



**Università  
degli Studi  
di Palermo**

AREA RICERCA E TRASFERIMENTO  
TECNOLOGICO  
SETTORE DOTTORATI E CONTRATTI PER  
LA RICERCA  
U. O. DOTTORATI DI RICERCA

Scienze Molecolari e Biomolecolari  
Dipartimento di scienze e tecnologie biologiche chimiche e farmaceutiche  
Settore Scientifico Disciplinare BIO/05

**ESTRATTI DI MACROALGHE *ERICARIA CRINITA*, *ERICARIA BRACHYCARPA* E *ASPARAGOPSIS TAXIFORMIS*: DAGLI EFFETTI SUL RICCIO DI MARE *ARBACIA LIXULA* (LINNEO, 1758) ALLE POTENZIALI APPLICAZIONI**

**IL DOTTORE  
ROSARIO BADALAMENTI**

**IL COORDINATORE  
PROF.SSA GIOVANNA PITARRESI**

**IL TUTOR  
PROF. VINCENZO ARIZZA**

**IL CO-TUTOR  
PROF. ANTONIO PALUMBO PICCIONELLO**

CICLO XXXVI  
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2024





Scienze Molecolari e Biomolecolari  
Dipartimento di scienze e tecnologie biologiche chimiche e farmaceutiche  
Settore Scientifico Disciplinare BIO/05

**ESTRATTI DI MACROALGHE *ERICARIA CRINITA*, *ERICARIA BRACHYCARPA* E *ASPARAGOPSIS TAXIFORMIS*: DAGLI EFFETTI SUL RICCIO DI MARE *ARBACIA LIXULA* (LINNEO, 1758) ALLE POTENZIALI APPLICAZIONI**

**IL DOTTORE  
ROSARIO BADALAMENTI**

**IL COORDINATORE  
PROF.SSA GIOVANNA PITARRESI**

**IL TUTOR  
PROF. VINCENZO ARIZZA**

**IL CO-TUTOR  
PROF. ANTONIO PALUMBO PICCIONELLO**

**CICLO XXXVI  
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2024**

# Indice

<b>1. Introduzione</b>	pag. 10
1.1 Le Alghe	pag. 10
1.2 Le Cistoseire	pag. 11
1.2.1 Aspetti Ecologici	pag. 13
1.2.2 <i>E. crinita</i> e <i>E. brachycarpa</i>	pag. 13
1.2.3 Le molecole bioattive delle Cistoseire	pag. 14
1.2.3.1 <i>I terpeni</i>	pag. 16
1.3 Macroalghe alloctone: <i>A. taxiformis</i>	pag. 19
1.3.1 Le molecole bioattive estratte da <i>A. taxiformis</i>	pag. 21
1.4 Proprietà biologiche di <i>E. crinita</i> e <i>E. brachycarpa</i> e <i>A. taxiformis</i>	pag. 24
1.4.1 Antimicrobiche	pag. 24
1.4.2 Antinfiammatorie	pag. 25
1.4.3 Antiossidanti	pag. 27
1.4.4 Citotossiche	pag. 28
1.5 Attività miorilassante delle macroalghe	pag. 31
1.6 Attività immunomodulante di macroalghe negli organismi acquatici	pag. 32
1.7 Bio-marker dello stress negli organismi acquatici	pag. 33
1.8 L'organismo modello <i>Arbacia lixula</i>	pag. 37
1.9 Sistema immunitario degli echinodermi	pag. 39
1.10 Sviluppo embrionale nel riccio di mare	pag. 44
1.10.1 Effetti dello stress sullo sviluppo embrionale	pag. 46
<b>2. Scopo del lavoro</b>	pag. 48
<b>3. Estrazione, caratterizzazione e valutazione del contenuto fenolico negli estratti di <i>E. brachycarpa</i>, <i>E. crinita</i>, <i>A. taxiformis</i></b>	pag. 50
3.1 Materiali e Metodi	pag. 50
3.1.1 Campionamento e preparazione degli estratti algali	pag. 50
3.1.2 Caratterizzazione dei metaboliti presenti nei tre estratti algali mediante HPLC-MS	pag. 50
3.1.3 Valutazione del contenuto fenolico degli estratti algali CHCl <sub>3</sub> -MeOH	pag. 50
3.2 Risultati e discussioni	pag. 50
3.2.1 Metaboliti presenti negli estratti algali	pag. 50

3.2.2 Contenuto fenolico degli estratti algali	pag. 59
<b>4. Valutazione dell'attività antimicrobica contro patogeni di origine alimentare</b>	pag. 60
4.1 Materiali e Metodi	pag. 60
4.2 Risultati e discussioni	pag. 60
<b>5. Valutazione dell'attività citotossica estratti di macroalghe</b>	pag. 63
5.1 Materiali e Metodi	pag. 63
5.1.1 Attività Emolitica vs Eritrociti di Mammifero	pag. 63
5.1.2 Attività citotossica vs linee cellulari SH-SY5Y	pag. 63
5.1.2.1 Elettroforesi e Western blot	pag. 64
5.1.2.2 Saggio di frammentazione del DNA	pag. 66
5.1.2.3 Analisi statistica	pag. 66
5.1.3 Attività citotossica vs linee cellulari HepG2	pag. 66
5.1.3.1 Analisi statistica	pag. 66
5.2 Risultati e discussioni	pag. 67
5.2.1 Attività Emolitica vs Eritrociti di Mammifero	pag. 67
5.2.2 Attività citotossica EBE vs linee cellulari SH-SY5Y	pag. 68
5.2.2.2 Elettroforesi, Western blot e Frammentazione del DNA	pag. 69
5.2.3 Attività citotossica EBE, ECE, ATE vs linee cellulari HepG2	pag. 73
<b>6. Valutazione dell'attività miorilassante estratti di <i>A. taxiformis</i> su colon di <i>Rattus norvegicus</i></b>	pag. 75
6.1 Materiali e Metodi	pag. 75
6.1.1 Analisi dei dati	pag. 77
6.2 Risultati e discussioni	pag. 77
<b>7. Valutazione dell'attività immunomodulante di estratti di <i>E. brachycarpa</i>, <i>E. crinita</i>, <i>A. taxiformis</i> sul riccio di mare <i>A. lixula</i></b>	pag. 81
7.1 Materiali e Metodi	pag. 81
7.1.1 Animali	pag. 81
7.1.2 Piano sperimentale	pag. 81
7.1.3 Analisi biochimiche sui lisati cellulari e sui cell-free	pag. 84

7.1.4 Concentrazione proteica e saggi enzimatici	pag. 84
7.1.5 Analisi statistica	pag. 85
<b>7.2 Risultati e discussioni</b>	pag. 85
7.2.1 Conte cellulari	pag. 85
7.2.2. ROS, Nitriti, GSH	pag. 86
7.2.3 Concentrazione proteica, esterasi, fosfatasi alcalina	pag. 92
<b>8. Valutazione dell'attività embriotossica dell'estratto di <i>E. brachycarpa</i> in <i>A. lixula</i></b>	pag. 97
8.1 Materiali e metodi	pag. 97
8.1.1 Campionamento, fecondazione e trattamento di <i>A. lixula</i>	pag. 97
8.1.2 Analisi morfologica degli embrioni di riccio di mare	pag. 98
8.1.3 Curve dose-risposta	pag. 99
8.1.4 Elettroforesi, Western blot	pag. 99
8.1.5 Saggio Frammentazione del DNA	pag. 100
8.1.6 Analisi statistica	pag. 100
8.2 Risultati e discussioni	pag. 100
8.2.1 Curve dose-risposta	pag. 100
8.2.2 Analisi morfologica degli embrioni di riccio di mare	pag. 102
8.2.2.1 <i>Valutazioni dell'effetto di EBE ad alte concentrazioni</i>	pag. 104
8.2.3 Elettroforesi, Western blot e frammentazione del DNA	pag. 106
<b>9. Valutazione dell'attività di pascolo di <i>A. lixula</i> sulle macroalghe <i>E. crinita</i> e <i>Caulerpa taxifolia</i> var. <i>disticophilla</i></b>	pag. 112
9.1 Materiali e metodi	pag. 112
9.1.1 Campionamento di ricci e macroalghe	pag. 112
9.1.2 Piano sperimentale	pag. 112
9.1.3 Analisi statistica	pag. 113
9.2 Risultati e discussioni	pag. 113
<b>10. Conclusioni</b>	pag. 116
<b>11. REFERENZE BIBLIOGRAFICHE</b>	pag. 120

## Abstract

The study of macroalgae is essential for the understanding of marine ecosystems, and for the exploitation of the economic resources that they represent as a source of biomolecules with high biological value. This study involved the extraction and chemical characterization of secondary metabolites present in the macroalgae species *Ericaria crinita*, *Ericaria brachycarpa* and *Asparagopsis taxiformis* and the evaluation of their biological properties. The characterization of secondary metabolites allowed the identification of compounds: predominantly oxylipin in *E. brachycarpa* extracts, meroterpenoids in *E. crinita* and brominated compounds in *A. taxiformis*. In particular, the analyses allowed us to determine a high phenolic content in the extracts in the *E. crinita* species. Subsequently, the extracts were used to evaluate the antimicrobial activity against some bacterial strains of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* and cytotoxic activity vs mammalian erythrocytes, neuroblastoma and hepatocarcinoma cells. Regarding antibacterial activity, the extracts of *E. brachycarpa* and *A. taxiformis* they act across a broad spectrum towards *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* strains. These extracts showed a low haemolytic activity towards mammalian erythrocytes (< 5%) at concentrations  $\leq 40 \mu\text{g/ml}$ .

Subsequently, *E. crinita* and *E. brachycarpa* extracts were tested to evaluate the antitumor activity against HepG2 and SH-SY5Y tumor cell lines. The results obtained demonstrated that at the tested concentrations the *E. crinita* and *E. brachycarpa* extracts exerted anti-tumor activity towards HepG2 tumor cell line, while the anti-tumor dosage of *E. brachycarpa* extracts showed the important cytotoxic activity towards tumor cell line SH-SY5.

Finally, based on the results previously obtained, the muscle relaxant activity (*ex vivo*) of the extracts of the macroalgae *A. taxiformis* on the smooth muscles of the colon of *Rattus norvegicus* was evaluated. *A. taxiformis* extract was able to regulate the intestinal motility of *R. norvegicus* showing antispasmodic activity.

Based on the results obtained, it was decided to evaluate the effects of these extracts using the model organism *Arbacia lixula*, one of those responsible for the degradation of Cystoseira in the marine environment. Cell counts, levels of ROS, NO, GSH, total protein concentration and enzymatic activity of esterase and alkaline phosphatase were used as biological parameters of the haemolymph in control and treated animals. The results showed important changes in the enzymatic activities after 3 hours of *in vivo* treatment. The cytotoxic activity of algal extracts on the embryonic development of *A. lixula* was analyzed only after studying their anti-tumor activity against the tumor cell lines HepG2 and SH-SY5Y, testing 4 concentrations (1,4,20,40  $\mu\text{g/ml}$ ) at 24, 48 and 72 hours after fertilization of sea urchins. The results obtained showed how the *E. brachycarpa* extract, at a

concentration of 40 µg/ml, causes 100% mortality (apoptosis) of *A. lixula* embryos. In fact, the embryos exposed to the highest concentration of *E. brachycarpa* (40 µg/ml) degenerate, while at lower concentrations (1-4 µg/ml) the extract shows activity, delaying the embryonic development of the urchins and showing significant characteristics morphological variations in the different stages of development of the embryos.

Based on the literature and results previously obtained on *A. lixula*, a study was conducted on the trophic interaction between the sea urchin *Arbacia lixula* and two species of macroalgae, *E. crinita* and *Caulerpa taxifolia* var. *disticophilla*. It emerged that *A. lixula* is capable of grazing both species of macroalgae, showing a preference for the non-native one. This result provided an important basis for understanding the possible role of *A. lixula* in containing the spread of alien macroalgae.

In conclusion, the results obtained demonstrate how the compounds present in the tested macroalgae species possess antioxidant properties that could be used for the food and livestock industry, potentially capable of improving the level of antioxidants and allowing a greater shelf life of food products. Furthermore, the potential applications, regarding the pharmaceutical industry, are considerable interest, since these compounds would allow the potential development of drugs with anti-inflammatory, anti-tumor, intestinal antispasmodic, and antibiotic therapeutic action. Finally, the results obtained for the first time showed the presence of oxylipin in the *E. brachycarpa* extract and his possible influence on the embryonic development of *A. lixula*, suggesting a potential defence mechanism that could be implemented by the *Cystoseira* against its herbivores.

## **Abstract**

Lo studio delle macroalghe è essenziale per la comprensione degli ecosistemi marini e per lo sfruttamento delle risorse economiche che esse rappresentano come fonte di biomolecole ad alto valore biologico. Questo studio ha comportato l'estrazione e la caratterizzazione chimica dei metaboliti secondari presenti nelle specie di macroalghe *Ericaria crinita*, *Ericaria brachycarpa* e *Asparagopsis taxiformis* e la valutazione delle loro proprietà biologiche. La caratterizzazione dei metaboliti secondari ha permesso l'identificazione dei composti: prevalentemente ossilipine negli estratti di *E. brachycarpa*, meroterpenoidi in *E. crinita* e composti bromurati in *A. taxiformis*. In particolare, le analisi hanno permesso di determinare un elevato contenuto fenolico negli estratti della specie *E. crinita*. Successivamente, gli estratti sono stati utilizzati per valutare l'attività antimicrobica contro alcuni ceppi batterici di *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* e l'attività citotossica verso eritrociti di mammifero, cellule di neuroblastoma ed epatocarcinoma. In particolare, per quanto riguarda l'attività antibatterica, gli estratti di *E. brachycarpa* e *A. taxiformis* agiscono ad ampio spettro nei confronti dei ceppi di *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Questi

estratti hanno mostrato una bassa attività emolitica nei confronti degli eritrociti di mammifero (< 5%) a concentrazioni  $\leq 40 \mu\text{g/ml}$ .

Successivamente gli estratti di *E. crinita* ed *E. brachycarpa* sono stati testati per valutare l'attività antitumorale nei confronti delle linee cellulari tumorali HepG2 e SH-SY5Y. I risultati ottenuti hanno dimostrato che alle concentrazioni testate gli estratti di *E. crinita* ed *E. brachycarpa* hanno esercitato attività antitumorale verso la linea tumorale HepG2, mentre il dosaggio antitumorale degli estratti di *E. brachycarpa* ha mostrato l'importante attività citotossica verso la linea tumorale SH-SY5Y.

Infine, sulla base dei risultati precedentemente ottenuti, è stata valutata l'attività miorilassante (*ex vivo*) degli estratti della macroalga *A. taxiformis* sulla muscolatura liscia del colon di *Rattus norvegicus*. L'estratto di *A. taxiformis* è stato in grado di regolare la motilità intestinale di *R. norvegicus* mostrando attività antispasmodica.

Sulla base dei risultati ottenuti si è deciso di valutare gli effetti di questi estratti utilizzando l'organismo modello *A. lixula*, uno dei responsabili della degradazione delle Cistoseire in ambiente marino. La conta cellulare, i livelli di ROS, NO, GSH, la concentrazione di proteine totali e l'attività enzimatica di esterasi e fosfatasi alcalina sono stati utilizzati come parametri biologici del fluido celomatico negli animali di controllo e trattati. I risultati hanno mostrato importanti cambiamenti dei livelli di ROS, NO, GSH e delle attività enzimatiche dopo 3 ore di trattamento *in vivo*. L'attività citotossica degli estratti algali sullo sviluppo embrionale di *A. lixula* è stata analizzata solo dopo aver studiato la loro attività antitumorale nei confronti delle linee cellulari tumorali HepG2 e SH-SY5Y, testando 4 concentrazioni (1,4,20,40  $\mu\text{g/ml}$ ) a 24, 48 e 72 ore dopo la fecondazione di ricci di mare. I risultati ottenuti hanno mostrato come l'estratto di *E. brachycarpa*, alla concentrazione di 40  $\mu\text{g/ml}$ , provoca una mortalità (apoptosi) del 100% degli embrioni di *A. lixula*. Infatti, gli embrioni esposti alla concentrazione più alta di *E. brachycarpa* (40  $\mu\text{g/ml}$ ) degenerano, mentre a concentrazioni più basse (1-4  $\mu\text{g/ml}$ ) l'estratto manifesta attività, ritardando lo sviluppo embrionale dei ricci e mostrando variazioni significative morfologiche nelle diverse fasi di sviluppo degli embrioni.

Sulla base della letteratura e dei risultati precedentemente ottenuti su *A. lixula*, è stato condotto uno studio sull'interazione trofica tra il riccio di mare *Arbacia lixula* e due specie di macroalghe, *E. crinita* e *Caulerpa taxifolia* var. *disticophilla*. È emerso che *A. lixula* è in grado di pascolare entrambe le specie di macroalghe, mostrando una preferenza per quella non autoctona. Questo risultato ha fornito una base importante per comprendere il possibile ruolo di *A. lixula* nel contenere la diffusione delle macroalghe aliene.

In conclusione, i risultati ottenuti dimostrano come i composti presenti nelle specie di macroalghe testate possiedano proprietà antiossidanti che potrebbero essere utilizzate per l'industria alimentare e zootecnica, potenzialmente in grado di migliorare il livello di antiossidanti e consentire una maggiore

conservabilità dei prodotti alimentari. Inoltre, le potenziali applicazioni, per quanto riguarda l'industria farmaceutica, sono di notevole interesse, poiché questi composti permetterebbero il potenziale sviluppo di farmaci con azione terapeutica antinfiammatoria, antitumorale, antispasmodica intestinale e antibiotica. Infine, i risultati ottenuti hanno mostrato per la prima volta la presenza di ossilipine nell'estratto di *E. brachycarpa* e la sua possibile influenza sullo sviluppo embrionale di *A. lixula*, suggerendo un potenziale meccanismo di difesa che potrebbe essere messo in atto dalla *Cystoseira* contro i suoi erbivori.

