

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RAFAEL JORGE SANTOS ARACATI PADILHA

**PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Caulerpa racemosa*
(Forsskal) J. Agardh**

RECIFE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RAFAEL JORGE SANTOS ARACATI PADILHA

**PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Caulerpa racemosa*
(Forsskal) J. Agardh**

RECIFE

2014

RAFAEL JORGE SANTOS ARACATI PADILHA

**PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Caulerpa racemosa*
(Forsskal) J. Agardh**

Dissertação de Mestrado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof.^o Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Cláudia Sampaio de Andrade Lima

RECIFE

2014

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Padilha, Rafael Jorge Aracati
Perfil químico e atividade antimicrobiana de *Caulerpa racemosa* (Forsk.) J. Agard/
Rafael Jorge Santos Aracati Padilha. – Recife: O Autor, 2014.

83 folhas: il.

Orientadores: Ranilson de Souza Bezerra, Cláudia Sampaio de Andrade
Lima

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

1. Drogas – Resistências em micro-organismos 2. Alga marinha 3.
Bactérias patogênicas I. Bezerra, Ranilson de Souza (orient.) II.
Andrade Lima, Cláudia Sampaio de (coorient.) III. Título.

616.92

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-252

RAFAEL JORGE SANTOS ARACATI PADILHA

**PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Caulerpa racemosa*
(Forsskal) J. Agardh**

Dissertação de Mestrado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 30 de abril de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Pós-graduação em Ciências Biológicas – UFPE (Presidente)

Dr. Dárlio Inácio Alves Teixeira

(membro externo)

Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim – UFPE

(Membro interno)

RECIFE

2014

“Instruir-te-ei, e ensinar-te-ei o caminho que deves seguir; guiar-te-ei com os meus olhos.”

Salmo 32:8

**Aos meus pais a minha esposa Regina e a todos
meus amigos e familiares que estiveram comigo
nesta jornada**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que ele fez em minha vida, por ele ter me guiado e ensinado o caminho reto, pois desde o momento que entrei no laboratório de biofísica química sei que estava comigo. Sou grato por mais uma etapa em minha vida com o término deste trabalho;

Aos meus pais, Paulo Aracati Padilha e Teresa Cristina Santos Padilha pelo carinho, companhia, orientação, conselhos e por todo o incentivo que puderam me oferecer antes e durante todo esse trabalho. A minha esposa Regina Silva Picasso que esteve comigo me ajudando, me incentivando, e colaborando comigo em tantas outras atividades que certamente não seria capaz de suportar a pressão sem ela;

Ao professor Dr. Ranilson de Souza Bezerra, por ter aceitado me orientar e ter confiado em mim para a realização desse trabalho;

A Professora Dra. Cláudia Sampaio de Andrade Lima por ter me orientado e me acolhido em seu laboratório, pessoa com quem aprendi muito. Agradeço a professora por ela ter sempre me incentivado, pois no começo me julgava incapaz da realização de qualquer trabalho. Eu sou grato porque aprendi com ela o que significa ser um cientista, e pela grande amizade formada;

Ao Professor Dr. Ricardo Yara, também agradeço por toda ajuda, e pela orientação e pelo incentivo no aperfeiçoamento do saber e por toda a amizade formada durante esse tempo;

A professora Dra. Kêsia Xisto pela enorme contribuição nos experimentos microbiológicos, e toda sua equipe;

Ao professor Thiago Aquino pela contribuição na elucidação das estruturas coletadas.

A professora Dra. Maria Elizabeth Bandeira-Pedrosa por ter me ajudado na identificação das algas coletadas;

A todos do Laboratório de Biofísica Química, porque toda a pesquisa fica mais fácil quando temos amigos que sempre estão dispostos a ajudar, especialmente a Brunna Patriota, aluna de iniciação científica que aguentou toda a minha “paciência”, e esteve ao meu lado durante todo esse projeto com as algas, e também aos amigos e coletores de algas arribadas Renan, Vinícius, Felipe, Yago, Rute, João Paulo, Amanda, Aline, Emília, Natália Onofre, Anna Livia, Dewson, Paulo Euzébio, Bela, Thiago Jampa, Diogo Lins, Aline Pitt, Gilvânia, Felipe, Carlos seu Fredson e todos os outros que fazem ou fizeram parte da rotina deste laboratório;

A Raquel, Thiago Cahou, Janilson, Marina e a todos os amigos e colaboradores do LABENZ que por muitas vezes me socorreram nos experimentos;

À todos da igreja Maranata que estiveram vivenciando os meus estudos e continuamente oravam por isso: Carlinhos, Zeza, a todos da família Murta (Gilson, Júlia e suas filhas), a família Wolkorff (Marcelo, Barbara, João e Marina), Fábio, Ivanildo, Júlia, Alvetete, Dora, Prazeres e tantos outros irmãos;

A todos que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. Aos momentos inesquecíveis das aulas com os professores, no SICBIO, com os amigos e funcionários durante todo esse projeto;

À CAPES pela bolsa concedida durante o período de desenvolvimento desta dissertação;

Muito obrigado.

RESUMO

A resistência antimicrobiana tornou-se, nas últimas décadas, um dos principais problemas de saúde pública no mundo, sendo necessário buscar fontes mais eficazes para combater estes agentes infecciosos. A descoberta de metabólitos secundários no ambiente marinho vem consolidando a importância deste ambiente nos últimos anos. A presença de uma grande diversidade de espécies vegetais e animais, pode fornecer uma enorme variedade de substâncias que podem ser usadas na indústria farmacêutica. Dentre todos os organismos marinhos, as algas representam o primeiro elo da cadeia alimentar e possuem um papel muito importante na manutenção da vida aquática, além de serem igualmente relevantes tanto do ponto de vista econômico quanto social. O presente estudo visa realizar prospecção química e microbiológica a partir de extratos de algas marinhas do gênero *Caulerpa* Lamouroux (Bryopsidales, Chlorophyta). A coleta do material foi realizada na praia de Maracaípe (município de Ipojuca), litoral de Pernambuco, limita-se ao norte pela praia de Porto de Galinhas e ao sul pela praia de Enseadinha. O objetivo principal deste estudo foi realizar uma prospecção química e a avaliação microbiológica dos metabólitos secundários de *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh nas condições bentônicas e arribadas, frente aos micro-organismos com maiores índices de infecção hospitalar. O extrato bruto foi caracterizado quanto a sua ação antioxidante (DPPH), além disso, foi realizada uma análise fitoquímica para detecção de saponinas, alcaloides, fenóis, taninos e antocianinas. Foi realizado o isolamento e purificação da fração mais ativa da alga bentônica, onde foram purificadas 4 substâncias, que foram submetidas à elucidação através de técnicas espectroscópicas convencionais (IV, UV e RMN ^1H). Os testes antimicrobianos utilizados seguiram o método de difusão de disco e foi constatado que as frações e os extratos brutos das algas bentônicas apresentaram uma marcante atividade frente ao *Enterococcus faecalis* e cepas resistentes de *Enterococcus*. Além disso, foi observado que as frações apresentaram uma ação inibitória mais discreta frente a outros representantes de bactérias Gram-positivas. A triagem fitoquímica mostrou a presença de saponinas e alcaloides nesses dois grupos de algas. Os testes antioxidantes revelaram que as algas bentônicas possuem uma ação antioxidante superior as arribadas. A avaliação espectroscópica também indicou a presença de pigmentos clorofilados, esteróides e foi confirmada a presença da caulerpicina.

Palavras-chaves: *Caulerpa racemosa*, antimicrobiano, caulerpicina

ABSTRACT

Antimicrobial resistance has become, in recent decades, one of the major public health problems in the world. It is need to seek new sources against these infectious agents. The discovery of secondary metabolites from marine environment has been consolidating the importance of the environment in recent years. The presence of a wide variety of plant and animal species can provide a wide range of substances that can be used in the pharmaceutical industry. Among all marine organisms, algae are the first step in the food chain and have a very important role in the maintenance of aquatic life, and are equally relevant from both an economic and a social perspective. The present study aims to conduct chemical and microbiological prospecting from extracts of marine algae of the genus *Caulerpa Lamouroux* (Bryopsidales, Chlorophyta). Material collection was held on the beach Maracaípe (Ipojuca), coast of Pernambuco, is limited to the north by the beach of Porto de Galinhas and south along the beach called Enseadinha. The main of this study was to evaluate the chemical and microbiological activities of the secondary metabolites of *Caulerpa racemosa*, using benthic and free material against microorganisms with higher rates in the hospital infection. The crude extract was also characterized as its antioxidant activity (DPPH), moreover a phytochemical analysis was performed to detect saponins, alkaloids, phenols, tannins and anthocyanins. The isolation and purification of the most active fraction of benthic algae, furnished 4 substances, which were evaluated using conventional spectroscopic techniques (IR, UV and $^1\text{H-NMR}$). Antimicrobial tests were performed following the method of disk diffusion and it was founded that fractions and crude extracts of benthic algae showed a marked activity against *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus* resistant strain. Moreover, it was observed that the fractions showed an inhibitory effect against other more discreet representatives of Gram-positive bacteria. The phytochemical screening showed the presence of saponins and alkaloids in these two groups of algae. Antioxidants tests revealed that benthic and free algae have higher antioxidant activities. The spectroscopic evaluation also indicated the presence of chlorophylls, steroids and confirmed the structure of caulerpicine.

Keywords: *Caulerpa racemosa*, antimicrobial, caulerpicine

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

	Representantes das algas. Alga marrom: <i>Padina gymnospora</i> (A); alga	
Figura 1:	vermelha: <i>Gracilaria multipartita</i> (Clemente) Harvey (B); alga verde: <i>Caulerpa racemosa</i> (C).....	20
	Exemplos de <i>Caulerpa</i> : (A) <i>Caulerpa prolifera</i> (Forsskal) J. V. Lamouroux; (B) <i>Caulerpa mexicana</i> Sonder ex Kutzing; (C) <i>Caulerpa</i>	
Figura 2:	<i>fastigiata</i> Montagne; (D) <i>Caulerpa cupressoides</i> (Vahl) C. Agardh; (E) <i>Caulerpa racemosa</i> (Forsskal) J. Agardh; (F) <i>Caulerpa sertularioides</i> (S. G.Gmelin) M. A.Howe.....	22
Figura 3:	Aspecto geral da alga <i>Caulerpa racemosa</i> (Forsskal) J. Agardh.....	23
Figura 4:	Foto da praia do Pontal em Maracaípe no litoral sul Pernambucano. <i>Caulerpa</i> (setas em vermelho). Detalhe a cima de <i>Caulerpa racemosa</i> (Fonte: Arquivo pessoal).....	24
Figura 5:	Placa de Petri com extratos em disco (Fonte: Arquivo pessoal).....	27
Figura 6:	Sistema de Cromatografia Flash – Equipamento Isolera one.....	33
Figura 7:	Estrutura da caulerpina: AGUILLAR SANTOS (1970) (A), e GUVEN, et al (2010) (B).....	34
Figura 8:	Estrutura da caulersina (SU et al., 1997).....	35
Figura 9:	Estrutura química da caulerpenina (A) e da furocaulerpenina (B) (NAPOLI et al.,1981).....	36
Figura 10:	Estrutura básica do Caulerpal.....	36
Figura 11:	Estrutura da caulerpicina por Nielsen et al., (1982).....	37
Figura 12:	Estrutura química do clionasterol (F. M: C ₂₉ H ₅₀ O).....	37

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1:	TLC of the <i>C. racemosa</i> in the λ ultraviolet light (365 nm) and (254 nm).....	55
Figure 2:	TLC dos compostos F.2.a, F.2.b, F.2.c e F.2.d.	59

LISTA DE TABELAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1:	Características microscópicas e manifestações clínicas de micro-organismos de importância clínica.....	29
Tabela 2:	Atividade antibacteriana do extrato bruto em diferentes solventes (halo de inibição em mm) da alga <i>Caulerpa racemosa</i>	32

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1:	yield <i>Caulerpa racemosa</i>	54
Table 2:	Phytochemical constituents of ethanol extracts of <i>Caulerpa racemosa</i>	55
Table 3:	DPPH free radicals activity in marine algae <i>Caulerpa racemosa</i>	56
Table 4:	Antimicrobial activity of the crude extracts of <i>Caulerpa racemosa</i>	56
Table 5:	Test of antimicrobial-resistant Enterococcus.....	57
Table 6:	Antimicrobial test with fractions of <i>Caulerpa</i>	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLP	Caulerpina
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
HPLC	High-Performance Liquid chromatography
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IV	Infravermelho
UV/VIS	Ultravioleta - Visível
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	OBJETIVOS.....	19
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1	Conceitos Gerais das Algas.....	20
3.1.1	Algas arribadas.....	21
3.2	Algas verdes (Clorophyta) ordem Bryopsidales (gênero <i>Caulerpa</i>).....	21
3.2.1	Alga <i>Caulerpa racemosa</i> (Forsskal) J. Agardh.....	23
3.3	Cultivo de <i>Caulerpa racemosa</i> com vista à sustentabilidade.....	24
3.4	Metabólitos secundários.....	25
3.4.1	Atividade antioxidante.....	25
3.4.2	Atividade antimicrobiana.....	26
3.5	Cromatografia na separação dos compostos.....	33
3.6	Compostos isolados da <i>Caulerpa racemosa</i>	34
4.	REFERÊNCIAS.....	39
5.	Artigo em preparação para ser submetido à revista Journal of Applied Phycology	51
6.	CONCLUSÕES.....	65
7.	PERSPECTIVAS.....	66
8.	ANEXOS.....	67

1 INTRODUÇÃO

As algas são um grupo de organismos com ampla diversidade de formas, fotossintéticos, polifilético, e apresentam grande importância no ecossistema. É confirmada a presença de mais de 3000 espécies endêmicas no Brasil, e o grupo de algas verdes estão presentes em diversos habitats e representam grande diversidade de tipos morfológicos (BICUDO & MENEZES, 2010). A ocorrência delas é grande nos mares tropicais e subtropicais como os da costa brasileira, ainda assim precisam ser exploradas. Devido à abundância de algas no ecossistema, estas cada vez mais, tornam-se uma importante fonte de novos compostos bioativos para a indústria farmacêutica (PINTEUS, 2011).

A biodiversidade marinha forneceu, somente no ano de 2010, mais de 1000 novos compostos com atividades biológicas a partir de micro-organismos, fitoplânctons, algas verdes, marrons, vermelhas, cnidários, esponjas entre outras espécies (BLUNT, *et al.* 2012).

A alga verde *Caulerpa racemosa* bastante conhecida na região litorânea do Brasil devido ao seu formato peculiar, que é similar a um cacho de uvas. Tem chamado atenção de diversos pesquisadores devido ao seu potencial biológico como: antitumoral e antiviral entre outros. Várias substâncias já foram isoladas de *C. racemosa*: entre elas, alguns alcaloides, terpenos e esteróis, que apresentaram atividade biológica antibacteriana e antioxidante (AGUILLAR-SANTOS, 1970; GUVEN *et al.*, 2010; GORBI *et al.*, 2014).

Segundo Harvey (2000) apenas 10% das mais de 25.000 plantas tem sido investigadas em relação às suas atividades biológicas. Além disso, o ambiente marinho pode conter cerca de 80% das espécies do planeta, entre elas: plantas, animais e outros organismos que podem ser considerados como potencial fonte de novos produtos biologicamente ativos. Embora existam algumas destas propriedades já descritas na literatura científica, relacionando o gênero *Caulerpa*, ressalta-se que a nossa bioflora ainda requer muito estudos adicionais (SRIVASTAVA *et al.*, 2010).

