FLEURENCE, J. The enzymatic degradation of algal cells walls: a useful approach improving protein accessibility. **Journal Applied Phycology**, v.11,p. 313-314, 1999.

FORBES, V.E.; FORBES, T.L. **Ecotoxicology in Theory and Practice**. Chapman and Hall. Londres. p.247, 1994.

FRUGULHETTI, I.C.P.P.; AMORIM, L.M.F.; TEIXEIRA, V.L.; PEREIRA, R.C. Estudos da atividade antiviral e anticâncer de substâncias isoladas de algas marinhas. **Potencial Biotecnológico das Macroalgas Marinhas**. Oficina de Trabalho, Angra dos Reis, 2005.

GAINES, S.D.; LUBCHENCO, J. A unified approach to marine plant-herbivore interactions. II. Biogeography. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v.13,p. 111-138, 1982.

GEISELMAN, J.A.; MCCONNELL, O.J. Polyphenols in brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*: chemical defences against the marine herbivorous snail, *Littorina littorea*. **Journal Chemical Ecology**, v.7,p.1115-1133,1981.

GOMES, E.C.; ELPO, E.R.S.; GABRIEL, M.M.; LOPES, M. Plantas Medicinaias com características tóxicas usadas pela população de Morretes, PR. **Revista Visão Acadêmica**, v.2, n.2, p.77-80, 2001.

GONZALEZ DEL VAL, A.; PLATAS, G.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; GORROCHATEGUI, J.; SUAY, I.; VICENTE, F.; PORTILLO, E.; JIMÉNEZ DEL RÍO, M.; REINA, G. G.; PELÁEZ, F. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). **International Microbiology**, v.4, p. 35-40, 2001.

GOTTESMAN, M.M; PASTAN, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. **Annual Review of Biochemical**, v.62, p.385-427, 1993.

HALPERIN, D.R. de. Las algas in la alimentacion humanas. CIBIMA. Buenos Aires (**contribuicion técnica**), CIBIMA, v.10, 39p., 1971.

HARADA, H.; KAMEI, Y. Selective cytotoxicity of marine algae extracts to several human leukemic cell lines. **Cytotechnology**, v.25, p. 213-219, 1997.

HARWIG, J; SCOTT, P. Brine shrimp (*Artemia salina*) larvae as a screening system for fungal toxins. **Applied Environmental Microbiology**, v.21, p. 1011-1016, 1971.

HAY, M.E. Coral reef ecology: have we been putting all of our herbivores in one basket? **BioScience**, v.34, p.23-324, 1984.

HAY, M.E.; FENICAL, W. Chemical ecology and marine biodiversity: insights and products from the sea. **Oceanography**, v.9, p.10–20, 1996.

HEMINGWAY, J.; H. RANSON. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual Review Entomology**, v.45, p.371-391, 2000.

HOIBY, N. Understanding bacterial biofilms in patients with cystic fibrosis: current and innovative approaches to potential therapies. **Journal of Cystic Fibrosis**, v.1, p.249-254, 2002.

HOSHINO, T.; HAYASHI, T.; HAYASHI, K.; HAMADA, J.; LEE, J. B. SANKAWA, U. An antivirally active sulphated polysaccharide from *Sargassum horneri*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 21, p. 730-734, 1999.

ISNARD-BAGNIS, C.; MOULIN, B., LAUNAY-VACHER, V.; IZZEDINE, H. TOSTIVINT, I.; DERAY, G. Anticancer drug-induced nephrotoxicity. **Nephrology Therapy**, v.1, p.101-114, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA).**Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer**, Rio de Janeiro, INCA, 98p., 2009.

IVANOVA, V.; ROUSEVA, R.; KOLAROVA, M.; SERKEDJIVA, J.; RACHEV, R. E MANOLOVA,N. Isolation of a polysaccharide with antiviral effect from *Ulva lactuca*. **Preparative Biochemistry**, v. 24, n. 2, p. 83-97, 1994.

JANSSENS, J.C.A.; STEENACKERS, H.; ROBIJNS, S.; GELLENS, E.; LEVIN, J.; ZHAO, H.; HERMANS, K.; DE COSTER, D.; VERHOEVEN, T.L.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J.; DE VOS, D.E.; DE KEERSMAECKER, S.C.J. Brominated Furanones Inhibit Biofilm Formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Applied Environmental Microbiology**, v.74, n.21, p. 6639-6648, 2008.

KABARU, J.M; GICHIA, L. Insecticidal activity of extracts derived from different parts of the mangrove tree *Rhizophora mucronata* (Rhizophoraceae) Lam. Against three arthropods, **African Journal Science Technology**, v.2, p.44-49, 2001.

KATZ, N.; PEIXOTO, S. V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.3, p.303-308, 2000.

KHALIQ-UZ-AMAN, S.M.; SIMIN, K.; SHAMEEL, M. Antimicrobial activity and phytotoxicity of sterols from *Chara wallichii* A. Br. (Charophyta). **Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research**, v.44, n. 5, p.301-304, 2001.

KELECOM, A. Marine natural products in Brazil. Part1. Isolation and structural determination. **Ciência e Cultura - Journal of the Brazilian Association for the advancement of Science**, v. 49, n 5/6, p. 321-330, 1997.

KLOAREG, B.; QUATRANO, R.S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides, **Oceanography Marine Biology Annual Review**, v.26, p. 259-315, 1988.

KOEHN, F.E.; GUNASEKERA, S.P.; NIEL D.N.; CROSS, S.S.. Halitunal, an unusual diterpene aldehyde from the marine alga *Halimeda tuna*, **Tetrahedron Letters**. v.32, p. 169-172, 1991.

LEE, E. **Phycology**. 4ed. Cambridge University Press; Cambridge, 2008.

LARDANS, V., DISSOUS, C.. Snail control strategies for reduction of schistosomiasis transmission. **Parasitology Today**, v.14, p.413-417. 1998.

LAHLOU, M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. **Phytotherapy Research**, v.18, p.435-438, 2004.

LEE, J. B.; YAMAGAKI, T.; MAEDA, M.; NAKANISHI, H. Rhamnan sulfate from cell walls of *Monostroma latissimum*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 6, p. 921-925, 1998.

LHULLIER, C. **Triagem de macroalgas bênticas do litoral de Santa Catarina biomonitorada pelo ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* e investigação fitoquímica de *Pterocladia capillacea***. Florianópolis, 100p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina. 2005.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V.E. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 23, p.429-438, 2002.

MAGALLANES, C.; CÓRDOVA, C.; OROZCO, R. Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. **Revista Peruana Biologica**, v.2, n.10, p.125-132, 2003.

MARTINEZ, M.; DEL RAMO, J.; TORREBLANCA, A.; D'IAZ-MAYANS, J. Effect of cadmium exposure on zinc levels in the brine shrimp *Artemia partenogenetics*. **Aquaculture**, v.172, p. 315-325, 1999.

MCLAUGHLIN, J.L. Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractions. In: Dey PM, Harbone JB (ed.) **Methods in Plant Biochemistry**. New York: Academic Press, p.1-32, 1991

MENDOZA, L.; WILKENS, M.; URZÚA, A. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.58, n. 2, p. 85-88,1997.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**,v.45, p. 31-34, 1982.

MICHAEL, A.S.; THOMPSON, C.G.; ABRAMOVITZ, M. *Artemia salina* as a test organism for a bioassay. **Science**, v.123, p. 464-468, 1956.

MOO-PUC, R.; ROBLEDO, D.; FREILE-FELEGRIN, Y. *In vitro* cytotoxic and proliferative activities of marine algae from Yucatan, Mexico. **Ciencias Marinas**, v.35, n.4, p. 345-3582, 2009.

MOLL, B.; DEIKMAN, J. *Enteromorpha clathrata*: A potential seawater-irrigated crop. **Bioresource Technology**, v.52, n.3, p.255-260, 1995.

MUTHUKRISHNAN J.; PUSHPALATHA, E.; KASTHURIBHAI, A. Biological effects of four plant extracts on *Culex quinquefasciatus* Say larval stages, **Science Application**, v.17, p.389-394, 1997.

PADILLA, D.K. Structural resistance of algae to herbivores. A biomechanical approach. **Marine Biology**, v. 90, p. 103-109, 1985.

PAINTER, T.J. Algae polysaccharide. IN: ASPINAL, G.O. (ed.). **The polysaccharides**. New York Academic Press. v.2, 1983. 517p.

PARREIRA, D.F.; NEVES, W.S.; ZAMBOLIM, L. Resistência de Fungos a Fungicidas Inibidores de Quinona. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.3, n.2, p. 24-34, 2009.

PATEL, A.V.; WRIGHT, D.C.; ROMERO, M.A.; BLUNDEN, G.; GUIRY, M.D. Molluscicidal polyphenols from species of Fucaceae. **Natural. Products Communication**. v.3, n.2, p.245-249. 2006.

PELKA, M.; DANZL, C.; DISTLER, W.; PETSCHERT, A. A new screening test for toxicity testing of dental materials. **Journal of Dentistry**, v.28, p.341-345, 2000.

PESANDO, D. Antibacterial and antifungal activities of marine algae. In: I.Akatsuka (ed.) **Introduction to Applied Phycology**. SBP. Publishing by The Hague, p.3-27, 1990.

PUGLISI, M.P.; TAN, L.T.; JENSEN P.R.; FENICAL, W. Capisterones A and B from the tropical green alga *Penicillus capitatus*: unexpected anti-fungal defenses targeting the marine pathogen *Lindra thallasiae*. **Tetrahedron**, v.60, p. 7035-7039, 2004.

PUPO, D. **Monitoramento de impactos ambientais decorrentes da maricultura**. Oficina de trabalho potencial biotecnológico das macroalgas marinhas. Angra dos Reis, RJ. p: 03, 2005.

PUSHPALATHA, E.; MUTHUKRISHNAN, J. Efficacy of two tropical plant extracts for the control of mosquitoes, **Journal Applied Entomology**, v.123,p.369-373,1999.

QUEIROZ, K.C.; ASSIS, C.F.; MEDEIROS, V.P; ROCHA, H.A.O; AOYAMA, H.; FERREIRA, C.V.; LEITE, E.L. Cytotoxicity effect of algal polysaccharides on HL60 cells. **Biochemistry (mosc)**, v.71, n.12, p.1312-1315, 2006.

RAVEN, H.P.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 7ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 2007. 830p.

REIS, R.P. **Estudos sobre maricultura, produção de carragenana e crescimento de algas de interesse comercial no Estado do Rio de Janeiro**. Brasil. Oficina de trabalho potencial biotecnológico das macroalgas marinhas. Angra dos Reis, RJ. p: 24, 2006.

RICE, S.A.; MCDUGALD, D.; KUMAR, N.; KJELLEBERG, S. The use of quorum sensing blockers as therapeutic agents for the control of biofilm associated infections. **Current Opinion and Investigation Drugs**, v.6, p. 178-184, 2005.

ROBLES-CENTENO, P.O; BALLANTINE, D.L; GERWICK, W.H. Dianamics of bacterial activity in three species of Caribbean marine algae as a function of habitat and life history. **Hidrobiologia**, v.327/327, p.457-462, 1996.

ROMANOS, M.T.V. **Potencial antiviral de macroalgas marinhas**. Oficina de trabalho potencial biotecnológico das macroalgas marinhas. Angra dos Reis, RJ. p: 15, 2006.

RUDOLPH, B. **Seaweed products: red algae of economic significance**. In: R.E. MARTIN (Ed.) *Marine & freshwater products handbook*. Technomic Publishing Co., Lancaster, p: 515-529, 2000.

RUIZ, A.L.T.G.; MAGALHÃES, E.G.; MAGALHÃES, A.F; FARIA, A.D.; AMARAL, M.C.E.; SERRANO, D.R.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.; MAGALHÃES, L.A. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.15, p. 98-102, 2005.

RUPÉREZ, P. Mineral content of edible marine seaweeds. **Food Chemistry**, v.79, n.1,p 23-26,2002.

RYTHER, J. H.; DUNSTAN, W. M. Nitrogen, Phosphorus, and Eutrophication in the Coastal Marine Environment. **Science**, v.171, n.3975, p.1008-1013, 1971.

SANTELICES, B. A conceptual framework for marine agronomy. **Hydrobiologia** v.399,p.15-23, 1999.

SANTOS JR., I.D. dos; SOUZA, I.A.M.; BORGES, R.G.; SOUZA, L.B.S. de SANTANA, W.J. de; COUTINHO, H.D.M. Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol General traits of action, treatment and fungal resistance to fluconazol. **Scientia Medica**, v.15, n.3, p.189-197, 2005.

SCHAUFELBERGER, D; HOSTETTMANN, K. On the Molluscicidal Activity of Tannin Containing Plants. **Planta Medica**,v.48, p.105-107, 1983

SELVIN, J.; LIPTON, A.P. Biopotentials of *Ulva fasciata* and *Hypnea musciformis* collected from the peninsular coast of India. **Journal of Marine Science and Technology**, v.12,p.1-6, 2004.

SLEET, R.B.; BRENDDEL, K. Improved methods for harvesting and counting synchronous populations of *Artemia nauplii* for use in developmental toxicology. **Ecotoxicol Environ Safety**, v.7, p. 435-446, 1983.

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

SMITH, B.D.; BOTSFORD, L.W.; WING, S.R. Estimation of growth and mortality parameters from size frequency distribution lacking age patterns: the red sea urchin (*Stongylocentrotus franciscanus*) as an example. **Canadian Journal Fisheries Aquatic Science**, v.55, P. 1236-1247, 1998.

SOLIS, P.N.; WRIGHT, C.W.; ANDERSON, M.M.; GUPTA, M.P.; PHILLIPSON, J.D. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. **Planta Medica**, v.59, p. 250-252, 1993.