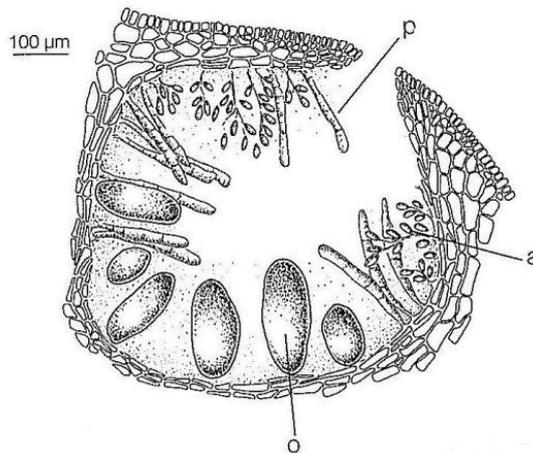
## **1. Introduzione**

### **1.1 Le Alghe**

Le alghe sono organismi fotosintetici, procariotici ed eucariotici che svolgono un ruolo importante come produttori primari in diversi ecosistemi di acqua dolce e marina producendo sostanza organica, fissando la CO<sub>2</sub> e rilasciando O<sub>2</sub>. I processi fotosintetici permettono alle alghe di produrre numerose molecole attraverso il metabolismo primario e secondario. I metaboliti primari sono molecole prodotte da tutti gli organismi e sono essenziali per la loro vita (Dewick, 2002). I metaboliti secondari sono invece biomolecole spesso specifiche per ciascun organismo, rilasciati nell'ambiente (Sarker et al. 2001), generalmente essenziali per lo sviluppo, che svolgono anche funzione di messaggeri chimici o di difesa contro predatori (Hay, 1996; Dewick 2002; Pohnert e Boland, 2002; Cembella, 2003; Legrand et al., 2003). Tra le alghe appartenenti alla divisione Heterokontophyta è stato dimostrato che composti comprendenti aldeidi polinsature (PUA), derivate da acidi grassi con unità idrossi-, cheto-, osso- e idrossi-epossidiche, genericamente denominati ossilipine, esplicano attività embriotossica (d'Ippolito et al., 2018; Ruocco et al., 2020). Questi composti sono prodotti e rilasciati negli ambienti acquatici in seguito alla degradazione enzimatica degli acidi grassi polinsaturi indotta in seguito alla rottura della membrana cellulare (d'Ippolito et al., 2002; Pohnert, 2002; Watson et al., 2001; Watson, 2003; Watson e Satchwill, 2003; Hansen et al., 2004; Wichard et al., 2005b). Infatti, un composto derivato dalle diatomee, il 2E,4E-decadienale è stato ampiamente utilizzato come aldeide modello che ha dimostrato di indurre alterazioni della replicazione del DNA e degli eventi mitotici durante la segmentazione degli embrioni di riccio di mare e dello sviluppo degli embrioni nei crostacei (Caldwell et al., 2003; Hansen et al., 2004). Questi composti sono prodotti dalle diatomee e le macroalghe brune per svolgere la funzione di messaggeri chimici e anche di difesa contro i pascolatori (Pohnert, 2002).

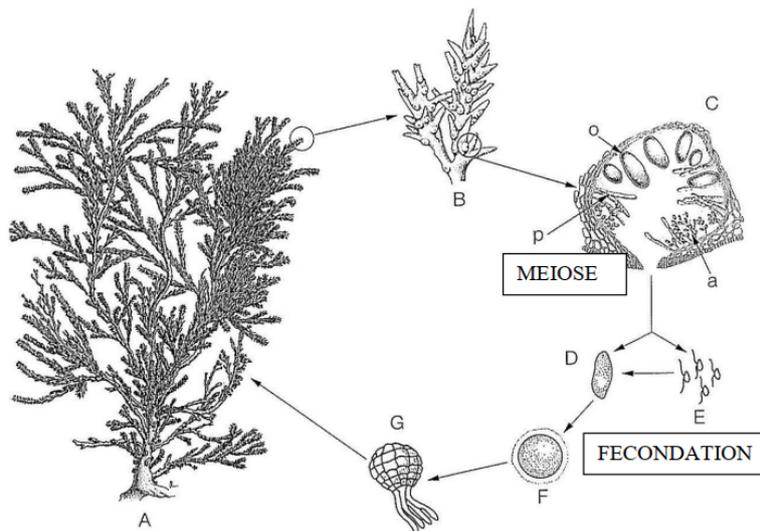
## 1.2 Le Cistoseire

Tra le macroalghe brune dell'ordine Fucales la famiglia Sargassaceae comprende circa 400 specie (Liu et al., 2012). All'interno della famiglia Sargassaceae il genere *Cystoseira* è esclusivamente marino ed è distribuito nell'Atlantico orientale, nelle coste del Mediterraneo, dell'Adriatico e nell'arcipelago della Macaronesia (Guiry, 2016; Orellana et al. 2019). Da un punto di vista morfologico i talli delle Cistoseire sono semiperennanti costituiti da un cauloide cilindrico o piatto con rami primari e secondari, che si attaccano al substrato roccioso mediante un disco basale (Garreta et al. 2001). La variabilità morfologica rende spesso difficile l'identificazione delle specie, rendendo per tanto necessaria l'analisi molecolare. Per esempio, alcune specie come *Ericaria selaginoides* e *Treptacantha nodicaulis*, possono presentare un'iridescenza blu, viola o verde quando osservate sott'acqua. Nelle Fucales la riproduzione è oogama, caratterizzata da piccoli gameti maschili mobili (5  $\mu\text{m}$ ) e da un gamete femminile grande e immobile (100-200  $\mu\text{m}$ ) (Garreta et al. 2001). I gameti maschili mobili presentano due flagelli, uno liscio rivolto verso la parte posteriore e uno munito di peli (pleuronematico) rivolto verso la parte anteriore (Guern, 1962). Il ciclo è monogenetico diplonte, caratterizzato da una generazione diploide (2n) in cui lo sporofito produce i gameti (n) attraverso una divisione meiotica (Fig. 2) (Garreta et al. 2001). Questa generazione produce all'interno di concettacoli, sullo stesso individuo o su individui diversi, gametocisti maschili e femminili (Fig. 1). I concettacoli non sono isolati ma riuniti a formare ricettacoli. Le gametocisti maschili, a forma di sacche ovoidali, contengono pacchetti di 64 gameti (Fig.1) (Garreta et al. 2001). Al momento della riproduzione, i pacchetti di gameti maschili vengono rilasciati attraverso l'ostiolo del concettacolo. Una volta in acqua, la parete che circonda il pacchetto si rompe rilasciando i 64 gameti. Il gamete femminile, oogonio (Fig. 2) a seguito di divisioni meiotiche e mitotiche darà origine a 8 nuclei aploidi circondati da tre pareti (Garreta et al. 2001). Di questi 8 nuclei solo uno è attivo mentre gli altri degenerano. Una volta in acqua, le tre pareti si rompono lasciando uscire i nuclei (Garreta et al. 2001).



**Figura 1** Immagine di una sezione trasversale del concettacolo di *Ericaria mediterranea*. a) gametocisti maschili, o) gametocisti femminile e p) parafisi (cellule sterili come funzione meccanica) (Garreta et al. 2001)

I gameti maschili fecondano quindi l'oosfera e si forma lo zigote che precipita sul substrato. Dopo 15-24 ore dalla fecondazione (Susini, 2006), lo zigote inizia la segmentazione e compaiono i primi rizoidi che consentono allo zigote di aderire al substrato. Una volta che lo zigote aderisce bene al substrato inizia ad accrescersi per mitosi generando un nuovo sporofito 2n (Garreta et al. 2001).



**Figura 2** Schema del ciclo riproduttivo di *Cystoseira*. A) Individuo maturo, B) estremità del ramo con concettacoli, C) concettacolo in sezione trasversale, D) gamete femminile, E) gameti maschili, F) zigote, G) embrione con rizoidi (Garreta et al. 2001).

### 1.2.1 Aspetti Ecologici

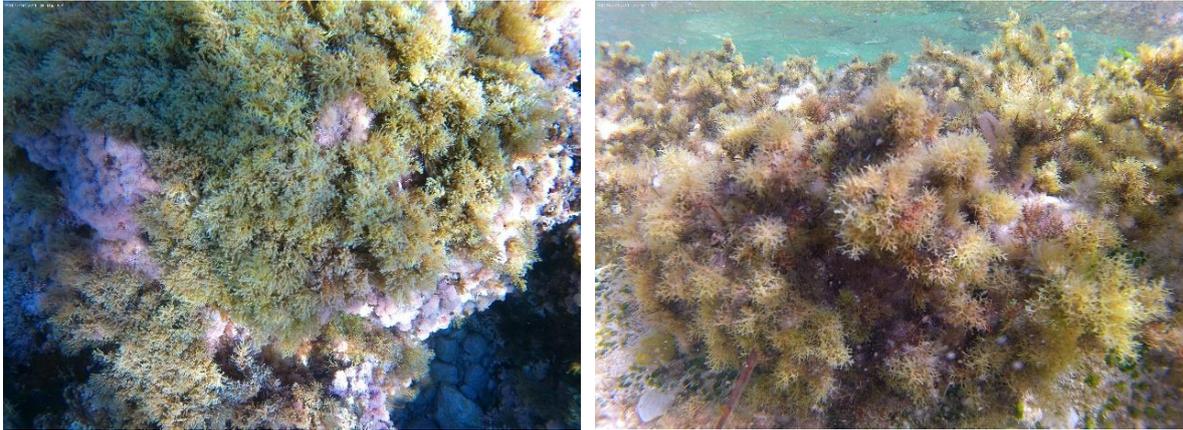
La maggior parte delle Cistoseire sono considerate specie che strutturano l'habitat in 3 dimensioni. Di conseguenza, le foreste di *Cystoseira* ospitano grandi numeri di specie diverse (Sauvageau, 1912; Funk, 1927; Ballesteros et al. 1998). Alcuni possono formare vere e proprie foreste e associazioni fitosociologiche come: *Cystoseiretem crinitae* (Molinier 1960), *Cystoseiretum strictae* (Molinier 1960), *Cystoseiretum sauvageauanae* (Giaccone et al. 1994), *Cystoseiretum barbatae* (Pignatti, 1962), *Cystoseiretum balearicae* (Verlaque 1987; Giaccone et al. 1994), *Cystoseiretum caespitosae* (Ballesteros, 1990b). In effetti, le foreste di *E. brachycarpa* var. *balearica* e *E. crinita* svolgono un ruolo essenziale come rifugi nella fase giovanile di molte specie di teleostei costieri come *Symphodus* spp., *Labrus* spp e *Seranus* spp. (Cheminée et al. 2013). Inoltre, i Cistoserieti, secondo i criteri della direttiva quadro sulle acque dell'Unione Europea (Direttiva quadro 2000/60 / CE), sono indicatori di acque costiere di alta qualità (Bermejo et al. 2013).

### 1.2.2 *E. crinita* e *E. brachycarpa*

*Ericaria crinita* (Fig. 3; a destra) è una specie endemica del Mar Mediterraneo, presente in tutto il bacino del Mediterraneo (Ribera et al. 1992, Sales et al. 2012), segnalata anche nell'Oceano Atlantico ed alle Isole Canarie (Pizzuto 1999). Questa specie è perennante e il tallo si presenta di colore scuro e non iridescente, cespitosa con più di due cauloidi che aderiscono al substrato mediante un disco basale che si accresce maggiormente in primavera (Sales et al. 2012). Gli assi eretti hanno lunghezza che può raggiungere i 20–30 centimetri e diametro sino a mezzo centimetro e sono di solito più scuri delle fronde (Garreta et al. 2001)). Alla base non hanno tofuli, ma possono presentare cicatrici provocate dal distacco dei vecchi rami e gli apici sono prominenti e portano spine piuttosto lunghe (Garreta et al. 2001). Si incontra su substrati rocciosi e ben illuminati, generalmente soggetti a poco o a ridotto moto ondoso nella zona infralitorale superiore in lieve pendenza (Sales e Ballesteros 2009, 2010, 2012). È una specie che svolge un ruolo importante nelle comunità infralitorali (Boudouresque 1972, Ballesteros 1992) ed è altamente sensibile alle pressioni umane (Sales et al. 2011). Questa specie è sottoposta all'eccessiva attività di pascolo da parte dei ricci di mare (*Arbacia lixula* e *Paracentrotus lividus*) e risente della presenza di alghe invasive aliene come *Lophocladia lallemandii* e *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea*.

La specie *Ericaria brachycarpa* (sinonimi *Cystoseira brachycarpa*, *Carpodesmia brachycarpa*) (Fig. 3; a sinistra) è endemica nel Mar Mediterraneo e distribuita ampiamente nel Mediterraneo occidentale (Sauvageau, 1912; Ribera et al., 1992; Garreta et al. 2001). I talli di questa specie sono arborescenti alti fino a 25 cm, di colore bruno chiaro e le ramificazioni primarie e di ordine superiore cilindriche, sono provviste di abbondanti appendici spinose nella parte terminale (Garreta et al. 2001) che si

accregono maggiormente in primavera (Hoffmann et al., 1992). Questa specie fotofila forma dense popolazioni su substrati rocciosi della zona infralitorale superiore (Ballesteros, 1990a; Pizzuto, 1999) ed è sensibile all'aumento della temperatura che ne influenza lo sviluppo e la riproduzione (Bellissimo et al., 2014). I principali consumatori di *E. brachycarpa* nel Mediterraneo sono i ricci di mare, *P. lividus* e *A. lixula*, e il pesce sparide *Sarpa salpa*, responsabili della degradazione di questa specie e di altre cistoseire (Vergés et al. 2009; Agnetta et al. 2015; Piazzì e Ceccherelli, 2019).



**Figura 3** Popolamenti a *E. brachycarpa* (a sinistra) e di *E. crinita* (a destra) (Photo©: Dott. Rosario Badalamenti).

### 1.2.3 Le molecole bioattive delle Cistoseire

Negli ultimi anni sta crescendo la domanda di prodotti di origine naturale, in quanto più efficaci e con minori effetti collaterali rispetto a quelli di sintesi (Carocho et al., 2013). Per esempio, le macroalghe contengono varie molecole bioattive, alcune delle quali hanno suscitato interesse per le loro potenziali applicazioni medicinali, nutrizionali o industriali (Duarte et al., 2016; de Sousa et al., 2017). Le cistoseire sono macroalghe brune che producono numerosi composti come: fucoidani, polifenoli, pigmenti fotosintetici, alginati e terpeni (Matos et al., 2021; El-Beltagi et al., 2022; El-Sheekh et al., 2023).

I fucoidani sono carboidrati complessi presenti in varie specie di alghe brune e sono conosciuti per le loro importanti proprietà benefiche per la salute dell'uomo, tra cui proprietà antinfiammatorie, antiossidanti e immunomodulanti (Saeed et al., 2021; Apostolova et al., 2022). I polifenoli presenti nelle cistoseire sono diversi e includono: florotannini, flavonoidi, lignani e tannini (Fernando et al., 2016; Jimenez-Lopez et al., 2021; Subbiah, et al., 2023; Ravichandran et al., 2024).

Questi composti sono noti per le loro proprietà antiossidanti ed aiutano a proteggere le alghe da fattori di stress ambientale come le radiazioni UV e i predatori (Jimenez-Lopez et al., 2021; Fernando et al., 2022a; Nabil-Adam et al., 2023). I florotannini hanno anche suscitato interesse in vari campi grazie

alle loro proprietà benefiche per la salute dell'uomo, tra cui proprietà antinfiammatorie, antitumorali e antidiabetiche (Meng et al., 2021; Zheng et al., 2022). Inoltre, per queste molecole si conoscono le potenziali applicazioni nel settore alimentare, farmaceutico e cosmetico (Sanjeeva et al., 2016; Javed et al., 2021; Fernando et al., 2022b).

I flavonoidi sono caratterizzati dalla loro struttura chimica costituita da 15 atomi di carbonio disposti in tre anelli (A, B e C) sui quali posso avere varie sostituzioni su questi anelli, portando ad un'ampia gamma di strutture e funzioni biologiche (Kumar e Pandey, 2013). Per questa ragione, a questi composti sono attribuite numerose proprietà biologiche quali: antimicrobiche (Pistelli e Giorgi, 2012.), antiossidanti (Shen, et al., 2019), antinfiammatorie (Al-Khayri et al., 2022), neuroprotettive (Putteeraj et al., 2018), epatoprotettive (Yadav et al., 2020) e protettive sulla pelle (Domaszewska et al., 2021).

I lignani sono un gruppo di polifenoli con peculiarità specifiche in quanto, essendo fitoestrogeni, possono imitare o modulare gli effetti degli estrogeni nel corpo umano (Ricci, 2012). Infatti, numerosi studi hanno dimostrato come riescano a regolare i sintomi della menopausa (Baeza e De la Fuente, 2013), l'osteoporosi (Martiniakova et al., 2020) o riescono a contrastare lo sviluppo di alcuni tipi di cancro ormone-dipendente come, ad esempio, il cancro al seno (Pan et al., 2015) e alla prostata (Peuhu 2013). I tannini, sebbene siano comunemente associati alle piante terrestri, in ambiente acquatico sono presenti in diverse specie di macroalghe brune (Yegdaneh et al., 2016). Per esempio, alcuni autori conducendo delle analisi chimiche su estratti di *Cystoseira indica* e *Cystoseira merica*, hanno indentificato diversi tannini in queste specie di alghe brune (Yegdaneh et al., 2016).