Relatos descrevem que, cada vez mais, os antibióticos sintéticos apresentam alta toxicidade e muitas vezes não conseguem debelar a carga microbiana nas infecções, devido à resistência adquirida pelos diversos agentes patológicos hospitalares, por causa disso torna-se necessária a busca de novas drogas naturais, mais eficazes e menos tóxicas (TEIXEIRA & KELECOM, 1990). Estudos apontam que os extratos brutos de uma mesma espécie coletada em regiões diferentes, apresentam ação antimicrobiana variável (ZBAKH *et al.*, 2012). Por isso o presente trabalho justifica-se na importância de fornecer dados sobre os

metabólitos secundários da alga verde *Caulerpa racemosa* do litoral Pernambucano que possam apresentar atividade antimicrobiana, assim como sua caracterização fícoquímica, além de ampliar o conhecimento sobre essas algas no Estado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar a avaliação química e microbiológica de *Caulerpa racemosa* bentônica e arribada.

2.2 Objetivos específicos

- (a) Analisar a atividade ficoquímica e antioxidante nas algas bentônicas e arribadas;
- (b) Avaliar ação antimicrobiana das algas frente micro-organismos de importância clínica;
- (c) Caracterizar as estruturas com atividade antibacteriana dos produtos isolados a partir de análises espectroscópicas convencionais (UV/VIS, IV e RMN ^1H).

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Conceitos gerais das Algas

O termo algas se relacionado a organismos que fazem parte de grupos polifiléticos e não apresentam uma categoria taxonômica definida, mas são predominantemente aquáticas. À princípio todo organismo que viesse a ter essa denominação era agrupado numa categoria chamada criptógamas. O avanço da bioquímica, o aumento do conhecimento acerca das estruturas fisiológicas e da biologia molecular comprovou que esses seres pertencem a várias linhagens evolutivas e hoje são classificados em diferentes filos, reinos ou domínios (LEWIS & MCCOURT, 2004; KANAGAWA & NEVES, 2011). Uma das classificações que é bastante usada sobre esses organismos é em relação a sua pigmentação, são conhecidas como algas vermelhas (filo Rhodophyta), verdes (filo Chlorophyta) e marrons (filo Phaeophyta) (KANAGAWA & NEVES, 2011) (**Figura 1**).

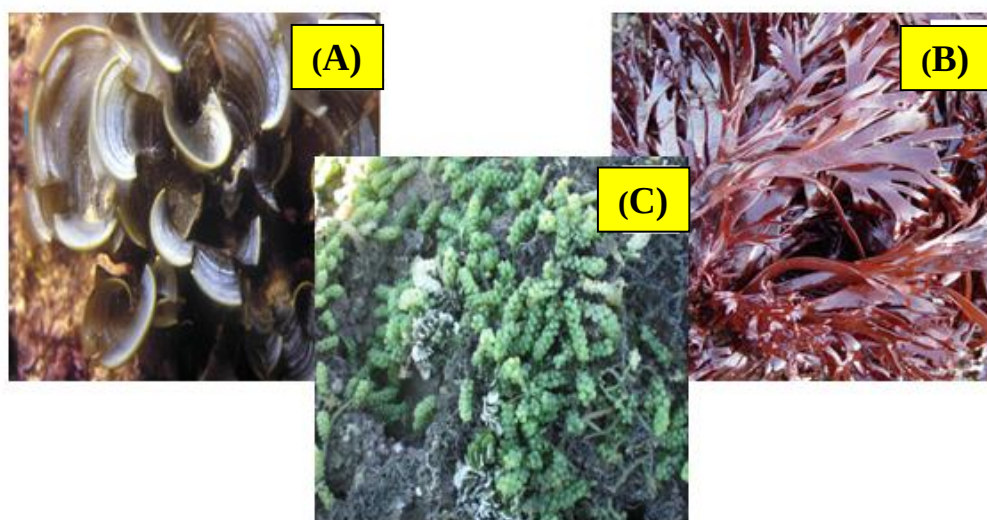


Figura 1: Representantes das algas. Alga marrom: *Padina gymnospora* (A); alga vermelha: *Gracilaria multipartita* (Clemente) Harvey (B); alga verde: *Caulerpa racemosa* (C)

Os fatores ambientais (químicos, físicos e biológicos) são aqueles que interferem no crescimento e no ciclo reprodutivo das algas. Elas podem se reproduzir tanto sexualmente, por meio da união de genes gerando novas combinações em seu material genético, formando indivíduos diferentes dos talos parentais; ou assexuadamente a partir de esporos ou fragmentação, isso se manifesta quando elas têm a capacidade de desenvolver indivíduos geneticamente iguais aos talos parentais (AGRAWAL, 2012).

Elas são responsáveis pela maior parte do oxigênio produzido nos oceanos, e assim como as plantas elas participam do processo de fotossíntese. Entre as macroalgas o filo Chlorophyta é um dos mais abundantes e diversificados, são classificadas no sub-reino *Viridiplantae* das plantas verde (LELIAERT *et al.*, 2012).

Além dos oceanos e mares, elas habitam em águas doces, solos, e ainda podem viver associadas em superfícies rochosas, ou com outros seres vivos. Quando elas são arrancadas de seus substratos e acabam depositadas na praia são chamadas de arribadas (SANTOS *et al.*, 2013).

3.1.1 Algas arribadas

Existe uma grande quantidade de macroalgas arribadas nas praias costeiras, que são costumeiramente usadas como adubo por causa do seu teor de proteínas, vitaminas e sais minerais, visando o enriquecimento do solo. No litoral catarinense plantas que foram tratadas com farinha de algas obtiveram pesos secos mais altos (SACRAMENTO *et al.*, 2013). Por causa da sua fonte nutricional essas macroalgas servem para alimentação de aves e peixes, contudo devido a sua aglomeração, exalam um “mal cheiro” causado pela deterioração da matéria orgânica, tornando certos pontos da praia inviáveis aos transeuntes (CALADO, 2003; CONSTANCIO, 2014).

Estudos indicaram que as algas marrons arribadas conseguem absorver metais pesado como o chumbo, por isso temos que levar em consideração o seu potencial para moléculas com bioatividade (CALADO, 2003). Elas também são usadas na agricultura como fertilizantes, e seus metabólitos ativos ajudam a planta a resistir as infecções frente a seus patógenos (LIMBERGER & GHELLER, 2013). Na praia de Flecheiras no estado do Ceará foram coletadas algas arribadas do gênero *Hypnea*, que também apresentaram atividade anticoagulante (RODRIGUES *et al.*, 2010).

3.2 Algas verdes (Clorophyta) da ordem Bryopsidales (gênero *Caulerpa*)

Mesmo encontrando na costa brasileira um aglomerado de alga arribada, as macroalgas em sua maioria são bentônicas, ou seja, elas crescem fixas ao substrato e apresentam diversos tipos morfológicos de talos: unicelulares, multicelulares filamentosos ou parenquimatosos (KANAGAWA & NEVES, 2011).

Entre as algas bentônicas a *Caulerpa* é um dos gêneros de algas marinhas mais distintas entre as da família Caulerpaceae, identificável não somente a partir da sua forma de crescimento como também na sua morfologia interna (BRAYNER, 2008) (**Figura 2**).

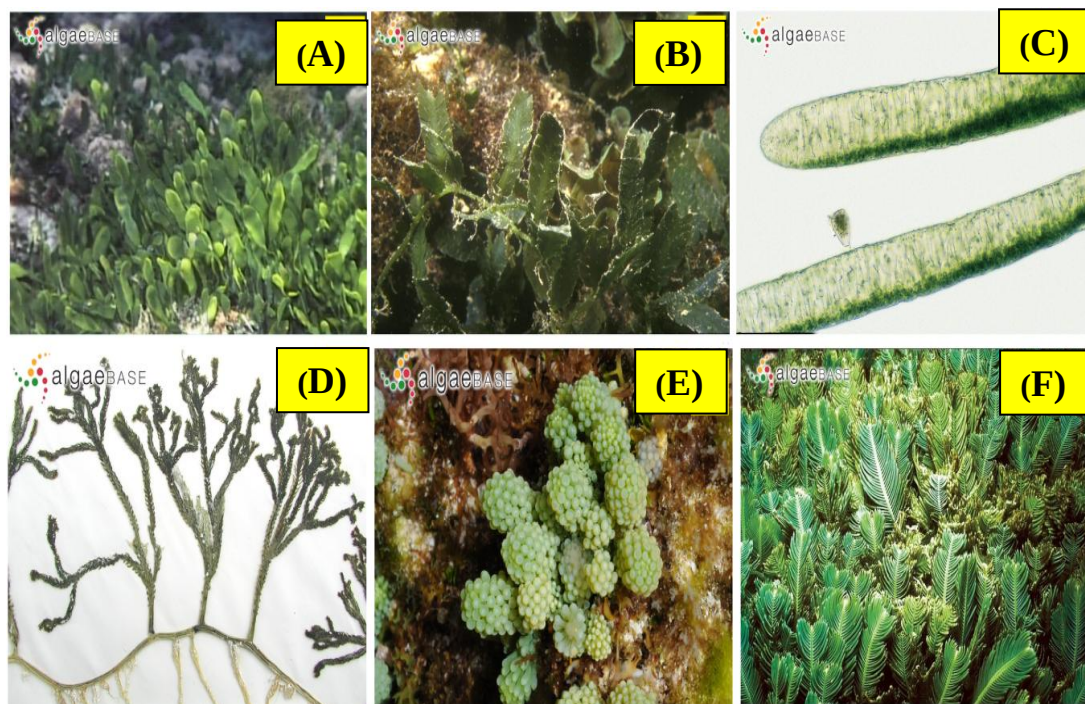


Figura 2: Exemplos de *Caulerpa*: (A) *Caulerpa prolifera* (Forsskal) J. V. Lamouroux; (B) *Caulerpa mexicana* Sonder ex Kützing; (C) *Caulerpa fastigiata* Montagne; (D) *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh; (E) *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh; (F) *Caulerpa sertularioides* (S. G. Gmelin) M. A. Howe. **Fonte:** algaebase.org

Existem muitas espécies desse gênero, contudo a espécie *C. racemosa* e a *C. lentilífera* são as mais consumidas na alimentação asiática. Conhecidas como “caviar verde” ou “uvas do mar”, são constituídas de uma textura succulenta e macia e apresentam um gosto picante, onde geralmente são consumidas na forma de vegetais frescos em saladas (PEREIRA, 2011).

Mesmo existindo algumas espécies consumidas, a *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* tornou-se conhecida pela liberação de substâncias tóxicas na fauna e flora (BEKÇI *et al.*, 2009).

Da mesma forma, como foi encontrado que algas marrons, conseguem remover materiais pesados em águas residuais, foi observado que a espécie *Caulerpa lentilífera* possui certos grupos funcionais envolvidos na absorção de certos oligoelementos como Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} e Zn^{2+} (PAVASANT, *et al.*, 2006).

Na sua constituição pesquisadores verificaram que o teor de lipídios da alga *Caulerpa racemosa* e *Caulerpa prolifera* está intimamente relacionado com a temperatura e o local

onde eles se localizam (BLAZINA *et al.*, 2009; TERRADOS & JIMENEZ, 1996), e que a concentração de certos esteróis, como o α -tocopherol varia durante todo o ano (PIRES-CAVALCANTE *et al.*, 2011).

As espécies e subespécies deste gênero podem viver em ambientes marinhos e em lagoas salobras. Segundo a biblioteca virtual ALGAEBASE (2014) foram catalogados para este gênero 368 algas que variam entre espécies e formas. Brayner e colaboradores (2008) claramente representaram em sua pesquisa que no litoral de Pernambuco e no arquipélago de Fernando de Noronha foram encontradas 12 espécies distribuídas entre praias do litoral Norte e do litoral Sul, são elas: *C. fastigiata*, *C. prolífera*, *C. serrulata*, *C. lanuginosa*, *C. webbiana*, *C. cupressoides*, *C. microphysa*, *C. Mexicana*, *C. sertularioides*, *C. Kempfii*, *C. pusilla* e *C. verticillata*.

3.2.1 Alga *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh.

A alga verde *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh. apresenta talos verdes claros de consistência firme sobre regiões rizomatosas ou estoloníferas que partem em direção oposta ao substrato, e ramos eretos sobre filamentos rizoidais. Seu estolão apresenta formato cilíndrico, ramificado e bem desenvolvido com 1,35 a 5,25 mm de diâmetro apresentando tufos rizoidais com 0,3 a 2,1 mm de diâmetro. Seus ramos variam de 1 a 7 cm de altura e 6 a 16 mm de largura. A nível celular o seu talo é conhecido como cenocítico, pois a partir de uma célula inicial e uninucleada ele cresce através de sucessivas divisões do nucleares (BRAYNER *et al.*, 2008; BARATA, 2008) (**Figura 3**).

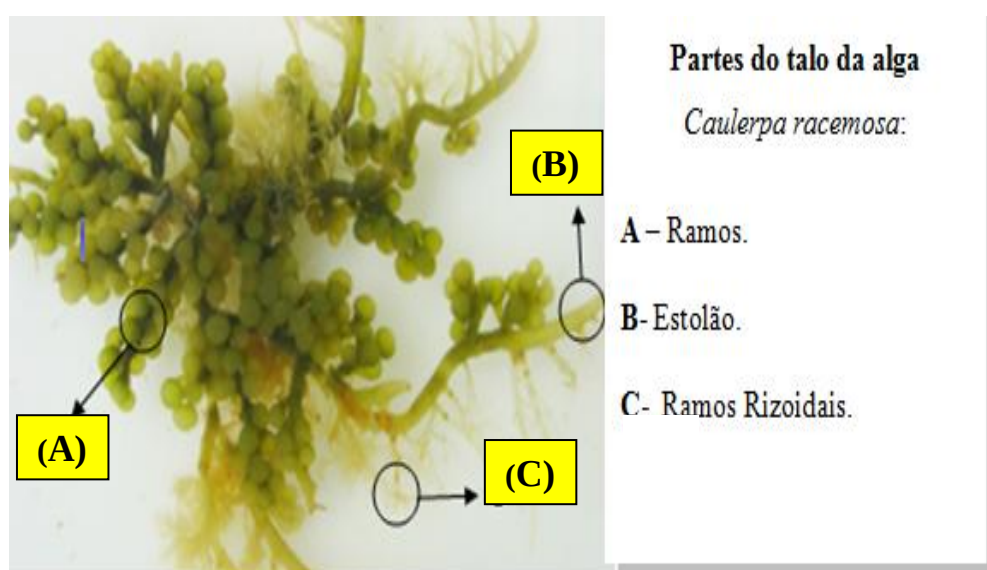


Figura 3: Aspecto geral da alga *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh.

Esse tipo de espécie já foi descrito em algumas regiões litorâneas brasileiras: Praia de Conceição, Paulista, ilha de Santo Aleixo, praia de Tamandaré, de Porto de Galinhas em Ipojuca (BRAYNER *et al.*, 2008) e na praia do Pontal em Maracáipe (**Figura 4**).



Figura 4: Foto da praia do Pontal em Maracáipe no litoral sul Pernambucano. *Caulerpa* (setas em vermelho). Detalhe a cima de *Caulerpa racemosa* (Fonte: Arquivo pessoal).

3.3 Cultivo de *Caulerpa racemosa* com vista à sustentabilidade

As macroalgas marinhas vêm sendo utilizadas há milênios pelos povos orientais e têm grande importância na parte social e econômica de vários países asiáticos. Com o advento da segunda guerra mundial o cultivo de algas começou a ocorrer em várias partes do mundo sendo a China, Japão e Coréia grandes cultivadores e consumidores (ROCHA, 2001).

O cultivo de macroalgas verdes como a *Caulerpa racemosa* começou em 1950, nas Filipinas quando um pescador percebeu que a alga crescia em seus viveiros. Essa prática hoje tornou-se um empreendimento rentável (HORSTMAN, 1983). Portanto hoje é muito comum em cultivos conhecer as condições da região, e consequentemente estabelecer uma metodologia para não ocorrer prejuízos e danos ambientais nos bancos naturais, como também degradar os substratos de fixação das mesmas (HORSTMAN, 1983).

Devido às condições propícias ao cultivo e uma variedade de espécies de *Caulerpa racemosa* encontradas no Estado de Pernambuco, torna-se importante o cultivo dessa alga para a pesquisa de metabólitos secundários.