STADNIK, M.J.; EL-GUEDARI, N.E.; MOERSCHBACHER, B.M. Effect of *Ulva fasciata* and chitosan on the uredospore germination of *Puccinia graminis* and peroxidase activity in wheat. **Summa Phytopathologica**, v.31, n.24, 2005.

STAMMLER, G.; STROBEL, D.; SEMAR M.; KLAPPACH, K. Diagnostics of fungicide resistance and relevance of laboratory data for the field. **Aspects of Applied Biology**, v.78, p.29-36, 2006.

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, n.27, p.4272-4277, 2010.

THAKUR, N.L; MULLER, W.E.G. Biotechnological potential of marine sponges. **Current Science**, v.86, p.1506-1512, 2004.

TRIGUEIRO, M.G.S. **Sociologia da tecnologia: bioprospecção e legitimação**. 1^a ed. Centauro, 2009. 200p.

TÜNEY, I.; CADIRCI, B.H.; UNAL, D.; SUKATAR, A. Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (Izmir, Turkey). **Turkish Journal Biology**., v. 30, p. 171-175, 2006.

VIDOTTI, E.C.; ROLLEMBERG, M.C.E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 139-145, 2004.

VLACHOS, V. CRITCHLEY, A.T.; VON HOLY, A. Differential antibacterial of extrates from selected Southern African marine algae. **South African Marine Science**, v.93, p.328-332, 1997.

VACLHOS, V. CRITCHLEY, A.T.; VON HOLY, A. Differential antibacterial activity of extracts from selected Southern macroalgae thalli. **Botanica Marina**, v.42, p. 165-173, 1999.

VANHAECKE, P.; PERSOONE, G.; CLAUS, C.; SORGELOOS, P. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. **Ecotoxicol Environ Safety**, v.5, p. 382-387, 1981.

WANG, SHENG-KAI; LIANG, PI-HUI; ASTRONOMO, R.D.; HSU, TSUI-LING; HSIEH, SHIE-LIANG.; BURTON, D. R; WONG, CHI-HUEY. Targeting thecarbohydrates on HIV-1: Interaction of oligomannose dendrons with human monoclonalantibody 2G12 and DC-SIGN. **PNAS, Chemistry Biodiversity**, v.195, n.10, p.3690-3695, 2008.

ZEMKE-WHITE, W.L.; OHNO, M. World seaweed utilization: An end-of-century summary. **Journal of Applied Phycology**.p.369-376, 1999.

ZETI, A.M.H.; IBRAHIM, J; ALMA, A.; NAZNI, W.A. Insecticidal activity of methanol extracts of some tunicate species against *Aedes aegypti* and *Anopheles maculates*, **Pharmaceutical Biology**, v.39, p. 213-216, 2001.

ZHANG, R.; CHAN, D.; JESSICA, S.; ISKANDER, G.; BLACK, D. S.; KUMAR, N. Synthesis of new aryl substituted 5-alkylidenefuran-2(5H)-ones. **Arkivoc**, p.102-115, 2009.

ZHENG, Y.; YIN-SHEN, C.; HAY, C.L. Screening for antibacterial and antifungal activities in some marine algae from the Fujian coast of China with three different solvents. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v.19, n.4, p.327-331, 2001.

ZVYAGINTSEVA, T.N; SCHEVCHENKO, N.M; NAZAROVA, I.V; SCOBUM, V; LUK'YANOV, P.A; ELYAKOVA, L.A. Inhibition of complement activation by water-soluble polysaccharides of some far-western brown seaweeds. **Comparative Biochemistry Physiology and Toxicology and Pharmacology**, v.126. p. 209-215, 2000.

CAPITULO I

ARTIGO SUBMETIDO E ESCRITO DE ACORDO COM AS NORMAS DA REVISTA CYTOTECNOLOGY

CYTOTOXIC ACTIVITY OF MARINE ALGAE AGAINST CANCEROUS CELLS

Elica Amara Cecília Guedes¹, Teresinha Gonçalves da Silva², Jaciana Santos Aguiar², Lurdiana Daise de Barros³, Laura Marina Pinotti⁴, Antonio Euzebio Goulart Sant'Ana³

¹Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPQRN) e Laboratório de Ficologia (LABFICO) Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, 57072-970- Brazil

²Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos e Laboratório de Cultura de Células da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-50670-901, Brazil

³Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPQRN) -Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, 57072-970- Brazil

⁴Laboratório de Processos Biotecnológicos - Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, Espírito Santo, 29.932-540 - Brazil

Corresponding autor: Email: eac.guedes@gmail.com; Address: Rua Rodolfo Abreu,405C-Apt.301, cruz das Almas, Maceio,Alagoas, Brazil- 57039-160. Fone: 55-82-32351913 Fax: 55-82-32212501

ABSTRACT

This paper presents a novel investigation on the cytotoxic activity in human tumor cell from dichloromethane, chloroform, methanol, ethanol, water extracts, and hexane and chloroform fractions from green, brown and red algae collected at Riacho Doce Beach, north coast of Alagoas (Brazil) against the cancer cells K562 (chronic myelocytic leukemia), HEp-2 (laryngeal epidermoid carcinoma) and NCI-H292 (human lung mucoepidermoid carcinoma) through the MTT colorimetric method. The dichloromethane extract and chloroform fraction of *Hypnea musciformis* showed the best cytotoxic activity against K562 ($3.8 \pm 0.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and $6.4 \pm 0.4 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively). Dichloromethane extracts of *Dictyota dichotoma* ($16.3 \pm 0.3 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and the chloroform fraction of *H. musciformis* ($6.0 \pm 0.03 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloroform fraction of *P. gymnospora* (8.2 ± 0.4) were more active against HEp-2 as well as ethanol extracts of *P. gymnospora* ($15.9 \pm 2.8 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloroform fraction of *H. musciformis* ($15.0 \pm 1.3 \mu\text{g.mL}^{-1}$) against the cell NCI-H292. The constituents with higher anticancer action are present in extracts of dichloromethane and chloroform and the chloroform fraction of *H. musciformis*, *Digenea simplex*, *P. gymnospora*, and *D.dichotoma*. In the case of the seaweed *S. vulgare*, the anticancer constituents are present in the aqueous extract.

Key Index Words: Seaweed, cancerous cells, cytotoxicity, algae extract

LIST OF ABBREVIATIONS

CH₂Cl₂- Dichloromethane
 CHCl₃- Chloroform
 CH₃OH- Methanol
 C₂H₆O- Ethanol
 DMEM- Dulbecco's Modified Eagle Medium
 Hep-2 human larynx epidermoid carcinoma
 IIF-ANA-antinuclear antibody-immunofluorescence
 K562-chronic myelocytic leukemia
 NCI-H292-human lung cancer
 MTT- (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-,5 diphenyltetrazolium bromide)

INTRODUCTION

The search for promising substances through rational selection of natural products as anticancer drugs source is an alternative subsidy to cancer treatment and have guided numerous searches for new medicines (Magalhães 2005). Algae, fungi, lichens, fungi and vascular plants are major sources for the research of new bioactive molecules through the direct use of secondary metabolites or biosynthesis-derived compounds produced in order to increase effectiveness and absorption or to decrease toxicity (Hostettman et al 1997).

Extensive researches are targeted for cancer's chemoprevention aiming at stopping or reversing the process that leads to the development and progression of precancerous cells through the use of non-cytotoxic doses of functional nutrients and/or pharmacological agents (Gamal-Elden et al 2009). The HEp-2 cell (American Type Culture Collection CCL-23), a tumor cell strain derived from human larynx carcinoma grown in monolayers on glass slides, has proved to be an excellent medium for self-antigens provision in the IIF-ANAtest (antinuclear antibody-immunofluorescence) since 1980. This HEp-2 cell virtually replaced cuts or rodents' liver imprint in clinical laboratories throughout the world due to its excellent visibility and easy handling for cell culture compared to the maintenance of animal facilities suitable for laboratory breeding routine (Dellavance and Andrade 2011). NCI-H292 cells correspond to a continuous strain of mucoepidermoid cells obtained from human lung carcinoma, which has been used for isolation and propagation of *Paramyxovirus humano* (Morier et al 1996). The K562 strain is Ph⁺erythroleukemic, widely used as a model for studying drugs with anti-proliferative capacity and/or inductors of fetal hemoglobin synthesis (Lozzio and Lozzio 1975).

Anti-tumor cytotoxic substances from marine organisms have been reported over the past 40 years (Ibrahim et al 2005). Marine organisms are important and promising resources in cancer research and a number of compounds from these organisms have undergone clinical trials as antitumor agents Shoenib et al (2005)

screened for in-vitro cytotoxic activities using DLD-1 cells of methanolic extracts of 33 species of British marine algae. The methanolic extract of *Polysiphonia lanosa* was the only one found to have an IC₅₀ value of less than 50 µg. mL⁻¹, and its chloroform fraction was found to be significantly more active than the parent methanolic extract. *P. lanosa* is rich in brominated phenolic compounds.

Harada and Kamei (1997) selected, among 306 seaweed species, those with *in vitro* cytotoxic potential against L1210 leukemic cells, observing that only 17 were active. The methanol extract of *Amphiroa zonata* (IC₅₀ 20 µg.mL⁻¹) was more efficient against strains of human leukemic cells (L1210 and K562). Testing eight alga species in China with potential antitumor activity, Xu et al (2004) found that chloroform and ethanol extracts from *Polysiphonia urcedata*, the ethanolic from *Scytosiphon lomentarius* and hexane from *Dictyopteris divaricata* showed cytotoxic activity against human oral epidermoid carcinoma (KB). Substances isolated from algae, such as fucoidan, laminaran and terpenoids have activity against cancer cell strains (Gerwik and Bernart 1993; Synytsia et al 2010) and the search for new drugs from these organisms is crescent. In order a drug to be considered effective in treating cancer, it is necessary to have a selective antitumor activity without side effects Xu et al (2004). Jolles et al (1963) were the first researchers to report the influence of a sulphated degraded laminarin obtained from seaweed extract in inhibiting the growth of tumor cells.

The use of cells as a tool of biological processes has been stimulated, since several research lines can be addressed such as: gene expression, proliferation, cell-cell interaction, adhesion and carcinogenesis (Perez and Curi 2005).

In view of the foregoing, this paper presents a study on the screening of some green, brown and red alga species from Riacho Doce beach, Alagoas, Brazil, by evaluating the *in vitro* cytotoxic potential of extracts and fractions of these organisms on three cancer cell strains: NCI-H292 (human lung cancer), Hep-2 (human larynx epidermoid carcinoma) and K562 (chronic myelocytic leukemia).

MATERIAL AND METHODS

Biological material

Algae were manually collected from the Riacho Doce beach, (9 ° 34 '0 "S and 35 ° 39' 0" W) during low tide period between October 2007 to July 2009. The collected samples were immediately transported to the Phycology Laboratory of the Biological Sciences Institute (ICBS), Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Nine species of algae from three divisions were used for this study : Chlorophyta-*Ulva lactuca* Linnaeus-MAC51238, Phaeophyta - *Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V.Lamouroux-MAC51230; *Padina gymnospora*

(Kutzing) Sonder-MAC51235 *Sargassum vulgare* C. Agardh- MAC 51236 and Rhodophyta – *Gracilaria caudata* J. Agardh - MAC51232, *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamouroux-MAC51234, *Galaxaura rugosa* (J. Ellis & Solander) J.V. Lamouroux-MAC51239; *Gellidium pusillum* (J.Stackhouse) Le Jolis-MAC51233, *Digena simplex* (Wulfen) C. Agardh-MAC51231). The voucher of respected species were deposited in the MAC Herbarium, Environment Institute of the city of Maceió, Alagoas (Br) as internal reference material.

Extracts obtainment

Algae were washed with distilled water, dried in air-circulating ovens (Blue Mod1401440SC, USA) at 45°C for five hours and crushed in industrial blender (type TA-2 METVISA model, Brazil). The dried and ground material from each collection and each alga was mixed in equal amounts to dilute any possible seasonal difference in chemical extracts to be obtained. To obtain crude extracts, 500g samples of dried seaweed were suspended in 1000 mL dichloromethane, chloroform, methanol, ethanol and water and macerated for 72 hours with three repetitions. Organic extracts were filtered and roto-evaporated (Rotevaporator Buchii Heating Bath-B490, Switzerland) at 25°C and 40°C, except for the aqueous extract that was lyophilized (Edwards High Vacuum Lyophilizer, ModE2MB, Brazil). The mass from these extracts was measured and stored under refrigeration for subsequent cytotoxicity assays. Dichloromethane extracts from *H. musciformis* and *P. gymnospora* were selected for fractionation by having higher yields: 11.86 g (2.58%) and 13.96 g (3.04%), respectively. For fractionation by liquid-liquid partition, crude extracts of *H. musciformis* (2.73g) and *P. gymnospora* (1.90g) were suspended in methanol:water (3:1) and extracted with hexane and chloroform respectively, resulting in hexane and chloroform fractions to test for cytotoxic activities. All solvents used were VETEC-Quimica Fina (RJ-Brazil)

Cytotoxic activity in vitro

Cell strains K562 (Human chronic myelocytic leukemia), NCI-H292 (Human lungmucoepidermoid carcinoma), HEp-2 (Human larynx epidermoid carcinoma) were all obtained from Cell Bank in Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brazil). Cells were maintained in DMEM GIBCO® supplemented with 10% fetal bovine serum, 2mM glutamine, 100U.mL⁻¹ penicillin, 100 µg.mL⁻¹ streptomycin at 37°C with 5% CO₂ (Eagle 1955).