I principali pigmenti fotosintetici presenti nelle cistoseire (alghe brune) includono: Clorofilla a e c, Fucoxantina e  $\beta$ -carotene (Mikami et al., 2013; Din et al., 2022). Questi pigmenti fotosintetici insieme cooperano nel catturare l'energia luminosa attraverso l'assorbimento della luce solare alle diverse lunghezze d'onda, nei diversi piani batimetrici marini, massimizzando l'efficienza della fotosintesi nelle alghe brune (Barrett et al., 1977; Songaila et al., 2013; dos Santos et al., 2019). Inoltre, a questi composti sono associate numerose proprietà benefiche per l'uomo quali: nutrizionali (Burri et al., 1997; Grune et al., 2010; Jan et al., 2011; Zhang et al., 2015; Kang et al., 2018; Zepka et al., 2019; Miyashita et al., 2020; Martins et al., 2023), antiossidanti (Demirel et al., 2009; Rodríguez-Bernaldo de Quirós et al., 2010; Fung et al., 2013; Fariman et al., 2016), detossificanti (Mishra et al., 2011; Rocha et al., 2018; Hayes et al., 2020; Wei et al., 2021), antinfiammatorie (Subramoniam et al., 2012; Kawata et al., 2018; Liu et al., 2018; Phan et al., 2018; Carvalho et al., 2020; Bigagli et al., 2021), rigenerative (Ahn et al., 2019; Chen et al., 2020; Guvatova et al., 2020; Dadashkhan et al., 2021; Suwanmanee et al., 2023), anti-obesità (Coronel et al., 2019; Marcelino et al., 2020; Mumu et al., 2022; Figueiredo et al., 2023), antitumorali (Dashwood et al., 1997; Tanaka et al., 2012; Terasaki et

al., 2021), cardioprotettive (Agarwal et al., 2012; Sakil et al., 2018; Mohibbullah et al., 2022), per la pelle (Joshi et al., 2018; Lourenço-Lopes et al., 2021; Kalasariya et al., 2022; Martins et al., 2023), per la vista (Christaki et al., 2013; Zarekarizi et al., 2019; Bhatt et al., 2020).

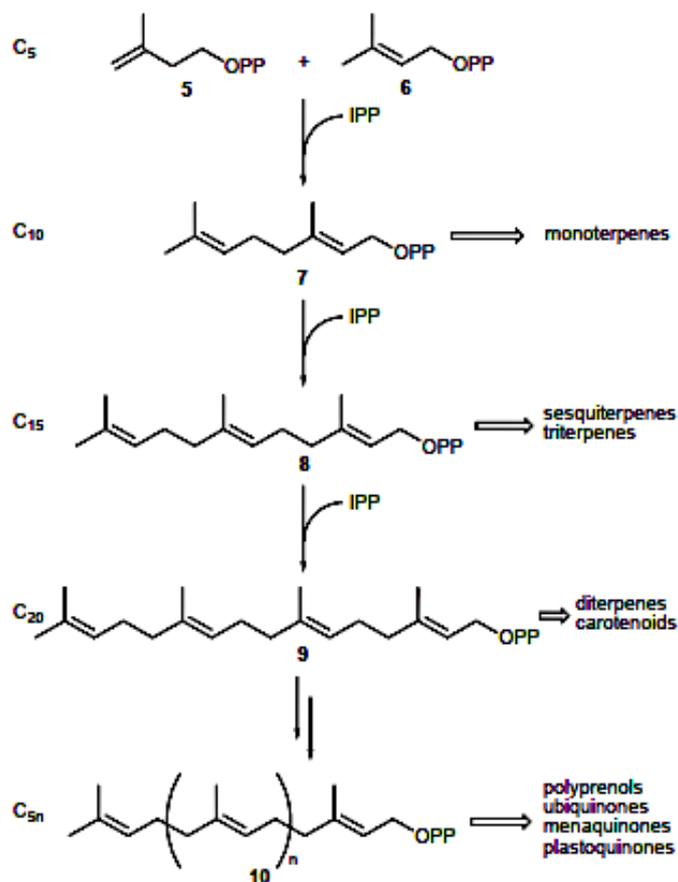
Gli alginati sono dei polisaccaridi presenti nelle macroalghe brune (Trica et al., 2019; Benslima et al., 2021; Aitouguinane et al., 2023), e hanno varie applicazioni industriali, compreso il loro uso come agenti addensanti, gelificanti e stabilizzanti negli alimenti, nei prodotti farmaceutici e nei cosmetici (Paolini et al., 2003; Qin et al., 2018; Priyan Shanura Fernando et al., 2019; Abka-Khajouei et al., 2022).

### ***1.2.3.1 I terpeni***

I terpenoidi sono derivati delle unità prenili a cinque atomi di carbonio, unite in un legame testa-coda a formare catene di 10, 15, 20, 25, 30 e 40 atomi di carbonio (Ashour et al., 1995; Wagner et al., 2003).

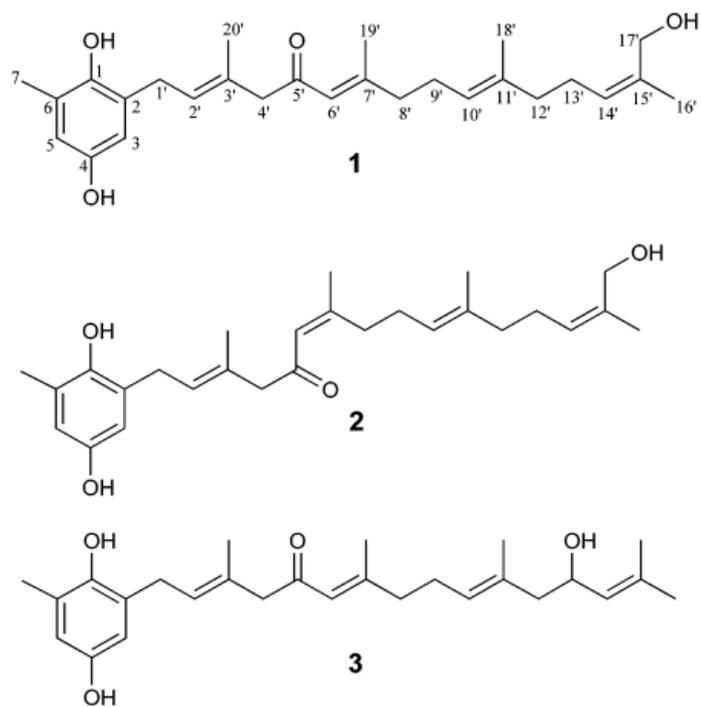
Queste catene ciclizzando producono diverse strutture consentendo la produzione di molecole altamente complesse in seguito anche a riarrangiamenti scheletrici (Christianson, 2017).

Ogni gruppo di molecole ha un particolare ruolo nelle attività delle piante e delle alghe. Alcuni tetraterpeni, come i carotenoidi, forniscono diverse colorazioni ai vegetali mentre i triterpeni, precursori della sintesi di fitormoni, modulano lo sviluppo delle cellule e proteggono la membrana dei cloroplasti dove avviene la sintesi sia della clorofilla che dei carotenoidi (Tziveleka et al., 2021; Habeebullah et al., 2023). I triterpeni producono anche gli steroli che sono fondamentali nella cellula perché garantiscono la fluidità e la permeabilità del doppio strato fosfolipidico delle membrane cellulari e sono importanti precursori ormonali (Barreira et al., 2015). La biosintesi dei terpenoidi avviene tramite due vie alternative che possono coesistere: un percorso è quello dell'acido mevalonico (MVA), mentre il secondo è il cosiddetto MEP/DOXP (2-C-metil-D-eritritolo 4-fosfato/1-deossi-D-xilulosio 5-fosfato) (Monson, 2013). Il primo percorso, il più comune, è utilizzato dai batteri, piante, animali e funghi, mentre il secondo avviene nei batteri, alghe e piante (Rohmer, 1999; Kant et al., 2023). Le piante usano entrambi i percorsi, anche se li localizzano in diversi compartimenti cellulari: i cloroplasti e il citosol per le vie MEP e MVA, rispettivamente. Nel citosol vengono prodotti sesquiterpenoidi e triterpenoidi, nei plastidi si sintetizzano mono-, di- e tetraterpenoidi e infine, nei mitocondri e/o nell'apparato di Golgi, l'ubichinone (Vranová et al., 2013; Liao et al., 2016; Kant et al., 2023). In entrambi i percorsi, si sintetizzano DMAPP (dimethylallyl diphosphate) ed IPP (isopentenyl diphosphate) (Fig. 4) che rappresentano lo starter ed il building block, rispettivamente, nella sintesi delle catene terpeniche ad opera delle prenil transferasi (Malico et al., 2020; Chen et al., 2024)



**Figura 4** Schema della via metabolica del mevalonato per la biosintesi degli isoprenoidi. A partire da IPP 5 che è l'equivalente biologico dell'isoprene con scheletro a cinque atomi di carbonio ramificato dell'unità isoprenica. 2,3 Preniltransferasi catalizza la condensazione di IPP 5, dimetialil difosfato 6, geranyl difosfato 7, farnesile difosfato 8, geranylgeranyl difosfato 9, poliprenil difosfati 10 (Rohmer 1999).

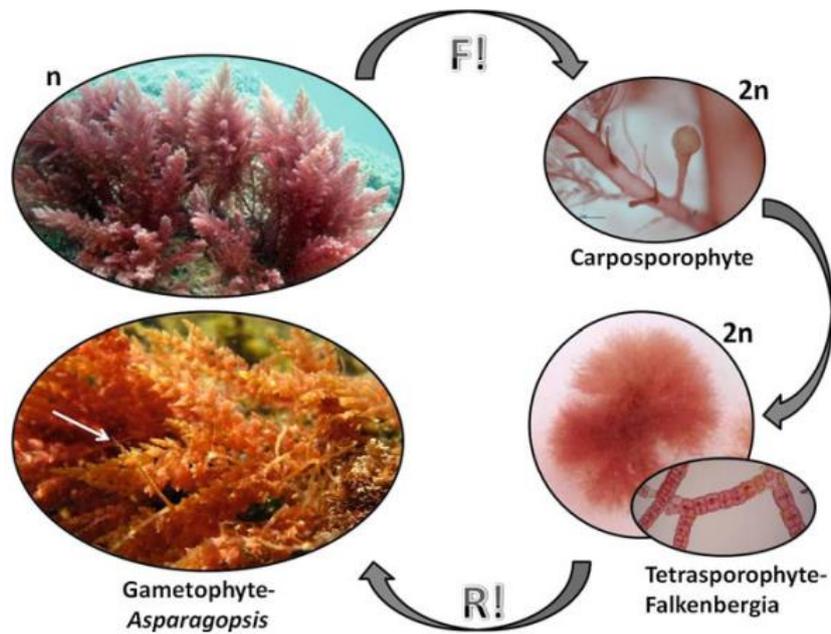
Inoltre, esiste una classe di terpeni, che si origina per biosintesi mista, chiamata meroterpeni. Nell'ambiente marino, questi metaboliti secondari sono isolati principalmente da: alghe brune come *Cystoseira* (Fadli M. et al. 1991), microrganismi (Cueto M. et al. 2006), coralli molli (Sheu J.H. et al. 2004) o invertebrati marini, come spugne o ascidie (Mitome H. et al. 2002; Garrido L. et al. 2002). I meroterpeni (Fig. 5) sono costituiti principalmente da un chinone o idrochinone legato ad una porzione terpenoide che può variare da una a nove unità preniliche (Fig. 5)



**Figura 5** Alcuni esempi di meroterpeni isolati dall'alga bruna *Ericaria crinita* (Fisch et al. 2003).

### 1.3 Macroalghe alloctone: *A. taxiformis*

*Asparagopsis* è un genere di alghe rosse della famiglia Bonnemaisoniaceae, rappresentato solo da due specie, *Asparagopsis armata* e *Asparagopsis taxiformis*. Entrambe le specie sono originarie dell'Australia occidentale, la prima è endemica dell'emisfero sud e la seconda è distribuita nelle zone tropicali e subtropicali (Chualáin et al., 2004). *Asparagopsis taxiformis* è invasiva nella regione indo-pacifica, inclusi Giappone e Hawaii, in tutto il Mediterraneo e lungo la costa atlantica europea ed è considerata un'immigrata pre-lessepsiana (Andreakis et al., 2004). È stata segnalata per la prima volta nel Mar Mediterraneo in Egitto da Delile et al., (1813). Probabilmente l'introduzione di *A. taxiformis* nel mediterraneo è avvenuta tramite l'acquacoltura di ostriche (Otero et al., 2013). Questa specie insieme ad *A. armata* hanno mostrato un forte comportamento invasivo e per tale motivo sono state incluse nella lista "Worst invasive alien species threatening biodiversity in Europe" (EEA 2007) e nell'elenco delle 100" Worst Invasives in the Mediterranean Sea "(Streftaris et al., 2006). Questo genere di macroalghe ha un ciclo trigenetico eteromorfo, in cui si alternano gametofito (n), carposporofito (2n, microscopico) e tetrasporofito (2 n) filamentoso (stadio a Falkenbergia) (Feldmann et al., 1942; Rojas et al., 1982) (Fig. 6). Il gametofito (n) (Fig. 7) cresce nel piano infralitorale e si presenta con un tallo eretto raggruppato in ciuffi di colore rosa (Fig. 6). Il carposporofito (2n), è microscopico, cresce sul gametofito femminile (che lo ha prodotto), come parassita (gonotrofia). Il tetrasporofito (2n) è composto da un insieme di filamenti pluriseriati microscopici che si aggregano in una struttura simile a uno pompon attaccati ad altre alghe (Fig. 6). Si ritiene che le fasi della vita microscopica siano più resistenti e favoriscono la dispersione, di queste macroalghe, a lunga distanza (Breeman et al., 1988).



**Figura 6** Ciclo biologico del genere *Asparagopsis*. La freccia bianca indica la struttura a forma di arpione caratteristica di *A. armata*, non presente in *A. taxiformis*. F! fecondazione; R! meiosi, n: livello di ploidia. (Zanolla et al., 2016).

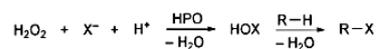


**Figura 7** Gametofito di *Asparagopsis taxiformis* (Photo©: Dott. Rosario Badalamenti).

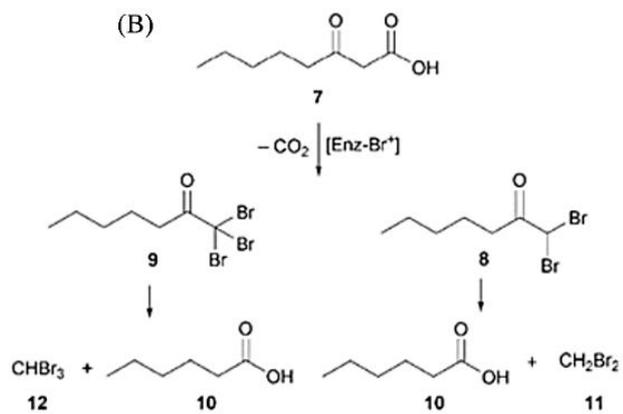
### 1.3.1 Le molecole bioattive estratte da *A. taxiformis*

Come nelle macroalghe sopra descritte, anche nel caso di *A. taxiformis* ci sono numerose molecole capaci di mostrare numerose proprietà biologiche (Ponte et al., 2022). In particolare, questa specie in letteratura è conosciuta per la capacità di produrre numerosi composti alogenati (McConnell e Fenical, 1977), tra cui i polialometani. La biosintesi dei polialometani (come  $\text{CHCl}_3$  o  $\text{CH}_2\text{Br}_2$ ) è catalizzata dalle aloperossidasi (HPO) (Butler et al., 2004, Butler e Carter-Franklin, 2004; Neumann et al., 2008; Butler e Sandy, 2009; Winter e Moore, 2009; Paul e Pohnert, 2011). Questi enzimi possono contenere ferro o vanadato come cofattori e sono classificati sulla base dell'alogenuro più elettronegativo che riescono ad ossidare. Per esempio, ci sono le perossidasi che sono capaci di ossidare cloruro, bromuro e ioduro (cloroperossidasi). La classe più dominante di aloperossidasi tra le alghe marine sono le bromoperossidasi (BrPO), per lo più dipendenti dal vanadio e presenti in tutti i tipi di alghe delle divisioni Chlorophyta (Manthey e Hager, 1981; Ohshiro et al. 1999), Rhodophyta (Theiler et al., 1978; Sheffield et al., 1993) ed Heterokontophyta (Wever et al., 1985, de Boer et al., 1986; Moore et al., 1996). Durante la reazione dell'alo-perossidasi, l' $\text{H}_2\text{O}_2$  viene utilizzata per ossidare gli anioni alogenuro mediante un'ossidazione a due elettroni producendo il corrispondente acido HXO. Questo intermedio reattivo  $\text{X}^+$  può quindi essere utilizzato per alogenare substrati organici ricchi di elettroni (Fig. 8-A). Nelle alghe, la formazione di dibromometano e bromoformio avviene attraverso il precursore acido 3-chetoottanoico (Fig. 8-B7). Dopo la sua decarbossilazione, la bromurazione produce gli intermedi **8** e **9** (Fig. 8-B9). Questi subiscono poi reazione aloformica per via non enzimatica, producendo i rispettivi alometani e l'acido esanoico (Fig. 8-B10) (Paul e Pohnert, 2011). (Theiler et al., 1978; Beissner et al., 1981). Il rilascio di specie di alogeni ossidati da parte della BrPO extracellulare, e la successiva reazione con la materia organica disciolta nell'acqua di mare, può rappresentare un meccanismo alternativo per la formazione dei polialometani (Manley, 2002). Nelle macroalghe si osserva tipicamente la produzione di idrocarburi alogenati con catena più lunga. Nelle alghe rosse e brune sono stati segnalati anche alcoli, aldeidi e chetoni alogenati, così come idrocarburi  $\text{C}_3$ - $\text{C}_5$  mono e polialogenati (Le Pape e Grua-Priol, 1993; Giese et al., 1999; Moore et al., 1999). L'alga rossa *Asparagopsis taxiformis* è una risorsa prolifica per questi metaboliti, producendo idrocarburi insaturi funzionalizzati (Fig. 8-C) (Moore, 1977; Kladi et al., 2004, Burrenson et al., 1976; Woolard et al., 1976).