3.4 Metabólitos secundários

Tendo em vista o processo adaptativo, e a capacidade de habitar em diversos ambientes, as algas produziram uma variedade de substâncias: ácidos graxos, esteroides, carotenoides, polissacarídeos, entre outras. E isso tem chamado a atenção da indústria farmacêutica, pois elas tem grande potencial antinociceptivo, antiinflamatório, antioxidante e antimicrobiano (CARDOZO *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2014).

Para produzir todas essas substâncias os seres vivos são dotados de ações ao nível celular, formando os metabólitos secundários. Diferentemente das grandes moléculas como: DNA, proteínas e lipídios sem as quais as funções celulares não seriam possíveis, os metabólitos secundários não estão envolvidos diretamente nos processos de desenvolvimento e manutenção das condições vitais, mesmo assim apresentam uma elevada diversidade estrutural, e são comumente usado tanto nas algas como nas plantas para sua proteção contra predadores (SUDATTI, 2010).

3.4.1 Atividade antioxidante

O termo antioxidante é usado sempre quando se refere a qualquer tipo de molécula capaz de estabilizar ou desativar radicais livres que ataquem as células. Nas algas esses radicais tem fundamental importância no seu desenvolvimento, contudo a ativação descontrolada dessas espécies reativas de oxigênio pode gerar sérios efeitos danosos às células (RAHMAN, 2012; PIOTROWSKA-NICZYPORUK & BAJGUZ, 2014).

O ataque ocasionado pelas espécies reativas de oxigênio à membrana celular pode causar peroxidação lipídica, que se trata da degradação oxidativa pelos lipídios e isso gera falhas na permeabilidade, provocando a morte celular. Uma tentativa de inibir essa reação de peroxidação é com a formação de compostos antioxidantes (LIMA *et al.*, 2001).

O método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) é uma técnica muito utilizada para avaliar a atividade antioxidante. Essa substância tem normalmente uma coloração púrpura, mas ao entrar em contato com uma espécie reativa de oxigênio, este é reduzido formando

uma substância de coloração amarelada. Esse monitoramento se dá através das leituras realizadas em espectrofotômetro UV- VIS (BRAND-WILLIAMS & BERSET, 1995).

A pesquisa de substâncias antioxidantes marinhas surgiu na década de 80 no Japão quando a indústria alimentícia procurava substituir certos antioxidantes sintéticos que apresentaram efeitos cancerígenos e outras alterações enzimáticas nos estudos conduzidos em animais (ROCHA *et al.* , 2006; FUJIMOTO & KANEDA, 1984). Kaneda & Ando em 1971 foram os pioneiros nessa área, eles descobriram lipídios em uma alga vermelha *Porphyra tenera* que tinha ação antioxidante e, após esse achado, vários trabalhos trocaram a pesquisa no ambiente terrestre pelo marinho, pela busca desses novos produtos naturais (FUJIMOTO & KANEDA, 1984).

Foram realizados testes antioxidantes na Malásia e percebeu-se que a macroalga marrom *Turbinaria conoides* apresentou um elevado IC₅₀ quando comparado com as vermelhas e as algas verdes *Caulerpa* estudadas (SARINI *et al.* , 2014). Esse resultado está de acordo com outros observados na literatura, pois existem metabólitos chamados florotaninos que são encontrados no grupo Phaeophyta apresentando ampla atividade biológica (WANG *et al.*, 2012).

Análises espectroscópicas indicaram que compostos fenólicos presentes na alga *C. racemosa* coletada na China são os responsáveis por uma alta atividade antioxidante (LI *et al.*, 2012). Análises químicas ainda indicaram que o polissacarídeo oriundo de *C. racemosa* mostrou ser mais eficiente que seus compostos fenólicos (MAHENDRAN & SARAVANAN, 2013).

Uma análise da literatura mostrou que os resultados dos testes antioxidantes variam para algas do mesmo gênero, comprovando que o local coletado, o meio de extração, assim como o tipo de metabólito influenciam sobre a ação antioxidante (YANGTONG *et al.*, 2009; (MAHENDRAN & SARAVANAN, 2013; LI *et al.*, 2012).

3.4.2 Atividade antimicrobiana

As doenças infecciosas estão entre as principais causas de óbitos, e as cepas multirresistentes tem se tornado um desafio para médicos e pesquisadores no mundo inteiro. Na microbiota humana elas geralmente não trazem risco a indivíduos saudáveis, contudo afetam indivíduos com sistema imune comprometido, sendo um risco a pacientes hospitalizados. (SOUZA, 2013; ARIAS *et al.*, 2010). O fato de existir bactérias resistentes pode ser considerado como uma manifestação regida pelo princípio evolutivo da mesma e também

pelo uso indiscriminado de antibióticos, selecionando assim as cepas resistentes. Portanto tem-se a necessidade do desenvolvimento de novos e eficazes compostos antimicrobianos para a aplicação clínica (CAUMO *et al.*, 2010).

Entre essas substâncias os produtos naturais por serem mais acessíveis a população do que os medicamentos sintéticos, são bastante utilizados. Comparados aos produtos sintetizados quimicamente evidenciamos: redução ou ausência dos efeitos colaterais, melhor tolerância do paciente ao medicamento, além de serem mais econômicos em relação a outras drogas e também melhor aceitação da sociedade devido a longa história de uso (LOURES, *et al.*, 2010). O ambiente terrestre foi o foco da indústria farmacêutica e o habitat marinho permaneceu praticamente inexplorado no que se refere a capacidade de produzir metabólitos farmacologicamente ativos, por isso nas ultimas décadas a pesquisa se expandiu da terra para o mar, onde foram conduzidas buscas por agentes químicos que apresentassem atividade antibiótica frente a diversas classes de agentes infecciosos (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Conhecendo isso, diversos autores utilizam-se do método descrito por Bauer *et al.*, (1966) para testar a atividade antimicrobiana em diversos extratos.

Esse método também é conhecido como teste de difusão em disco, e é bem difundido na clínica. Esta técnica de baixo custo determina a resistência ou sensibilidade dos micro-organismos. Baseia-se em sorver pequenos discos de papel com uma concentração conhecida do extrato analisado, havendo propriedades antibióticas no extrato, ele se difunde ao redor do disco, formando um halo transparente decorrente da lise bacteriana (Bauer *et al.*, 1966; CLSI, 2003) (**Figura 5**).

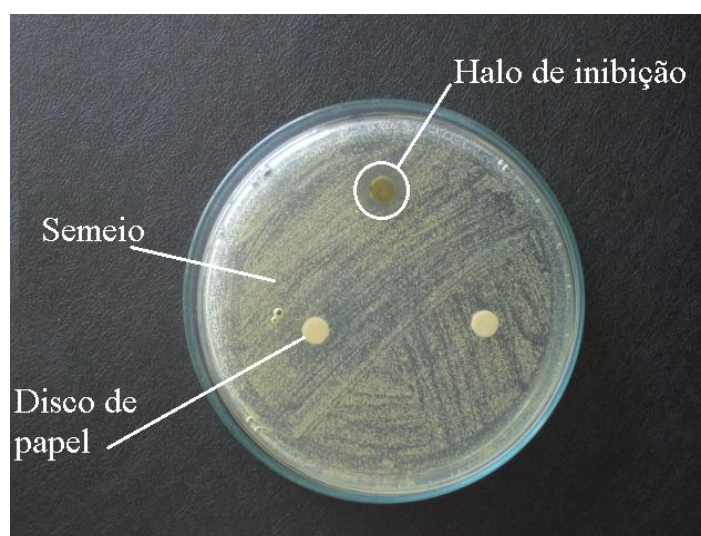


Figura 5: Placa de Petri com extratos em disco (Fonte: Arquivo pessoal).

Os agentes infecciosos mais conhecidos na clínica são: *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcerans*, *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa*. Diante desse contexto é importante conhecer as características desses agentes causadores de infecção e suas manifestações clínicas (**Tabela 1**).

Tabela 1: Características microscópicas e manifestações clínicas de micro-organismos de importância clínica.

Microorganismos	Características	Manifestação clínica
<i>Staphylococcus aureus</i>	Apresentam colônias imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados são cocos gram-positivos. As colônias após 24h de incubação apresentam-se arredondadas, lisas e brilhantes (SANTOS <i>et al.</i> , 2007).	Pielonefrite, cistite, artrite séptica, impetigo, infecções paroníquias, foliculite, carbúnculos, intoxicação, gastroenterocolite, e, infecções abdominais entre outras (SANTOS, <i>et al.</i> , 2007).
<i>Micrococcus luteus</i>	Apresentam pigmentação de suas colônias (amarelas, róseas ou alaranjadas) sendo Cocos gram-positivos, formato de tétrades, catalase positiva e oxidase negativa (VIEIRA, 2007).	Em pacientes com HIV estas bactérias produzem infecções cutâneas. Também provocam artrite séptica, meningite e endocardite (MILTIDIADOUS & ELISAF, 2011).
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilo Gram-positivo formado de endósporos, bastonetes com extremidades retas, móveis, catalase positiva, produz colônias irregulares (contorno ondulado ou filamentoso) (ANVISA, 2013).	Intoxicação, sepse e pneumonia em imunossuprimidos e neutropênicos (BRIDIER <i>et al.</i> , 2012).
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Bactéria álcool-ácido resistente, arilsulfatase negativo, e positividade em Macconckey sem cristal violeta (ETIENNE <i>et al.</i> , 2005).	Infecções cutâneas em feridas pós-operatórias, celulite, endocardite, meningites (PITOMBO <i>et al.</i> , 2009).
<i>Enterococcus faecalis</i>	São cocos gram-positivos e podem ser visualizados como células individuais, em pares ou em cadeias, apresentando comumente morfologia ovoide. Suas	Infecções urinárias, feridas cirúrgicas, cistite entre outras (GOLD, 2001).

	colônias são catalase negativas, crescem em meios contendo 6,5% de NaCl e hidrolisam a esculina (PARADELLA, <i>et al.</i> , 2007).	
<i>Escherichia coli</i>	Bactérias bacilares Gram-negativas, anaeróbios facultativos, crescem em meios simples e fermentam lactose (PITOUT & CHURCH, 2004).	Diarreia, infecções urinárias, pneumonia e outras doenças respiratórias (ANVISA, 2013).
<i>Serratia marcerans</i>	Bactéria Gram-negativa, anaeróbio facultativo, oxidase negativa pertencente a família Enterobacteriaceae que cresce abundantemente em agar chocolate e agar sangue. Suas colônias produzem um pigmento vermelho chamado prodigiosina (PATINO, <i>et al</i> 2005).	Infecções pancreáticas, pneumonia e septicemia, em pacientes com câncer reticuloendotelial que recebem quimioterapia. Esse microrganismo também provoca infecções do trato urinário e ferimentos (KONEMAN <i>et al.</i> , 2001) .
<i>Candida albicans</i>	Formando pontas como estrela, de consistência butirosa (manteiga), densidade opaca, hifas, pseudohifas hialinas ou ramificadas com presença de clamidosporos (ANVISA, 2004).	Uretrite, cistite e pielonefrite, osteomielite, lesões eritematosas superficiais (paroníquia, micoses), infecções pancreáticas, meningite aguda, candidíase vulvovaginal, sinusite (RIBEIRO <i>et al.</i> , 2004)..
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	É uma bactéria de aspecto baciliforme, gram-negativo, aeróbio. Suas colônias apresentam aspectos variados. A pioverdina e a picianina são pigmentos fluorescentes produzidos por este micro-organismo (FERREIRA, 2005).	Trato urinário, peritonites, bacteremias e infecções de cirurgias (FERREIRA & LALA, 2010).

Entre todos esses gêneros infecciosos, existe um que tem chamado atenção o *Enterococos*, tem sido uma grande ameaça em hospitais devido a sua resistência intrínseca a vários antimicrobianos. É uma bactéria com alta capacidade de adaptação e sobrevivência em diversos ambientes, ocasionados por internações duradouras, estado de gravidade da doença, cirurgias, e o uso contínuo de antibióticos de largo espectro (RICE, 2001).

As opções de tratamento para os *Enterococcus* resistentes são limitadas e por isso deve-se escolher bem os antibióticos segundo seu perfil de sensibilidade (RICE, 2001; GOLD, 2001). Estudos já mostraram um efeito probiótico de um produto natural extraído da alga verde *Caulerpa mexicana* em cepas de *Enterococcus faecium*.

Quando foi analisada a atividade antibacteriana de algas coletadas do mar vermelho isolado da Costa de Quedar na Arábia saudita, eles verificaram que o extrato de *Caulerpa occidentalis* apresentou atividade frente ao micro-organismo *Enterococcus*, enquanto que no Brasil, os pesquisadores Lima-filho e colaboradores (2002) estudando as algas *Caulerpa cupressoide* e *Caulerpa prolifera*, ao Norte do Ceará, não verificaram qualquer atividade antibacteriana para Gram-negativos. No Sudeste da Índia, Kandhasamy e Arunachalam (2008) verificaram que a alga da espécie *Caulerpa racemosa* apresentou atividade para *Pseudomonas aeruginosa*, embora não se tenha verificado qualquer formação de halo para *E. coli*. Já na costa do Marrocos, algas da espécie *Caulerpa prolifera*, encontrada em localidade próxima ao mar do Mediterrâneo, foi verificada atividade para esse patógeno (ZBAKH *et al.*, 2012) (**Tabela 2**).

Esses estudos mostram que assim como a ação antioxidante também são encontradas diferenças sobre a atividade antibacteriana em relação aos diferentes solventes orgânicos usados para a obtenção dos extratos, e que da mesma forma, a mudança do local de uma coleta, interfere nos resultados do teste (FREILE PELEGRIN & MORALES, 2004; RADHIKA *et al.*, 2012; BALLANTINE, 1987) (**Tabela 2**).

Tabela 2: Atividade antibacteriana do extrato bruto em diferentes solventes (halo de inibição em mm) da alga *Caulerpa racemosa*.

Referencia	Local	Micro-organismos testados (halo de inibição em mm)								
		<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. marcerans</i>	<i>C. albicans</i>
Ballantine, (1987)	Porto Rico	1 ^(A)	X	1.0 ^(A)	X	X	X	-	X	-
Freile Pelegrin & Morales (2004)	Yucatan	X	- ^(B)	7.3± 0.6 ^(B)	X	X	- ^(B)	X	X	X
Freile Pelegrin & Morales (2004)	Yucatan	X	- ^(A)	7 ^(A)	X	X	- ^(A)	X	X	X
Kandhasamy & Arunachalam (2008)	Distrito de tâmil na Índia	16 ^(C)	14 ^(C)	15 ^(C)	14 ^(C)	X	15 ^(C)	X	X	X
Srivastava (2010)	Costa da Índia	12 ^(c)	X	- ^(c)	- ^(c)	X	X	- ^(c)	X	X
Srivastava (2010)	Costa da Índia	- ^(f)		18 ^(f)		X	X	- ^(f)	X	X
Srivastava (2010)	Costa da Índia	5 ^(E)	X	- ^(E)	- ^(E)	X	X	12 ^(E)	X	X
Srivastava (2010)	Costa da Índia	5 ^(D)	X/	- ^(D)	- ^(D)	X	X	12 ^(D)	X	X
Mtolera & Semesi (1996)	Tanzania	2.5 ^(G)	X	2.5 ^(G)	X	X	X	11 ^(G)	X	-
Radhika et al (2012)	Golfo do Mannar Sul da Índia	X	X	X	X	X	X	1 ^(c)	X	X

Legenda: (A): extração em clorofórmio metanol; (B): etanol; (C): Metanol; (D) Butanol; (E): Clorofórmio; (F) Diclorometano; (G) Éter dietílico
 - Não houve formação de halo; X não testado.

3.5 Cromatografia na separação dos compostos

Quando reconhecemos que determinado extrato tem ação biológica, existe uma preocupação em relação ao isolamento dessas substâncias naturais de plantas, algas ou outro organismo. A cromatografia é um processo muito utilizado na separação desses compostos orgânicos (DEGANI, *et al.*, 1998).

Entre muitos procedimentos para separação dos compostos bioativos, a cromatografia em camada delgada é empregada como uma técnica inicial e primordial para determinarmos o melhor tipo de solvente extrator dos metabólitos secundários (SPANGENBERG *et al.*, 2011, STRIEGEL & HILL, 1996).