Cells suspension of 1x10⁵cells/mL (HEp-2 e NCI-H292) and 0.3x10⁶cells/mL (K562) were distributed in 96-well plates and incubated at 37°C in a wet atmosphere (5% CO₂) for 24 hours. Then the extracts at different concentrations (6.25, 12.50, 25.0 and 50µg.mL⁻¹) were added to the plates and the concentrations that

killed approximately 50% of cells were tested again in 4 more tests to confirm results and calculation of IC_{50} . After 24 h, extracts ($6.25 - 50\mu\text{g.mL}^{-1}$) dissolved in DMSO were added to each well and incubated for 72 h. Control groups received DMSO. Etoposide ($1.25 - 20\mu\text{g.mL}^{-1}$) was used as positive control. The growth of tumor cells was quantified by the ability of living cells to reduce yellow tetrazolium MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) to a blue formazan product (Mosmann 1983; Alley et al 1988). At the end of 72-hour incubation, the plate was added with MTT (5.0mg.mL^{-1}). Three hours later, for suspended cells and two for adherent cells, the formazan product of MTT reduction was dissolved in DMSO and absorbance was measured using a multi-plate reader. The drug effect was quantified as percentage of control absorbance of reduced dye at 450 nm (Multiplate Reader Thermoplate-Mod TP_Reader). Results were expressed as mean percentage of growth inhibition in 50% of cell population (IC_{50} growth inhibition) (GI)% \pm SD - Standard Deviation (SD).

RESULTS AND DISCUSSION

The cytotoxic activity of 48 samples of crude algae extracts and fractions thereof on human cancer cell strains is presented in table 1. The evaluation was conducted in accordance with the Protocol of the *American Cancer Institute* (NCI), which recommends that IC_{50} values $\leq 30\mu\text{g.mL}^{-1}$ should be considered significant for crude extracts of plant origin as well as IC_{50} values $\leq 4\mu\text{g.mL}^{-1}$ for pure substances (Geran et al 1972). This paper presents the first studies on the effect of crude extracts and fractions of different algal species from the coast of Alagoas on different cancer cell strains, emphasizing that 55.17% of species showed cytotoxic activity.

Ethanol extracts of *H. musciformis* ($22.0 \pm 3.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), *P. gymnospora* ($15.9 \pm 2.8 \mu\text{g.mL}^{-1}$), *D. dichotoma* ($22.7 \pm 4.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloroform extracts of *D. dichotoma* ($25.2 \pm 1.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) showed selectivity towards NCI-H292 cells. Regarding HEP-2 cells, the dichloromethane extract ($16.3 \pm 0.3 \mu\text{g.mL}^{-1}$), chloroform extract (18.2 ± 0.3) and extract methanolic ($20.6 \pm 0.7 \mu\text{g.mL}^{-1}$) of *D. dichotoma* were active against these cells. Cytotoxicity showed by *Dictyota* may be due to the presence of diterpenes common to Dictyotaceae family, which shows activity against tumor cells (Gedara et al 2003).

Extracts that showed cytotoxic activity against K562 cells were obtained with dichloromethane ($3.8 \pm 0.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloroform ($17.4 \pm 1.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) of *H. musciformis*. Dichloromethane ($14.9 \pm 0.7 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and chloroform ($15.5 \pm 0.7 \mu\text{g.mL}^{-1}$) extracts of *P. gymnospora* and dichloromethane extract of *D. dichotoma* ($14.4 \pm 0.7 \mu\text{g.mL}^{-1}$) were also active for K562 cells. Ktari and Guyot (1999) evaluated the cytotoxic activity of dichloromethane extract of *Padina pavonica* against KB cells and results showed significant activity ($IC_{50} =$

10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). In our study, chloroform fraction of the dichloromethane extract of *P. gymnospora* showed similar value to that found by these authors for K562 ($\text{IC}_{50} = 11.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and HEP-2 ($\text{IC}_{50} = 8.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) cells. Abourriche et al (1999) determined the cytotoxic activity (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) of dichloromethane extract of *Cystoseira tamariscifolia* collected in Morocco (Mexico) which inhibited 30% KB cells. Cytotoxicity results obtained with the chloroform fraction of dichloromethane extract of *H. musciformis* were significant for all three tested cell strains: NCI-H292 ($\text{IC}_{50} = 15.0 \pm 1.3 \mu\text{g.mL}^{-1}$), HEP-2 ($\text{IC}_{50} = 6.0 \pm 0.3 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and K562 ($\text{IC}_{50} = 6.4 \pm 0.4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) suggesting the existence of specific secondary metabolites that can interfere with cellular mitosis (Moo-Puc et al 2009). The chloroform fraction of *P. gymnospora* also showed significant values against NCI-H292 ($\text{IC}_{50} = 20.9 \pm 1.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), HEP-2 ($\text{IC}_{50} = 8.2 \pm 0.4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and K562 ($\text{IC}_{50} = 11.0 \pm 0.6 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Shoeib et al(2004), evaluating the *in vitro* cytotoxic activity of the red alga *Polysiphonia lanosa* against DLD-1 and HCT-116 cells (human colon carcinoma) showed that the chloroform fraction yielded better results than the methanol extract, which was also observed in our study regarding chloroform fraction of *H. musciformis* against HEP-2 cells ($\text{IC}_{50} = 6.0 \pm 0.3 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Some evidence has suggested that phenolic compounds inhibit telomerase activity in tumor cells (Naasani et al 1998; Chakraborty et al 2006). In most tumors the maintenance of telomeres occurs with the telomerase expression (Akiyama et al 2002). Moo-Puc et al (2009), performed a test to evaluate the effect of aqueous and organic (dichloromethane: methanol-7: 3) extracts of 27 algal species on three human cancer cell strains (Hep-2, KB and HeLa) and found that most of cytotoxic extracts were organic and from species belonging to Chlorophyta (*Udotea flabellum* 22.5 $\mu\text{g.mL}^{-1} \pm 1.2$ and ± 1.4 *U. conglutinate* 22.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) and Rhodophyta (*Bryothamnion triquetrum* 8.2 $\pm 1.3 \mu\text{g.mL}^{-1}$) divisions against Hep-2 cells and Phaeophyta division (*Lobophora vairegata* 26.2 $\mu\text{g.mL}^{-1} \pm 1.3 \pm 1.2$ and *Dictyota caribaea* 27.9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) that showed cytotoxic activity against KB strains. Taskin et al (2010) investigated the antitumor activity of *Padina pavonica* and *H. musciformis* against breast cancer cells (MCF-7) and several strains of prostate cancer (DU-145, LNCaP and PC3) by *in vitro* cytotoxicity assay with methanolic extract and found that crude extracts of *H. musciformis* at 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ had low toxicity against cell strains tested. In this study, methanolic extract of *H. musciformis* also showed no cytotoxic activity against cell strains tested; however, it showed promising cytotoxicity for dichloromethane, chloroform and ethanol extracts. Concerning to aqueous extracts, only *S. vulgare* showed activity ($\text{IC}_{50} = 18.7 \pm 3.8 \mu\text{g.mL}^{-1}$) thus considering that organic extracts have different constituents in comparison with hydrophilic ones, which have permeability with respect to cell membrane, partly explaining the limited effects of aqueous extracts on cancer cells (Moo-Puc et al (2009). Wang et al (2008) tested for proliferative potential of aqueous extract of 12 algae species from Hong Kong in HL-60 cells (promyelocytic leukemia) and MCF-7 (breast cancer) and found that *Hydroclathrus clathratus* and *Padina arborescens* inhibited

their growth being also less toxic to normal cells. The extract that showed increased cytotoxic activity in this study was dichloromethane of *H. musciformis* ($IC_{50} = 3.8 \pm 0.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) against K562 cells which is higher than the etoposid control. *H.musciformis*, *D. simplex*, *P. gymnospora*, *S. vulgare* and *D. dichotoma* were among species considered promising by LC_{50} values ≤ 30 obtained from different extracts.

Although the metabolites responsible for the antiproliferative action of algae species studied have not been chemically characterized in this study, the data indicate the occurrence of several secondary compounds with low polarity which are spread more easily in cell membranes than the more polar (Moo-Puc et al 2009; 2011) since the crude extracts of dichloromethane, ethanol and chloroform fraction concentrated the substances responsible for the most significant cytotoxic activity.

CONCLUSION

Results of cytotoxic activity with seaweed extracts and fractions against tested cell strains (NCI-H292, Hep-2 and K562) showed that compounds with higher anticancer action are present in species *H.musciformis*, *D.simplex*, *P. gymnospora*, *S. vulgare*, *D.dichotoma*, particularly in dichloromethane, chloroform extracts and chloroform fraction. It was found that crude extracts of dichloromethane and ethanol and the chloroform fraction concentrated the substances responsible for the most significant cytotoxic activity on the strains tested, once less polar compounds are more easily spread in the cell membranes than the more polar ones. *Hypnea musciformis* and *Padina gymnospora* might be a potential source for anticancer metabolites which can be mustered for the development of effective cancer drugs.

REFERENCES

- Aborriche A, Charrouf M, Berrada M, Bennamara A, Chaib N, Francisco C (1999). Antimicrobial activities and cytotoxicity of the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. *Fitoter.* 70:611-614 DOI:10.1016/S0367-326X(99)00088-X
- Alley M C, Scudiere D A, Monks A, Hursey M L, Czerwinski M J , Fine D, Abbott B J, Mayo J G, Shoemaker R H, Boyd M R (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48: 589 – 601
- Akiyama M, Hideshima T, Munshi N C, Anderson K C (2002). Telomerase inhibitors as anticancer therapy. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 2: 567–575.
- Carte B K (1996). Biomedical potential of marine natural products. *Bioscience*, 46: 271-286. Chakraborty S, Ghosh U, Bhattacharyya N P, Bhattacharya K, Roy M (2006). Inhibition of telomerase activity and induction of

- apoptosis by curcumin in K-562 cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 7: 201–207. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2005.12.007
- Dellavance A, Andrade L E C (2011). Das células LE às células HEP-2: perspectiva histórica e avaliação crítica do teste de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos antinúcleo. *Rev. Bras. de Med.* 7-21.
- Eagle H (1955). Propagation in a Fluid Medium of a Human Epidermoid Carcinoma, Strain KB (21811). *Proceed.of the Soc. for Exp. Biol. and Med*, 89:362-364. DOI: 10.3181/00379727-89-21811
- Gamal-Eldeen A M, Ahmed F E, Abo-zeid M A(2009). In vitro cancer chemopreventive properties of polysaccharide extract from the brown alga, *Sargassum latifolium*. *Food and Chem. Toxic.* 47:1378–1384. DOI:10.1016/j.fct.2011.09.002
- Gedara R, Zubía E, Ortega M, el-Sharkavy S, Salama O, Shier T, Halim A (2003). Cytotoxic hydroazulene diterpenes from the brown alga *Dictyota dichotoma*. *Z. Naturforsch.* 58: 17–22. DOI: 0939D5075/2003/0100D0017.
- Geran R I, Greenberg N H, Macdonald M M, Schumacher A M, Abbott B J (1972) Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemother Reports* 3: 1-102
- Gerwick W H, Bernart M W (1993). Eicosanoids and related compounds from marine algae In: *Marine Biotechnology*. Zaborski, O.R, Attaway, D.H (eds). Plenum Press, New York, 101-152.
- Harada H, Kamei Y (1997). Selective cytotoxicity of marine algae extracts to several human leukemic cell lines. *Cytotechnology* 25: 213–219 DOI:10.1023/A:1007987010840
- Hostettmann K, Wolfender J, Rodriguez S (1997). Rapid detections and subsequent isolation of bioactive
- Ibrahim A M M, Mostafa M H, El-Masry M H, El-Naggar M M A (2005). Active biological materials inhibiting tumor initiation extracted from marine algae. *.31(1): 146-155.*
- Jolles B, Remington M, Andrews P S (1963). Effects of sulphated degraded Laminarin on experimental tumor growth. *Brit. J. Cancer*, 17: 109-11517.
- Ktari L, Guyot M (1999). A cytotoxic oxysterol from the marine alga *Padina pavonica* (L.) Thivy. *J. App. Phicol.* 11: 511–513.
- Lozzio C B, Lozzio B B (1975). Human chronic myelogenous leucemia cell-line with positive Philadelphia Chromosome. *Blood*. 45:321-324 DOI:10.1182
- Magalhães F I E (2005). Atividade Antitumoral (*in vitro e in vivo*) das fisalinas B e D isoladas da *Physalis angulata* LIN. Dissertation. Universidade do Estado do Ceará.
- constituents of crude plant extracts. *Planta Medica.* 63:2-10. DOI: 10.1055/s-0030-1271196.