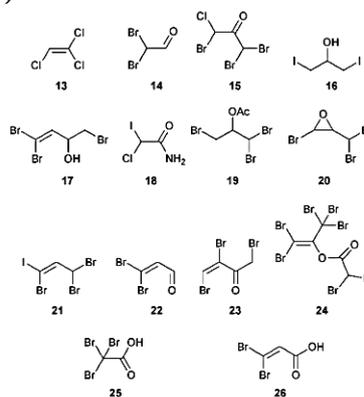
(A)



(B)

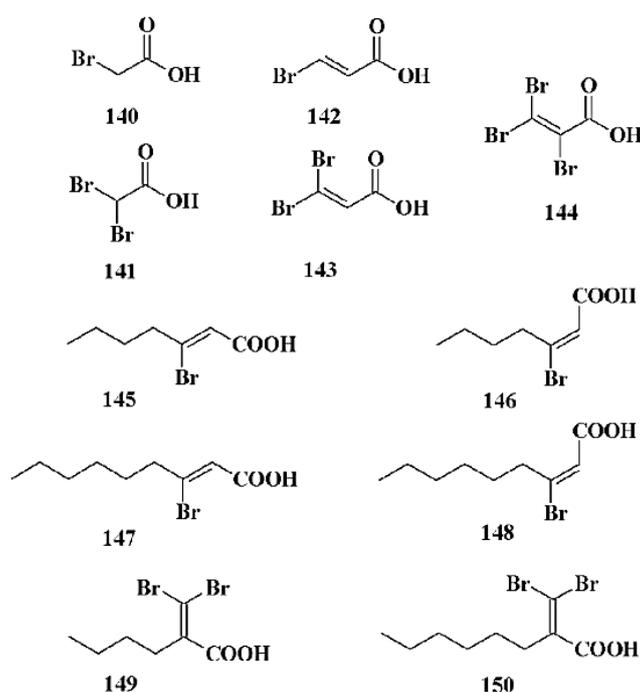


(C)



**Figura 8** A) Reazione dell'alooperossidasi con substrati organici; B) Biosintesi dei polialometani; C) Aloidrocarburi algali a catena corta (Paul e Pohnert, 2011).

Inoltre, nel genere *Asparagopsis* le specie *A. taxiformis* e *A. armata* sintetizzano una serie di derivati dell'acido acetico e acrilico (Fig. 9 X; **140-144**) (McConnell e Fenical, 1977), con forme Z ed E dell'acido 3-bromo-2-eptanoico (Fig. 9 X; **145, 146**), e Z-E degli acidi 3-bromo-2-nonanoici (Fig. 9-**147 e 148**), scoperti anche nelle alghe rosse *Bonnemaisonia nootkana*, *Bonnemaisonia hamifera* e *Trilliella intricata* (McConnell e Fenical, 1977). Tra i vari composti isolati ci sono anche gli acidi dibromo-2-n-butilacrilico (Fig. 9-**149**) e 3,3-dibromo-2-n-esilacrilico (Fig.9-**150**) dalle specie di alghe *B. nootkana*, *B. hamifera* e *T. intricata* (Burreson et al., 1976).



**Figura 9** Composti acetici, bromurati e acidi acrilici prodotti e identificati nella famiglia delle Bonnemaisoniaceae (Dembitsky e Srebnik, 2002)

Tuttavia, ad oggi, non sono stati riportati esperimenti sulla biosintesi di questi metaboliti, ma si può razionalizzare che le HPO siano piuttosto aspecifiche, e coinvolte nella produzione di questi composti ad elevata diversità strutturale (Paul e Pohnert, 2011).

## 1.4 Proprietà biologiche di *E. crinita*, *E. brachycarpa* e *A. taxiformis*

### 1.4.1 Antimicrobiche

Negli ultimi anni sta diventando sempre più difficoltoso combattere i microorganismi patogeni a causa dell'aumento della resistenza agli antibiotici (Fleming et al., 2017). Per superare questo problema, sono stati esplorati nuovi farmaci derivati da prodotti naturali, come ad esempio le macroalghe marine (de Sousa et al., 2017). In ambiente marino la biodiversità delle alghe marine contribuisce alla produzione di numerosi composti strutturalmente nuovi e biologicamente attivi (Sandsdalen et al., 2003; Tüney et al., 2006; Erbabley e Junianto 2020). Tra le macroalghe brune la famiglia delle Sargassaceae è conosciuta per la capacità di produrre biomolecole che esprimono importanti attività antimicrobiche (de Sousa et al., 2017; Moubayed et al., 2017; Li et al., 2018; Palanisamy et al., 2019; Abu-Khudir et al., 2021). Per esempio, estratti in metanolo-acqua ottenuti dalle specie *Carpodesmia crinita* (oggi *Ericaria crinita*) e *Carpodesmia brachycarpa* (oggi *E. brachycarpa*) esprimono attività inibente verso il ceppo Gram-positivo *Kocuria rhizophila* (Maggio et al., 2022), invece un estratto etanolicco di *Cystoseira brachycarpa* (oggi *E. brachycarpa*) (500 µg/disco) è stato capace di creare un alone di inibizione (>20 mm) nei confronti di tutti i batteri testati, simile a quello del controllo positivo (rifampicina 30 µg) (Wahidi et al., 2015). Altri estratti in metanolo ottenuti da *E. crinita* hanno mostrato importanti attività antimicrobiche nei confronti di diverse specie batteriche patogene di Gram-positivi e negativi (Alghazeer et al., 2013; Berber et al., 2015; Abu-Khudir et al., 2021). Dall'estratto in metanolo-cloroformio (1:1) di *E. crinita*, sono state prodotte delle sotto frazioni, dalle quali è stata determinata la minima concentrazione inibente (MIC) verso la specie *Staphylococcus aureus*. Le sotto frazioni che hanno dato maggiore attività (MIC 250 µg/ml) sono state quelle ottenute in cloroformio e n-butanolo (Kamenarska et al., 2009). Alcuni estratti ottenuti mediante idro-distillazione (metodo Clevenger) dalla specie *E. crinita* hanno permesso di ottenere degli oli essenziali che hanno mostrato un'elevata attività contro *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. D'altro canto, gli estratti in cloroformio e diclorometano hanno avuto elevata efficacia contro *Bacillus cereus* ATCC 10876 (Tayyibe Beyza YÜCEL, 2022). Recentemente, utilizzando metodi green di estrazione (estratto acquoso) di *E. crinita* combinato a nanoparticelle di ossido di zinco e di ossido di magnesio, è stata riportata un'eccellente attività antimicrobica contro vari batteri patogeni e funghi (Elrefaey et al., 2022; Fouda et al., 2022).

Per quanto riguarda il genere *Asparagopsis* produce diverse sostanze biologicamente attive, con proprietà benefiche per l'uomo e gli animali (Moigne, 1998, Cabrita et al., 2010; Blunt et al., 2018; Machado et al., 2016a). La specie *A. taxiformis* è conosciuta per la sua capacità di produrre quantità significative di oli essenziali composti da cloro-, bromo-, metani anche contenenti iodio, etanolo,

etano, aldeidi, chetoni, 2-acetossipropani, epossipropani, derivati del propene e dell'acroleina. (Burreson et al., 1976; Genovese et al., 2012; Magnusson et al., 2020).

Riguardo la specie aliena *A. taxiformis* diversi autori hanno dimostrato che gli estratti di questa specie hanno importanti attività antimicrobiche verso *Aeromonas salmonicida*, *Aspergillus fumigatus*, *A. fumigates*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Bacillus subtilis*, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Limnea truncatula*, *Mycobacterium smegmatis*, *Photobacterium damsela*, *Photobacterium piscicida*, *Photobacterium aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* e attività antiprotozoaria sulla *Leishmania* (Capone et al., 1997; Val et al., 2001; Manilal et al., 2010; Genovese et al., 2013; Parsaeimehr e Chen, 2013; Vitale et al., 2015; Saim et al., 2021; Ktari et al., 2022) e anti-cianobatterica (Capone et al., 1997). Mentre, gli estratti etanolici di *A. taxiformis* hanno effetti inibitori su *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus* e *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* (Cormaci et al., 2004). Inoltre, è stato dimostrato che alcuni composti di *A. taxiformis* sono capaci di modulare il Quorum sensing nei batteri esposti, mostrando quindi anche proprietà antivegetative (Jha et al., 2013).

In tempi recenti numerosi studi stanno dimostrando come questa specie di macroalga sia capace di ridurre le emissioni di metano *in vitro* e negli allevamenti di ruminanti tra il 42.7% e il 98.0%, grazie alla capacità di questa specie, di inibire lo sviluppo dei batteri metanogeni presenti nel microbiota (Li et al., 2018; Kinley et al., 2016; Machado et al., 2016a; Machado et al., 2016b; Li et al., 2018; Machado et al., 2018; Roque et al., 2019b; Abbott et al., 2020; Roque et al., 2020; Min et al., 2021; Stefenoni et al., 2021; Camer-Pesci et al., 2023).

### 1.4.2 Antinfiammatorie

La risposta infiammatoria a stimoli potenzialmente dannosi (lesioni, stress o infezioni) include il rilascio di mediatori proinfiammatori come il fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), l'interleuchina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e l'interleuchina 6 (IL-6). Il TNF- $\alpha$  induce l'attivazione dei macrofagi e aumenta la produzione, per esempio, di IL-1 $\beta$  e IL-6. IL-6 è noto come mediatore endogeno della febbre indotta da lipopolisaccaride (LPS) mentre IL-1 $\beta$  è prodotta principalmente dai macrofagi ed è coinvolto nella fisiopatologia dell'artrite reumatoide. I loro livelli elevati promuovono un'inflammazione prolungata e infiltrazione di monociti, granulociti, linfociti e mastociti nel sito della lesione. Quando attivati, queste cellule potrebbero favorire un'inflammazione eccessiva (manifestata con dolore ed edema) e il conseguente danno tissutale (Lee et al., 2012; Jeong et al., 2017; Muralidharan et al., 2013; Apostolova et al., 2020). Si ritiene che il consumo di alghe marine brune migliori alcuni disturbi

infiammatori, il cancro al seno ed il livello elevato di colesterolo (Fitton, 2003). La forte associazione tra l'aumento del consumo di questi prodotti naturali e la prevenzione delle malattie umane è stata spiegata dal contenuto di fitonutrienti (Halliwell e Gutteridge, 1997). Il genere *Cystoseira* è una potenziale risorsa di nuove biomolecole per l'industria farmaceutica, infatti questo genere produce composti come: polifenoli, polisaccaridi, pigmenti e acidi grassi, che possiedono importanti attività antinfiammatorie (Olate-Gallegos et al., 2019; Graiff et al., 2016; Khan et al., 2007).

Studi condotti *in vivo* su ratti "Wistar" hanno dimostrato come gli estratti acquosi, fucoidani e alginati ottenuti da *C. crinita*, saggiati alle dosi di 25.5 mg/kg, hanno prodotto una significativa diminuzione dell'edema della zampa, dei danni alla mucosa indotti dall'agente necrotizzante HCl/EtOH e dei livelli di IL-6 e nel siero nei ratti (Mhadhebi et al., 2014; Hadj Ammar et al., 2015; Apostolova et al., 2022; Kokova et al., 2023). Un altro studio ha valutato l'attività antinfiammatoria di estratti (in CHCl<sub>3</sub> e AcOEt) di *E. crinita*, alla dose di 50 mg/kg, mostrando l'inibizione della formazione dell'edema del 81.7 e 84.9% dopo 3 ore dal trattamento (Mhadhebi et al., 2011). Mansur, (2022) stimolando i macrofagi umani con LPS e successivamente trattandoli con estratti in metanolo di *E. crinita*. (250 µg/ml), ha rilevato una inibizione significativa del rilascio di TNF- $\alpha$  e IL-1  $\beta$  rispettivamente del 40 e 50% paragonati ai controlli positivi, di fatto riducendo l'infiammazione prodotta da LPS. Le cicloossigenasi (COX) sono enzimi fondamentali nella biosintesi delle prostaglandine e responsabili del processo fisiopatologico dell'infiammazione. L'enzima COX si presenta in tre isoforme, COX-1, COX-2 e COX-3. La COX-1 si trova nei tessuti normali, dove controlla la produzione di prostaglandine ed è necessaria per la normale funzione fisiologica. La COX-2 invece viene prodotta durante il processo di infiammazione e carcinogenesi (Ye et al., 2005; Khan, 2007; Wang e DuBois, 2015; Pang et al, 2016). I farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) bloccano gli enzimi COX-1 e COX-2 in misura diversa e riducono la biosintesi delle prostaglandine (Steinmeyer, 2000; Minghetti, 2004). Il blocco della COX-1 causa diverse complicazioni, la più comune delle quali è l'ulcerazione del tratto gastrointestinale (Brune e Patrignani, 2015).

Diversi studi dimostrano come composti bromurati prodotti dagli organismi marini riescono ad inibire l'attività delle COX-2 (Meijer et al., 2003; Ahmad, 2004; Benkendorff et al, 2015; Ahmad et al., 2017). Estratti acquosi di *A. taxiformis* hanno avuto la capacità di inibire in modo significativo l'attività della COX-2 (Julião et al., 2021). Altri autori utilizzando come solvente di estrazione l'etanolo, hanno valutato l'attività antinfiammatoria degli estratti ottenuti da *A. taxiformis* contro le COX-2. I risultati di questo studio hanno evidenziato come l'estratto in etanolo di *A. taxiformis*, sottoposto a differenti metodi di conservazione, e testato alla concentrazione di 1 mg/ml, è stato capace di inibire le COX-2 del 40 % (Regal et al., 2020).

### 1.4.3 Antiossidanti

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) includono l'anione superossido ( $O_2^{\cdot-}$ ), il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) e i radicali idrossilici (OH), e queste molecole inducono un danno verso lipidi, proteine e DNA (Cross et al., 1987). I danni ossidativi sono responsabili di molte malattie croniche come: malattie coronariche, l'aterosclerosi, cancro e l'invecchiamento (Finkel et al., 2000). Per prevenire o ridurre la gravità di queste malattie importante è l'azione degli antiossidanti che possono esercitare un effetto protettivo (Li et al., 2007). A riguardo, di recente gli antiossidanti sintetici causano particolari preoccupazioni e scarsa affidabilità in quanto responsabili di danni epiteliale, infiammazione gastriche e favorendo la carcinogenesi (Felter et al., 2021). Per questa ragione sta crescendo la necessità di scoprire e utilizzare molecole prodotte dalle piante e dalle alghe in quanto importantissime fonti naturali di composti antiossidanti (Fukumoto and Mazza, 2000; Duan et al., 2006; Kelman et al., 2012; Roohinejad et al., 2017). Tra le macroalghe la famiglia delle Sargassaceae è conosciuta per produrre numerosi composti antiossidanti (de Sousa et al., 2017). Fisch et al., (2003), hanno estratto e identificato nella specie *E. crinita* numerosi composti meroterpenici i quali hanno espresso attività antiossidanti paragonabili a quelle del butilidrossitoluene (BHT sintetico). Altri estratti (in  $CH_2Cl_2$ ) di *E. crinita*, in cui erano presenti composti tetrapreniltoluchinoli, che hanno mostrato valori della relativa efficienza antiossidante (relative antioxidant efficacy, RAE) di 0.4 paragonata all'attività antiossidante del  $\alpha$ -tocoferolo (Ruberto et al., 2001). Analogamente utilizzando il test antiossidante del DPPH per valutare il potere antiossidante degli estratti di *E. crinita* in metanolo (a freddo) alle concentrazioni di 50 - 250  $\mu g/ml$ , hanno mostrato un  $IC_{50}$  di 125  $\mu g/ml$  (Abu-Khudir et al., 2021), mentre altri autori testando la componente polisaccaridica dei fucoidani ottenuta da *E. crinita* mostrato valori di  $EC_{50}$  pari a 0.8 mg/ml (Hadj Ammar et al., 2015 Lukova et al., 2023). Mentre utilizzando altri estratti di *E. crinita*, preparati a diverse concentrazioni (1000, 500, 250, 125 e 62.5  $\mu g/mL$ ), hanno permesso di evidenziare proprietà antiossidanti simili a quelle dell'acido ascorbico (Berber et al., 2015). Recentemente utilizzando metodi di estrazione "green" (estratti acquosi) in *E. crinita* combinati a nanoparticelle di ossido di zinco hanno mostrato attività antiossidante (Elrefaey et al., 2022). Mentre valutando il potere antiossidante del solo estratto acquoso di questa specie ha permesso di mostrare l'attività antiossidante simile a quella del Trolox (un derivato sintetico della vitamina E) (Mhadheb et al., 2014).

La specie *A. taxiformis*, è conosciuta per essere ricca di iodio a tal punto che alcuni autori suggeriscono il suo utilizzo per migliorare la malattia del gozzo (Kaliaperuma, 2003).