Na cromatografia em coluna tradicional o usuário preenche as colunas de vidro e utiliza a pressão ambiente como método de separação de compostos. Um fator importante é que nesse tipo de análise, a separação dos componentes da amostra é muito lenta. A cromatografia flash automatizada, foi aperfeiçoada ao longo dos últimos anos, e atualmente, as colunas são cartuchos de plástico contendo a fase estacionária já compactada, e além disso, os solventes orgânicos utilizados são bombeados, utilizando-se gradientes de polaridade pré-definidos, tornando a operação mais eficiente e segura. Estes equipamentos possuem detectores UV ou sensores de massas, que permitem a melhor separação dos metabólitos secundários, atuando de forma comparativa à Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE) (Roge *et al.*, 2011) (**Figura 6**).



Figura 6: Sistema de Cromatografia Flash – Equipamento Isolera one.

Nas algas esse procedimento cromatográfico já foi utilizado para isolamento de microcistinas, enzimas, pigmentos entre outras substâncias (STOCKER, *et al.*, 1996; EDWARDS, *et al.*, 1996; BAUDELET *et al.*, 2013).

3.6 Compostos isolados da *Caulerpa racemosa*

Diante da diversidade estrutural encontrada no ambiente marinho é necessário conhecermos as principais estruturas encontradas em algas, tendo como foco o gênero *Caulerpa*.

Os alcalóides são compostos que possuem um átomo de nitrogênio em um anel cíclico. Esse termo “alcaloides” foi proposto para identificar somente substâncias encontradas em plantas, cuja morfina foi a primeira encontrada no século 18. Meio século após continuava-se a busca por esses tipos de compostos, foi quando descobriram a hordenina, o primeiro alcaloide isolado da uma alga vermelha *Phyllophora crispa* em 1969 (GUVEN, *et al.*, 2010).

Um ano após essa descoberta foi publicado a primeira substância alcaloide isolada da alga verde *Caulerpa racemosa* “a caulerpina (CLP)”.

A CLP ($C_{24}H_{18}N_2O_4$) é um alcaloide bisindólico não tóxico que também foi isolado de outras espécies de *Caulerpa*: *C. Ashmeadii*, *C. paspaloides*, *C. languinosa*, *C. Mexicana*, *C. peltata*, *C. prolifera* (SCHWEDE, *et al.*, 1987). Foi a partir de uma extração etílica que foi observado esse composto, com a forma de pequenos cristais vermelhos (AGUILLAR-SANTOS, 1970).

Na época os testes espectroscópicos indicaram a presença de grupos aromáticos conjugados, e ainda de grupos metoxila (AGUILLAR-SANTOS, 1970), contudo anos mais tarde esta estrutura foi reformulada e dois análogos foram propostos (**Figura 7**).

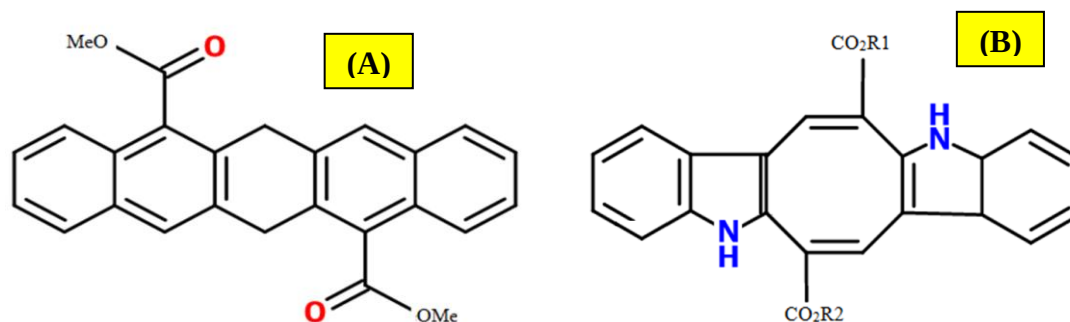


Figura 7: Estrutura da caulerpina: AGUILLAR SANTOS (1970) (A), e GUVEN, *et al* (2010) (B).

A CLP é descrita na IUPAC como dimetil-6,13-diidro dibenzo[b,i]phenazine-5,12-dicarboxilatoe metil ester, é caracterizada por dois grupos indólicos ligados por um anel cíclico contendo oito carbonos com dois grupos carboxi (GUVEN *et al.*, 2010). Desde a sua descoberta, muitos experimentos foram realizados para detectar a sua potencial atividade biológica. Constatou-se que peixes que tinham uma dieta rica nestas algas, certas substâncias do seu metabolismo foram alteradas, sugerindo que à nível celular estas algas poderiam modular a biotransformação de certas enzimas (GORBI *et al.*, 2014).

Foi verificada a sua ação antitumoral, pois a caulerpina conseguiu inibir a hipóxia induzida em células, promovendo a capacidade de angiogênese *in vitro* (LIU *et al.*, 2009). Comprovada sua ação antiviral, pois a CLP conseguiu inibir as fases e replicação do vírus HSV-1 mostrando que esta pode ser uma alternativa para drogas sintéticas como o aciclovir (MACEDO *et al.*, 2012).

Em 1997, à partir das análises da *Caulerpa serrulata* (Forsskal) J. Agardh (*Caulerpaceae*) das ilhas do mar de Xisha foi isolado outro composto alcaloide estruturalmente muito similar ao composto da caulerpina, “a caulersina” embora não se tenha constatado qualquer tipo de atividade biológica (**Figura 8**) (SU *et al.*, 1997).

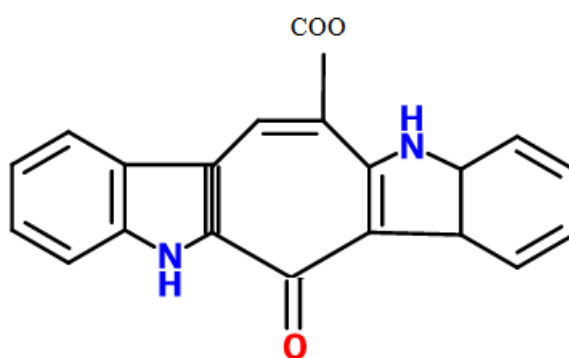


Figura 8: Estrutura da caulersina (SU *et al.*, 1997).

Os organismos marinhos também são fonte consideráveis de terpenos. Estruturalmente esta classe de compostos orgânicos é formada por unidades de isoprenos insaturadas ligadas, e o número de unidades de carbono se vem de classificação para estes compostos: moterpenos (10 Carbonos), sesquiterpenos (15 Carbonos), diterpenos (20 Carbonos) (ABAD & BERMEJO, 2011).

A investigação de algas marinhas já resultou no isolamento de diversos compostos terpenóides, a alga tropical *Caulerpa taxifolia* é um desses exemplos. Ela ficou conhecida pelos seus danos ao ecossistema, devido a liberação de um sesquiterpeno tóxico chamado

caulerpenina (fórmula molecular: $C_{21}H_{26}O_6$) (MOZZACHIODI *et al.*, 2001). A caulerpenina (1,4-diacetoxibuta-1,3-dieno; segundo a IUPAC) é um composto acíclico e em sua estrutura encontramos 3 grupos acetoxi (AMICO *et al.*, 1978). Semelhantemente foi encontrado em *C. prolifera*, outro sesquiterpeno conhecido como furocaulerpina, com a presença de um anel furano (NAPOLI, *et al.*, 1981) (**Figura 9**)

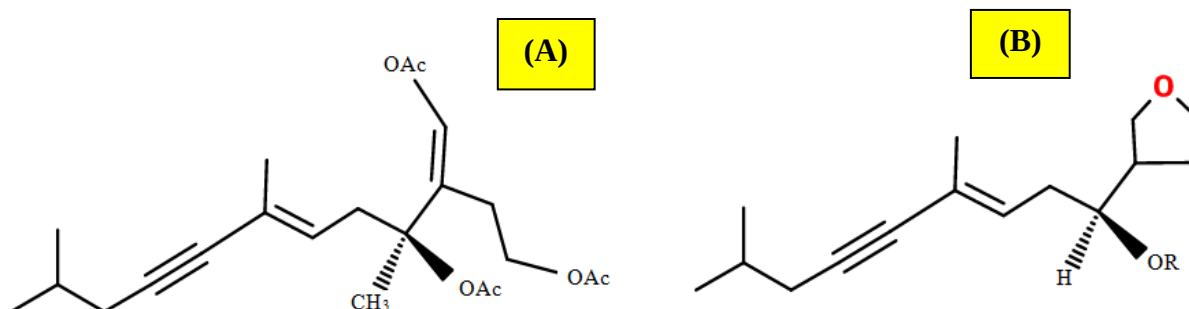


Figura 9: Estrutura química da caulerpenina (A) e da furocaulerpina (B) (NAPOLI *et al.*, 1981).

Estudos mostraram que a caulerpenina tem propriedades antibacterianas (em *Serratia marinorubra*, *Vibrio splendida* e outros vibriões) e antifúngicas (*Leptosphaeria sp.*, *Lulworthia* e outros), além de serem tóxicas para peixes, larvas e outros animais marinhos (Paul & Fenical, 1986)

Em 2006, foram descobertos dois novos sesquiterpenos aromáticos valerenanos, que apresentaram ação inibitória frente a proteína hPTP1B (proteína humana tirosina fosfatase 1 B), a qual é responsável em diminuir os níveis de insulina (MAO *et al.*, 2006) essas substâncias da alga *Caulerpa taxifolia* ficaram conhecidas como Caulerpal A e B (**Figura 10**).

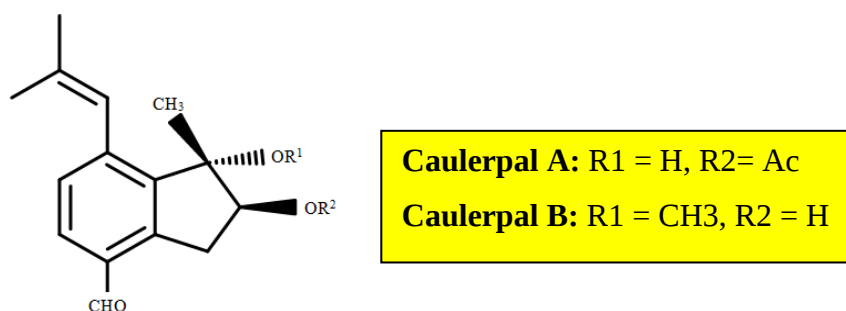


Figura 10: Estrutura básica do Caulerpal.

Esteroides também foram isolados de uma *C. racemosa* do Sri Lanka, entre essas a caulerpicina. Foi proposto que esse composto seria uma mistura de três homólogos do 2-

aminoheptadecanol com o ácido heptaconasóico (MAHENDRAN *et al.*, 1979), contudo mais tarde foi feita uma revisão na estrutura e perceberam que se tratava de uma mistura de vários compostos: ceramidas, derivados de esfingosina e de resíduos de ácidos graxos, ao contrário das outras substâncias desse gênero não foi relatado qualquer atividade antimicrobiana nem antioxidante (NIELSEN, *et al.*, 1982) (**Figura 11**).

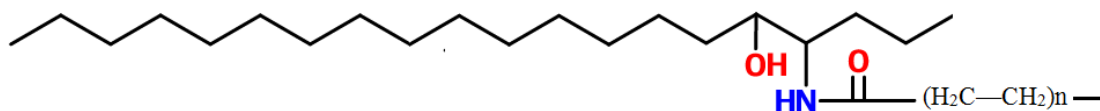


Figura 11: Estrutura da caulerpicina por Nielsen *et al.*, (1982).

O esterol predominante nas algas verdes é clionasterol. Dzeha et al (2013), mostraram que essa substancia é letal para larvas de mosquitos. Nesse mesmo ano foram realizadas extrações etanólicas com alga *Caulerpa racemosa* frente as espécies *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, indicando que o produto natural marinho tinha potencial biológico (ALI *et al.*, 2013) (**Figura 12**)

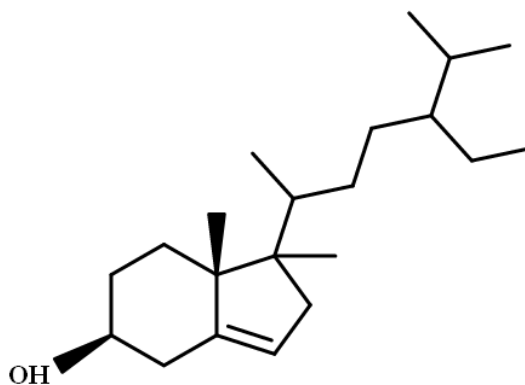


Figura 12: Estrutura química do clionasterol (F. M: C₂₉H₅₀O)

Á partir de extrações etanólicas foram isolados outros esteroides em *C. racemosa*: colesterol, brassicasterol, 24-metilenocolesterol, poriferasterol, fucosterol entre outras (SHEVCHENKO, *et al.*, 2009; AKNIN *et al.*, 1992).

Para essa mesma espécie ainda foi relatado o primeiro caso da presença de compostos preniladas, para-xilenas, em algas marinhas denominadas de Caulerprenilois.

Esses compostos exibiram ampla atividade antimicrobiana contra *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans* e *Trichophyton rubrum* (LIU *et al.*, 2013).

Diante do acima exposto, fica bastante claro que muito ainda pode ser realizado, utilizando-se como recursos naturais, as algas verdes e sobretudo as que pertencem ao gênero *Caulerpa*.

4. REFERÊNCIAS

AGRAWAL, S. C. Factors controlling induction of reproduction in algae – review the text. **Folia Microbiol**, v. 57, p.387-407, 2012.

AGUILLAR-SANTOS, G. Caulerpin, a New Red Pigment from Green Algae of the Genus *Caulerpa*. **J. Chem. Soc. (C)**, p. 842-843, 1970.

AKNIN, M.; NZAOU, M.; KORNPROBST, M.; GAYDOU, E. M.; SAMB. A.; MIRALLES, J. Sterol composition of twelve *Chlorophyceae* from the Senegalese coast and their chemotaxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 31, n. 12, p. 4167-4169, 1992.

ALGABASE (**Biblioteca virtual**). Site: Disponível em; <<http://www.algaebase.org/>> Acessado em 01/04/2014 às 17:00.

ALI, M. Y. S.; RAVIKUMAR, S.; BEULA, J. M. Mosquito larvicidal activity of seaweeds extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Asian Pac. J. Trop. Dis.**, v.3, n. 3, p. 196-201, 2013.

ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Ver. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 34, n.1, p.37-41, 2013.

AMICO, V.; ORIENTE, G.; PIATTELLI, M. TRINGALI, C.; FATORRUSO, E.; MAGNO, S. MAYOL, L. Caulerpenyne, an usual sesquiterpenoid from the green alga *Caulerpa prolifera*. **Tetrahedron Letters**, n. 38, p. 3593– 3596, 1978.

ANVISA, **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. Edição Comemorativa para o IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, 1. Ed, mod. VII – 13, 2004.

ANVISA. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção relacionada à assistência à saúde. **Módulo 6:** Detecção e identificação e bactérias de importância médica. 1 edição, p. 98, 2010.

ARIAS, C. A.; CONTRERAS, G. A.; MURRAY, B. E. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 6, p. 555-562, 2010.

BALLANTINE, D.L.; GERWICK, W. H.; VELEZ, S. M.; ALEXANDER, E.; GUEVARA, P. Antibiotic activity of lipid-soluble extracts from Caribbean marine algae. **Hydrobiologia**, 1987, 151/152, p. 463–469, 1987.

BARATA, D. Taxonomia e Filogenia do Gênero *Caulerpa* J. V. Lamour. (Bryopsidales, Chlorophyta) no Brasil. Tese apresentada ao instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2008.

BAUDELET, P.; GAZES, A.; BÉRARD, J. JUIN, C.; BRIDIAU, N.; KAAS, R.; THIERY, V.; CADORET, J.; PICOT, L. Antiproliferative Activity of *Cyanophora paradoxa* Pigments in Melanoma, Breast and Lung Cancer Cells. **Mar. Drugs.**, v. 11, p. 4390- 4406, 2013.