- Mizushima Y, Ishidoh T, Takeuchi T, Shimazaki, N, Koiwai O, Kuramochi K, Kobayashi S, Sugawara, F, Sakaguchi K, Yoshida H (2005). Mono acetyl curcumin: A new inhibitor of eukaryotic DNA polymerase lambda and a new ligand for inhibitor-affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337: 1288–1295.
- Moo-Puc R, Robledo D, Freile-Felegrin Y (2009). *In vitro* cytotoxic and proliferative activities of marine algae from Yucatan, Mexico. *Cienc. Mar.* 35(4): 345-358.
- Moo-Puc R, Robledo D, Freile-Felegrin Y (2011). Improved antitumoral activity of extracts derived from cultured *Penicillium dumetosus*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 10 (2): 177-185.
- Morier L, Perez L, Cancio R, Savon C, Gonzales Z, Goyenechea A (1996). Comparacion de la linea NCI-H292 con otras lineas continuas para la multiplicacion de virus respiratorios. *Rev Cubana Med Trop.* 48(3):171-3.
- Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65:55-63. DOI:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Nassani I, Seimiya H, Tsuruo T (1998). Telomerase inhibition, telomere shortening and senescence of cancer cells by tea catechins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249:391-396. DOI:10.1006/bbrc.1998.9075
- Perez C M, Curi R (2005). *Como cultivar células*. 1 (ed. edn), Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
- Shoeib N A, Michael C B, Blunden G, Linley P A, Swaine D J (2004). *In-vitro* cytotoxic activities of the major bromophenols of the red alga *Polysiphonia lanosa* and some novel synthetic isomers. *J. Nat. Prod.* 67:1445-1449 DOI. 10.1021/np0305268
- Synytsya A Kim, W J, Kim S M, Pohl R, Synytsya A, Kvasnicka F, Copikova J, Park Y. (2010). Structure and antitumor activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*. *Carbohydr. Polymers* 81:41-48 DOI:10.1016/j.carbpol.2010.01.052
- Taskin E, Caki Z, Ozturk M, Taskin E (2010). Assessment of *in vitro* antitumoral and antimicrobial activities of marine algae harvested from the eastern Mediterranean sea. *African J. Biotech.* 9(27):4272-4277
- Wang Sheng-Kai, Liang Pi-Hui, Astronomo R D, Hsu Tsui-Ling, Hsieh Shie-Liang, Burton D R, Wong Chi-Huey (2008). Targeting the carbohydrates on HIV-1: Interaction of oligomannose dendrons with human monoclonal antibody 2G12 and DC-SIGN. *PNAS, Chemistry Biodiversity* 195(10):3690-3695. DOI:10.1073/pnas.0712326105
- Xu N, Fan X, Yan X, Tseng C K (2004). Screening marine algae from China for their antitumor activities. *J. Appl. Phycol.* 16: 451–456 DOI: 10.1007/s10811-005-5508-5

Table 1. GI₅₀ values (µg/mL⁻¹) for crude extracts of marine benthic algae against NCI-H292, HEP-2 and K562tumor cells. Results are expressed as minimum inhibitory concentration able to destroy 50% population ± standard deviation (SD).

| ALGAE | SOLVENT | *GI _{50%} Strains | | |
|---------------------------|---|----------------------------|----------|-----------|
| | | NCI-H292 | HEP-2 | K562 |
| <i>Ulva lactuca</i> | CH ₂ Cl ₂ | >50 | > 50 | > 50 |
| | CHCl ₃ | >50 | > 50 | > 50 |
| | CH ₃ OH | >50 | > 50 | > 50 |
| | C ₂ H ₆ O | >50 | > 50 | > 50 |
| | H ₂ O | >50 | 48.5±2.9 | > 50 |
| <i>Hypnea musciformis</i> | CH ₂ Cl ₂ | >50 | >50 | 3.8±0.2 |
| | CHCl ₃ | >50 | >50 | 17.4±1.1 |
| | CH ₃ OH | 40.2±3.1 | 48.3±3.9 | > 50 |
| | C ₂ H ₆ O | 22.0±3.5 | 44.4±6.3 | > 50 |
| | H ₂ O | >50 | 43.6±5.4 | > 50 |
| <i>Digena simplex</i> | CH ₂ Cl ₂ | >50 | >50 | > 50 |
| | CHCl ₃ | >50 | >50 | > 50 |
| | CH ₃ OH | >50 | >50 | 33.8±1.8 |
| | C ₂ H ₆ O | >50 | 32.2±1.0 | > 50 |
| | H ₂ O | > 50 | > 50 | > 50 |
| <i>Galaxuara rugosa</i> | CH ₂ Cl ₂ | >50 | > 50 | > 50 |
| | CHCl ₃ | >50 | > 50 | > 50 |
| | CH ₃ OH | >50 | > 50 | > 50 |
| | C ₂ H ₆ O | >50 | > 50 | > 50 |
| | H ₂ O | >50 | > 50 | > 50 |
| <i>Gracilaria caudata</i> | CH ₂ Cl ₂ | >50 | > 50 | > 50 |
| | CHCl ₃ | >50 | > 50 | > 50 |
| | CH ₃ OH | >50 | > 50 | > 50 |
| | C ₂ H ₆ O | >50 | > 50 | > 50 |
| | H ₂ O | >50 | > 50 | > 50 |
| <i>Gellidium pusillum</i> | CH ₂ Cl ₂ | >50 | > 50 | > 50 |
| | CHCl ₃ | >50 | > 50 | > 50 |
| | CH ₃ OH | >50 | > 50 | > 50 |
| | C ₂ H ₆ O | >50 | > 50 | > 50 |
| | H ₂ O | >50 | >50 | > 50 |
| <i>Padina gymnospora</i> | CH ₂ Cl ₂ | >50 | >50 | 14.9±0.7 |
| | CHCl ₃ | 40.2±1.9 | >50 | 15.5±0.7 |
| | CH ₃ OH | >50 | >50 | 30.8±1.7 |
| | C ₂ H ₆ O | 15.9±2.8 | 42.1±2.5 | >50 |
| | H ₂ O | >50 | >50 | >50 |
| <i>Sargassum vulgare</i> | CH ₂ Cl ₂ | >50 | > 50 | > 50 |
| | CHCl ₃ | >50 | > 50 | > 50 |
| | CH ₃ OH | >50 | >50 | > 50 |
| | C ₂ H ₆ O | >50 | >50 | > 50 |
| | H ₂ O | >50 | 18.7±3.8 | > 50 |
| <i>Dictyota dichotoma</i> | CH ₂ Cl ₂ | 41.1±2.3 | 16.3±0.3 | 14.4±0.7 |
| | CHCl ₃ | 25.2±1.1 | 18.2±0.3 | 32.5±1.9 |
| | CH ₃ OH | 40.3±3.0 | 20.6±0.7 | > 50 |
| | C ₂ H ₆ O | 22.7±4.2 | 47.6±5.9 | > 50 |
| | H ₂ O | >50 | >50 | > 50 |
| <i>H. musciformis</i> | Fraction CHCl ₃ | 15.0±1.3 | 6.0 ±0.3 | 6.4±0.4 |
| <i>P. gymnospora</i> | Fraction C ₆ H ₁₄ | > 50 | > 50 | > 50 |
| <i>P. gymnospora</i> | Fraction CHCl ₃ | 20.9±1.1 | 8.2 ±0.4 | 11.0 ±0.6 |
| <i>Etoposideo</i> | Control | 6.1±0.19 | 2.7±0.1 | 4.4±0.2 |

*GI_{50%} - Dose that inhibits 50% cell growth (µg.mL⁻¹) ± standard deviation.

CAPITULO II

ARTIGO SUBMETIDO E ESCRITO DE ACORDO COM AS NORMAS DA REVISTA
MYCOPHATOLOGIA

**ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF DIFFERENT EXTRACTS OF MARINE MACROALGAE AGAINST
DERMATOPHYTES AND *CANDIDA* SPECIES**

Elica Amara Cecília Guedes¹; Maria Anilda dos Santos Araújo²; Aryanna Kelly Pinheiro Souza²; Larissa Isabela Oliveira de Souza²; Lurdiana Daise de Barros¹; Fernanda Cristina de Albuquerque Maranhão³, Antônio Euzebio Goulart Sant'Ana¹.

¹Instituto de Química e Biotecnologia, Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970. Maceió, Alagoas, Brazil.

²Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de Micologia, Centro Universitário Cesmac, 57051-160. Maceió, Alagoas, Brazil.

³Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Laboratório de Microbiologia Geral e Clínica, Universidade Federal de Alagoas, 57010-020, Maceió, Alagoas, Brazil.

Key words: dermatophyte; *Trichophyton*; *Candida*; macroalga; extracts

Corresponding author

Tel: + 55-82-3223-5613; fax: + 55-82- 3235-1913

E-mail address: eac.guedes@gmail.com (Elica Amara Cecília Guedes)

ABSTRACT

Algae are bioactive natural resources and due to the medical importance of superficial mycoses, we focused the action of macroalga extracts against dermatophytes and *Candida* species. Seaweed obtained from the Riacho Doce beach, Alagoas (Brazil) were screened for the antifungal activity, through crude extracts using dichloromethane, chloroform, methanol, ethanol, water and chloroform and hexane fractions of green, brown and red algae in assays with standard strains of the dermatophytes *Trichophyton rubrum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *M. gypseum* and yeasts *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. guilliermondi* and *C. parapsilosis*. The M44-A and M27-A2/M38A manuals by CLSI were followed and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ranged from 0.03 to 16.00 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and an inhibition halo of 10.00-25.00 mm was observed for dermatophytes, while for yeast, it was from 8.00 to 16.00 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and 10.00-15.00 mm. *M. canis* showed MIC of .03 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and the largest inhibition halo in *T. rubrum* (25.00 mm) through the use of the methanol extract. For *C. albicans*, dichloromethane, methanol and ethanol extracts formed the largest inhibition halo. The ethanol extract was shown to be the best inhibiting fungi growth and chloroform and hexane fractions of *H. musciformis* inhibited the growth of all dermatophytes and *C. albicans*, yielding the conclusion that apolar extracts obtained from algae presented the best activity against important pathogenic fungi.

Introduction

Fungi as agents of superficial mycoses cause a wide range of diseases in humans and animals, involving the outer layer in the stratum corneum of the skin and frequently causing chronic infections. The major etiological agents of these mycoses are dermatophytes and *Candida* species, cosmopolitan fungi that are able to affect deeper layers of the epidermis and mucous or organs in debilitated individuals. As the population of immune compromised continues to arise, the opportunistic fungal pathogens infecting these patients continue to increase as well [1, 2].

Dermatophytes are a group of filamentous fungi that have the ability to invade keratinized tissues of humans and other animals, usually causing superficial lesions after gene-regulated expression in response to characters of each anatomic site, like nutrient availability, specific carbon sources and Ph [3, 4]. Among the dermatophyte species, the most prevalent in fungal infections are *Trichophyton rubrum*, *T. tonsurans* and *Microsporum canis*, causing different clinical cases observed in the world [5]. The other important group of pathogens fungi included the yeasts, which are considered opportunistic agents, especially *Candida* species, frequently observed in vulvovaginitis, onychomycosis and other mucus-cutaneous frameworks [6]. Nonetheless, invasive fungal infections due to *Candida* species constitute an increasing clinical problem [7, 8].

The indiscriminate and prolonged use of antimicrobial drugs has led to therapeutic failures associated to the selection of resistant pathogens [9, 10]. The search for new drugs from plants has been expanding for the treatment against fungi due to the existence of a few antifungal classes and the emergence of resistant strains [11, 1]. Natural elements of several plants are being used and numerous studies have reported the presence of bioactive compounds in alga extracts, especially those capable of inhibiting the growth of bacteria and fungi. The potential in macroalga extracts is studied in medical and biochemical research, due to presence of compounds with pharmacological action, as that was observed in the control of diseases caused by fungi, pathogens of plants and animals, including humans [12-14].

In vitro susceptibility testing for fungi has not been routinely employed. However, such tests have a great importance for the verification of microorganisms resistance, aiming at choosing the best antimycotic treatment and for the research of alternative substances to be used as drugs [15]. Recent observations have indicated that the disc diffusion method is successfully performed in susceptibility drugs analyses in bacteria and fungi pathogens [16-18]. As a matter of fact, the best *in vitro* antifungal susceptibility test is the microdilution for MIC analyses, once that it helps to optimize the selection for an effective antifungal drug [19].

Considering the demand for treatments, especially in immunocompromised individuals, the study focusing therapeutic properties of plants has grown considerably, including those with antimycotic activity. In addition, the present work represents the first experimental study in the state of Alagoas (Brazil) in order to investigate algae with antifungal activity, through *in vitro* research of alga crude extracts using different solvents into species of dermatophytes and *Candida*, aiming at the expansion of the alternatives for low-cost and more effective treatment of fungal infections.

Methods

Marine Alga Sampling and Isolation of Alga Extracts

Algae were collected on the beach Riacho Doce, north coast of Alagoas State (9° 34 '0 "S and 35° 39' 0" W), during low tide period (October 2007 to July 2009) and transported to the Phycology Laboratory at UFAL. Each species was identified through classical methods. Exsiccates species of *Ulva lactuca* Linnaeus (MAC51238) (Chlorophyta), Phaeophyta member *Dictyota dichotoma* (Hudson) Lamouroux (MAC51230), *Padina gymnospora* (Kützinger) (Sonder, MAC51235), *Sargassum vulgare* Agardh (MAC 51236) and Rhodophyta *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (MAC51234), *Digenea simplex* (Wulfen) Agardh (MAC51231) were deposited in the MAC Herbarium, Environment Institute, Maceió, Alagoas (Brazil).

The algae were washed with distilled water, dried in air-circulating ovens (BLUE, MOD-1401440SC, USA) at 45 °C for 3 h and crushed in an industrial blender (METVISA model TA-2). The dried and crushed material from each alga was mixed in equal quantities, aiming at diluting any possibility of seasonal chemical difference in the extracts. To obtain crude extracts, 500 g of dried alga samples were suspended in 1000 mL of dichloromethane, chloroform, methanol, ethanol or water as solvents for maceration. Organic extracts were filtered and treated in a rotoevaporator (MOD Bath B-490, Switzerland) at 25-40 °C, except for the aqueous extract, that was lyophilized (Freeze dryer Mod E2MB, Brazil). All extracts were stored (20 °C) for further testing for antifungal activity.

Due to the better yields, dichloromethane extracts of *H. musciformis* and *P. gymnospora* were selected for fractionation, 11.86 g (2.58%) and 13.96 g (3.04%) respectively. For fractionation through liquid-liquid partition, crude extracts of *H. musciformis* (2.73 g) and *P. gymnospora* (1.90 g) were suspended in methanol, water (3:1) and extracted with hexane and chloroform to obtain specific fractions. All solvents were purchased from (VETEC, Brazil).