Produce numerosi metaboliti alogenati, che spesso funzionano come composti di difesa, includendo bromo e iodio derivati, che vengono prodotti e immagazzinati in apposite cellule ghiandolari specializzate (Paul et al., 2006a). Analizzando il contenuto fenolico degli estratti di questa specie è

possibile apprezzare numerosi composti capaci di esprimere importanti attività antiossidanti (Chan et al., 2015). Per esempio, altri autori usando estratti in EtOH di *A. taxiformis* hanno registrato valori alti del contenuto fenolico totale e della clorofilla A. Inoltre, utilizzando i test antiossidanti del FRSA (Free radical scavenging activity), RA (Reducing Activity) e FIC (ferrous ion chelation) rilevandone un elevato potere antiossidante (Nunes et al., 2018). Altri autori testando estratti acquosi e metanolici di *A. taxiformis* hanno registrato importanti attività di inibizione contro i radicali superossido e dell'ossido nitrico, con valori di IC<sub>50</sub> di 5.1 e 15.0 µg/ml rispettivamente, quando il valore dello standard (acido ascorbico) di riferimento era di IC<sub>50</sub> 3.7 µg/ml. Inoltre, gli estratti acquosi e metanolici hanno mostrato una forte inibizione del processo di perossidazione lipidica dell'acido linoleico ad una concentrazione di 300 µg/ml simile al butilidrossiltoluene (BHT) (Mellouk et al., 2017). Studi condotti in quattro frazioni degli estratti di *A. taxiformis* hanno dimostrato di avere come questi estratti hanno la capacità di eliminare i radicali in modo dose-dipendente. Infatti, testando la concentrazione di 500 µg/ml, ha avuto come effetto l'eliminazione dei radicali registrando valori del 85% nell'estratto metanolico, 79% nel cloroformio, 47% nell'etere di petrolio e del 45% dell'acetato di etile (Neethu et al., 2017). Analogamente, altri autori conducendo i test del DPPH e del ABTS, per la valutazione del potere antiossidante nei diversi estratti acquosi ed etanolici di *A. taxiformis*, hanno dimostrato che effettivamente l'estratto acquoso abbiamo maggiori proprietà antiossidanti rispetto all'estratto etanolico (Julião et al., 2021).

#### **1.4.4 Citotossiche**

Ad oggi esistono oltre 200 tipi diversi di cancro e circa il cinquanta per cento delle persone in tutto il mondo contrarranno il cancro nel corso della loro vita (Nascimento-Gonçalves et al., 2018; Nordqvist e Chun, 2017; Hallek, 2019). Tra le cause che contribuiscono a questo fenomeno sono la continua crescita e invecchiamento della popolazione, e si prevede che il peso globale del cancro aumenterà fino a 21.7 milioni di nuovi casi e 13 milioni di decessi entro il 2030 (Ferlay et al., 2013). Di tutti i casi di cancro, il 90-95% sono dovuti ai fattori ambientali mentre i casi residui (5-10%) sono dovuti a fattori genetici ereditari (Anand et al., 2008). Attualmente uno dei trattamenti più comuni per combattere il cancro è la chemioterapia (Coffelt e deVisser, 2015; Senthebane et al., 2017). Purtroppo, questo trattamento causa numerosi effetti avversi nei pazienti come ad esempio l'infertilità, l'immunosoppressione e danni agli organi (Turan et al., 2014; Nurgali et al., 2018; Kaur et al., 2022). Per questo motivo recentemente, c'è sempre un utilizzo maggiore di prodotti bioattivi derivati dall'ambiente marino capaci di mostrare efficacemente attività di chemioprevenzione, esplicando attività chemioterapica naturale producendo meno effetti collaterali (Abourriche et al., 1999; Zubia et al., 2009; Alves et al., 2018; Ercolano et al., 2019). Tra questi le macroalghe producono

biomolecole capaci di esprimere attività citotossiche (Mayer e Gustafson, 2006; Smit, 2004). Alcuni autori suggeriscono di consumare le alghe come agenti chemiopreventivi contro diversi tumori (Yuan e Walsh, 2006). La famiglia di macroalghe brune Saragassaceae è conosciuta per le numerose proprietà antitumorali espresse dagli estratti o dalle molecole ottenute da queste macroalghe (de Sousa et al., 2017). Per esempio, estratti in metanolo e cloroformio di *E. crinita* hanno avuto attività citotossica contro linee cellulari derivate dalla leucemia (HL60, THP-1) e linfomi (REC-1) mostrando un IC<sub>50</sub> di 85.3; 103.3 e 108.9, µg/ml (Mansur, 2022). Saggiando gli estratti in metanolo (80%) di *E. crinita* contro adenocarcinoma mammario umano (positivo per il recettore degli estrogeni (MCF-7)), epatico (HepG2), è stata registrata una IC<sub>50</sub> di 18 e 82.3 µg/ml rispettivamente. Investigando il processo mediante il quale questi estratti portassero a morte le cellule tumorali è stato dimostrato che inducano la morte cellulare programmata, attraverso l'aumento dell'espressione di mRNA e proteine di Bax e Beclin-1 e diminuendo l'espressione di Bcl-2, inducendo l'apoptosi e l'autofagia nelle cellule MCF-7 (Abu-Khudir et al., 2021).

Altri estratti crudi in cloroformio e acetato di etile hanno mostrato una significativa attività antiproliferativa sia contro carcinoma del colon (HCT15) registrando un IC<sub>50</sub> di 41-58 µg/ml, che contro l'adenocarcinoma della mammella (MCF7) registrando un IC<sub>50</sub> di 37-65 µg/ml (Mhadhebi et al., 2011).

Recentemente, utilizzando metodi green di estrazione (estratti acquosi) di *E. crinita*, è stata valutata l'attività antiproliferativa verso linee cellulari di adenocarcinoma polmonare (A549), HCT15 e di MCF7. I risultati hanno mostrato un'importante attività antitumorale con valori di IC<sub>50</sub> di 49.5 µg/ml per A549, 26.4 µg/ml per HCT15 e di 17.9 µg/ml in MCF7 (Mhadhebi et al., 2014). Inoltre, combinando estratti acquosi di *E. crinita* a nanoparticelle di ossido di magnesio (MgO-NPs) altri autori hanno osservato che questo complesso è stato capace di esplicare attività antitumorale contro linee cellule di adenocarcinoma coloretale umano (Caco-2), con valore di IC<sub>50</sub> di 113.4 µg/ml (Fouda et al., 2022). Sembrerebbe che questa attività antitumorale sia dovuta al complesso estratto/MgO-NP in quanto veicolato all'interno delle cellule tumorali attraverso endocitosi o macro-pinocitosi, attiverebbe la via apoptotica portando a morte le cellule come suggerito da altri autori (Verma et al., 2020).

Inoltre, numerosi studi dimostrano come i composti bromurati siano importanti nell'esercitare attività antitumorali (Glazman-Kuśnierczyk et al., 1992; Segreaves e Crews, 2005; Shoemaker, 2006; Morretta et al., 2024). Alcuni autori hanno valutato l'attività citotossica di estratti della specie *A. taxiformis* in uova di *Artemia salina* dopo 24 ore di esposizione. L'effetto tossico è risultato dose dipendente ed ha causato il 100 % dell'inibizione dello sviluppo delle uova alla concentrazione di 500 µg/ml (estratti ottenuti mediante: etere di petrolio, metanolo e acetato di etile) mentre a concentrazione più bassa

(125 µg/ml), la frazione dell'estratto ottenuta con acetato di etile, ha prodotto danni alle uova di *A. salina* (Neethu et al., 2017). Altri estratti di *A. taxiformis* testati contro linee tumorali di adenocarcinoma umano A549 hanno dimostrato che alle concentrazioni di 200 µg/ml l'estratto in CHCl<sub>3</sub>-MeOH (2:1) causa il 100% di mortalità delle cellule di A549 con valori di IC<sub>50</sub> di 98.0 µg/ml. Mentre testando gli estratti etanoliche alla concentrazione di 200 µg/ml hanno avuto una minore attività antitumorale causando una mortalità del 20.1 % nelle cellule A549 (Nunes et al., 2020).

## 1.5 Attività miorilassante delle macroalghe

I disturbi gastrointestinali possono portare ad una diminuzione della qualità della vita e ad un aumento del rischio di ansia e depressione (Anheyer et al., 2017). Questi disturbi sono caratterizzati da dolore addominale ricorrente o cronico e sindrome dell'intestino irritabile (IBS) (Holtmann et al., 2018). Tradizionalmente rimedi naturali sono stati utilizzati (economicamente vantaggiosi) per la cura di diverse malattie (Tang et al., 2010; Ghasemi et al., 2013).

Le piante medicinali come la camomilla (*Matricaria chamomilla*) sono fonti di molecole usate nella medicina tradizionale con importanti attività antinfiammatoria e antispasmodica per curare i disturbi intestinali e mestruali (Nathan, M., Scholten, R. 1999; Asadi-Samani et al, 2013), tuttavia, recentemente diversi studi hanno dimostrato come estratti e molecole di macroalghe possiedano importanti attività antispasmodiche (Cavalcante-Silva et al., 2016; Babich et al., 2022).

Ad esempio, molecole prodotte dalle specie di macroalghe brune come *Sargassum polyceratum* e *Cystoseira brachycarpa* var. *balearica* (e.g., due diterpeni lineari, eleganolone ed elegandiolo) hanno mostrato importanti proprietà spasmolitiche sulla contrazione dei muscoli lisci dell'ileo del porcellino d'india (Bhakuni et al. 1992; Della Pietà et al., 1996; Correia et al., 2011).

Numerosi studi dimostrano come il floroglucinolo (1,3,5-triidrossibenzene), una molecola presente e prodotta anche nelle macroalghe, esercita importante attività antispasmodica (El Hattab et al., 2015). Questo polifenolo porta al rilassamento muscolare inibendo i canali del calcio voltaggio-dipendenti (Bueno et al., 1997; Lazaraki et al., 2014) e non mostra effetti collaterali anticolinergici associati alle altre classi di antispastici (Ford et al., 2008; Ruepert et al., 2011; Lazaraki et al., 2014). Inoltre, uno studio dimostra come il floroglucinolo riesce a ridurre la motilità del rettosigmoide dopo un pasto di prova (Cargill et al., 1992), ed è capace di ridurre le contrazioni fasiche del colon, promosse dall'iniezione di glicerolo nel retto, senza influenzare il tono del colon (Louvel et al., 1996). Questo composto agisce direttamente sulla muscolatura liscia intestinale (Jafri et al., 2006). Inoltre, uno studio dimostra che il floroglucinolo non ha effetti teratogeni sulle donne in gravidanza (Lacroix et al., 2011). Per questa ragione questo composto trova molte applicazioni nel settore farmaceutico per la produzione di farmaci antispasmodici, ad esempio, come generico prodotto dalla multinazionale Mylan® o nel farmaco Spasfon prodotto dalla Lyoc®.

Altri studi condotti su K-carragenina, ottenuta da estratti di un'alga rossa *Hypnea musciformis* hanno dimostrato che essa antagonizza lo spasmo indotto dall'istamina nell'ileo del porcellino d'india (Das, 1980).

Altri composti come le caulerpine prodotte in ambiente acquatico dal genere *Caulerpa*, per esercitare attività allelopatiche verso altre specie marine (Raniello et al., 2007), promuovono l'attivazione dei

recettori  $\beta$ -adrenergici nell'ileo del porcellino d'india esplicando importante attività antispasmodica (Cavalcante-Silva et al., 2016).

Inoltre, un prodotto già presente nel mercato (Klamin®), contenente estratti della microalga *Aphanizomenon flos aqua* è capace di ridurre l'ampiezza delle contrazioni spontanee della muscolatura liscia circolare umana in modo dose-dipendente (Amato et al., 2021). Ciò ci suggerisce l'importanza delle macroalghe come fonte di prodotti naturali dall'alto valore biologico, rappresentando una nuova risorsa in ambito commerciale per la formulazione di prodotti green, performanti dall'elevata bioattività.

## **1.6 Attività immunomodulante di macroalghe negli organismi acquatici**

Le macroalghe svolgono un ruolo cruciale negli ecosistemi acquatici e hanno un impatto significativo su vari organismi all'interno di tali ecosistemi (Biris-Dorhoi et al., 2020). Tuttavia, gli organismi acquatici risentono dei cambiamenti quali: qualità dell'acqua, disponibilità di cibo, attività antropica e dal cambiamento climatico. (Sanders, 1993; Hedrick, 1998; Valavanidis et al., 2006; Marcogliese, 2008; Niinemets et al., 2017; Liu et al., 2018; Kataoka et al., 2021; Kazmi et al., 2022). Quando gli animali acquatici sperimentano questi stress possono attivare il sistema immunitario come meccanismo di difesa (Tort, 2011), rilasciando molecole proinfiammatorie come citochine e chemochine (Verburg-Van Kemenade et al., 2009). In generale la risposta infiammatoria è una parte fondamentale della reazione del sistema immunitario allo stress o alle lesioni, per difendersi da potenziali minacce e finalizzata a ripristinare l'omeostasi (Chovatiya e Medzhitov, 2014).

A riguardo, diversi composti presenti nelle macroalghe, come polifenoli, polisaccaridi e acidi grassi, possiedono proprietà antinfiammatorie (Bilal et al., 2019; Safavi et al., 2019; Silva et al., 2020; Rocha et al., 2022). Questi composti riescono a regolare l'infiammazione indotta dallo stress, migliorando così la resilienza degli organismi acquatici (Gomez-Zavaglia et al., 2019; Safavi et al., 2019; Naiel et al., 2021; Mapelli-Brahm et al., 2023; Mishra et al., 2023; Mokolensang et al., 2023). Numerosi studi dimostrano come gli estratti delle macroalghe possano inibire la produzione di citochine ed enzimi proinfiammatori, modulando l'attività delle cellule immunitarie in risposta a vari stimoli, inclusi agenti patogeni e fattori di stress ambientali (Bischof et al., 2012; Sangha et al., 2014), riducendo l'infiammazione negli organismi acquatici (Jaswir et al., 2011; Regoli et al., 2014; Cian et al., 2018; Barbalace et al., 2019; Agatonovic-Kustrin et al., 2022; Rocha et al., 2022).

Per esempio, i florotannini, i fucooidani ed i polisaccaridi prodotti dalle macroalghe possiedono importanti proprietà antiossidanti (Pádua et al., 2015; Saeed et al., 2021). Questi composti grazie alle loro proprietà riescono ad eliminare i radicali liberi dannosi, riducendo così lo stress ossidativo negli

organismi acquatici (Saeed et al., 2021; Vladkova et al., 2022). I florotannini sono composti polifenolici tipici delle alghe brune e possiedono una forte attività antiossidante grazie alla loro capacità di donare atomi di idrogeno o elettroni, neutralizzando così i radicali liberi e prevenendo il danno ossidativo alle cellule (Freile-Pelegrín et al., 2013; Meshalkina et al., 2023). Mentre i fucoidani sono polisaccaridi solfati e presenti nelle pareti cellulari delle alghe brune, ed esibiscono varie attività antiossidanti capaci di eliminare i radicali liberi, chelare gli ioni metallici coinvolti nei processi ossidativi, e riducono lo stress ossidativo (Wang et al., 2016; Priya e Khora, 2023; Cholaraj et al., 2024). Questi composti eliminando i radicali liberi e modulando l'attività degli enzimi antiossidanti, mitigando i danni associati all'infiammazione negli organismi acquatici (Saeed et al., 2021; Michalak et al., 2022). Inoltre, diversi studi dimostrano come estratti di macroalghe promuovono la guarigione delle ferite negli organismi acquatici (Machado et al., 2021), riducendo l'infiammazione delle ferite e stimolando la rigenerazione dei tessuti (Prasedya et al., 2020).

Nel complesso, l'attività antinfiammatoria delle macroalghe negli organismi acquatici è promettente anche per varie applicazioni, tra cui l'acquacoltura, la conservazione ambientale e lo sviluppo di prodotti farmaceutici.

## **1.7 Bio-marker dello stress negli organismi acquatici**

È noto in letteratura che le risposte a condizioni di stress negli organismi acquatici possono essere valutate grazie all'analisi di diversi tipi di biomarker quali per esempio: i livelli di cortisolo, le Heat Shock Proteins (HSPs) e l'attività enzimatica di esterasi e fosfatasi alcalina (Matranga et al., 2000; Livingstone, 2001; Valavanidis et al., 2006; Regoli et al., 2014; Sadoul et al., 2019; Vazzana et al., 2020). In merito, numerosi studi dimostrano che organismi acquatici sono particolarmente suscettibili allo stress ossidativo a causa della loro esposizione diretta a inquinanti ambientali, radiazioni UV e altri fattori di stress presenti negli ecosistemi acquatici (Di Giulio et al., 1989; Livingstone, 2001; Häder et al., 2011; Lushchak et al., 2011).

I celomociti sono cellule presenti nel celoma, la cavità corporea di molti invertebrati (Tahseen et al., 2009; Sharlaimova et al., 2021). Svolgono vari ruoli nell'immunità, nella rimozione dei rifiuti e nella riparazione dei tessuti (Mydlarz et al., 2006). Negli invertebrati marini, come gli echinodermi, i celomociti sono componenti essenziali del loro sistema immunitario (Smith et al., 2018).

Un aumento delle conte cellulari totali negli animali acquatici indicano che gli organismi acquatici in esami sono sottoposti a stress ambientali (Ellis et al., 2011; Huang et al., 2016; Kim et al., 2019; Xu et al., 2021). Infatti, l'esposizione a inquinanti, le fluttuazioni di temperatura possono innescare risposte immunitarie, portando a cambiamenti del numero cellule immunitarie (Wingfield, 2013; Makrinos e Bowden, 2016).