BAUER, A.W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M.; Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. n. 45, p. 493-496, 1966.

BEKÇI, Z.; SEKI, Y.; CAVAS, L. Removal of malachite green by using an invasive marine alga *Caulerpa racemosa* var, *cylindracea*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, p. 1454- 1460, 2009.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. Introdução as Algas do Brasil. Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 49-60, v. 1, 2010.

BLAZINA, M.; IVEZA, L. NAJDEK, M. *Caulerpa racemosa*: adaptive varieties studied by fatty acid composition (Northern Adriatic Sea, Vrsar, Croatia). **Eur. J. Phycol.**, v. 44, n.2, p. 183–189, 2009.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine Natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 29, p. 144–222, 2012.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Technol.**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRAYNER, S.; PEREIRA, S.M.B.; BANDEIRA-PEDROSA, M. B. Taxonomia e distribuição do gênero *Caulerpa* Lamouroux (Bryopsidales - Chlorophyta) na costa de Pernambuco e Arquipélago de Fernando de Noronha, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v.22, n.4, p. 914-927, 2008.

BRIDIER, A.; SANCHEZ-VIZUETE, M. P.; LE COQ, D.; AYMERICH, S.; MEYLHEUC, T.; MAILLARD, J.; THOMAS, V. DUBOIS-BRISSONET, F.; BRIANDET, R. Biofilms of a *Bacillus subtilis* Hospital isolate protect *Staphylococcus aureus* from Biocide Action. **Plos One**. v. 7, n.9, p. 1-8, 2012.

CALADO, S. C. S.; SILVA, V. L. PASSAVANTE, J. S. O.; ABREU, C. A. M.; LIMA, E. S.; DUARTE, M. M. M. B. DINIZ, E. V. G. S. Cinética e equilíbrio de biofixação de chumbo por macroalgas. **Tropical Oceanography**, v. 31, n. 1, p. 53–62, 2003.

CARDOZO, K. H. M. GURATINI, T.; BARROS, M. P.; FALCÃO, V. R. TONON, A. P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUZA, A.O.; COLEPICOLA, P.; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 146, p. 60–78, 2007.

CAUMO, K.; DUARTE, M.; CARGINI, S. T.; RIBEIRO, V. B.; TASCA, T.; MACEDO, A. J. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, v. 11, n.16, p. 89-188, 2010.

CLSI. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-Difusão: Norma aprovada** – oitava edição, v. 3, n. 1, 2003.

CONSTANCIO, T. Espuma branca nas praias do Rio desencoraja banhistas. Estadão / Brasil. Disponível em <http://www.estadao.com.br/noticias/cidades,espuma-branca-nas-praias-do-rio-desencoraja-banhistas,1120712,0.htm> Data do acesso: 09/04/2014.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na escola**, n.7, p. 21-25, 1998.

DZEHA, T.; JASPARS, M.; TABUDRAVU, J. Clionasterol, a triterpenoid from the Kenyan Marine Green Macroalga *Halimeda macroloba*. **Western Indian Ocean J. Mar. Sci.** v. 2, n. 2, p. 157-161, 2003.

EDWARDS, C.; LAWTON, L. A.; COYLE, S. M.; ROSS, P. Laboratory-scale purification of microcystins using flash chromatography and reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 734, pg.163-173, 1996.

ETIENNE, G.; LAVAL, F.; VILLENEUVE, C.; DINADAYALA, P.; A.AHMED.; Z. DIDIER.; GALAMBA. A.; DAFFÉ, M. The cell envelope structure and properties of *Mycobacterium smegmatis* mc2 155: is there a clue for the unique transformability of the strain? **Microbiology**, n. 151, p. 2075–2086, 2005.

FERREIRA, L. L. ESTRUTURA CLONAL E MULTIRRESISTÊNCIA EM *Pseudomonas aeruginosa*. **Dissertação apresentada na Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz**, 2005.

FERREIRA, H; LALA, E. R. P. *Pseudomonas aeruginosa*: um alerta aos profissionais de saúde. *Rev. Panam. Infectol.* v.12, n.2, p.44-50, 2010.

FREILE-PELEGRIN, Y.; MORALES, J. L. Antibacterial activity in marine algae from the coast of Yucatan, Mexico. **Botanica Marina**, v. 47. 2004, pg. 140–146.

FUJIMOTO, K.; KANEDA, T. Separation of antioxygenic (antioxidant) compounds from marine algae. **Hydrobiologia**, p. 116-117, 1984.

GOLD, H. S. Vancomycin-Resistant Enterococci Mechanism and Clinical Observations, Antimicrobial resistance, **Clin. Infect. Dis.**, v.33, p.210-218, 2001.

GORBI, S.; GIULIANI, M. E.; PITTURA, L.; D'ERRICO, G; TERLIZZI, A. FELLINE, S; GRAUSO, L.; MOLLO, E.; CUTIGNANO, A.; REGOLI, F. Could molecular effects of *Caulerpa racemosa* metabolites modulate the impact on fish populations of *Diplodus sargus*? **Marine Environmental Research**, n.30, p. 1-10, 2014.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; Pupo, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectiva para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, 2010, pg. 667-679.

GUVEN, K. C.; PERCOT, A.; SEZIK, E. Alkaloids in Marine Algae. **Mar. Drugs.**, v. 8, p. 269-284, 2010.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **DDT**, v. 5, n.7, 2000.

HORSTMANN, U. Cultivation of the green alga *Caulerpa racemosa*, in tropical waters and some aspects of its physiological ecology. **Aquaculture**, v. 32, p.361-371, 1983.

KANAGAWA, A. L.; NEVES, M. A. Biologia e Sistemática de Fungos, Algas e Briófitas. **Ciências Biológicas – Caderno CB Virtual** 2, n.2, p.279-302, 2011

KANDHASAMY M.; ARUNACHALAM, K. D. Evaluation of *in vitro* antibacterial property of seaweeds of southeast coast of India. **African Journal of Biotechnology**. vol. 7, n.12, pg. 1958-1961, 2008.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, J. R.; Diagnóstico microbiológico. 5 ed. São Paulo, 2001.

LELIAERT, F.; SMITH, D. R.; MOREAU, H.; HERRON, M. D.; VERBRUGGEN, H.; DELWICHE, C. F.; CLERCK, O. D. Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.31, n., p. 1–46, 2012.

LEWIS, L. A.; MCCOURT, R. M. Green algae and the origin of land plants. **American Journal of Botany**, v. 91, n.10, p. 1535-556, 2004.

LI, Z.; WANG, B.; ZHANG, Q.; QU, Y.; XU, H.; LI, G.; Preparation and antioxidant property of extract and semipurified fractions of *Caulerpa racemosa*. **J. Apply Phycol**, v. 2, p. 1527-1536, 2012.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-393, 2001.

LIMA-FILHO, J. V. M. et. al. Antibacterial activity of extracts of six Macroalgae from the Northeastern Brazilian Coast. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 311-313, 2002.

LIMBERGER, P. A.; GHELLER, J. A. Efeito da aplicação foliar de extrato de algas, aminoácidos e nutrientes via foliar na produtividade e qualidade de alface crespa. **Cultivando o saber**, v.6, n.2, p.14-21, 2013.

LIU, Y.; MORGAN, J. B.; COOTHANKANDASWAMY, V.; LIU, RUI; JEKABSONS, M. B. MAHDI, F. NAGLE, D. G.; ZHOU, Y. The *Caulerpa* Pigment Caulerpin Inhibits HIF-1 Activation and Mitochondrial Respiration. **J. Nat. Prod.**, v.72, n.12, p. 2104–2109, 2009.

LIU, A.; LIU, D.; LIANG, T.; YU, X.; FENG, M.; YAO, L.; FANG, Y.; WANG, B.; FENG, L.; ZHANG, M. MAO, S. Caulerprenylols A and B, two rare antifungal prenylated para-xylenes from the green alga *Caulerpa racemosa*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, n. 23, p. 2491–2494, 2013.

LOURES, M.C.; PORTO, C. C.; SIQUEIRA, K. M.; BARBOSA, M. A.; MEDEIROS, M.; BRASIL, V. V.; PEREIRA, M. A. D. Contributions of phytotherapy to quality of life: user perceptions. **Rev. Enferm. UERJ**, v.18, n. 2, p. 278-283, 2010.

MAHENDRAN, S.; SARAVAN, S. purification and in vitro antioxidant activity of polysaccharide isolated from green seaweed *Caulerpa racemosa*. **Inter. J. pharm. Bio. Sci.** v. 4, n. 4, p. 1214-1227, 2013

MAO, S.; GUO, Y; SHEN, X. Two novel aromatic valerenane-type sesquiterpenes from the Chinese green alga *Caulerpa taxifolia*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.16, p. 2947-2950, 2006.

MILTADOUS, G. ELISAF, M. Native valve endocarditis due to *Micrococcus luteus*: a case report and review of the literature. **Journal of Medical Case Reports**. v. 5,p. 251, 2011.

MOZZACHIODI, R.; SCURI, R.; ROBERTO, M.; BRUNELLI, M. Caulerpenyne, a toxin from the seaweed *Caulerpa taxifolia*, depresses afterhyperpolarization in invertebrate neurons. **Neuroscience**, v. 107, n. 3, p. 519-526, 2001.

MTOLERA, M.S.P.; SEMESI, A. K. Antimicrobial of Extracts form Six Green Algae from Tanzania. **Corrent trends in Marine Botanical Research in east African Region**, pg. 211-217, 1996.

NAPOLI, L.; FATTORUSSO, E.; MAGNO, S.; MAYOL, L. Furocaulterpin, a new acetylenic sesquiterpenoid from the green alga *Caulerpa prolifera*. **Experientia**, v. 37, p.1132, 1981.

NIELSEN, P. G.; CARLÉ, J. S. CHRISTOPHERSEN, C. Final Structure of caulerpicin, a toxin misture from the green alga *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**, v. 21, n.7, p. 1643- 1645, 1982.

PARADELLA, T. C.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C. Enterococcus faecalis: considerações clínicas e microbiológicas. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 36, n.2, p. 163-68, 2007.

PATINO, S. L.; RODRIGUEZ, N. M. L. ALARCON, T. R. R.; ABITBOL, M. P. Infeccion por Serrtia Marcescens: Caso Clínico. **Revista de posgrado de la Via Cátedra de Medicina**, n. 147, 2005.

PAUL, V. J. FENICAL, W. Chemical defense in tropical green algae,order Caulerpales. **Marine Ecology - Progress Series**, v. 34, p. 157-169, 1986.

PAVASANT, P.; APIRATIKUL, R.; SUNGKHUM, V.; SUTHIPARINYANONT, P.; WATTANACHIRA, S.; MAHARBA, T. F. Biosorption of Cu²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, and Zn²⁺ using dried marine green macroalga Caulerpa lentillifera. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2321–2329, 2006.

PEREIRA, L. A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds. In: Seaweed: Ecology Nutrient Composition of Selected Edible Seaweeds. **Nova Science Publishers, Inc**, v. 2 p. 15-47, 2011.

PINTEUS, SUSETE FILIPA GONÇALVES. Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana em algas da costa de Peniche (Portugal): identificação de compostos bioactivos com elevado potencial biotecnológico. Dissertação (Mestrado em Biologia de Recursos Marinhos). Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria, 2011.

PIRES-CAVALCANTE, K. M. S;ALENCAR, D. B.; SOUSA, M. B.; SAMPAIO A. H.; SAMPAIO, S. S. Seasonal Changes of α -Tocopherol in Green Marine Algae (Caulerpa genus). **Journal of Food Science**, v. 76, n. 5, p.775-781, 2011.

PLOTROWSKA-NICZYPORUK, A.; BAJGUZ, A. The effect of natural and synthetic auxins on the growth, metabolite content and antioxidant response of green alga *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). **Plant Growth regul**, v. 73, p. 57-66, 2014.

PITOMBO, M. B.; LUPI, O. DUARTE, R, S. Infecções por micobactérias de crescimento rápido resistentes a desinfetantes: uma problemática nacional? **Revista Bras. Ginec. Obstr.**, v. 31, n. 11, p. 529-533, 2009.

PITOUT, J. D. D.; CHURCH, D. L.; Emerging gram-negative enteric infections. **Clin Lab Med.**, v. 24, p. 605–626, 2004.

RADHIKA, D. VEERABAHU, C. PRIYA, R. Antibacterial activity of some selected seaweeds from the gulf of Mannar Coast, South India. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, 2012, v. 5, edição 4 pg 89-90.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. (Review). **Clinical Interventions in Aging**, v. 2, n. 2, p. 219-236, 2007.

RIBEIRO, E. L.; GUIMARÃES, R.I.; INÁCIO, M. C.C.; FERREIRA, W. M.; CARDOSO, G. G.; DIAS, S. M. S.; NAVES, P. L. F. Aspectos das leveduras de *Candida* vinculada a infecções nosocomiais. **NewsLab**, v. 64, pg. 106-126, 2004.

RIBEIRO, N. A.; ABREU, T. M.; CHAVES, H. V.; BEZERRA, M. M.; MONTEIRO, H. S. A.; JORGE, R. J. B.; BENEVIDES, N. M. B. Sulfated polysaccharides isolated from the green seaweed *Caulerpa racemosa* plays antinociceptive and anti-inflammatory activities in a way dependent on HO-1 pathway activation. **Inflammation Research**, 2014.

RICE, L. B. Emergence of Vancomycin- resistant Enterococci. **Emerging Infectious Diseases**, v.7, n.2, 2001.

ROCHA, I. P. Aquicultura: um excelente negócio. **Revista Brasileira de Agropecuária**, v. 1, n. 11, p. 6–12, 2001.

ROCHA, F. D.; PEREIRA, R. C.; KAPLAN, M. A. C.; TEIXEIRA, V.L. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Revista Brasileira de farmacognosia**. v.17, n. 4, p. 631-639, 2007.

ROGE, A. B.; FIRKE, S. N.; KAWADE, R. M.; SARJE, S. K.; VADVALKAR, S. M. Brief review on: flash chromatography. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 8, p.1930- 1937, 2011.

SACRAMENTO, R. M. O.; SEIDLER, E.; SOUZA, M.; YOSHIMURA, C. Y.Utilização de macroalgas arribadas do litoral catarinense na adubação orgânica de olerícolas. **Associação Brasileira de incentivo a Ciência – ABRIC**, v. 1, n. 1, 2013.

SANTOS, A. L; SANTOS, D. O. FREITAS, C.C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. **Bras. Patol. Med. Lab.** v. 43, n.6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, G. N.; NASCIMENTO, O.S.; PEDREIRA, F. A.; RIOS, G.I.; VASCONCELOS, J. N. C.; NUNES, J. M. C. Análise quali-quantitativas das algas arribadas do Norte do estado da Bahia, Brasil. **Acta Botanica**, Malacitana, v. 38, 2013.

SARINI, A. W.; AISHAH, H. N.; ZAINI, M. Determination of Antioxidant Activity for Seven Types of macroalgae. **International conference on Food Engineering and Biotechnology**. v. 65, p. 51-55, 2014.

SCHWEDE, J. G. CARDELLINA, J. H.; GRODE, H. S.; JAMES, T. R.; BLACKMAN, A. J. Distribution of the pigment caulerpin in species of the green alga *Caulerpa*. **Phytochemistry**. v.26, n.1, p. 155- 158, 1987.

SHEVCHENKO, N. M.; BURTSEVA, Y. V.; ZVYAGINTSEVA, T. N.; MAKAEVA, T. N.; SEERGEVA O, S.; ZAKHARENKO, A. M.; ISAKOV, V. V.; LINH, N. T.; HOA, N. X.; NY; LY, B. M.; HUYEN, P. V. Polysaccharides and sterols from green algae *Caulerpa lentilifera* e *C. sertularioides*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 1,p. 1-5, 2009.