Fungi Strains and Culture Conditions

The fungal species used in our study were obtained from the URM Culture Collection (University of Recife Mycology), identified through standard methods as strains of the dermatophytes *Trichophyton rubrum* (URM-4158), *T. tonsurans* (URM-4963), *T. mentagrophytes* (URM-4422), *Microsporum canis* (URM-4158), *M. gypseum* (URM-3645), *Epidermophyton floccosum* (URM-3345) and yeasts *Candida albicans* (URM-5689), *C. krusei* (URM-1059), *C. guilliermondi* (URM-5563) and *C. parapsilosis*-URM-5583). For the storage, all species were maintained by culturing in Potato Dextrose Agar (PDA, HiMed-M096) at 28-35 °C until the next steps.

Antifungal Analyses

The antifungal activities of the extracts were performed *in vitro* according to Clinical and Laboratory Standards. For the conventional microdilution procedures, the dermatophyte assays were performed according to M 438-A [20] descriptions with modifications indicated by Fernandez-Torrez *et al.* [21] and Barros *et al.* [22], in parallel with disc diffusion, while yeasts were treated with crude extract during assays *in vitro* using agar disc diffusion and microdilution methods following the M27-A2 and M44-A2 manuals [23]. The minimal inhibitory concentration (MIC) was then determined for each test sample after culture in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, USA) with L-glutamine and without sodium bicarbonate, buffered to pH 7.0 with MOPS [3-(N-

morpholino) propanesulphonic] to 0.165 M (Sigma-Aldrich, USA) and sterilized using a 0.22 µm membrane (Millipore, USA).

Microdilution Assays

Fungal isolates were prepared after 7 days and 48 h cultures were grown on Potato Dextrose Agar (HiMed-M096), respectively for dermatophytes (28 °C) and *Candida* species at 35 °C. The suspensions of each fungus was prepared with 5 ml of sterile distilled water in test tubes, agitation on vortex and a sedimentation step (30 min) at room temperature. The fungi suspensions were adjusted to 0.5 MacFarland scale (*Candida* spp) and optical density reading in a spectrophotometer (dermatophytes) at 530 nm for 0.11-0.09. The suspensions were then diluted (1:50) to obtain the final inoculum concentration of approximately 0.4×10^4 to 5×10^4 CFU ml⁻¹. In 96-well microtiter plates (Corning Incorporated Costar® USA), we incubated 100 µl extract, and a final concentration in each well ranged from 0.03 to 16.00 µg ml⁻¹. Cell suspensions with equal volume (100 µl) were inoculated in test wells and all microplates were incubated without agitation, at 28 °C ± 2 °C for 7 days with dermatophytes and 33 °C ± 2 °C for 48 h with *Candida* species for further reading and result interpretation. Control wells were included for each test, containing 100 ml of RPMI 1640 medium with fluconazole (negative control) at 5×10^3 µg ml⁻¹ and RPMI 1640 with spores (positive control). Each assay was carried out in duplicate and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of alga extracts was determined by visual inspection of each well through evaluation of fungal growth inhibition in comparison to growth control well and quantified according to the protocol of CLSI[20, 23].

Disc Diffusion Procedures

Fungi colonies were diluted in sterilized water adjuster to 0.5 MacFarland scale turbidity standard (10^8 CFU/ml suspension). Individually, each dermatophyte and *Candida* species were inoculated through swabbing on plates containing solid YPD medium (Yeast Peptone Dextrose, HiMed M935). After 30 min, six wells with 5 mm in diameter were opened in the middle with sterilized molds, where five extracts per plate for each species of dermatophytes and *Candida* were tested individually, containing 5 µL extracts and control [fluconazol-positive (Zoltec Pfizer®, 150 mg) and negative-dimethyl sulfoxide-DMSO] at 100 µg ml⁻¹. Afterwards, plates were incubated at 32 °C for 5 days and the results were determined from the observation of presence or absence of growth and size of the inhibition zone, measured with the aid of calipers (Mitutoyo 150 mm MOD 530 101, Japan). All experiments were performed in duplicate.

Results

In this report, we investigated the action of crude extracts of six macroalgae species prepared in different compositions against standard strains of fungi pathogens, the major agents of common superficial mycoses, such as dermatophytosis and candidiasis, using microdilution and disc diffusion standards procedures.

MICs of crude macroalga extracts for six dermatophyte strains were determined. Extracts of dichloromethane, methanol and ethanol of *H. musciformis* against *M. canis* and *T. tonsurans* showed a MIC of $0.03 \mu\text{g ml}^{-1}$, while *P. gymnospora* has effective activity against *T. tonsurans*, *T. rubrum*, *M. canis* and *E. floccosum* and dichloromethane and methanol extracts of *D. simplex* against *T. rubrum* and *M. canis*. The aqueous extract of *Ulva lactuca* showed $5.00 \mu\text{g ml}^{-1}$ MIC against *T. rubrum* and *E. floccosum*. Significant activities were observed about methanolic extracts of *H. musciformes*, dichloromethane of *P. gymnospora* and ethanol from *S. vulgare*. In Table 1, it is possible to observe the MICs of different extracts for all fungi tested, when different fractions (Table 2) were evaluated.

After analyses of results for agar diffusion, the extracts dichloromethane of *P. gymnospora*, ethanolic of *H. musciformes* and methanol of *D. dichotoma* were those that showed best results, probably due to the polarity of these extracts with concentration of substances present in these algae responsible for antifungal activity, as is observed in Table 3, where we presented the specific diameter of inhibition zones. The inhibition halo of ethanol extract from *H. musciformis* was 2.00 mm in the tests with *M. canis*, while 2.50 mm was observed with dichloromethane, methanol and ethanol extracts from *P. gymnospora* against *T. rubrum* and methanolic from *D. dichotoma* against *M. canis*. The ethanolic extract of *D. simplex* also formed a halo with 15mm when it was tested against *M. canis* and *E. floccosum*.

About our results of yeast species, dichloromethane and ethanol extracts of *H. musciformis* and *D. simplex* generated a MIC of $8.00 \mu\text{g ml}^{-1}$ against *C. albicans*, but chloroform and ethanol extracts of *P. gymnospora* and *S. vulgare* demonstrated a $16.00 \mu\text{g ml}^{-1}$ MIC against the same species. Similar results were obtained with aqueous extract of *U. lactuca* against *C. albicans*, *C. krusei* and *C. parapsilosis*. However, dichloromethane and ethanolic extract of *P. gymnospora* showed antifungal activity only against *C. albicans*, with the largest inhibition halo (15.00 mm) (Table 3). Then, extracts of *H. musciformis*, *D. dichotoma* and *P. gymnospora* showed antifungal activity against all species of dermatophytes, but between yeasts, only on *C. albicans*.

Regarding the results obtained with fractions of chloroform and hexane extracts of *H. musciformes* and *P. gymnospora* through the microdilution test and agar diffusion, we found that these fractions had higher antifungal activity against dermatophytes than did the *Candida* species (Tables 2 and 4).

Discussion

The antimicrobial activities of numerous alga species have been tested and reported, presenting an extended spectrum of action against bacteria and fungi, including dermatophytes and *Candida* species. According to Ostrosky *et al.* [19] and Chiheb *et al.* [24], regarding the methods used to evaluate the antimicrobial activity, agar dilution is the most widely used due to its simplicity of implementation and low cost, which was confirmed in this study. For MIC determination, the microdilution method was the best mainly due to the sensitivity and minimal amounts of reagents, allowing a higher number of replicates and increasing the reliability of results. A combination of different methodologies may also provide a great platform for discovering new antifungal drugs for treatment of dermatophytosis and other mycoses [1]. Temperature and duration of incubation used in the microdilution method according with the document M 38-A of filamentous fungi were modified in our study. We adopted temperature and incubation time according to Fernandez-Torrez *et al.* [21] and Barros *et al.* [22] for better results and observations in susceptibility tests with dermatophytes, but we continued to use PDA also recommended by the CLSI reference method because it is a good medium to enhance the sporulation in dermatophytes.

The antimicrobial activity of alga extracts was observed in bacteria and fungi strains by many researchers and ecological parameters could have influenced in the results. As noted, purified compounds from seaweed have better direct effects against microorganisms than do crude extracts, but interesting results are observed by the use of macroalga crude extracts like some tested in our experiments. Hellio *et al.* [25] tested many extracts of seaweed and observed a decrease in the development of fungi and Gram negative bacteria, while Ballesteros *et al.* [26] observed large antimicrobial activity of methanolic alga extracts from 71 species on the Mediterranean area, finding antifungal activities in tests with *Dictyota*, *Padina* and *Sargassum* species. In 2008, Shanmughapriya *et al.* [24] tested members of Rhodophyta, Phaeophyta and Chlorophyta against fungi and bacteria, including multi-resistant human pathogens, resulting in the inhibition of growth in many species. Rizvi & Shameel [12], studying the bioactivity of chemical elements in marine algae from Karachi coast (Pakistan), found antifungal activity on *M. canis* and *T. mentagrophytes* by using methanol extracts of *H. musciformis*, *S. vulgare*, *U. lactuca*, *D. hauckiana* and *P. tetrastratica* and the crude water extract from a *Digenea simplex* seaweed exhibited anti-HIV-1 and anti-helminth activity *in vitro* [28-29], probably due to presence of domoic and α -kainic acids. Additionally, a protein fraction rich in lectin was obtained from *H. musciformis*, which demonstrated a power to growth inhibition of *T. rubrum*, *Colletotrichum lindemuthianum* [30], *C. guilhermondii* and low activity against *C. albicans* from patients with vaginal candidiasis [31].

Tuney *et al.* [32] pointed out results that may be related to the presence of bioactive metabolites soluble in ethanol, which may also have occurred with dichloromethane and methanol extracts of the algae analyzed in this study. In the same study, they evaluated the antimicrobial activity of diethyl ether extracts from marine algae through the agar diffusion technique, detecting halos larger than 15 mm for *Candida* species. Interesting, Salvador *et al.* [33] found antimicrobial activity in crude, fresh and lyophilized extracts of *A. armata* against *C. albicans* and detected a high zone of inhibition (53.2 mm). These results agree with those obtained in our experiments with yeast in disc-diffusion tests in agar. However, data from this study differ from those observed by Orandy *et al.* [34], who tested the active fraction of four species of marine algae against bacteria and *C. albicans* and found increased activity of the fraction of petroleum ether extract of *Sargassum fluitans* on *C. albicans*.

It can be concluded that dichloromethanolic, methanol and ethanol extracts showed the best antifungal activity against species of dermatophytes and *C. albicans*. Of the six alga species tested, all the macroalgae demonstrated antifungal activity against the dermatophytes through both methods used, but the same did not occur with *Candida* species, in which good results were only observed in the microdilution method with *H. musciformis*, *D. simplex* and *S. vulgare*. The present study in searching alga species with antifungal properties presents advantage due to the use of different solvents, resulting in a more selective extraction, responsible for antimicrobial activities. However, the bioactive compounds present in these extracts, which vary widely in their chemical polarity, must be purified for better results.

Acknowledgements

We are grateful to Ana Maria Queijeiro Lopes (IQB/UFAL) and Eurípedes Alves Silva Filho (ICBS/UFAL) for suggestions and to Abilio Borghi for the review on the manuscript. This work was supported by grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

1. Peres NTA, Maranhão FCA, Rossi A, Martinez-Rossi NM. Dermatophytes: host pathogen interaction and antifungal resistance. *An Bras Dermatol* 2010; 85: 657-67.
2. Hay RJ, Jones RM. New molecular tools in the diagnosis of superficial fungal infections. *Clin Dermatol* 2010; 4: 190-6
3. Mota CRA, Miranda KC, Lemos JA, Costa CR, Hasimoto LKS, Passos XS, Meneses HS, Silva MR. Comparison of *in vitro* activity of five antifungal agents against dermatophytes, using the agar dilution and broth microdilution methods. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42: 250-4.

4. Maranhão FC, Paião FG, Martinez-Rossi NM. Isolation of transcripts over-expressed in human pathogen *Trichophyton rubrum* during growth in keratin. *Microbiol Pathog* 2007; 43: 166-72.
5. Seebacher C, Bouchara JP, Mignon B. Updates on the Epidemiology of Dermatophyte Infections. *Mycopathologia* 2008; 166: 335-52
6. Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol* 2011; 3: 5771
7. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards JE, Filler SG, Fisher, JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Soberl JD. Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of American. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 503-35.
8. Diogo HC, Sarpieri A, Melhem M, Pires MC. Evaluation of the disk-diffusion method to determine the in vitro efficacy of terbinafine against subcutaneous and superficial mycoses agents. *An Bras Dermatol* 2010; 85: 324-30.
9. Tresoldi T, Barison EM, Pereira RM, Padoveze MC, Trabasso P. Risk factors associated with the acquisition of multiresistant bacteria in pediatric nursery. *J Pediatr* 2000; 4: 275-86.
10. Dovigo LN, Pavarina AC, Mima EGO, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses* 2009; 54: 123-130
11. Mishra NN, Prasad T, Sharma N, Payasi A, Prasad R, Gupta DK, Singh R. Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2007; 54: 201-235.
12. Rizvi MA, Shameel M. Studies on the bioactivity and elementology of marine algae from the coast of Karachi, Pakistan. *Phyt Res* 2004; 18: 865-872.
13. Smit, AJ. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *J Appl Phycol* 2004; 16: 245-62.
14. Del Val GA, Platas G, A. Basilio. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Gran Canary Islands, Spain). *Int Microbiol* 2001; 4: 35-40.
15. Alves PM, Leite PAAS, Pereira JV, Pereira LF, Pereira MSV, Higino JS, Lima EO. Antifungal activity of the extract of *Psidium guajava* Linn. ("goiabeira") upon yeasts of *Candida* of the oral cavity: an *in vitro* evaluation. *Braz J Pharm* 2006; 16: 192-6.
16. Vellinga A, Murphy AW, Hanahoe B, Bennett K, Cormican MA. A multilevel analysis of trimethoprim and ciprofloxacin prescribing and resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in general practice. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1514-20.
17. Guimarães KG, Souza Filho JD, Dos Mares-Guia TR, Braga, FC. Dihydroisocoumarin from *Xyris pterygoblephara* active against dermatophyte fungi. *Phytochemistry* 2008; 69: 439-44.
18. Sequeira BJ, Vital MJ, Pohlit AM, Pararols IC, Caúper GS. Antibacterial and antifungal activity of extracts and exudates of the Amazonian medicinal tree *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (common name: sucuba). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 659-61.
19. Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Methods for evaluation of the antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of plant extracts. *Rev Bras Farmacogn* 2008; 18: 301-7.
20. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard M38-A, Wayne, PA. 2002.
21. Fernandez-Torres B, Cabanes FJ, Carrillo-Munoz AJ, Inza I, Guarro J. Collaborative evaluation of optimal antifungal susceptibility testing condition for dermatophytes. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3999-4003.