Generalmente un organismo aumenta il numero di cellule immunitarie come meccanismo di difesa contro agenti patogeni o tossine (Yui et al., 1983; Acheson e Luccio, 2004; Margolick et al., 2014; Spiering, 2015; Dettleff et al., 2020; Wang et al., 2023). Tuttavia, la modifica del numero degli immunociti negli organismi acquatici può essere indotto da altri fattori ambientali quali: danni ai tessuti o dall'inflammazione (García-Bueno et al., 2008; Reuter et al., 2010; Landén et al., 2016; Gusev et al., 2022), temperatura (Matranga et al., 2000; Murano et al., 2023), salinità (Geng et al., 2016; Barrett et al., 2024), inquinamento (Oweson et al., 2008; Garcia-Velasco et al., 2023;), danni fisici (Matranga et al., 2000; Caulier et al., 2020), esposizione alle tossine (Nuseti et al., 1998; Dolmatova et al., 2003), processi riproduttivi (Currie et al., 2000; Ellis et al., 2011) e dalle variazioni stagionali (Currie et al., 2000; Gallo et al., 2023).

Per esempio, i ricci di mare *Paracentrotus lividus* sottoposti a stress termico (35 °C e 4 °C) aumentano in modo significativo il numero dei celomociti e dell'espressione di HSP 70 (Matranga et al., 2000). Oppure esponendo lo scorfano nero *Sebastes schlegelii* e la specie *Pagrus major* a 1–2 mg/ml di manganese per 14 giorni, causa una diminuzione significativamente del numero totale di leucociti ((Do et al., 2019), indicando che il manganese presente in eccesso nelle acque può provocare l'immunosoppressione degli organismi acquatici (Hernroth et al., 2020).

Per questa ragione il monitoraggio delle variazioni delle conte totali, negli organismi acquatici è uno degli strumenti che possono fornire informazioni sullo stato di salute degli organismi acquatici sottoposti a vari stress (Hofstra et al., 2020; Pelletier et al., 2020; Beale et al., 2022).

Altri biomarker utilizzati negli organismi acquatici sono le specie reattive dell'ossigeno (ROS). I ROS includono molecole come l'anione superossido ( $O_2^-$ ), il radicale idrossile ( $\bullet OH$ ) e il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) generati come sottoprodotti naturali del metabolismo aerobico (Ozougwu, 2016). Quando presenti in eccesso i ROS possono causare danni ai lipidi, alle proteine e al DNA causando lo stress ossidativo (Juan et al., 2021). Il monitoraggio dei livelli di ROS negli organismi acquatici è importante in quanto può fornire preziose informazioni sulla loro salute e sulle condizioni ambientali in cui vivono (Lushchak et al., 2011; Sies et al., 2022). A riguardo, esistono vari test biochimici che permettono la misurazione dei livelli di ROS negli organismi acquatici, come ad esempio la microscopia a fluorescenza o la citometria a flusso (Goedken et al., 2004; Le Goïc et al., 2014).

In letteratura diversi autori hanno dimostrato che le cellule immunitarie esposte a tossine aumentano la produzione di ROS (Hwang et al., 2019; Moosova et al., 2019) come per esempio i celomociti dell'echinoderma *Eupentacta fraudatrix* se esposti a delle tossine di *Yersinia pseudotuberculosis* (Dolmatova et al., 2003). Oppure esponendo gli amebociti della stella marina *Asterias rubens*, con i batteri Gram-positivi, *Micrococcus luteus* (10 e  $25 \times 10^7$  cellule batteriche/ml) aumentano significativamente la produzione e il rilascio di ROS (Coteur et al., 2002).

Un altro biomarcatore utilizzato per la valutazione dello stato di salute degli organismi acquatici è quello dei nitriti (Pandey et al., 2003; Ekambaram et al., 2014; Venditti et al., 2022). Il nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) è un sottoprodotto dell'ossidazione dell'ossido nitrico (NO) e viene spesso generato durante condizioni di stress ossidativo (Lundberg et al., 2008). Lo stesso ossido nitrico può agire come molecola di segnalazione in vari processi fisiologici (Lamattina et al., 2003), ma in condizioni di stress ossidativo può reagire con i radicali superossido per formare perossinitrito ( $\text{NO}_3^-$ ) (Piacenza et al., 2022). Il monitoraggio del NO insieme ad altri biomarcatori e parametri fisiologici può fornire preziose informazioni sullo stato di salute degli ecosistemi acquatici (Kuklina et al., 2013; Monteiro et al., 2021; Kadim et al., 2022). Per esempio, il riccio di mare *Paracentrotus lividus* esposto all'inquinamento antropico e alla presenza della specie *Lophocladia lallemandii*, una macroalga aliena, aumenta in modo significativo il livello di  $\text{NO}_3^-$ , indicando come questi fattori (inquinanti, presenza della specie aliena) influenzino lo stato di salute di questi organismi acquatici.

Il GSH, o glutazione, è uno dei biomarcatori utilizzati per valutare lo stress ossidativo negli organismi acquatici (Hellou et al., 2012). È un tripeptide composto da cisteina, glicina e acido glutammico e svolge un ruolo cruciale nei meccanismi di difesa antiossidante all'interno delle cellule (Almeida et al., 2009; Regoli et al., 2014). Una delle funzioni primarie del glutazione è neutralizzare i ROS e proteggere le cellule dal danno ossidativo (Marí et al., 2009; Jozefczak et al., 2012). Di conseguenza, la concentrazione di glutazione all'interno delle cellule può servire da indicatore dei livelli di stress ossidativo (Schulz et al., 2000; Regoli et al., 2014; Demirci-Cekic et al., 2022). Diminuzioni dei livelli di glutazione o alterazioni nel rapporto tra glutazione ridotto (GSH) e ossidato (GSSG) possono indicare un aumento dello stress ossidativo negli organismi acquatici (Lushchak et al., 2011; Hellou et al., 2012; Eroglu et al., 2015; Ming et al., 2019).

Infatti, negli organismi acquatici l'esposizione a metalli pesanti come piombo, mercurio, cadmio e arsenico può comportare una diminuzione dei livelli di GSH, in quanto i metalli generano ROS nelle cellule, causando la riduzione di GSH che elimina questi radicali liberi per proteggere le cellule dai danni (Ercal et al., 2001; Mahboob, 2013). Una diminuzione dei livelli di GSH negli organismi, indicano un aumento del danno ossidativo e anche la compromissione delle funzioni cellulari (Lushchak et al., 2011), che possono comportare diversi effetti avversi quali: riduzione dello sviluppo, compromissione della capacità riproduttiva o persino la morte (Peña-Llopis et al., 2003; Braun et al., 2010; Zhang et al., 2016). Per questa ragione il monitoraggio dei livelli di glutazione negli organismi acquatici può fornire preziose informazioni sullo stato di salute dei loro ecosistemi e aiutare a valutare l'impatto dei fattori di stress ambientale su questi organismi (Lam, 2009; Lushchak et al., 2011; Hellou et al., 2012; Hook et al., 2014). Inoltre, comprendere il ruolo del glutazione nei meccanismi di difesa antiossidante può aiutare a sviluppare strategie per mitigare lo stress ossidativo e proteggere la

biodiversità acquatica (Lushchak et al., 2011; Birnie-Gauvin et al., 2017).

Negli ambienti acquatici, gli organismi sono spesso esposti a inquinanti provenienti da fonti industriali, agricole e urbane (Valavanidis et al., 2006; Bukola et al., 2015; Malik et al., 2020). Questi inquinanti possono indurre risposte allo stress negli organismi acquatici, portando a cambiamenti nelle loro attività enzimatiche, comprese le esterasi (Basopo et al., 2014; Lomartire et al., 2021).

L'esterasi è un enzima appartenente alla classe delle idrolasi che catalizza la reazione di idrolisi del legame estere (Levisson et al., 2009; de Souza Vandenberghe et al., 2020).

Questo enzima svolge un ruolo cruciale nel processo di disintossicazione scomponendo vari composti tossici, tra cui pesticidi, metalli pesanti e inquinanti organici in sostanze meno dannose (Oves et al., 2016; Kumari et al., 2021; Saravanan et al., 2021; Yaashikaa et al., 2022). È uno dei più comuni enzimi utilizzato come biomarcatore negli organismi acquatici in quanto bioindicatore di stress ambientale (Galloway et al., 2002; Forget et al., 2003; Rickwood e Calloway, 2004; Barata et al., 2004; Hannam et al., 2008; Ren et al., 2015; Parisi et al., 2017; Vazzana et al., 2020). Aumenti o diminuzioni dei livelli di attività esterasica possono indicare l'esposizione a fattori di stress ambientale, come l'inquinamento o i cambiamenti nella qualità dell'acqua (Pretti et al., 2001; Wheelock et al., 2008; Franco et al., 2016; Gonçalves et al., 2021).

Per esempio, il salmone atlantico (*Salmo salar*) sottoposto ad infezioni di *Lepeophtheirus salmonis* aumenta in modo significativo l'attività esterasica (Ross et al., 2000).

A riguardo, lo stato di salute degli organismi acquatici può essere monitorato attraverso l'utilizzo di test biochimici e metodi molecolari che determinano l'attività esterasica negli organismi acquatici (Hannam et al., 2008; Domingues et al., 2010; Mauro et al., 2022).

Un altro enzima utilizzato come bioindicatore negli organismi acquatici è la fosfatasi alcalina, un metalloenzima che catalizza l'idrolisi non specifica dei monoesteri fosfatici e svolge un ruolo cruciale in processi come il ciclo dei nutrienti, è presente in vari organismi acquatici (McComb et al., 2013; Sharifian et al., 2018; Buscaino et al., 2019), e spesso è utilizzato come biomarcatore per valutare i fattori di stress e lo stato di salute degli organismi in ambiente acquatico (Zhang et al., 2004; Zhou et al., 2008; Gonçalves, et al., 2021; Mohamed et al., 2020; Vazzana et al., 2020; Singh e Padey, 2023). Infatti, quando gli organismi sono esposti a inquinanti, cambiamenti nella qualità dell'acqua o degrado dell'habitat (Cooper et al., 1993; Akhtar et al., 2021), i loro processi fisiologici, comprese le attività enzimatiche della fosfatasi alcalina, possono essere influenzati (Ugokwe et al., 2015; Mohamed et al., 2020; Gonçalves et al., 2021).

Per esempio, le carenze alimentari di nutrienti come il fosforo nel cladocero *Daphnia magna* provoca l'aumento significativo dell'attività di fosfatasi alcalina (McCarthy et al., 2010). Inoltre, è stato dimostrato che questo enzima aumenta la sua attività in modo significativo durante il processo

rigenerativo di bracci nella stella di mare *Asteria forbensis* (Donachy, et al., 1990). Risultati simili sono stati ottenuti sull'echinoderma *Holothuria tubulosa*. Infatti, un'ora dopo dal taglio (ferita) l'attività enzimatica della fosfatasi alcalina aumenta, raggiungendo la sua attività massima dopo 24 ore, indicando che questo enzima sia coinvolto nel processo di guarigione delle ferite (Mauro et al., 2021).

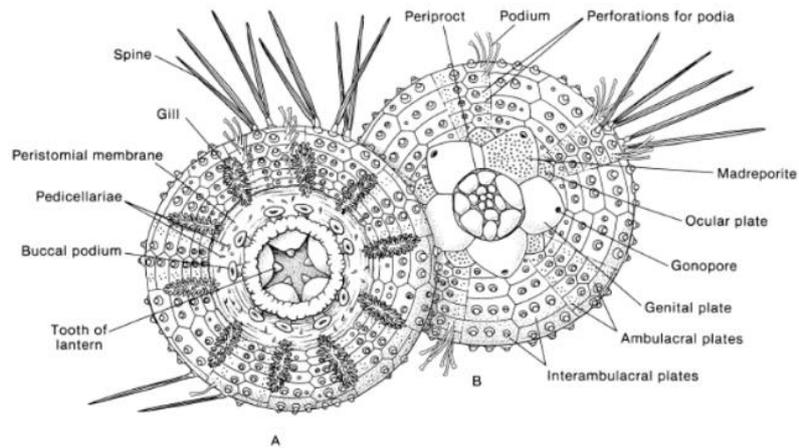
In fine il monitoraggio dell'attività della fosfatasi alcalina in organismi come pesci, alghe o invertebrati, permette di valutare la salute generale degli ecosistemi acquatici e prendere decisioni importanti nelle politiche di gestione e conservazione degli ambienti acquatici (Cairns e Pratt; 1989; Sala et al., 2012; Carmichael and Boyer, 2016; Forio et al., 2020).

## **1.8 L'organismo modello *Arbacia lixula***

Il phylum degli echinodermi è interessante perché possiede sia caratteristiche tipiche dei protostomi, sia caratteristiche che ritroviamo nei deuterostomi, suggerendo un passaggio chiave nell'evoluzione (Fell, 1972; Nielsen et al., 2017). All'interno di questo phylum la classe echinoidea (ricci di mare) è nota per avere come caratteristica gli embrioni trasparenti, che li rende ottimi organismi modello per studiare con una certa facilità le malformazioni e individuare gli effetti subletali degli inquinanti sulla formazione del corpo multicellulare nella fase iniziale dello sviluppo (Roccheri et al., 1997; Vega et al., 2004; Lesser et al., 2003). Mentre gli adulti sono ampiamente utilizzati per lo studio della risposta immunitaria innata come bioindicatore dello stress ambientale (Matranga et al., 2000; Pinsino et al., 2015; Smith et al., 2018; Chiaramonte et al., 2019; Migliaccio et al., 2019; Vazzana et al., 2020; Queiroz et al., 2021).

Nei nostri ambienti la specie *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758) è parecchio conosciuta, è termofila e distribuito in tutto il Mediterraneo e nell'Atlantico medio-orientale (Spagna, Portogallo, Africa Nord-Occidentale), compresi gli arcipelaghi delle Azzorre, delle Isole di Capo Verde e delle Canarie (Gianguzza e Bonaviri 2013).

A livello morfologico è facilmente riconoscibile in quanto gli individui adulti si presentano con una colorazione nera (Fig. 11) e le dimensioni variano da circa 15 mm a 50 mm di diametro (senza spine) e le spine sono di lunghezza da moderata a lunga, spesso mostrando differenze di dimensioni e forma (Gianguzza, 2020). Il peristoma può essere nudo, ma di solito ha piccole spine e pedicellarie e contiene placche incastonate che supportano l'apertura boccale (Fig. 10) (Gianguzza e Bonaviri, 2013). Il periprocto è in gran parte coperto da quattro placche subtriangolari e subuguali (Gianguzza, 2020).



**Figura 10** Anatomia del riccio di mare.



**Figura 11** Esemplare Adulto di *A. lixula*. Photo©: Rosario Badalamenti

Questa specie è comune e colonizza i substrati rocciosi in acque poco profonde in tutto il Mediterraneo, e mostra una grande resistenza al movimento dell'acqua ed è ben adattata alle acque turbolente dei primi metri dell'infralitorale superiore (Gianguzza e Bonaviri, 2013).

Nel Mediterraneo questa specie condivide il suo habitat con un altro riccio di mare, il *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816).

Gli studi sull'ecologia di queste specie hanno rivelato che *A. lixula* è più comune sui substrati verticali ed è considerato un estirpatore principale di alghe coralline e incrostanti (Benedetti-Cecchi et al., 1998; Bulleri et al., 1999), mentre il *P. lividus* è generalmente più abbondante su substrati orizzontali o leggermente inclinati, dove si nutre principalmente di alghe erette. Nel Mediterraneo, le due specie sono considerate i pascolatori più importanti, in quanto la variazione della loro densità e intensità di pascolo può modificare il dominio bentonico da un complesso assemblaggio stratificato di diverse macroalghe erette (Cistoseriati), a uno più semplice composto da poche alghe incrostanti: il cosiddetto