SOUZA, M. A. Emergência e disseminação de Enterococo Resistente à Vancomicina em Hospital Universitário no Centro Oeste do Brasil. Dissertação apresentada na Universidade federal de Goiás, Programa de pós Graduação em Medicina tropical e saúde pública, p. 44, 2013.

SPANGENBERG, B.; POOLE, C. F.; WEINS, Ch.. Theoretical Basis of thin layer chromatography, **Quantitative Thin-layer Chromatography**. A practical survey cap. 2, edit. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011

SRIVASTAVA, N.; SAURAV, K.; MOHANASRINIVASAN, V.; KANABBIRAN, K.; SIGH, M. Antibacterial Potential of Macroalgae Collected from the Madappam Coast, Índia. **British Journal of Pharmacology and Toxicology**, v.1, n.2, p. 72-76, 2010.

STOCKER, A.; FRETZ, H.; FRICK, H.; RUTTIMAN, A.; WOGGON, W. The substrate specificity of Tocopherol Cyclase. **Bioorganic & medicinal Chemistry**, v. 4, n. 7, pg. 1129-1134, 1996.

STRIEGEL, M. F.; HILL, J. Thin-Layer Chromatography for Binding Media Analysis. **Scientific Tools for Conservation**. Publicado por Getty, J. P. cap. 2, p.19, 1996.

SU, J.; ZHU, Y.; ZENG, L.; XU, X. A New Bisindole from Alga *Caulerpa serrulata*. **J. Nat. Prod.**, v. 60, p. 1043-1044, 1997.

SUDATTI, D. B. Influência de fatores abióticos e bióticos na química defensiva da macroalga marinha *Laurencia dendroidea* J. Agardh (Ceramiales: Rhodophyta), **Tese da Universidade Fluminense**, 2010

TEIXEIRA V. L.; KELECOM, A. O uso de carotenóides taxonômicos e filogenéticos de algas. 1. Principais características das classes. **Química Nova**, n.13, v.4, 1990.

TERRADOS, J.; JIMENEZ, L. A. Fatty acid composition and chilling resistance in the green alga *Caulerpa prolifera* (Forrskal) Laamouroux (Chlorophyta, Caulerpales). **Biochemistry and Molecular Biology International.**, v.39, n. 5, p. 863-869, 1996.

VIEIRA, D. C. M. Pesquisa de patógenos oportunistas em medicamentos tópicos padronização e análise comparativa de metodologias convencional e molecular. Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2007.

WANG, T. JONSDOTTIR, R. LIU, H. GU, L. KRISTINSSON, H. G. RAGHAVAN, S. OLAFSDOTTIR, G. Antioxidant Capacities of phlorotannins extracted from the brown algae *Enteromorpha flexilis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5874-5883, 2012.

ZBAKH, H.; CHIHEB, H. BOUZIANE, H.; SANCHEZ, V. M.; RIADI, H. Antibacterial activity of Benthic Marine Algae Extracts From the Mediterranean Coast of Morocco. **Journal of Microbiology Food Sciences**, v. 2, n.1, p. 219-228, 2012.

5. Artigo em preparação para ser submetido à revista Journal of Applied Phycology

ORIGINAL ARTICLE

Evaluation of the chemical profile and antimicrobial activity of *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh.

Rafael J. S. A. Padilha¹, Brunna, F. L. Patriota¹, Maria, E. Bandeira-Pedrosa², Ricardo Yara³, Kêsia X. F. R. de Sena⁴, Thiago M. de Aquino, Ranilson⁵ de S. Bezerra⁶, Cláudia S. de A. Lima^{1*}.

¹ Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

² Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

³ Departamento de Engenharia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

⁴ Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

⁶ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

Correspondent author: Cláudia S. de A. Lima*, Av. Prof. Moraes Rego, S/N.

Departamento de Biofísica e Radiobiologia, CCB, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil. E-mail: claudia.salima@gmail.com.

Abstract

The present study aims to conduct chemical and microbiological prospecting from marine algae of the genus *Caulerpa* Lamouroux collected in Maracáipe, an area located in south of Pernambuco state in Brazil. In this study, the ethanolic extract of *Caulerpa racemosa* (Forsskal) benthic and *arribadas* J. Agardh was used for most test. The algae were evaluated for their antimicrobial activity by disc diffusion method for microorganisms with clinical importance. It was selected the microorganism more sensible to the substances from *Caulerpa racemosa*. After this it was performed some essays against resistant strains of them. In order to characterize the samples, it were performed the screening to check the phytochemical antioxidant properties. The antimicrobial essays of benthic algae showed a marked activity against *Enterococcus faecalis* and their resistant strains. Moreover, it was observed that the fractions also showed an inhibitory effect against other representatives of Gram positive bacteria. The antioxidants tests (DPPH) indicated that benthic algae has a superior action than *arribadas* collected algae. The bioactive fractions were submitted to flash chromatography and spectroscopic evaluation using IR, UV/VIS and H-NMR indicated the presence of chlorophylls and steroids proving to be an effective therapeutic. It was also isolated the caulerpicina.

Keywords: *Caulerpa racemosa*, antimicrobial, phytochemical screening, caulerpicine.

1. Introduction

Infectious diseases are among of the leading causes of deaths in hospitals, and multidrug-resistant strains has become a problem for medical doctors and researchers. On human microflora microorganisms generally do not carry a risk to healthy individuals, yet affect people with compromised immune systems are at risk hospital patients (Arias et al., 2010). One of the factors of resistance is conditioned by the indiscriminate use of antibiotics, so select resistant strains. Therefore, there is the need to develop new and effective antimicrobial compounds for clinical application (Wright et al. 2014).

There are many studies on algae and their antimicrobial capacity. Among the many species *Caulerpa racemosa* green alga draws enough attention because it is one of the most consumed in Asian diets in the form of fresh vegetables in salads featuring a spicy taste. Its aspect is also quite flashy, popularly known as "green caviar" or "sea grapes", because they have a juicy and tender texture (Pereira, 2011; Lee, 2008).

In its constitution researchers found that the lipid content of the algae *C. racemosa* are closely related to the temperature and the place where they are based (Blazina et al , 2009; Terrados and Lopez - Jimenez , 1996), and the concentration of certain sterols such as α - tocopherol varies throughout the year (Pires-Cavalcante et al., 2011) . This type of species has been described in some Brazilian coastal regions: Conceição Beach , Sao Paulo , Santo Aleixo Island, beach Tamandaré, Porto de Galinhas Ipojuca , and the beach in Depth Maracaípe (Brayner et al, 2008).

Algae are well known for their pharmacologically active structures. One of the most known substances in algae, the caulerpine, is an alkaloid that has an antiviral activity and acts as a cell biomodulator in fish (Macedo et al., 2012; Gorbi et al., 2014). The chemical analysis with crude extracts of this species shown that they are a potential drug, against bacteria of clinical interest.

2. Materials and methods

2.1. Collection preparation of the extract and separation fractions of *C. racemosa*

The seaweed *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh was collected on the Maracaípe beach (8°32'23.0" S 35°00'07.6"W) in September and December 2012 under low tide. The species was collected in two conditions (benthic and *arribadas*). They were collected and stored in plastic bags, which were transported to the laboratory. The species was washed using tap water to remove salt and other algae epiphytes, sand and some rest of the animals. Part of the samples was designed to obtain the extract and the other part was stored for identification in the laboratory of Phycology the Federal Rural University of Pernambuco. After collection they were subjected to oven drying (42°C), with forced air circulation for three days. Dried algae, they were ground and weighed. After verification were soaked in a 70% ethanol solution until exhaustion (Kumar et al., 2013). After each extraction, the extract liquid was subjected to vacuum distillation on a evaporator of 45° C and disposed in desiccator until constant weight (Paiva et al., 2012).

2.2 Microbiological Activity

The evaluation of the antimicrobial activity where performed using the method of the paper disk diffusion (Bauer et al., 1966), modified by the Department of Antibiotics, from Federal University of Pernambuco (UFPEDA) laboratory. The standardized suspension of test microorganisms were grown on the surface of an appropriate culture medium. The

extracts were soaked in a solution of DMSO (2mg/ml) and after it emerged in paper disks of 6 mm diameter and tested for antibacterial activity. Tests for antimicrobial activity were performed with the following microorganisms: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 01), *Mycrococcus luteus* (UFPEDA 06), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 16), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 39), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Serratia marcescens* (UFPEDA 398), alcohol-acid resistant *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71) and the yeast *Candida albicans* (UFPEDA 1007). All microorganisms were inoculated in Muller Hinton medium and GL, in addition clinical isolates of *Enterococcus* spp. were obtained from the culture collection of the Department of antibiotics UFPE.

2.3 Phytochemical Screening

The dried, powdered samples were submitted to qualitative tests for the identification of phytochemical constituents according to standard procedures (Yadarva and Agarwala, 2011; Harborne, 1973).

2.3.1 Test for saponins

To 0,3g of extract 5 ml of distilled water was added and shaken vigorously. The solution was then observed for a stable persistent froth.

2.3.2 Test for alkaloids

Dissolving 0,3g of the dried extract in 5 mL solution of 5% HCl, and add the reactive Dragendorff brick red precipitate indicates positivity to the test.

2.3.3 Test for tannins and phenols

Three drops of an alcoholic solution of FeCl₃ (2%) were added and stirred briefly. It has also prepared a blank test with distilled water and ferric chloride for comparison. The presence of phenols and tannins was determined according to the emergence of the color displayed for each substance when the "blank" test is negative. Varying color between blue and red is indicative of the presence of phenols. Precipitated with dark blue hue, the presence of hydrolyzable tannins, green staining, condensed tannins. The " blank " test was performed using water and ferric chloride

2.3.4 Test for Anthocyanins

One sample acidification (pH 3-4) and the same alkalization is performed, there is a change in the original color in the medium indicates the presence of this class of compounds.

2.4 DPPH Radical-Scavenging Assay (RSA).

Radical-cleaning activity (RSA) of *C. racemosa* extracts of algae benthic and *arribadas* against stable DPPH was determined by spectrophotometry. Extracts in different concentrations (0, 50, 100, 200, 500, 1000 ppm) were mixed using an equal volume of 0,2 mM methanolic DPPH solution. The samples were kept in the dark, for 30 min at room temperature and absorption-reduction was measured. Absorption negative control containing

the same amount of methanol and DPPH solution was prepared and measured at the same time. The experiments were performed in octuplicate. The RSA was measured using the following formula (% inhibition) = $\{[Ab-Aa]/Ab\} \times 100$. Where AB is absorption of blank sample at t=0 min and AA is the tested sample absorption at t = 30 min. The antioxidant activity was also expressed as IC₅₀, which was defined as effective concentration of the sample (in µg/mL) at which 50% of DPPH radicals are scavenged. The ascorbic acid was used as a positive control. Each average result and standard deviation were reported as described by Brand-Williams et al., 1985.

2.5 Separation and characterization of active compounds against *Enterococcus*

The extracts were also submitted to the flash chromatography system (Biotage Isolera - one), using a eluents with polarity gradient from hexane to ethyl acetate, starting with pure hexane (7:3 , 5:5 , 3:7) to pure ethyl acetate. The sample was characterized by conventional spectroscopic methods such as UV-Vis (UV -1800, Shimadzu) , infrared (IFS 66 , Bruker , USA) and ¹H Nuclear Magnetic Resonance (Varian Unity 300 MHz, Garden State Scientific, USA). The TLC was performed using a solution of ethyl acetate/toluene (9:1) and observed under UV-wavelengths 365 and 254 nm. All these data were compared with literature.

3. Results and Discussion

3.1 Analysis of the crude extract

After obtaining the crude extract, the yield from of benthic and *arribadas Caulerpa racemosa* algae was calculated (Table 1).

Table 1: Yield of the *Caulerpa racemosa*

	Weight of the powdered sampled (g)	Weight of the sample extract obtained (g)	Percentage yield (%)
<i>Caulerpa racemosa</i> (benthic)	36,33	2,71	7,45
<i>Caulerpa racemosa</i> (arribadas)	107,46	4,06	3,78

$$\text{Percentage yield} = \frac{\text{Weight of the sample extract obtained (g)} \times 100}{\text{Weight of the powdered sampled used (g)}}$$

It was verified that the amount of metabolite extracted from benthic algae (7,45 %) is higher than in *arribadas* algae (3,78%). This result is in agreement with another sources described (Ali et al., 2013; Ravikumar et al., 2011). The exposure conditions of solar radiation and tidal action cause the living macroalgae in the intertidal zone and especially in the subtidal zone is under a lower hydrodynamic and hence a weaker action of UV radiation due to the damping effect on seawater. And *Arribadas* algae remain longer in regions of the beach and are exposed to the harmful effects of radiation, modifying not only their biomass (%) as their growth (Gao and Xu, 2008; Figueroa and Vinegla, 2001).

3.2 Phycochemical Screening

The phychochemical investigation of the branches of *Caulerpa racemosa* revealed the presence of saponins and alkaloids in both benthic and *arribadas* algae (Table 2).

Table 2:Phychochemical constituents of ethanol extracts of *Caulerpa racemosa*.

	<i>Caulerpa racemosa</i> benthic	<i>Caulerpa racemosa</i> arribadas
Saponins	+	+
Alkaloids	+	+
Tannins	-	-
Phenols	-	-
Anthocyanins	-	-

Legend: (+) Positive for the test; (-) Negative for the test.

Alkaloids and saponins are composed based on several species of algae . Saponins are steroid or polycyclic terpenes. Various biological effects have been ascribed to this substance: antimicrobial agents, immunostimulants, anticancer, among others (Francis et al, 2002). This component is very important in marine life as it is directly related to diet in fish. It was found that the prolific algae *Caulerpa* can contain about 10-20 % of saponins in its constitution and promote good growth and development in fish, however a yield of over 30% saponins in *Caulerpa* is very high and for predual life (Zinadah et al., 2013).

A metabolite that does exist in the majority of the algae *Caulerpa* genus are the alkaloids. Alkaloids are compounds that have a nitrogen atom and a cyclic ring. The caulerpine is the most known compound of this class in these algae (Aguilar - Santos, 1970). This alkaloid showed a variety of important biological activities already described in the literature as a factor of regulatory and antitumor growth in plants. Besides this substance, other alkaloids were elucidated in smaller quantities (Macedo et al., 2012; Guven et al., 2010). Analysis of the chromatogram (TLC) confirm a variety of substances (Figure 1).

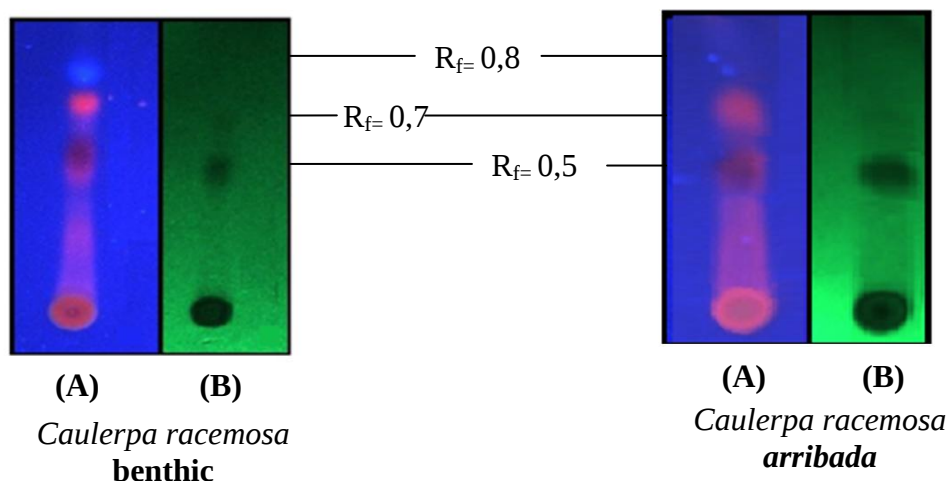


Figure 1: TLC of the *C. racemosa* in the ultraviolet light 365 nm (A) and 254 nm (B)

The ethanol extracts benthonic and *arribadas* algae has several kinds of substances from diferentes polarities. The TLC analysis from the both algae show several similarities (R_f) when analysed in UV (254 and 354nm). Doty and Aguillar-Santos (1970) when analyse four compounds from *Caulerpa sertularioides*: Caulerpine, caulerpine, Palmitic acid, β -sitosterol and make the comparison with the ethanolic extract, observed that the R_f from

this four compound are very near. The same Rfs, were founded in this work, in both kinds of algae from *C. racemosa*.