22. Barros MES, Santos DA, Hamdan JS. Evaluation of susceptibility of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* clinical isolates to antifungal drugs using a modified CLSI microdilution method (M38-A). *J Clin Microbiol* 2007; 56: 514-18.
23. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast fungi. Approved Standard Document M27-A, Wayne PA. 2008.
24. Chiheb I, Riadi H, Martinez-Lopez J, Dominguez SJF, Gomez VJA, Bouziane H, Kadiri M. Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco. *Afr J Biotechnol* 2009; 8: 1258-62.
25. Hellio C, Bremer G, Pons AM, Le Gal Y, Bourgougnon N. Inhibition of the development of microorganisms (bacteria and fungi) by extracts of marine algae from Brittany, France. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000; 54: 543-9.
26. Ballesteros E, Martin D, Uriz MJ. Biological activity of extracts from some mediterranean macrophytes. *Bot Mar* 1982; 35: 481-5.
27. Shanmughapriya S, Aseer M, Sugathan S, Kiran SJ, Seghal G, Kalimuthusamy N. Antimicrobial activity of seaweeds extracts against multiresistant pathogens. *Ann Microbiol* 2008; 58: 535-41.
28. Sekine H, Ohonuki N, Sadamasu K. The inhibitory effect of the crude extract from a seaweed of *Dygenea simplex* C. Agardh on the in vitro cytopathic activity of HIV-1 and its antigen production. *Chem Pharm Bull* 1995; 43: 1580-4.
29. Bhakuni DS, Rawat DS. Bioactive marine natural products. Anamaya Publishers and Springer, USA, 2005: 346 p.
30. Melo VMM, Medeiros DA, Rios FJB, Castelar LIM, Carvalho AFFU. Antifungal properties of proteins (agglutinins) from the red alga *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux. *Bot Mar* 1997; 40: 281-84.
31. Cordeiro RA, Gomes VM, Carvalho AFFUM, Maciel VM. Effect of Proteins from the Red Seaweed *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux on the Growth of Human Pathogen Yeasts. *Braz Arch Biol Technol* 2005; 49: 915-21.
32. Tuney BH, Cadirci D, Ünal A, Sukatar. Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (Izmir, Turkey). *Turk J Biol* 2006; 20: 171-5.
33. Salvador N, Garreta AG, Lavelli L, Ribera MA. Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. *Sci Mar* 2007; 71: 101-13.
34. Orandy MA, Verde MJ, Martinez-Lozano SJ, Waksman NH. Active fractions from species of marine algae. *Intern J of Exp. Bot* 2004; 165-70.

Table 1. Minimum inhibitory concentration of algae extracts against different species of dermatophytes and *Candida* through the microdilution test.

| ALGAE/ SOLVENTS | Minimum inhibitory concentration (MIC*- $\mu\text{g.mL}^{-1}$) | | | | | | | | | |
|----------------------------------|---|-------|------|-------|------|------------------------|------|----|------|------|
| | DERMATOPHYTE SPECIES | | | | | <i>Candida</i> SPECIES | | | | |
| | TT | TR | TM | MC | MG | EF | CA | CG | CP | CK |
| <i>Hypnea musciformis</i> | | | | | | | | | | |
| Dichloromethane | - | - | 4.0 | 0.031 | 8,0 | - | 8,0 | - | 16.0 | 16.0 |
| Chloroform | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Methanol | 0.031 | 0.125 | 4.0 | 0.031 | - | 0.5 | - | - | - | - |
| Ethanol | 0.031 | 0.625 | 16.0 | - | 8,0 | 0.5 | - | - | - | - |
| Water | - | 0.625 | 16.0 | - | 8,0 | 0.5 | - | - | - | - |
| <i>Digenea simplex</i> | | | | | | | | | | |
| Dichloromethane | - | 0.031 | - | 0.031 | - | - | - | - | - | - |
| Chloroform | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Methanol | - | - | - | 0.031 | - | - | - | - | - | - |
| Ethanol | - | 2.0 | 8,0 | - | 8,0 | 4.0 | 8,0 | - | 16.0 | 16.0 |
| Water | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Padina gymnospora</i> | | | | | | | | | | |
| Dichloromethane | 0.031 | 0.031 | 4.0 | 0.031 | - | 0.031 | - | - | - | - |
| Chloroform | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Methanol | - | - | - | 0.031 | 8,0 | - | 16.0 | - | - | - |
| Ethanol | 0.031 | 4.0 | - | 0.031 | 8,0 | - | - | - | - | - |
| Water | - | 0.125 | 8.0 | - | - | 2.0 | - | - | - | - |
| <i>Dictyota dichotoma</i> | | | | | | | | | | |
| Dichloromethane | 4.0 | - | - | 0.031 | - | 0.031 | - | - | - | - |
| Chloroform | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Methanol | - | - | - | - | 8,0 | - | - | - | - | - |
| Ethanol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Water | - | - | 16.0 | 0.031 | 8,0 | 0.125 | - | - | - | - |
| <i>Sargassum vulgare</i> | | | | | | | | | | |
| Dichloromethane | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Chloroform | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Methanol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ethanol | 8,0 | 2.5 | 8.0 | 0.031 | - | - | 16.0 | - | 16.0 | 16.0 |
| Water | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ulva lactuca</i> | | | | | | | | | | |
| Dichloromethane | 4.0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Chloroform | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Methanol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ethanol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Water | - | 0.5 | 8.0 | - | 16.0 | - | 16,0 | - | 16.0 | 16.0 |
| Control+ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Control- | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

*MIC: expressed in extract concentration (v/v); **TT:** *Trichophyton tonsurans*; **TR:** *T. rubrum*; **TT:** *T. mentagrophytes*; **MC:** *Microsporum canis*; **MG:** *M. gypseum*; **EF:** *Epidermophyton floccosum*; **CA:** *Candida albicans*; **CG:** *C. guilliermondii*; **CP:** *C. parapsilosis*; **CK:** *C. krusei*; - (**hifen**): no antifungal activity **C+:** Positive control (DMSO/ETOH); **C-:** Negative control (Fluconazol)

Table 2. Minimum inhibitory concentration* of different fractions of algae extracts against species of dermatophytes and *Candida*.

| ALGAE/SOLVENTS | Minimum inhibitory concentration (MIC- $\mu\text{g.mL}^{-1}$) | | | | | | | | | |
|---------------------------|--|------|------|------|------|------|------------------------|----|----|----|
| | DERMATOPHYTE SPECIES | | | | | | <i>Candida</i> SPECIES | | | |
| | TT | TR | TM | MC | MG | EF | CA | CG | CP | CK |
| <i>Hypnea musciformis</i> | | | | | | | | | | |
| Hexane | 2.0 | 8.0 | 16.0 | 4.0 | 1.60 | 16.0 | 16.0 | - | - | - |
| Chloroform | 16.0 | 16.0 | 16.0 | 4.0 | 8.0 | 16.0 | 16.0 | - | - | - |
| <i>Padina gymnospora</i> | | | | | | | | | | |
| Hexane | 8.0 | 16.0 | - | 8.0 | - | 16.0 | - | - | - | - |
| Chloroform | 8.0 | 16.0 | 16.0 | 16.0 | - | 16.0 | 16.0 | - | - | - |
| Control+ | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Control- | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

TT: *Trichophyton tonsurans*; **R:** *T. rubrum*; **TT:** *T. mentagrophytes*; **MC:** *Microsporum canis*; **MG:** *M. gypseum*; **EF:** *Epidermophyton floccosum*; **CA:** *Candida albicans*; **CG:** *C. guilliermondii*; **CP:** *C. parapsilosis*; **CK:** *C. krusei*; **(hifen):** no antifungal activity. **C+:** Positive control (DMSO/ETOH); **C-:** Negative control (Fluconazol)

Table 3. Diameter of inhibition halos from different algae extracts against species of dermatophytes and *Candida*.

| ALGAE/SOLVENTS | AGAR DIFFUSION (mm) | | | | | | | | | |
|----------------------------------|----------------------|----|----|----|----|------------------------|----|----|----|----|
| | DERMATOPHYTE SPECIES | | | | | <i>Candida</i> SPECIES | | | | |
| | TT | TR | TM | MC | MG | EF | CA | CG | CP | CK |
| <i>Hypnea musciformis</i> | | | | | | | | | | |
| Dichloromethane | - | - | - | 15 | 10 | - | 10 | - | - | - |
| Chloroform | - | - | - | - | - | - | 10 | - | - | - |
| Methanol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ethanol | - | 20 | 15 | 20 | 15 | 15 | - | - | - | - |
| Water | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Digenea simplex</i> | | | | | | | | | | |
| Dichloromethane | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Chloroform | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Methanol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ethanol | - | - | 10 | 15 | - | 15 | - | - | - | - |
| Water | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Padina gymnospora</i> | | | | | | | | | | |
| Dichloromethane | 12 | 25 | - | 12 | 10 | 15 | 15 | - | - | - |
| Chloroform | - | - | 15 | - | - | - | - | - | - | - |
| Methanol | - | 25 | - | - | - | 15 | 10 | - | - | - |
| Ethanol | - | 25 | - | - | - | 15 | 10 | - | - | - |
| Water | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Dictyota dichotoma</i> | | | | | | | | | | |
| Dichloromethane | - | - | - | 15 | - | 15 | - | - | - | - |
| Chloroform | - | - | - | 10 | - | 10 | - | - | - | - |
| Methanol | 20 | 15 | 20 | 25 | 20 | - | 10 | - | - | - |
| Ethanol | - | - | - | - | - | - | 15 | - | - | - |
| Water | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Sargassum vulgare</i> | | | | | | | | | | |
| Dichloromethane | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Chloroform | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Methanol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ethanol | - | - | - | 10 | - | 10 | - | - | - | - |
| Water | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Ulva lactuca</i> | | | | | | | | | | |
| Dichloromethane | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Chloroform | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Methanol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ethanol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Water | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Control + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Control- | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |

TT: *Trichophyton tonsurans*; **TR:** *T. rubrum*; **TM:** *T. mentagrophytes*; **MC:** *Microsporum canis*; **MG:** *M. gypseum*; **EF:** *Epidermophyton floccosum*; **CA:** *Candida albicans*; **CG:** *C. guilliermondii*; **CP:** *C. parapsilosis*; **CK:** *C. krusei*; - (hífen): no antifungal activity. C+: Positive control (DMSO/ETOH); C-: Negative control (Fluconazol)

Table 4. Diameter of inhibition halos of different fractions of algae extracts against species of dermatophytes and *Candida*

| ALGAE/SOLVENTS | AGAR DIFUSION (mm) | | | | | | | | | |
|----------------------------------|----------------------|----|----|----|----|----|------------------------|----|----|----|
| | DERMATOPHYTE SPECIES | | | | | | <i>Candida</i> SPECIES | | | |
| | TT | TR | TM | MC | MG | EF | CA | CG | CP | CK |
| <i>Hypnea musciformis</i> | | | | | | | | | | |
| Hexane | 15 | 20 | 25 | 15 | 20 | 20 | 15 | - | - | - |
| Chloroform | 20 | 15 | 25 | 10 | 10 | 10 | 15 | - | - | - |
| <i>Padina gymnospora</i> | | | | | | | | | | |
| Hexane | 10 | 10 | - | - | - | 15 | - | - | - | - |
| Chloroform | 10 | 15 | 10 | - | - | 15 | 15 | - | - | - |
| Control+ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Control - | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |

TT: *Trichophyton tonsurans*; **TR:** *Trichophyton rubrum*; **TM:** *Trichophyton mentagrophytes*; **MC:** *Microsporum canis*; **MG:** *Microsporum gypseum*; **EF:** *Epidermophyton floccosum*; **CA:** *Candida albicans*; **CG:** *Candida guilliermondii*; **CP:** *Candida parapsilosis*; **CK:** *Candida krusei*; **C+:** Positive control (DMSO/ETOH); **C-:** Negative control (Fluconazol); **- (hifen):** no antifungal activity.