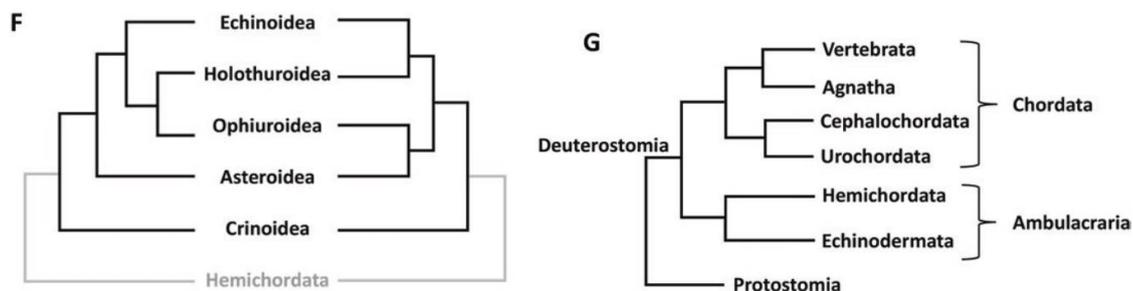
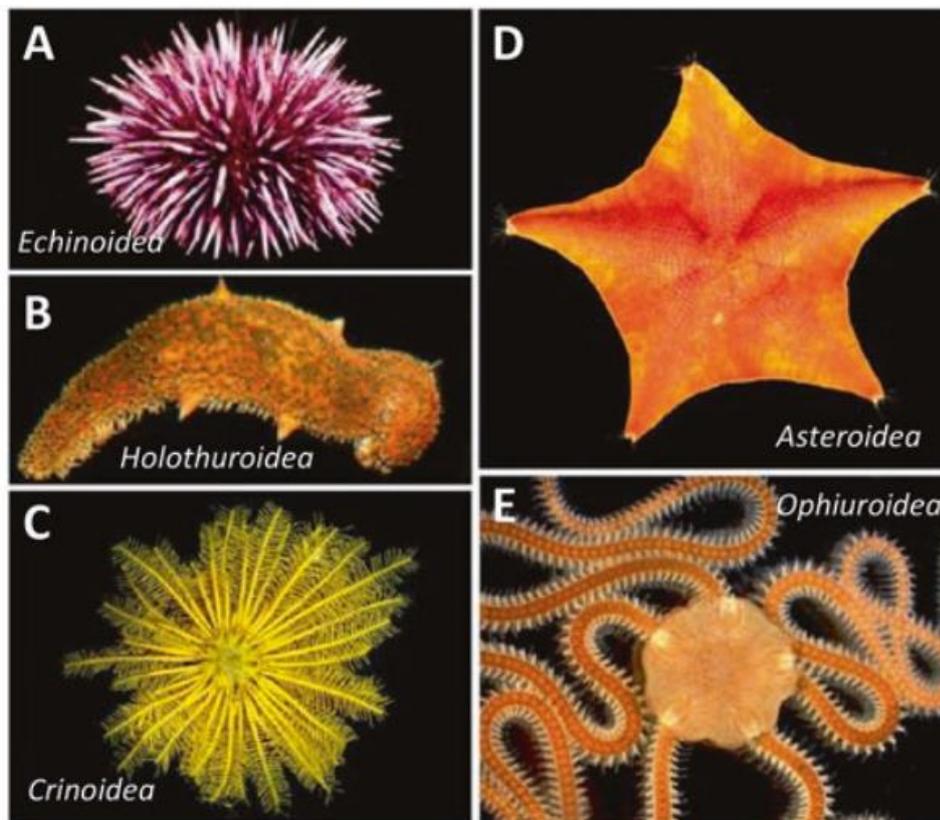
'Barrens habitat' (Sala et al., 1998; Boudouresque e Verlaque, 2001). Nel sublitorale mediterraneo ed in particolare nei substrati rocciosi ci sono alcune specie di pesci che sono potenziali predatori di questi ricci di mare. Tuttavia, è stato riportato che *Sparus aurata*, *Diplodus sargus* e *D. vulgaris* controllano efficacemente le popolazioni di *A. lixula* e *P. lividus* (Sala e Zabala, 1996; Guidetti, 2006). *Arbacia lixula* è stata tradizionalmente considerata una specie erbivora nel Mediterraneo a causa del dominio di alghe coralline incrostante trovate nel suo contenuto intestinale (Kempf, 1962; Régis, 1978; Verlaque e Nedelec, 1983; Frantzis et al., 1988; Boudouresque e Verlaque, 2001). Tuttavia, studi con analisi isotopiche ( $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ ) sulla dieta di *A. lixula* hanno dimostrato che occupa un livello trofico superiore a quello previsto per una specie erbivora (Wangsteen et al., 2011). *Arbacia lixula* è un onnivoro tendente al carnivoro (Wangsteen et al., 2011). Principalmente sipunculidi, sono l'alimento principale assimilato da *A. lixula* nel sud-ovest del Mediterraneo (Agnetta et al., 2013). Inoltre, è stato dimostrato che il tessuto animale è digerito più rapidamente rispetto al tessuto di alghe o semplicemente per il fatto che gli animali non vengono ingeriti nel loro insieme ma solo frammenti di essi che vengono raschiati dalla lanterna di Aristotele (ad esempio frammenti di Sipunculidi e Serpulidi) (Wangsteen et al., 2011; Agnetta et al., 2013). È stato dimostrato che *A. lixula* ha un ruolo di primo piano nel mantenimento di uno stato di sterilità del Mediterraneo sud-occidentale, anche se presente a bassa densità (Bonaviri et al., 2011).

## 1.9 Il sistema immunitario degli echinodermi

Gli echinodermi sono invertebrati che comprendono specie con ruoli chiave nell'ecosistema marino (Menge et al., 1994) (Fig. 12). Molti di essi, che vivono nelle acque costiere ed estuari, tra i vari tipi di stress antropici sono per esempio direttamente esposte a microrganismi potenzialmente patogeni. Per questo motivo, nel tempo hanno sviluppato risposte di difesa principalmente basate su immunociti e fattori umorali contenuti nel liquido celomatico (Coffaro e Hinegardner, 1977; Smith, 1981; Chia e Xing, 1996; fabbro et al., 1996; Pancer et al., 1999; Gross et al., 2000; Pancer, 2000; Kudriavtsev e Polevshchikov, 2004; Goldstone et al. 2006; Hamdoun e Epel 2007).

La prima risposta è di tipo cellulare che nel caso degli echinodermi è mediata dai celomociti. Queste cellule immunocompetenti sono libere e circolano all'interno della cavità celomatica, esercitando le funzioni immunitarie e possono anche infiltrarsi nei tessuti e negli organi (Ramírez-Gómez e García-Arrarás, 2010). La seconda è invece di tipo umorale e consiste nella produzione di fattori solubili nel plasma degli organismi, secreti dalle cellule stesse nel fluido celomatico come lectine, agglutinine, lisine, citochine, peptidi antimicrobici, fenolossidasi e i metaboliti della cascata profenolossidasi (Ramírez-Gómez e García-Arrarás, 2010).

Le proprietà morfo-funzionali degli immunociti sono ancora controverse e i loro meccanismi immunitari sono, in parte, sconosciuti. Sebbene ad oggi non siano ancora chiari i pathway di differenziamento che portano ai diversi tipi di celomociti si conosce il ruolo delle cellule progenitrici, in quanto sembrerebbero essere coinvolte nella produzione dei celomociti (Fig. 13) (Karp e Coffaro, 1982; Ramirez-Gómez e Garcia-Arraràs, 2010). Inoltre, diversi studi mostrano come l'epitelio celomatico e soprattutto l'organo assiale sembrano svolgere funzione emopoietica nella maggior parte delle specie studiate di echinodermi (Millot, 1969; Smith, 1981; Karp e Coffaro, 1982; Parrinello, 1995a; Ramirez-Gómez e Garcia-Arraràs, 2010).



**Figura 12** Cinque classi di Echinodermata. (A – E). A) L'Echinozoidea comprende ricci di mare e sono rappresentati dal riccio di mare viola, *Strongylocentrotus purpuratus*. B) Gli Holothuroidea sono rappresentati dal cetriolo mare *Parastichopus parvimensis*. C) I Crinoidea sono rappresentati dal giglio di mare *Oxycomanthus intermedius*. D) L'asteroide comprende stelle marine. F, G) Alberi filogenetici a cui appartengono queste classi di echinodermi. (L. Courtney Smith et al., 2018).

Cell type	Present in class	Role	Reference
Discoidal cell	E, H	Phagocytosis, clotting, encapsulation, chemotaxis, opsonisation, graft rejection	(Coteur <i>et al.</i> , 2002; de Faria and da Silva, 2008; Eliseikina and Magarlamov, 2002; Endean, 1966; Matranga <i>et al.</i> 2005; Ramirez-Gomez <i>et al.</i> , 2010; Smith <i>et al.</i> , 2006)
Polygonal cell	E		
Small phagocyte	E, H		
Amebocytes /Phagocytes	E, H, A, C, O		
Colored spherule	E, H, C	Antibacterial activity	(de Faria and da Silva, 2008; Endean, 1966; Smith <i>et al.</i> , 2006)
Colorless spherule	E, H, A, C, O	Antibacterial, inflammation, Wound healing, ECM remodeling	(Coteur <i>et al.</i> , 2002; de Faria and da Silva, 2008; Eliseikina and Magarlamov, 2002; Endean, 1966; Garcia-Ararras <i>et al.</i> , 2006; Ramirez-Gomez <i>et al.</i> , 2010; Smith <i>et al.</i> , 2006)
Lymphocyte	E, H, A	Progenitor cells	(Coteur <i>et al.</i> , 2002; Eliseikina and Magarlamov, 2002; Endean, 1966; Ramirez-Gomez <i>et al.</i> , 2010; Xing <i>et al.</i> , 2008)
Vibratile	E, H, A, O	Celomic fluid movement, clotting	(de Faria and da Silva, 2008; Eliseikina and Magarlamov, 2002; Endean, 1966; Matranga <i>et al.</i> , 2005; Pinsino <i>et al.</i> , 2008; Ramirez-Gomez <i>et al.</i> , 2010; Smith <i>et al.</i> , 2006; Xing <i>et al.</i> , 2008)
Crystal cells	H	Osmoregulation	(Eliseikina and Magarlamov, 2002; Endean, 1966; Ramirez-Gomez <i>et al.</i> , 2010; Xing <i>et al.</i> , 2008)
Hemocytes	H, A, O	Oxygen transport	(Eliseikina and Magarlamov, 2002; Endean, 1966; Pinsino <i>et al.</i> , 2008)

**Figura 13** Tabella tipi di immunociti presenti nelle diverse classi di echinodermi e le funzioni di queste cellule. Le lettere in maiuscolo indicano le classi: (E) Echinoidea, (H) Holothuroidea, (A) Asseroidea, (C) Crinoidea, (O) Ophiuroidea. Ramirez-Gómez e García-Ararrás, (2010).

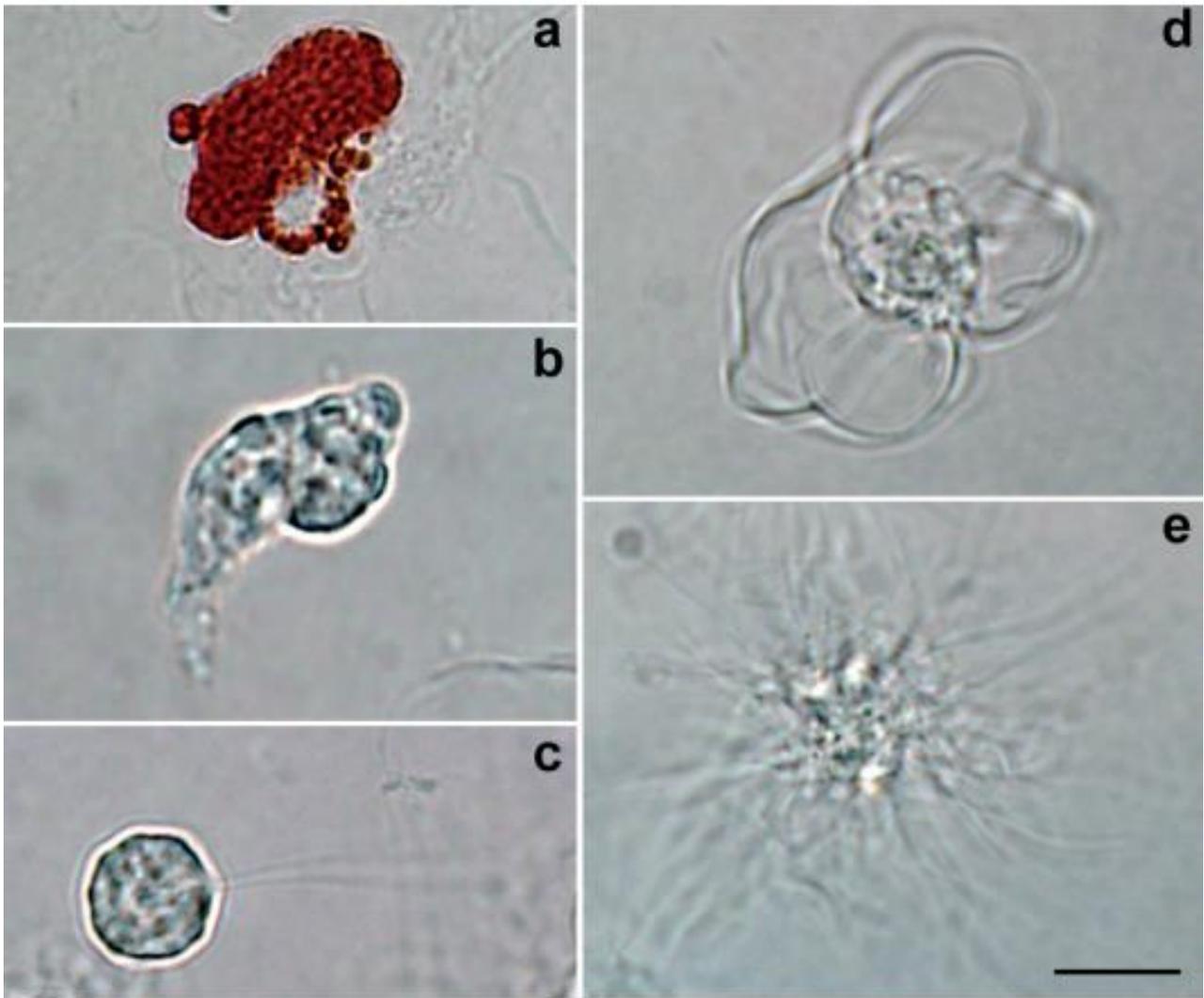
Negli echinoidea sono quattro i principali tipi di celomociti descritti: amebociti, cellule vibratili, sferulociti rossi e incolori (Booolootian e Giese, 1958; Johnson, 1969; Karp e Coffaro, 1980; Smith, 1981).

Numerosi studi hanno mostrato che esiste una grande varietà morfologica degli immunociti presenti all'interno del fluido celomatico degli echinodermi. Tale varietà di cellule è riassunta nella figura sottostante (Fig. 13), insieme alle particolari funzioni che sono state a esse attribuite.

- Fagociti (Phagocytes) (Fig. 14) hanno 14-30  $\mu\text{m}$  di diametro, sono di forma variabile, dotati di ampio citoplasma provvisto di un complesso di Golgi ben sviluppato e sottili granulazioni difficilmente risolvibili al microscopio ottico. Risultano tra i più abbondanti celomociti (fino al 80-85% del totale) e sono suddivisi in petaloidi (Fig. 14-d) e filopodiali (Fig. 14-e) sulla base della morfologia degli pseudopodi: le due morfologie rappresentano verosimilmente momenti maturativi diversi dello stesso tipo cellulare. Nel riccio di mare, *Strongylocentrotus droebachiensis*, il 20% dei fagociti ha forma petaloidi e il resto ha una forma intermedia (Bertheussen e Seljelid, 1982), a differenza della *Cucumaria miniata* che ha il 35 % a forma

petaloide, il 7 % filopodiale e il resto forme intermedie (Fontaine e Lambert, 1977; Edds, 1977). Si tratta di cellule mobili, capaci di attiva fagocitosi (De Faria e Da Silva, 2008), ricche in enzimi idrolitici (Canicatti, 1992) e coinvolte nella coagulazione (Smith, 1981). In Echinoidea e Asteroidea, l'iniezione nel celoma di cellule o particelle estranee porta ad un drastico calo di amebociti circolanti i quali, una volta fagocitato il materiale estraneo, si aggregano all'interno delle papule o nell'organo assiale per essere poi eliminate all'esterno (Karp e Coffaro, 1982; Parrinello 1995a).

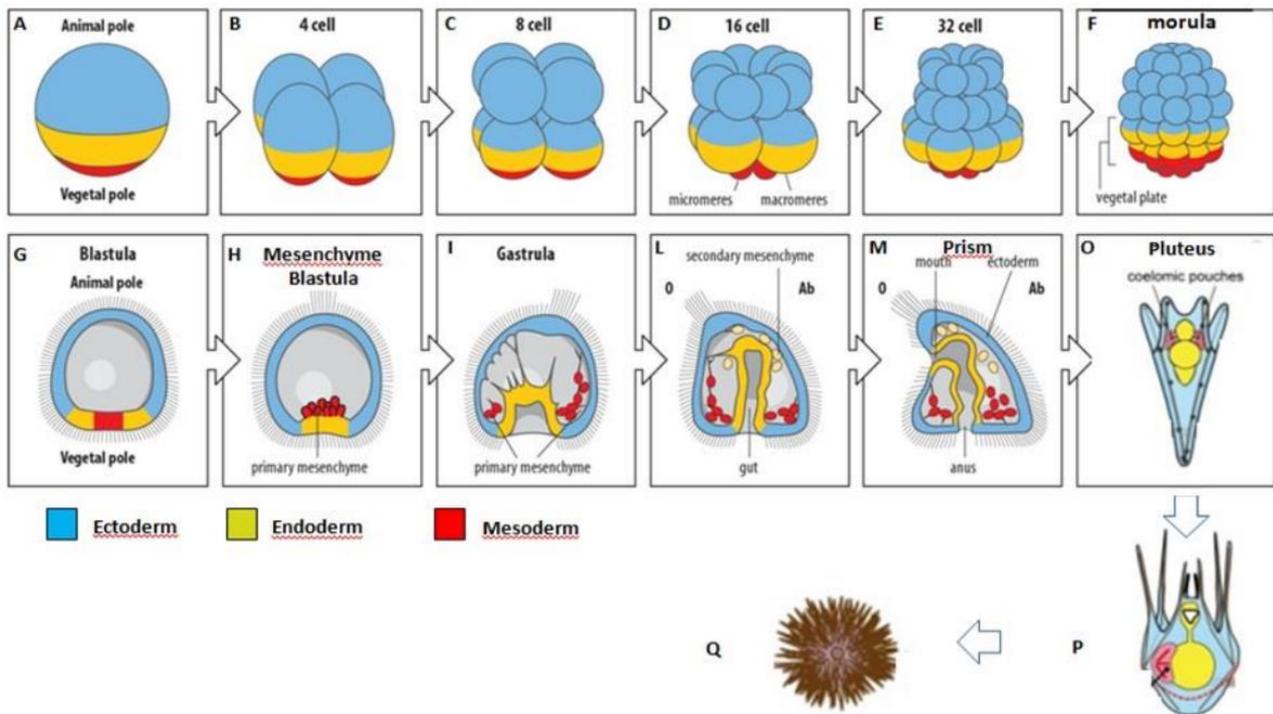
- Sferulociti, 8-20  $\mu\text{m}$  di diametro, con un citoplasma contenente sferule (2-5  $\mu\text{m}$  in diametro) contenenti mucopolisaccaridi e proteine, molte delle quali ad attività antimicrobica (Canicatti, 1992). Sono caratterizzati dalla presenza di vescicole al loro interno citoplasma, alcuni contenenti pigmenti (rosso, giallo, verde, marrone) (Ramírez-Gómez e García-Arraràs, 2010). Infatti, in base alle colorazioni di queste celomociti si distinguono gli sferulociti colorati (Red spherulocytes) (Fig. 14-a) e Sferulociti incolori (Colourless spherulocytes) (Figura 14-b). Negli Echinoidea la pigmentazione rossa è dovuta all'accumulo di composti naftochinonici chiamati Echinocromi. Tra questi troviamo l'echinocromo A e gli spinocromi (A, B, C, D, E) (Ageenko et al., 2022), i quali sono capaci di esercitare attività antimicrobiche, antiinfiammatorie e citotossiche (Kiselev et al., 2013; Li et al., 2013; Pozharitskaya et al., 2013).
- Cellule Vibratili (Vibratile cell), 5-10  $\mu\text{m}$  in diametro (Fig. 14-c), assenti in diverse specie, dotate di movimento all'interno della cavità celomatica. Il citoplasma contiene inclusi sferici, un complesso apparato del Golgi ben sviluppato e pochi mitocondri. Sono capaci di secernere sostanze mucoidi e sembrano essere coinvolti nell'aggregazione cellulare in corrispondenza di lesioni. A causa della loro ridotta distribuzione, le cellule vibratili sono state oggetto di diverse controversie: alcuni ricercatori le hanno considerate come protozoi parassiti, altri come cellule sfuggite dal peritoneo, gameti o artefatti (Hetzl, 1963; Endean, 1966).
- Cellule Cristalloidi (Crystal Cells), presenti nelle Oloturie in bassa quantità, variabili in lunghezza da 2 a 24  $\mu\text{m}$ , con una o più caratteristiche inclusioni cristalline di forma romboidale o stellata, di composizione sconosciuta (Smith, 1981).
- Emociti (Haemocytes) cellule di 10-20  $\mu\text{m}$  in diametro, di forma variabile, contenenti emoglobina nel citoplasma (Hetzl HR., 1963).