3.5 Activity Antioxidant

The antioxidant activity was evaluated by spectrophotometric assay (Swain, 1959). This test is based on the ability to reduce this extract on the action of DPPH. The antioxidant potential was evaluated in the form of IC₅₀ which is the amount of the extract to inhibit 50% oxidative action of *arribadas* radical. The results of benthic algae and *arribadas* are shown in Table 3.

Table 3: DPPH free radicals activity in marine algae *Caulerpa racemosa*.

	DPPH (Inhibition %)					
	1000 µg/ml	500 µg/ml	200 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	IC ₅₀ (µg/mL)
<i>Caulerpa racemosa</i> benthic	46,5±0,02	40,3±0,04	37,7±0,01	31,9±0,03	28,9±0,004	1140,0
<i>Caulerpa racemosa</i> <i>arribadas</i>	39,6±0,09	35,8±0,03	30,4±0,01	29,1±0,02	28,6±0,02	1805,2

Benthic algae obtained a biological antioxidant activity exceeding *arribadas* algae, however the results expressed still showed lower activity for the positive control (ascorbic acid). However, a purification of the sample can reveal a high antioxidant power as demonstrated in *Caulerpa racemosa* algae, collected in China who had IC₅₀ 353 mg/mL (Li et al., 2012). The type of the extract also has influence on this potential. It has been demonstrated that this seaweed polysaccharide it was better than the antioxidant compound presented in the same algae collected in another places (Wang et al, 2012; Mahendran and Saravan 2013).

3.4 Microbiological Activity

We observed that just the benthic algae extract showed antimicrobial activity against the following organisms Gram-positive: *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecalis* (Table 4).

Table 4: Antimicrobial activity of ethanol extracts of *Caulerpa racemosa*.

	Zone of inhibition (mm)								
	01	06	16	39	71	138	224	398	1007
<i>Caulerpa racemosa</i> benthic	-	12,3 ±1,5	8,4±1,5	-	-	15,1±0,2	-	-	-
<i>Caulerpa racemosa</i> <i>arribadas</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legend: (-) No growth. Number UFPEA = 01: *Staphylococcus aureus*; 06: *Micrococcus luteus*; 16: *Bacillus subtilis*; 39: *Pseudomonas aeruginosa*; 71: *Mycobacterium smegmatis*;

138: *Enterococcus faecalis*; 224: *Escherichia coli*; 398: *Serratia marcescens* and 1007: *Candida albicans*.

The best result was achieved against *E. faecalis* (15.1 ± 0.2) in view of this result, an antimicrobial analysis against clinical isolates of *Enterococcus* spp was performed. obtained from the Culture Collection of the Department of Antibiotics, only with *Caulerpa racemosa* benthic. (**Table 5**).

Table 5: Clinical isolates of *Enterococcus* spp. obtained from the culture collection of the Department of antibiotics UFPE.

Zone of inhibition (mm)					
<i>Caulerpa racemosa</i> benthic	<i>Enterococcus</i> 552006/851	<i>Enterococcus</i> 1014-5/854	<i>Enterococcus</i> 1532101/845	<i>Enterococcus</i> 551296/847	<i>Enterococcus</i> 4025/853
	5,6±0,5	6±0,0	7,6±1,5	6,6±1,1	9,3±1,5

Legend: Identification of *Enterococcus* spp.: deposit number from the Collection of the Department of Antibiotics

From these results with the benthic ethanolic extracts, column chromatography was performed and four were separated fractions (F1, F2, F3 and F4). The fractions that showed antimicrobial activities were the **F1**, **F2** and **F3**, and the latest showed the best results against *Enterococcus* (**Table 6**).

Table 6: Antimicrobial activity of ethanol extracts of *Caulerpa racemosa* fractions.

Zone of inhibition (mm)									
	01	06	16	39	71	138	224	398	1007
F1	7	14	10	-	-	14	-	-	-
F2	10	10	-	-	-	10			
F3	X	X	X	X	X	15	X	X	X
F4	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legend: (-) No growth. (X) No tested. Number UFPEDA = 01: *Staphylococcus aureus*; 06: *Mycrococcus luteus*; 16: *Bacillus subtilis*; 39: *Pseudomonas aeruginosa*; 71: *Mycobacterium smegmatis*; 138: *Enterococcus faecalis*; 224: *Escherichia coli*; 398: *Serratia marcescens* and 1007: *Candida albicans*. Collected fractions (F1, F2, F3 and F4).

Antimicrobial resistance has become a public health problem, and is closely related to treatment by antibiotics.

In the present study it was shown that *Caulerpa racemosa* collected on the coast of Pernambuco had a significant effect on Gram positive and Clinical Isolates of *Enterococcus* spp. A result like this was only found so far with the methanol extract found with seaweed *Caulerpa racemosa* collected in India (Kandhasamy and Arunachalam, 2008). According to the criterion adopted by Alves et al (2000), the results for the clinical isolates showed that the benthic ethanolic extract had presented resistance to four strains of *Enterococcus* (*Enterococcus* 552006/851, *Enterococcus* 1014-5/854, *Enterococcus* 1532101/845, *Enterococcus* 551296/847 and *Enterococcus* 4025/853), and a partial activity for one of the strains (*Enterococcus* 4025/853), but a purification presented higher antimicrobial. The compounds of the *Caulerpa racemosa* are inactive against Gram negative bacteria. This results are in agreement with described before (Silva, 2009; Ballantine et al., 1987).

The ethanol extract showed efficacy against *E. faecalis* (halo 15mm) and the same result was observed before when use methanol extracts (Kandhasamy and Arunachalam , 2008).

It was also described that the crude methanol extract was effective against the bacteria *Enterococcus faecalis* showing a similar result to that found in the workplace. However the above-mentioned tests confirm that these algae has significant potential in the treatment, and that much remains to be explored (Kandhasamy and Arunachalam, 2008).

The entire study was conducted with the region of the branches of algae, but it has been established that the antibacterial activity can show variations, even in the same part of a this algae (Freile - Pelgrin and Morales, 2004).

It was observed that arribadas algae showed no antibacterial activity. Environmental weathering such as exposure to radiation, temperature rise, and nutritional deficiency can be closely related in that metabolic activity.

3.5 Antimicrobial Compounds from *Caulerpa racemosa*

There are many studies that involve biological activity with crude extracts from the algae *Caulerpa racemosa*, but none of them came to characterize and identify these substances as a potential antibacterial and against-resistant *Enterococcus*. The **fraction 2**, that show this result, was chosen to be purified on flash chromatography system. Four compounds were isolated from the **F2 (F2.a, F2.b, F2.c, F2.d)** and identified according conventional spectroscopic data of infrared, ultraviolet and ^1H NMR.

In the **F2.a**, the ^1H NMR spectrum revealed the presence of: $\delta = 0,88, 1,3, 1,7, 2,2$ (2H). The infrared analysis, showed the following peaks: $2924,36\text{ cm}^{-1}$. 2853.72 cm^{-1} (CH axial stretching). 1712.02 cm^{-1} (C=O axial stretching). 1463 cm^{-1} (C-H angular deformation), 1260 cm^{-1} (C-O axial stretching); and $801,79\text{ cm}^{-1}$ (C—C axial stretching).

In the fraction **F2.b** ^1H NMR spectrum revealed the presence of signals included: $\delta = 0,88; \sim 1,26; 1,61; 2,22$ (2H); $3,69\text{--}3,76$ (m, 3H); $3,99$ (dd, 1H,); $7,4$ (1H of NH- C- C, s). Infrared showed peaks at: 3427 cm^{-1} (NH, secondary amide), 1635 cm^{-1} (OH), 2921 cm^{-1} (CH stretching) ; 2850 cm^{-1} (C-H axial elongation).

In fraction **F2.c** ^1H NMR showed the presence of: $\delta = 0,5$ (m, OH), $1,3$ (s, 2H), $1,7$ (XX), $2,4$ (XX) and various intensity signals fraction between $1,6$ and $2,3$ (2H), characteristic signals paraffin. The infrared the following peaks: 2955.3 cm^{-1} and 2924.44 cm^{-1} (axial elongation CH), 2853 cm^{-1} (CH₂ symmetric stretching), 1714 cm^{-1} (C = O), 1463 cm^{-1} in and 1377 (CH deformation angle cm^{-1}) and 1260 cm^{-1} (CO).

The fraction **F2.d** ^1H NMR showed the presence of $\delta = 0,88, 1,3$ and $1,6$ (2H), $3,3, 3,4, 3,7$ e $3,8$ (H). Showed in the infrared spectrum, the presence of a band at 2923 cm^{-1} that is characteristic of the stretching of bonds C-H of methylene groups (CH₂).

The Spectroscopie in the region of UV/VIS shows no significant bands when were observed in region between 300 nm to 700 nm , from the samples **F2.a** and **F2.b**, however, a small peak appears in the region around 400 nm . Within the region of 200 nm to 300 nm that a series of peaks characteristic of unsaturated chromophore groups were observed. In **F2.c** and **F2.d** constituents, it was already founded two peaks, near the region of 400 nm and 690 nm , and the **F2.d** with greater intensity. The chemical profile of such substance was reported in TLC (**Figure 2**).

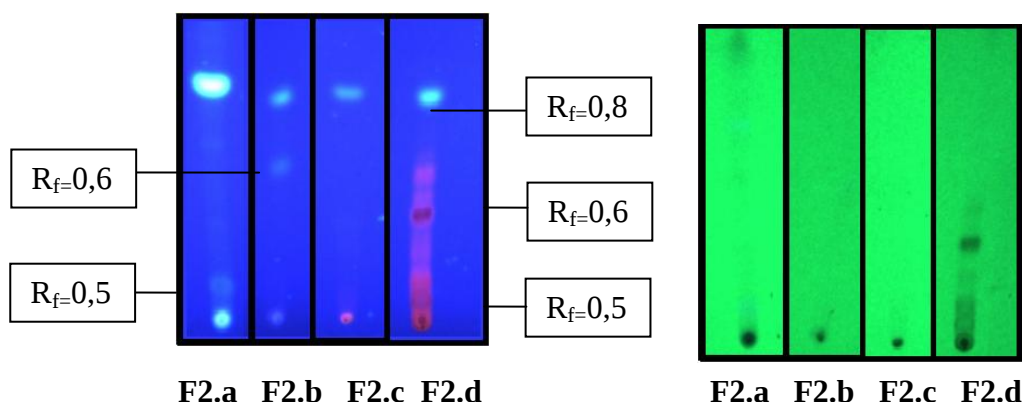


Figure 2: TLC dos compostos F2.a, F2.b, F2.c e F2.d.

The chromatogram shows that all fractions had an $R_f = 0.8$ formed by a blue fluorescent compound that was also observed in the crude extract of the sample. The **F2.b** fraction showed a small spot on $R_f = 0.5$. The compound **F2.d** show a red fluorescence that was also presented in the base of application of **F2.c** (Figure 2).

This fractions shows the same peaks in the NMR H^1 ($\delta = 0.65$; ~ 2.26) that is characteristics from steroids and terpenes mentioned before for *Caulerpa* gender (Napoli et al., 1982).

The literature shows that the compound **F2.b** has the same chemical characteristics found in caulerpicine. This substance is considered as ceramide and sphingosine derivative of fatty acid residues. Unlike other isolated compounds described in some papers, is referred to caulerpine, but there is no reported before, any antimicrobial activity although it has been discussed on its toxic effect (Nielsen et al., 1982).

In **F2.da** red fluorescence signals, is refered to the methyl hydrogens and methylene bounds, and the UV/VIS analysis of the wavelengths with peaks near 600 nm and 400 nm are characteristic of the mixture of phytol and the group of pigments such as chlorophyll or others (Milenkovic et al, 2012;. Tunzi et al, 1974).

Analysis of a group of researchers found that the solution had presented antifungal chlorophyll activity, but was not shown activity against *Enterococcus* (Maekawa et al., 2007). Antibacterial activity were also described in lipids and photosynthetic pigments of brown algae, demonstrating that this potential is inherent on some algae (Gerasimenko et al., 2014). The variation in results between species is great because antibacterial activity against *Enterococcus* was not found in *Caulerpa peltata* (Movahhedin et al., 2014).

An amino acid analysis revealed that several steroidal compounds have been identified in *C. racemosa* including algae brassicasterol, clionasterol, fucosterol, brassicasterol dihydro (Shevchenko et al, 2009; Aknin et al, 1992). Although it was mentioned before, the activity in another species of algae, It were never related this activity for *Caulerpa racemosa* against antimicrobial-resistant *Enterococcus*, and there is not mentioned, this algae from the Pernambuco coastline (Tian et al., 2011).

1. Conclusions

It was reported that the green alga *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh benthic collected on the southern coast of Pernambuco had the highest yield in its biomass, as well as higher antioxidant activity compared to the arribadas collected algae. Its phytochemical screening showed the presence of saponins and alkaloids. It was also reported that the crude extract in the benthic been shown to be effective in the face of Gram-positive bacteria with significant activity against the pathogen *Enterococcus faecalis* seem quite resistant and *Enterococcus*. The study showed that the antimicrobial activity is due to a number of steroid compounds and other pigments and it was confirmed the presence of Caulerpicine. Considering all these findings documented the importance of these research seaweeds that can be found around the world.

Acknowledgements

The authors are grateful to the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior” (CAPES), for the financial support and student fellowships.

References

- Aguillar-Santos, G. (1970). Caulerpin, a New Red Pigment from Green Algae of the Genus *Caulerpa*. J. Chem. Soc. (C), p. 842-843.
- Aknin, M., Nzaou, M.; Kornprobst, M.; Gaydou, E. M.; Samb. A.; Miralles, J. (1992). Sterol composition of twelve *Chlorophyceae* from the Senegalese coast and their chemotaxonomic significance. Phytochemistry, v. 31, n. 12, p. 4167-4169,
- Alves, T. M. A. Silva, A. F. Brandão, M.; Grandi, T. S. M.; Smânia, E. F.; Júnior, A. S.; Zani, C. L (2000). Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. Mem Inst. Oswaldo Cruz, 95(3): 367-373.
- Ali, M. Y. S., Ravikumar, S., Beula, J. M. (2013). Mosquito larvicidal activity of seaweeds extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. Asian Pac J Trop Dis, 2013; 3(3): 196-201, doi:10.1016/S2222-1808(13)60040-7.
- Arias, C. A., Contreras, G. A., and Murray, B. E. (2010). Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clin. Microbiol. Infec.* 16, 555–562.
- Ballantine, D. L.; Gerwick, W. H.; Velez, S. M.; Alexander, E.; Guevara, P. (1987). Antibiotic activity of lipid-soluble extracts from Caribbean marine algae. *Hydrobiologia*, 151/152, 463–469,
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C. and M. Turck. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45:493-496.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E. and Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 28: 25-30.
- Brayner, S., Pereira, S. M. B., and Bandeira-Pedrosa, M. E. (2008). Taxonomia e distribuição do gênero *Caulerpa* Lamouroux (Bryopsidales - Chlorophyta) na costa de Pernambuco e Arquipélago de Fernando de Noronha, Brasil. *Acta bot. bras.* 22(4): 914-928.
- Blazina, M., Ivesa, L., Najdek, M. (2009). *Caulerpa racemosa* adaptive varieties studied by fatty acid composition (Northern Adriatic Sea, Vrsar, Croatia). *Eur. J. Phycol*, 44b (2): 183–189, doi: 10.1080/09670260802428250.
- Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C., Almeida, L. M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 35, n. 15: 161-169. Doi: 0003-9861/94
- Francis, G., Keren, Z., Makkar, H. P. S., Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*, 88, 587–605.
- Figueiroa, F. L. Vinegla, B. (2001). Effects of solar radiation on photosynthesis and enzyme activities (carbonic anhydrase and nitrate reductase) in marine macroalgae from southern Spain. *Revista Chilena de Historia Natural* 74: 237-249.