CAPITULO III

ARTIGO SUBMETIDO E ESCRITO DE ACORDO COM AS NORMAS DA REVISTA
MARINE DRUGS

**Biological activity of marine algae from Alagoas State,
Northeast Brazil**

Elíca Amara Cecília Guedes^{1,2}, Cenira M. de Carvalho¹, Karlos Antonio Lisboa Ribeiro Junior¹,
Thyago Fernando Lisboa Ribeiro¹, Lurdiana Daise de Barros¹, Maria Raquel Ferreira de Lima¹, Flávia
de Barros Prado Moura², Antônio Euzebio Goulart Sant'Ana¹

¹Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia, Laboratório de Produtos Naturais - Maceió-AL, **Campus A.. C. Simões** - Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins - Maceió - AL, CEP: 57072-970. cmc@qui.ufal.br(CMC); karloslisboa@gmail.com (KALRJ); thyagoslr@hotmail.com (TFLR); lurdiana.lulu@gmail.com(LDB); mraquelf@gmail.com(MRFL); aegs@qui.ufal.br(AEGS);

² Universidade Federal de Alagoas, Icbis. Maceió-AL, **Campus A.. C. Simões** - Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins - Maceió - AL, CEP: 57072-970. eac.guedes@gmail.com(EACG); biodiversidade.ufal@gmail.com(FBPM).

*Authors to whom correspondence should be addressed: eac.guedes@gmail.com. Tel.: +55-82-33363444 (EACG); aegs@qui.ufal.br(AEGS) fbpmoura@gmail.com(FBPM).

Received: / Accepted: /Published:

Abstract

This study investigates the biological activity, which includes the larvicidal activity against *Aedes aegypti*, molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* and toxicity test against the non-target organism *Artemia salina*, of five benthic marine algae collected from the North coast of Alagoas.

Extracts of *Ulva lactuca* (Chlorophyta), *Padina gymnospora*, *Sargassum vulgare* (Phaeophyta), *Hypnea musciformis* and *Digena simplex* (Rhodophyta) were obtained from different solvents of increasing polarity such as dichloromethane, methanol, ethanol, and water. Of the five algae screened, the dichloromethane extract of *H. musciformis* and *P. gymnospora* exhibited highest activity and were subjected to bioassay guided fractionation in hexane and chloroform. The chloroform fraction of *P. gymnospora* and *H. musciformis* showed molluscicidal activity with values below $40\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($11.1460\mu\text{g.mL}^{-1}$ and $25.8689\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively) and the chloroform and hexane fraction of *P. gymnospora* showed larvicidal activity with values below $40\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($29.018\mu\text{g.mL}^{-1}$ and $17.230\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively). Results showed that crude extracts were non-toxic against *A. salina* while chloroform and hexane fractions of *P. gymnospora* ($788.277\mu\text{g.ml}^{-1}$ e $706.990\mu\text{g.ml}^{-1}$) showed moderate toxicity, indicating the non-polar nature of toxic compounds present in the algae. Results of this study demonstrate that extracts from algae do not provide toxicological risk to their use.

Keywords: molluscicidal, larvicidal toxicity, *Biomphalaria glabrata*, *Artemia salina*, *Aedes aegypti*, seaweed extract, bioassay.

1. Introduction

The marine environment, particularly in the tropics, has immense species diversity than that of tropical forests. This species richness is capable of producing a wide variety of chemical compounds with unique structures and functions, many of which can be utilized for the development of novel drugs and drug leads [1,2]. As an abundant sea resource in Brazilian coast, marine algae exhibit a greater source of potential. It is known that species of marine algae synthesized bioactive compounds with diverse activity [2,3]. Studies aiming to recognize representative genera of marine algae with bioactive substances have been explored by the scientific community. In the last three decades, the discovery of biologically active metabolites from macroalgae has hiked up [4,5,6].

The metabolite pattern of marine algae are analogous to terrestrial plants with respect to the production of terpenes, aromatic compounds, acetogenins, amino acid derivatives and polyphenols (Freitas et al., 1994 ; Faulkner, 2002). Many of these metabolites have known to possess antibacterial, antifungal, antiviral, antitumor activities [1,2].

The Brazilian Northeast is the poorest region of Brazil and has the worst Human Development Indices. Most of this population is subjected to neglected tropical diseases [7]. Dengue fever and Schistosomiasis cause major public health concerns in Brazil and other tropical developing countries.

Natural products with different biocidal activities can help to fight parasite vectors at the adult or larval stages and can act as alternatives to synthetic products due to their rapid biodegradation and lower cost [8].

The present study investigates the biological activity, which includes the larvicidal activity against *Aedes aegypti* molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* and toxicity test against the non-target organism *Artemia salina*, of five marine algae collected from the North coast of Alagoas.

2. Results and Discussion

The crude extracts obtained from dichloromethane, methanol, ethanol and water of different algal species - *Ulva lactuca* (Chlorophyta), *Padina gymnospora*, *Sargassum vulgare* (Phaeophyta), *Hypnea musciformis* and *Digena simplex* (Rhodophyta) and the chloroform and hexane fractions of algae *H. musciformis*, *P. gymnospora* were screened for biological activity. Tests were conducted using different concentrations of extracts according to the organism's susceptibility. Initial concentrations used were of 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for test toxicity against *Artemia salina*, 500 ppm for the larvicidal test against *Aedes aegypti* and 100 ppm for the molluscicidal test against *Biomphalaria glabrata*. This is the first report on the biological activity of marine algae collected from the coast of Alagoas State.

The activity of algal extracts on larvae of *A. aegypti* was found that only the hexane and chloroform fractions of *P. gymnospora* exhibited activity with LC_{50} value of 29.01 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 17.23 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively whereas the other extracts exhibited meager activity (Table 1).

Table 1. Lethal concentration of chloroform and hexane fractions (in $\mu\text{g.mL}^{-1}$) of *P. gymnospora* front *Aedes aegypti*.

| Algae/Fraction | LC_{10} | LC_{50} | LC_{90} |
|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| C_6H_{14} (a) | $3.004 \geq 7.67 \leq 12.373$ | $29.018 \leq 39.155 \geq 54.584$ | $117.977 \geq 199.791 \leq 572.243$ |
| CHCl_3 (b) | $0.992 \geq 3.009 \leq 5.559$ | $17.230 \leq 25.340 \geq 37.063$ | $116.650 \geq 213.374 \leq 633.942$ |

(a)Hexane fraction; (b) chloroform fraction

Selvin and Lipton [9], evaluating the biopotential of *Ulva fasciata* and *H. musciformis* in India verified larvicidal activity for the mosquito *Culex* sp, at the second and fourth instars and found that larvae at second instar produced 100% mortality at 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ with methanol: dichloromethane extracts (1:1). Although in our study, the mosquito species has not been evaluated by these same authors, *Culex* sp. has viral potential similar to *A. aegypti* and extracts from *H. musciformis* showed no lethality against *A. aegypti*. Analyzing larvicidal activity of methanol extracts of 20 species of seaweed collected off the coast of India against the second instar larvae of *A. aegypti*, [2] found that *Lobophora variegata* (Phaeophyta-Dictyotaceae) had a higher value of LD_{50} (70.38 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). In our work, only the hexane

and chloroform fractions of *P. gymnospora* (Phaeophyta) had the highest potential larvicide (29.018 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 17.230 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively)

In relation to *B. glabrata*, two algal fractions showed molluscicidal activity, chloroform fractions from *H. musciformis* and *P. gymnospora* and their lethal concentrations calculations. Hexane fractions of these two algal species did not show molluscicidal activity sufficient to calculate the lethal concentration (Table 2).

Regarding molluscicidal activity of the chloroform fraction from *H. musciformis* and *P. gymnospora* that had LC_{50} values of 11.1460 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 25.8689 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectively, and according to WHO [10], that recommends plant extracts with $\text{LC}_{50} < 40$ ppm can be used directly against *B. glabrata* and these fractions might be excellent source of new compounds with molluscicidal activity. Patel et al [11], evaluating the molluscicidal potential of methanolic extract of 60 marine algae found that only the species *Fucus serratus*, *F. vesiculosus*, *Pelvetia canaliculata*, *Ascophyllum nodosum*, *Halidrys siliquosa*, *Bifurcaria bifurcata*, *Dictyota dichotoma* and *Halopithy sincurve* exhibited activity against *B. glabrata* at 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Table 2. Accurate test with fractions from hexane (C_6H_{14}) and chloroform (CHCl_3) from seawater species collected on the beach Riacho Doce-AL against *B. glabrata*.

| Algae/Extract | LC_{10} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | LC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | LC_{90} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) |
|--|--|--|--|
| | IC(95%) | IC(95%) | IC(95%) |
| <i>H.musciformis</i> /CHCl ₃ | 2.7831(2.2906-3.2838) | 11.1460(10.1599-12.161) | 44.6382(39.5253-51.3482) |
| <i>P.gymnospora</i> / CHCl ₃ | 5.963(4.8189-7.1286) | 25.8689(23.4123-28.4624) | 112.2189(96.8318-133.4954) |
| <i>H.musciformis</i> */ C ₆ H ₁₄ | ----- | ----- | ----- |
| <i>P.gymnospora</i> */ C ₆ H ₁₄ | ----- | ----- | ----- |

*there was no possibility of LC calculation

The toxic effect on *A. saline* was analyzed in crude extracts of dichloromethane, methanol, ethanol and water as well as chloroform and hexane fractions of algae *H. musciformis* and *P. gymnospora*, since there was no mortality in various concentrations tested with other algal extracts tested, with no possibility of LC calculation.

The LC_{50} value expresses the concentration of extract or blank necessary to cause death in 50% of *A. salina* specimens present in cultivation. Therefore, the lower the LC_{50} value found, the greater the toxic effect of the substance to different toxins [12]. Test results with *A. salina* indicated low toxicity of crude extracts of dichloromethane, methanol, ethanol from *P. gymnospora* and dichloromethane, methanol e watter from *H. musciformis* (Table 3). In relation to the fractions of dichloromethane

extract, chloroform and hexane of *P. gymnospora*, they showed low toxicity against *A. salina* since their values were below 10^3 . Toxicity values of *H. musciformis* were not possible to calculate the LC (Table 4). For the other marine algae tested, there was no possibility of LC calculation.

Table 3. Accurate test with crude extracts of marine algae collected on the beach RiachoDoce-AL against *A. salina* (DCM-dichloromethane; MeOH-methanol; ETOH- ethanol H₂O- water)

| Algae/Extract | LC ₁₀ (µg/mL) | LC ₅₀ (µg/mL) | LC ₉₀ (µg/mL) |
|---|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| <i>H.musciformis</i> /CH ₂ Cl ₂ | 540.54 (410.67 – 620.21) | 1070.90 (930.20 – 1480.02) | 2130.46 (150.039 – 4780.61) |
| <i>P.gymnospora</i> CH ₂ Cl ₂ | 440.56 (250.32 – 550.61) | 1160.01 (940.48 – 2130.66) | 2950.41 (1770.11 – 16330.47) |
| <i>H.musciformis</i> /MeOH | 590.73 (470.908 – 670.167) | 1130.02 (970.18 – 1570.13) | 2130.85 (1540.77 – 4680.26) |
| <i>P.gymnospora</i> /MeOH | 640.42 (560.31 – 700.235) | 1000.78 (901.74 – 1170.73) | 1570.69 (1300.87 – 2250.43) |
| <i>P.gymnospora</i> /ETOH | 830.84 (720.39 – 970.64) | 1430.59 (1150.01 – 3070.08) | 2450.94 (1630.69 – 10770.90) |
| <i>H.musciformis</i> /H ₂ O | 550.25 (310.95 – 650.74) | 1450.61 (1080.68 – 476.40) | 3830.69 (2000.35-6360.94) |

Table 4. Accurate test with fractions from hexane (C₆H₁₄) and chloroform (CHCl₃) of algal species collected on the beach Riacho Doce-AL against *A. salina*

| Algae/Extract | LC ₁₀ (µg/mL) | LC ₅₀ (µg/mL) | LC ₉₀ (µg/mL) |
|--|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| <i>P.gymnospora</i> C ₆ H ₁₄ | 330.474(139.004-437.601) | 788.277(687.856-998.205) | 1880.271(1307.848-5926.118) |
| <i>H.musciformis</i> *C ₆ H ₁₄ | ----- | ----- | ----- |
| <i>P.gymnospora</i> CHCl ₃ | 423.49(322.234-489.074) | 706.990(648.747-776.152) | 1180.111(1009.600-1593.490) |
| <i>H.musciformis</i> */CHCl ₃ | ----- | ----- | ----- |

*there was no possibility of LC calculation

Ara et al [13] investigated the toxic activity of ethanol extracts from 22 algal species from Karachi coast against *A. salina* and found that five brown algae showed values below 10^3 (*Spatoglossum asperum*, indicates Stokey (507 µg.mL⁻¹), *Stoechospermum marginatum* (612µg.mL⁻¹), *Sargassum swartzii* (928µg.mL⁻¹) and *Sargassum binderi* (735µg.mL⁻¹) while only one green alga (*Caulerpa racemosa* - 929µg.mL⁻¹) was toxic. In the same study, authors found that the hexane fraction of *S. marginatum*(349 µg.mL⁻¹) and *S. swartzii* (61µg.mL⁻¹) were also toxic. In our work, chloroform and hexane fractions of *P. gymnospora* (788.277µg.mL⁻¹ and 706.990 µg.mL⁻¹, respectively) showed low activity, indicating the polar nature of the toxic compounds of this alga.

Lhuillier et al [14] screened 26 benthic macroalgae in the state of Santa Catarina bio monitored by the lethality test using larvae of *A. salina*, including ethanol extracts from red (Rhodophyta), brown (Phaeophyta) and green (Chlorophyta) algae species and found that 25 species had significant toxicity,

especially *Acantophoraspicifera* (LC₅₀), *H. musciformis* (97.5µg.mL⁻¹ and 85.0 µg.mL⁻¹) and *Pterocladia capillaceus* (LC₅₀). In this study, ethanol extract of *H. musciformis* did not record possible values to calculate the LC₅₀ while *P. gymnospora* was not lethal.