- Freile-Pelegrin, Y. and Morales, j. L., (2004) Antibacterial activity in marine algae from the coast of Yucatan, Mexico. *Botanica Marina* 47 (2004): 140–146.
- Gao, K. and Xu, J. (2008), Effects of solar UV radiation on diurnal photosynthetic performance and growth of *Gracilaria lemaneiformis* (Rodophyta). *Eur. J. Phycol.*, 43(3): 297–307.
- Gerasimenko, N. I., Martyyas, E. A., Logvinov, S. V., and Busarova, N. G. (2014). Biological Activity of lipids and Photosynthetic Pigments of *Sargassum pallidum* C. Agardh. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 50, No. 1, pp. 73–81.
- Gouda, S., Moharana, R. R., Das, G., Patra, J. K. (2013). Free radical scavenging potential of extracts of *Gracilaria verrucosa* (L) (Harvey): an economically important seaweed from Chilika lake, India. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol 6, Issue 1, 707-710.
- Gorbi, S., Giuliani, M. E., Pittura, L., d’Errico, G., Terlizzi, A., Fellingine, S., Grauso, L., Mollo, E., Cutignano, A., Regoli, F. (2014). Cold molecular effects of *Caulerpa racemosa* metabolites modulate the impact on fish populations of *Diplodus sargus*. *Marine Environmental Research*, 1e10,
- Güven, K. C., Percot, A., Sezik, E. Alkaloids in Marine Algae (2010). *Mar. Drugs*, 8, 269-284; doi:10.3390/md8020269.
- Harborne JB. Phytochemical methods. (1998). In: A guide to modern techniques of plant analysis. Edn 3, Chapman & Hall, London, 40-137.
- Kandhasamy, M.; Arunachalam, K. D. (2008) Evaluation of *in vitro* antibacterial property of seaweeds of southeast coast of India. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 7 (12), pp. 1958-1961
- Kumar, K., Mruthunjaya, K., Kumar, S., Mythreyi, R. (2013). Anti ulcer activity of ethanol extract of the stem bark of *Careya arborea* Roxb. *International Current Pharmaceutical Journal* 2(3): 78-82.
- Lambert, P. A. (2002). Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-Positive bacteria and mycobacteria. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 92, 46S–54S.
- Lee, B., (2008) Seaweed potential as a marine vegetable and other opportunities. Australian Government Rural Industries Research and Development Corporation, p. 11.
- Macedo, N. R. P. V., Ribeiro, M. S. R. Villaça, R. C., Ferreira, W., Pinto, A. M., Teixeira, V. L., Cirne-Santos, C., Paixão, I. C. N. P., Giongo, V. (2012) *Caulerpin* as potential antiviral drug against herpes simplex virus type 1. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22(4): 861-867, doi: 10.1590/S0102-695X2012005000072

- Maekawa, L. E., Lamping, R., Marcacci, S., Maekawa, M. Y., Nasrri, M. R. G., Koga-Ito, C. Y. (2007). Antimicrobial activity of chlorophyll-based solution on *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. RSBO v. 4, n. 2, 37.
- Milenkovic, S. M., Zvendanovic, J. B., Andelkovic, T. D., Markovic, D. Z. (2012) The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-Chromatography, visible and mass spectroscopy studies. *Advanced technologies*, 1(1), 16-24.
- Movahhedineh, N., Barah, J., Azard, F. F., Barzegari, A., Nazemiyer, H. (2014). Phytochemistry and biologic activities of *Caulerpa peltata* native to Oman Sea. *Iranian journal of Pharmaceutical Research*.
- Napoli, L., Fatorusso, E., Magno, S., and Mayol, L. (1982) Three Squalene derivatives from *Caulerpa racemosa*. *Phytochemistry*. Vol.21, No. 3, pp. 782-784. Doi: 10.1016/0031-9422(82)030782-0
- Paiva, L.S., R.F. Patarra, A.I. Neto, E.M.C. Lima & J.A.B. Baptista (2012). Antioxidant activity of macroalgae from the Azores. *Arquipelago. Life and Marine Sciences* 29: 01-06.
- Pereira, L. (2011) A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds. In: *Seaweed: Ecology Nutrient Composition and Medicinal Uses* (ed. V. H. Pomin), Nova Science Pub. Inc.: Hauppauge, NY; 15-49.
- Pires-Cavalcante, K. M. S., Alencar, D. B., Sousa, M. B., Sampaio, A. H., Saker-Sampaio, S. (2011) Seasonal Changes of α -Tocopherol in Green Marine Algae (*Caulerpa* genus), *Journal of Food Science*, Vol. 76, Nr. 5, doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02182.
- Ravikumar, S., Inbaneson, S. J. Suganthi, P., Gokulakrishnan, Venkatesan, M. (2011). In vitro antiplasmodial activity of ethanolic extracts of seaweed macroalgae against *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res*, 108:1411–1416 DOI 10.1007/s00436-010-2185-3
- Salem, W. M., Galal, H., El-Deen, N. F. (2011). Screening for antibacterial activities in some marine algae from the red sea (Hurghada, Egypt). *African Journal of Microbiology Research* Vol. 5(15) pp. 2160-2167, 4.
- Shevchenko, N. M.; Burteva, Y. V.; Zvyagintseva, T. N.; Makaeva, T. N.; Seergeva O, S.; Zakharenko, A. M.; Isakov, V. V.; Liinh, N. T.; Hoa, N. X.; Ny, LY, B. M.; Huyen, P. V. Polysaccharides and sterols from green algae *Caulerpa lentilifera* e *C. sertularioides*. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 45, n. 1, p. 1-5, 2009.
- Terrados, J., and Lopez-Jimenez, A. (1996). Fatty acid composition and chilling resistance in green alga *Caulerpa prolifera* (Forsskal) Lamouroux (Chlorophyta, Caulerpaceae). *Biochemistry and Molecular Biology International*. 39, (5): 863-869, doi: 10.1002/9712/96/050863~7505.00/0.
- Tian, X., Tang, H., Li, Y., Lin, H., Chen, X., Ma, N., Yao, M., Zhang, P. (2011) New Cytotoxic Oxygenated Sterols from the Marine Bryozoan *Cryptosula pallasiana*. *Mar. Drugs*, 9, 162-183; doi:10.3390/md9020162.

- 588 Tunzi, M. G., Chu, M. Y., Bain, R. C. B. (1974). In vivo fluorescence, extracted
589 fluorescence and chlorophyll concentrations in algal mass measurements. *Water Research* v.
590 1: 623-633.
591
- 592 Wright, G. D. (2014) Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic
593 drug discovery. *Can. J. Microbiol.* 60, 147–154, [dx.doi.org/10.1139/cjm-2014-0063](https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0063).
594
- 595 Yardav, R., Agarwala, M. (2011). M. Phytochemical analysis of some medicinal plants.
596 *Journal of Phytology* 3(12)10-14.
597
- 598 Zinadah, O. H. A., Khalil, W. K. B., Ashmaoui, H. M. E., Abdu, F., Alsoud, M. E. A. (2013)
599 Evaluation of the Anti-Genotoxicity and Growth Performance Impacts of Green Algae on
600 *Mugil cephalus*, *Life Science Journal*;10(3), 1543- 1554.

6. CONCLUSÕES

- O estudo sobre o perfil fitoquímico demonstrou a presença de saponinas e alcalóides tanto nas algas *Caulerpa racemosa* bentônicas quanto arribadas.
- Nos testes antioxidantes foi observado um menor IC₅₀ das algas bentônicas em relação às arribadas.
- O extrato bruto das algas bentônicas mostrou-se mais eficaz frente a bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *E. faecalis* e *Staphylococcus aureus*) e cepas resistentes de *Enterococcus* em relação às algas arribadas, que não apresentaram atividade antimicrobiana.
- Foram isolados quatro (04) compostos, a partir do sistema de cromatografia flash. Um possível metabólito da literatura reconhecido como caulerpicina e outras duas substâncias características de grupos esteroides, e uma substância que caracteriza uma mistura de compostos.

7. PERSPECTIVAS

Ficou claro que na busca por novos agentes antimicrobianos as algas *Caulerpa racemosa* encontradas no sul de Pernambuco abrem um leque de possibilidades para o isolamento de novos compostos em algas marinhas do litoral brasileiro. Contudo é preciso que sejam realizados testes adicionais, para verificar a citotoxicidade dos extratos e compostos purificados, assim como um estudo mais completo com outras avaliações antioxidantes in vivo, uma vez que existem populações que utilizam esta espécie de alga como alimento. O objetivo do trabalho foi encontrar atividade antimicrobiana, mas na revisão de literatura foi demonstrado que dependendo do local e do tipo de extração as algas de uma maneira geral apresentam uma variedade de ação biológicas. Por causa disso sugere-se que seja realizada uma análise da *Caulerpa racemosa* coletada em várias praias do litoral Pernambucano ou do nordeste para análise dos metabólitos secundários. Sugere-se adicionalmente a promoção de um cultivo racional destas algas, uma vez que estas apresentam uma atividade promissora frente à micro-organismos resistentes aos antibióticos convencionais.

Anexos



8. ANEXOS

8.1 Guia para formatação do artigo a ser submetido ao Journal of Applied Phycology

1. Instructions for Author

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

2. Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

3. Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

4. References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- **EndNote style (zip, 2 kB)**

5. Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

6. Artwork and illustration guidelines

Electronic Figure Submission

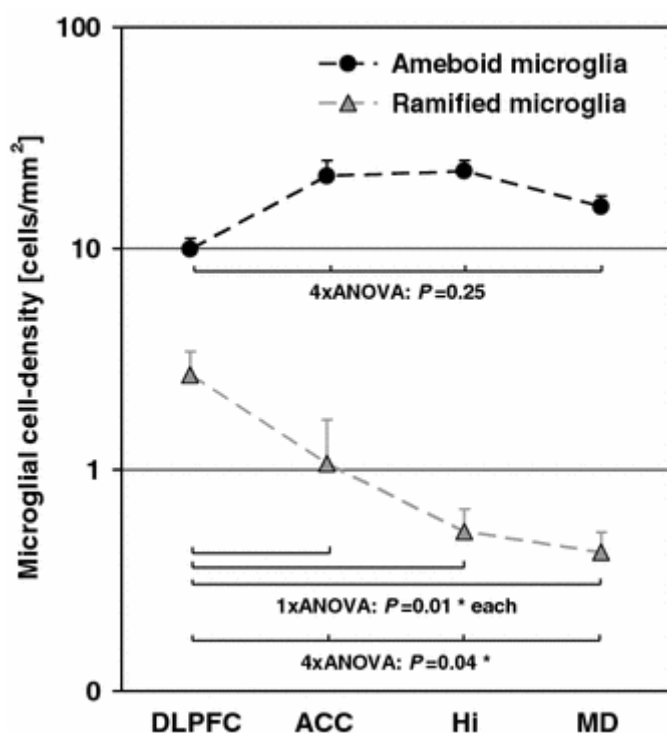
Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.



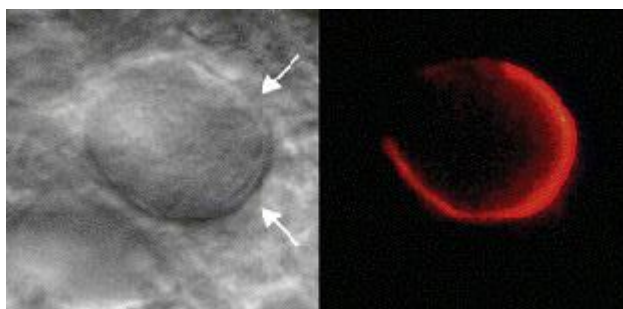
Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.



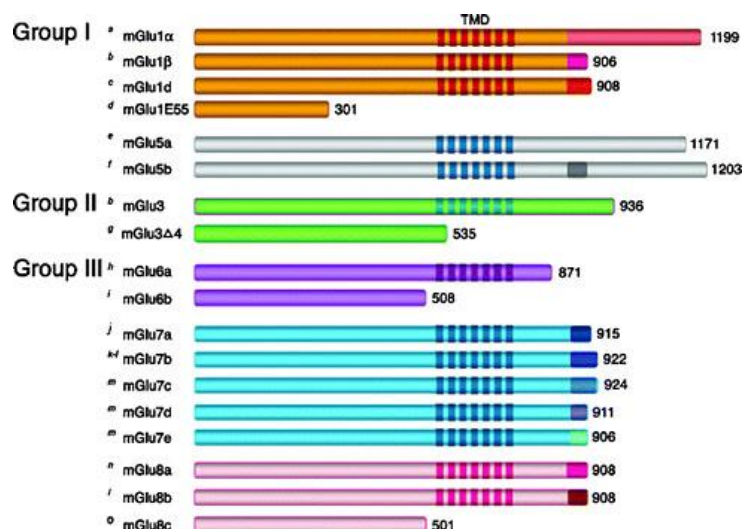
Halftone Art

halftone-gray-color

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi



Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc. Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,

"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts.

Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

7. Electronic supplementary material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.

Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk).

8. Does springer provide english language support?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in: Edanz English editing for scientists

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment

8. Ethical Responsibilities of authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”)).

- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

- Changes of authorship or in the order of authors are not accepted **after** acceptance of a manuscript.
- Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.

- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.
- The author's institution may be informed.

9. Compliance with ethical standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" before the References when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest

Research involving Human Participants and/or Animals

Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the Instructions for Authors carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

10. Disclosure of potential conflicts of interest

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor
- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

- [here](#):

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

11. After Acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- [Springer Open Choice](#)

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

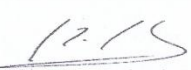
The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

8.2 Trabalhos apresentados em Congresso

Uma parte dos resultados encontrados durante a pesquisa foi apresentada no evento: “Encontro Científico, Tecnológico e Didático do Departamento de Biofísica e Radiobiologia, realizado pelo Departamento de Biofísica e Radiobiologia” na Universidade Federal de Pernambuco - UFPE.

C e r t i f i c a d o

Certificamos que o trabalho intitulado “*Avaliação antimicrobiana e perfil cromatográfico em algas do litoral Pernambucano*” foi apresentado por Brunna Fernanda Lira Patriota, Co-Autores: Maria Elizabeth Bandeira Pedrosa, Kêsia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena, Ricardo Yara, Ranilson de Souza Bezerra, Rafael Jorge Santos Aracati Padilha sob orientação de Cláudia Sampaio de Andrade Lima, durante o evento “Encontro Científico, Tecnológico, Extensionista e Didático do Departamento de Biofísica e Radiobiologia”, realizado pelo Departamento de Biofísica e Radiobiologia - CCB, nos dias 27 e 28 de janeiro de 2014, com carga horária total de 20 horas.


Prof. Edilson Fernandes de Souza
Pró-Reitor de Extensão


Cláudio Gabriel Rodrigues
Coordenador do Evento

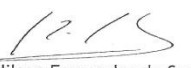
PROEXT
PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO

Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235, Cidade Universitária | Recife/PE



C e r t i f i c a d o

Certificamos que o trabalho intitulado “*Avaliação fitoquímica e atividade antioxidante em algas do litoral Pernambucano*” foi apresentado por Rafael Jorge Santos Aracati Padilha, Co-Autores: Brunna Fernanda Lira Patriota, Maria Elizabeth Bandeira Pedrosa, Kêsia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena, Ricardo Yara, Ranilson de Souza Bezerra sob orientação de Cláudia Sampaio de Andrade Lima, durante o evento “Encontro Científico, Tecnológico, Extensionista e Didático do Departamento de Biofísica e Radiobiologia”, realizado pelo Departamento de Biofísica e Radiobiologia - CCB, nos dias 27 e 28 de janeiro de 2014, com carga horária total de 20 horas.


Prof. Edilson Fernandes de Souza
Pró-Reitor de Extensão


Cláudio Gabriel Rodrigues
Coordenador do Evento

PROEXT
PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO

Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235, Cidade Universitária | Recife/PE