Checking the cytotoxicity of marine organisms from sponges, gorgonians, tunicate, echinoderms and macroalgae, Carballo et al (2002) found that the brown algae *Colpomenia tuberculata* (91µg.mL⁻¹) registered less activity compared to other organisms. Dichloromethane and methanol extracts of *Ulva fasciata* and *H. musciformis* collected on the peninsular coast of India were evaluated for toxicity against *A. salina* for Selvin and Lipton [9] and *U. fasciata* was moderately toxic.

The lower toxicity on the larvae of *A. salina* can be considered a very interesting feature for use of extracts or fractions of marine algae in natural environments for control of both the snail *B. glabrata* and mosquito larvae.

3. Experimental Section

3.1. Collection of marine algae

Algae were manually collected from the Riacho Doce beach, (9 ° 34 '0 "S and 35 ° 39' 0" W) during low tide period between October 2007 to July 2009. The collected samples were immediately transported to the Phycology Laboratory of the Biological Sciences Institute (ICBS), Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Five species of algae from three divisions were used for this study: Chlorophyta -*Ulva lactuca* Linnaeus-MAC51238; Phaeophyta - *Padina gymnospora* (Kützinger) Sonder-MAC 51235; *Sargassum vulgare* C. Agardh- MAC 51236; and Rhodophyta –*Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacque) J.V. Lamouroux-MAC51234, *Digenea simplex* (Wulfen) C. Agardh-MAC51231). The voucher of respected species were deposited in the MAC Herbarium, Environment Institute of the city of Maceió, Alagoas (Br) as internal reference material.

3.2. Extraction and fractionation of algae

Algae were washed with distilled water, dried in air circulating ovens (BLUE, MOD-1401440SC, USA) at 45°C for three hours and crushed using industrial blender METVISA model type TA-2. The dried and crushed material from each collection and each alga was mixed in equal quantities. To obtain crude extracts, 500g dried algae samples were suspended in 1000 mL using dichloromethane, methanol, ethanol and water as solvents, macerated for 72 hours and this process repeated three times. Organic extracts were filtered and rotoevaporated (MOD Rotoevaporator Buchhi heating Bath B-490, Switzerland) at 25°C – 40°C, except that the aqueous extract was lyophilized (Edwards Freeze dryer Mod E2MB of Brazil). Extracts of respective algal species were stored on at 4 °C. The dichloromethane extracts of *H. musciformis* and *P. gymnospora* were selected for fractionation by not showing better yields: 11.86 g (2.58%) and 13.96 g (3.04%) respectively. For fractionation by liquid-

liquid partition, crude extracts of *H. musciformis* (2.73 g) and *P. gymnospora* (1.90 g) were suspended in methanol: water (3:1) and extracted with hexane and chloroform, obtaining chloroform and hexane fractions. All solvents were purchased from VERTEC Fine Chemicals of Brazil.

3.3. Mosquito larvicidal activity

Tests with *A. aegypti* larvae were performed in bioassays laboratory IQB/UFAL, based on the protocol of WHO [15]. Bioassays used fourth instar larvae of *A. aegypti* at in two repetitions; each experimental plot consisted of 10 larvae which were placed in 250 ml cups containing 27 mL test solution at 100µg/mL. Extracts that had equal to or less than 50% mortality rate followed for the accurate tests in which 25 larvae were used in four replicates and their concentrations were defined by preliminary results.

Larvae were considered dead when failed to reach the solution surface as the container was stirred. The count of dead larvae was performed at 24 hours and 48 hours after the experiment beginning outlined in quadruplicate. In parallel, control tests were performed with 1% dimethyl sulfoxide aqueous solution (DMSO) and the synthetic larvicide Temephos® at 3µg.mL⁻¹. The activity level of extracts tested was based on the average percentage mortality of larvae at 48 hours [> 75% (highly active), > 50 and <75% (moderately active), > 25% and <50% (low active) and <25% (inactive)].

For larvae of *A. aegypti*, treatments with at least 50% mortality within 48 h were followed for bioassays with the same sample at different concentrations in order to determine the concentration required to kill 10% (LC₁₀), 50% (LC₅₀), 90 % (LC₉₀) for present larvae. Test analysis was performed according to the Probit method [16].

3.4. Toxicity test with *Artemia salina* (non-target organisms)

Toxicity against *Artemia salina* Leach nauplii was carried out according to the method described by Souza et al [17] with some modifications. *Artemia* cysts (about 1g. L⁻¹) were added to filtered seawater and maintained at temperature 27-30°C with aeration and under continuous light. Samples that showed mortality ≥ 30% at 1000 mg mL⁻¹ in preliminary tests were subjected to quantitative assay. After 24 hours, nauplii hatched and were collected with micropipette and concentrated in Petri dish with seawater maintained under the same temperature and luminosity for more 24 hours. 15g of each crude extract (dichloromethane, methanol, ethanol and water) were diluted in 5ml distilled water. Control solution was prepared with seawater and 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO). On plates containing 5 ml wells were placed 10 Artemis and 50µL of each extract subtraction and the control solution in six repetitions. After 24 h, the number of killed was determined with the aid of a Zoom stereo microscope, including larvae that remained immobile after stimulation for at least 10 sec. The toxicity degree of subtractions from plant extracts was determined as recommended by Deciga-Campos et al. (2007). These authors consider non-toxic extracts that have ≥ 1000µg.mL⁻¹, low toxicity if LC₅₀ ≥ 500 and

<1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, highly toxic when LC_{50} <500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. LC_{50} values (concentration that causes 50% mortality) and their confidence intervals (CI 90% and 95%) were calculated using the PROBIT analysis [16].

3.5. Molluscicidal activity

For molluscicidal activity, *Biomphalaria glabrata* (Say 1818) propagated in laboratories and descendants of specimens not infected by trematodes from Barreiro, peripheral zone of Belo Horizonte, Minas Gerais were used.

Snails were kept in glass tanks at room temperature, current and dechlorinated water system for 8 hours with a mixture of soil, sand and calcium carbonate. During the assay period they were fed with fresh lettuce and fish feed. The test for evaluation of molluscicidal activity mostly involved the immersion of *B. glabrata* in aqueous solution at 0.1% dimethylsulfoxide (DMSO) extract under investigation until obtaining different concentrations (0.10 to 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) [18].

The test solution for each algae extract was prepared at 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for the preliminary test with the snail. In the preliminary stage five snails were used per concentration. Two sets of controls were used in order to verify the susceptibility of snails, one positive with niclosamide at 3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and one negative only with dechlorinated water. The exposure of these organisms was 24 hours and time of observation was 72 hours with reading and exchanging of water every 24 hours and removal of dead specimens. Death of snails was indicated by discoloration, absence of muscle contractions, bleeding and deterioration of body tissues. As tests were conducted with adult snails, it was submitted to the accurate test the algal extract that promoted around 30% mortality at 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. In parallel, control tests were performed with the DMSO aqueous solution (0.1%) and the molluscicide niclosamide® at 3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. To calculate lethal concentration values (LC_{90} , LC_{50} , and LC_{10}), the Probit Program Version 1.5 (EPA, 2004) was used. The World Health Organization (WHO) recommends that crude extracts of plants showing LC_{50} <40 ppm (0.04% and 0.4 mg/mL) have some potential to be applied as molluscicidal and larvicidal compounds [10].

Results obtained for molluscicidal tests represent the average of three repetitions ($n = 3$) \pm mean' standard deviation. Results were submitted to ANOVA followed by Tukey test ($p \leq 0.05$). All tests were performed using the programs Microcal Origin, version 8.0 and Graph Pad Prism version 5.0.

4. Conclusions

According to the results obtained and the bioassay used in this study, crude extracts of algae showed no significant acute toxicity, posing no toxicological risk in their using. Chloroform fractions of algae *H. musciformis*, *P. gymnospora* might be excellent source of new compounds with molluscicidal activity, as well the hexane and chloroform fractions of *P. gymnospora* as larvicide. The main

advantage of using this crude extract would be the low cost of obtaining and non-pollution of the environment by being obtained from a renewable source of nature.

References

1. Molinski, T. F, Dalisay, D. S, Lievens, S. L, Saludes, J. P. Drug development from marine natural products. *Nat RevDrug. Disc.* **2009**, 8,69-85.
2. Manilal, A.; Thajuddin, N.; Selvin, J. Idhayadhulla, A.; Kumar, R.S.; Sujith,S. *In vitro* larvicidal activity of marine algae against the human vectors *Culexquinque fasciatus* (Say) and *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera:Culicidae). *Int. Journ. Zool. Res.* **2011**, 7(3),272-278.
3. Smit A.J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *J Appl. Phycol.***2004**, 16,245-262.
4. Cabrita, M.T.; Vale C.; Rauter, A.P. Halogenated compounds from marine algae. *Mar. Drugs* **2010**, 8, 2301–2317.
5. Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento. “A Verdadeira Riqueza das Nações: Vias para o Desenvolvimento Humano”. **2010**, Disponível em: <http://www.pnud.org.br/rdh>.
6. Genovese, G.; Tedone, L.; Hamann, M.T.; Morabito, M. The mediterranean red alga. *Asparagopsis*: A source of compounds against Leishmania. *Mar. Drugs***2009**, 7, 361–366.
7. Hotez , P.” A new voice for the poor”. *PLoS Neglected Tropical Diseases*,**2007**, .1.
8. A.Marston, and K. Hostettmann. “Plant molluscicides”. *Phytochemistry*, Vol. 24, 1985.
9. Selvin, J, Lipton, A. P. Biopotentials of *Ulva fasciata* and *Hypnea musciformis* collected from the peninsular coast of India.*J. Mar. Sci. Tec.***2004**. 12/1, 1-6.
10. World Health Organization (WHO). *Tropical Disease Research*. Geneva: World Health Organization.1993.
11. Patel. A. V, Wright, D. C, Romero, M. A, Blunden, G.,Guiry, M.D. Molluscicidal polyphenols from species of Fucaceae. *Nat. Prod.Comm.***2006**. 3/2,245-249.
12. Rodriguez, A G, Teixeira, O. M, Salles, F G,Vital, J.P, Peixoto, D S. Bioensaio com *Artemia salina* para detecção de toxinas em alimentos vegetais. *Estudos.* **2009**, 35,795-808.
13. Ara, J; Sultana,V, Ehteshamul-Haque, S, Qasim, R, Ahmad, V.U.Cytotoxic Activity of Marine Macro-algae on *Artemia salina* (Brine Shrimp). *Phytother. Res.* **1999**. 13, 304–307.
14. Lhullier, C, Horta, P. A. Falkenberg, M. Avaliação de extratos de macroalgas bêmicas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. *Braz. J. Pharm.* **2006**. 16/2,158-163,
15. World Health Organization (WHO). *Instruction for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides*. WHO/VBC/75.583. **1975**.
16. Finney, D.J. Probit analysis. Third ed. Cambridge, England: Cambridge University Press, **1971**. 31p.

17. Souza, C.P d, Mendes, N. M., Jannoti-Passos, L.K, Pereira, J.P. O uso da casca de castanha do caju *Anacardium occidentale* como moluscicida alternativo. Ver. Inst. Med. Trop, **1992**, 34/5, 459-66.
18. Santos A. F. dos; Sant'ana, A. E. G. Molluscicide activity of the diterpenoids jatrophonad jatropholones A and B isolated from *Jatropha elliptica* (Pohl) Muell. Arg. Phyt. Res, **1999**, 13. 660-664.

Samples Availability: Available from the authors.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como recurso marítimo abundante na costa brasileira, as algas marinhas exibem grande potencial de utilização e historicamente, têm sido utilizadas por vários países orientais como fonte de alimentação. Em vários programas de screening, a investigação de algas marinhas tem evidenciado numerosos extratos com variada bioatividade. A presença de compostos com bioatividade em algas marinhas é fato já conhecido, no entanto, desde a identificação de algas com potencial até sua utilização existe um longo caminho de pesquisa e testes a serem realizados. Neste sentido, o presente trabalho representou uma etapa inicial do processo de pesquisa sobre a utilização de algas marinhas do litoral alagoano visando sua utilização como produtos naturais larvicida, moluscicida, citotóxico e microbiológico.

O teste microbiano pelo método de microplaca foi bem sucedido para comparar a atividade dos extratos brutos e frações das diferentes espécies de algas. Os extratos lipossolúveis das macroalgas foram mais ativos contra os microorganismos testados enquanto os extratos aquosos não foram ativos ou estimularam o crescimento microbiano.

O ensaio com células cancerígenas utilizando as linhagens HEP-2 e K562 foram bem sucedidos e mostraram ser um modelo biológico que permitirá a realização de screenings e avaliar se os extratos considerados citotóxicos poderão oferecer alternativas mais eficazes para o tratamento de tumores .

Com relação aos bioensaios, os extratos não apresentaram toxicidade aguda significativa, não oferecendo risco toxicológico na utilização dos mesmos.

É importante ressaltar a necessidade de estudos de bioprospecção visando à busca de substâncias de origem vegetal, uma vez que os resultados aqui apresentados são à base de etapas de pesquisa posteriores que devem ser realizadas, para entender melhor os efeitos relatados com os extratos de algas. Os resultados obtidos permitem sua utilização, uma vez que, um dos grandes problemas enfrentados pela indústria farmacêutica que frustram o

desenvolvimento de novos fármacos é a toxicidade das moléculas obtidas de extratos vegetais, o que não foi observado no presente trabalho.

A utilização de produto natural de algas marinhas pode ser um método alternativo para o controle de alvos de teste como *A. aegypti*, *A. salina* e *B. glabrata*, que pode ajudar a minimizar o uso de inseticidas químicos, diminuindo assim a contaminação do meio ambiente.