**Figura 14** Immunociti di *Paracentrotus lividus*: a) Sferulocita rosso; b) Sferulocita incolore; c) Cellula Vibratile; d) Fagocita petaloide; e) Fagociti filopodiale. Bar 10  $\mu\text{m}$ . (V. Matranga Ed., Echinodermata – Page Proofs as of 01/19/05 – Kröner, HD).

## 1.10 Sviluppo embrionale nel riccio di mare

I ricci *A. lixula* raggiungono il picco riproduttivo da maggio a luglio (Fenaux 1968). Durante questo periodo gli ovuli e lo sperma vengono rilasciati nell'acqua (Meidele e Scheibling, 2001).



**Figura 15** Modello di sviluppo embrionale nel riccio di mare (*Paracentrotus lividus*). In ogni riquadro è rappresentato uno stadio di sviluppo. A) uovo; B) 4 cellule; C) 8 cellule; D) 16 cellule; E) 32 cellule; F) morula; G) blastula; H) blastula con mesenchima primario; I) gastrula precoce; L) gastrula tardiva; M) prisma; O) pluteo a 4 braccia; P) echinopluteo; Q) riccio di mare alla fine della metamorfosi.

Dopo circa 60-90 minuti dalla fusione dei gameti lo zigote inizia a segmentare compiendo una prima scissione (2 blastomeri) e successivamente una seconda che produce lo stadio a quattro cellule (Fig. 15-B) (Brachet e Alexandre, 2012). La terza scissione è equatoriale o orizzontale, e taglia perpendicolarmente attraverso l'asse polare e da luogo allo stadio di otto cellule (Fig. 15-C) (Conway et al., 1984; Henry, 1998). In questo stadio le cellule sono tutte della stessa dimensione e compare una piccola cavità tra i blastomeri. La quarta scissione produce l'embrione allo stadio di 16 cellule e man mano che la scissione continua, si crea uno spazio che si allargherà per formare il blastocele (Fig. 15-D) (Giudice, 2012; Bodenstern, 2020). In questo spazio entra il fluido che è in gran parte acqua di mare (Conway et al., 1984; Vidavsky et al., 2014) (Fig. 15-D). Lo stadio di 32 cellule i mesomeri si dividono orizzontalmente ed equamente, producendo due livelli (o strati) di cellule (Fig. 15-E) (Conway et al., 1964; Logan e McClay, 1999). La sesta scissione produce l'embrione allo stadio di 64 cellule contenente otto livelli o strati di cellule (Giudice, 2012). Le ulteriori divisioni sempre racchiuse dalla membrana di fecondazione, portano l'embrione allo stadio di morula (Fig. 15-F)

(Conway et al., 1984; Giudice, 2012).

Lo stadio a **blastula** è caratterizzato dalla presenza di un grande blastocele pieno di liquido, e da una riduzione della velocità di divisione cellulare (Giudice, 2012; Le Verge-Serandour et al., 2022). Circa sei ore dopo la fecondazione l'embrione del riccio di mare entra nella fase iniziale di blastula (Williams e Anderson, 1975; Vacquier, 2011). Le cellule della blastula disposti in un unico strato attorno al blastocele e i blastomeri, sviluppano le ciglia sulla loro superficie esterna (Fig. 15-G). In seguito, le ciglia dell'embrione ruotano e consentono il movimento all'interno dell'involucro di fecondazione (Giudice, 2012). Dopo dieci-dodici ore dalla fecondazione la blastula media, composta da circa 600 cellule, fuoriesce dalla membrana di fecondazione (Conway et al., 1984). Ciò avviene grazie al rilascio di enzimi prodotti dalla blastula che indeboliscono e dissolvono sufficientemente la membrana affinché la blastula possa fuoriuscire (Ishida, 1936; Kopac, 1941). Una volta fuoriuscita inizia a muoversi nella colonna d'acqua grazie al movimento delle ciglia (Wheeler, 2016; Allen et al., 2022). Nella fase tardiva di blastula l'embrione si ispessisce al polo vegetale, formando la placca vegetale (Fig. 15-H) (Angerer, 2000; Giudice, 2012). Durante la gastrulazione si verificano estesi riarrangiamenti cellulari, solitamente definiti movimenti morfogenetici, che convertono la blastula cava e sferica in una gastrula pluristratificata. I movimenti morfogenetici delle cellule dell'embrione vengono riorganizzate nei tre strati germinali: *ectoderma*, *mesoderma* ed *endoderma* (Gustafson e Wolpert 1967; Gustafson e Toneby 1971). La gastrulazione inizia quando le cellule mesenchimali primarie, che derivano dai micromeri, migrano come singole cellule nella regione del blastocele (Campanale et al., 2014; McClay et al., 2020). In questa fase iniziale della gastrulazione, l'embrione viene chiamato blastula mesenchimale (Fig. 15-H). Dopo l'ingresso delle cellule del mesenchima primario, costituito in questa fase da mesenchima secondario e mesoderma, invagina formando una depressione chiamata blastoporo (Fig. 15-I) (Kominami e Takata, 2004; Formery et al., 2022). Man mano che l'invaginazione della regione della placca vegetale continua, si forma un tubo a estremità cieca, l'archenteron (Conway et al., 1984). L'archenteron continua ad allungarsi grazie ai movimenti cellulari e ciò permette all'estremità dell'archenteron, costituita dal mesenchima secondario e dalle cellule del mesoderma, di entrare in contatto con l'ectoderma opposto al blastoporo (Fig. 15-L) (Technau e Scholz, 2003; Arnone et al., 2015). L'invaginazione avviene dalle 20 alle 24 ore più tardi dalla fecondazione (Burke et al., 1991). Sono necessarie circa sei ore affinché l'archenteron si muova attraverso il blastocele e entra in contatto con l'ectoderma del polo animale dell'embrione (Conway et al., 1984). In questo stadio la gastrula contiene circa 1000 cellule (Gustafson e Wolpert 1967; Conway et al., 1984). Successivamente si raggiunge lo stadio a prisma, caratterizzato da un cambiamento nella forma complessiva dell'embrione dove ha inizio la differenziazione della struttura larvale (Fig. 15-M) (Giudice, 2012). Al punto di contatto tra la punta dell'archenteron e l'ectoderma

sovrastante, l'ectoderma si invagina leggermente per formare il futuro stomodaeum (McIntyre, 2012; McClay et al., 2020). Dallo stomodaeum nella larva si svilupperanno la bocca e l'apertura anteriore del tubo digerente (Conway et al., 1984; McClay et al., 2020). Dal blastoporo si svilupperà invece l'apertura anale del tratto digestivo (Martik e McClay, 2014; Holland, 2020). Nell'archenteron compaiono due restringimenti che lo suddividono in tre regioni: esofago, stomaco e intestino (Lyons et al., 2012). Durante lo stadio prismatico l'embrione assume la forma di una piramide troncata e arrotondata (Baldrian e Wanninger 2015; de Santiago et al., 2023). Il lato dell'embrione contenente lo stomodaeum diventa appiattito formando la superficie orale (classicamente denominata lato ventrale) della larva in via di sviluppo. Anche il lato blastoporale dell'embrione si appiattisce e forma la superficie anale (classicamente denominata lato posteriore) della larva in via di sviluppo (Arnone et al., 2015; Pontheaux et al., 2021).

Allo stadio di pluteo le larve sono completamente sviluppate (Fig. 15-O) e sulla superficie orale appare un'escrescenza, il lobo orale stomodaeum (Conway et al., 1984). Man mano che lo sviluppo procede compaiono due bracci, i bracci preorali e si estendono dal lobo orale (Conway et al., 1984). Appaiono due bracci aggiuntivi, (bracci postorali) e si estendono dalla giunzione delle superfici orale e anale (Conway et al., 1984). Le spicole triradiate formate nello stadio a prisma si sviluppano in scheletriche aste che si estendono attraverso il corpo e attraverso i bracci (aste preorali e aste postorali). A causa dei cambiamenti nella forma della larva, il tratto digestivo si sviluppa e si presenta piegato a forma di J e lo stomaco si allarga e riempie gran parte del corpo del pluteo (Conway et al., 1984). Una larva di pluteo in questa fase di sviluppo viene chiamata larva di pluteo a quattro braccia (Shakirovich, 2020; Formery et al., 2022). Successivamente man mano che il pluteo a quattro braccia si nutre, si sviluppa fino al raggiungimento dello stadio a otto braccia (Conway et al., 1984). Per consentire l'accrescimento della larva è necessario un periodo di alimentazione estensivo e continuo prima che avvenga la metamorfosi in un riccio di mare in miniatura (Hinegardner, 1969; Okazaki, 1975; Harris e Eddy, 2015). Durante questo periodo, che dura generalmente da quattro a sei settimane (Conway et al., 1984), le larve dei ricci (Fig. 15-P), sono particolarmente mobili e favoriscono la dispersione delle specie (Gaylord et al., 2013; Harris e Eddy, 2015; Doll et al., 2022).

### **1.10.1 Effetti dello stress sullo sviluppo embrionale**

Numerosi studi condotti sugli embrioni dei ricci dimostrano che, se sottoposti a stress ambientali (termici, patogeni, tossine) questi organismi rispondono aumentando per esempio i livelli e sintesi delle chaperonine mitocondriali appartenente alla famiglia delle Heat shock proteine (HSPs) (Roccheri et al., 2001). Queste proteine svolgono la funzione protettiva contro molti tipi di fattori di stress ambientale (Casano et al., 2003; Roccheri et al., 2004; Campanale et al., 2011; Pinsino et al.,

2011; Russo et al., 2014; Aguirre-Martínez et al., 2015; Bonaventura et al., 2017; Chiarelli et al., 2019). A livello intracellulare si occupano dell'assemblaggio, localizzazione, secrezione, degradazione e del corretto ripiegamento delle proteine che ottengono la loro struttura tridimensionale (Gething, 1997; Feder 1999). Inoltre, un aumento della sintesi di queste chaperonine può promuovere anche l'apoptosi negli embrioni di riccio di mare (Roccheri et al., 2004; Agnello et al., 2007, Filosto et al., 2008; Chiarelli et al., 2014a).

Un altro importante meccanismo biologico con cui gli embrioni di riccio di mare si difendono e resistono alle condizioni di stress generate da sostanze inquinanti/tossiche è quello dell'autofagia (Filosto et al. 2008; Chiarelli et al., 2011; Chiarelli e Roccheri, 2014b). Questo meccanismo cellulare permette alle cellule eucariotiche di sequestrare e degradare porzioni di citoplasma e organelli attraverso la via lisosomiale (Klionsky e Emr 2000), e aumenta quando gli animali sono sottoposti a stress ambientali (Cuervo et al., 2004; Moore e Allen 2006a; Tasdemir et al 2008) per permettere il riciclaggio di componenti cellulari danneggiate (Chiarelli et al., 2014, 2016).

Malgrado questi meccanismi molecolari sia efficienti, può succedere che non riescono a contrastare l'effetto tossico di alcune sostanze e di conseguenza gli embrioni di riccio di mare degenerano (Romano et al. 2003), come osservato in seguito all'esposizione a staurosporine batteriche (Voronina e Wessel, 2001) o le ossilipine derivate da diatomee (Buttino et al., 1999). Questi composti aumentano lo stress del reticolo endoplasmatico in modo dose-dipendente, aumentando l'espressione della proteina CHOP-10/GADD153 (C/EBP homologous protein/DNA damage-inducible gene 153), p62/SQSTM1 (p62 protein/sequestosome 1) e delle LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) (Chiarelli et al., 2021). Questi bio-marker sono legati all'arresto del ciclo cellulare e all'attivazione della morte per apoptosi (Chiarelli et al., 2021), attivando la caspasi-8 e caspasi 3/7 (Romano et al. 2003; Hansen et al., 2004; Romano et al. 2010; Marrone et al., 2012; Ruocco et al., 2016). Una volta attivate, le caspasi-3/7 mature scindono un ampio insieme di substrati, determinando infine i caratteristici segni morfologici, come la formazione delle "Blebs" e dei corpi apoptotici o a livello molecolare la condensazione nucleare e la frammentazione del DNA genomico (Leonard et al., 2002; Lakhani et al., 2006; Lamkanfi 2010).

## 2. Scopo del lavoro

Lo scopo di questo progetto ha riguardato la caratterizzazione dei metaboliti secondari prodotti da alghe brune *Ericaria brachycarpa*, *Ericaria crinita* e dell'alga rossa *Asparagopsis taxiformis* presenti nei litorali siciliani, e la valutazione dei loro effetti biologici.

Inizialmente, è stato effettuato il campionamento delle alghe di interesse mettendo a punto opportune metodologie chimiche per l'estrazione e l'identificazione dei metaboliti secondari presenti nelle alghe. Gli estratti ottenuti sono stati valutati rispetto alla potenziale attività biologica quali antiossidante, antimicrobica, citotossica ed immunomodulante nel riccio di mare *Arbacia lixula*, quale sistema animale marino modello.

La tesi si è suddivisa in 2 fasi:

Prima fase ha riguardato:

- Campionamento, estrazione e caratterizzazione chimica dei metaboliti secondari presenti nelle specie di macroalghe *E. crinita*, *E. brachycarpa* ed *A. taxiformis*.
- Valutazione del contenuto fenolico totale degli estratti di *E. brachycarpa*, *E. crinita* e *A. taxiformis* per la determinazione del potere antiossidante.

La seconda fase ha avuto come obiettivo la valutazione delle proprietà biologiche degli estratti di *E. crinita*, *E. brachycarpa* ed *A. taxiformis* al fine di valutarne possibili applicazioni innovative in ambito farmaceutico, nutraceutico, zootecnico e alimentare.

I saggi biologici hanno riguardato lo studio delle seguenti attività:

- Valutazione attività antimicrobica degli estratti di *E. brachycarpa*, *E. crinita* e *A. taxiformis*, verso ceppi patogeni di origine alimentare di *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.
- Valutazione degli estratti di *E. crinita*, *E. brachycarpa* ed *A. taxiformis* attività citotossica verso eritrociti di mammifero e su linea tumorale HepG2;
- Valutazione proprietà pro-apoptotica dell'estratto di *E. brachycarpa* in linea tumorale di neuroblastoma SH-SY5Y (Indifferenziate e differenziate);
- Valutazione dell'attività immunomodulante degli estratti di *E. brachycarpa*, *E. crinita*, *A. taxiformis* *in vivo* sul riccio di mare *A. lixula* uno dei responsabili della degradazione dei cistoseriati ad aree a basso indice di biodiversità (Barren Habitat);
- Valutazione dell'attività embriotossica dell'estratto di *E. brachycarpa* nel riccio di mare *A. lixula*, sui diversi stadi di sviluppo (zigote, gastrula e pluteo);
- Valutazione dell'interazione ecologica tra *A. lixula* e le macroalghe *E. crinita* (autoctona) ed *Caulerpa taxifolia* var. *disticophilla* (alloctona), attraverso la valutazione dell'attività di pascolo dei ricci mare *A. lixula*;

- Valutazione dell'attività miorilassante dell'estratto di *A. taxifoirnis*, contenente composti bromurati, su colon di *Rattus norvegicus*, per verificare l'attività miorilassante.

I risultati di questo progetto consentiranno di comprendere l'interazione macroalghe/riccio, mediate da semiochimici, promuovendo una maggiore conoscenza dell'interazione tra le specie presenti nell'habitat marino, con lo scopo di acquisire conoscenze di base per la tutela e conservazione della biodiversità ambientale. Inoltre, considerando la potenziale bioattività di questi metaboliti secondari sarà possibile sviluppare nuove molecole di origine naturale potenzialmente applicabili in ambito cosmetico, nutraceutico o farmaceutico.

### **3. Estrazione, caratterizzazione e valutazione del contenuto fenolico negli estratti di *E. brachycarpa*, *E. crinita*, *A. taxiformis*.**

#### **3.1 Materiali e metodi**

##### **3.1.1 Campionamento e preparazione degli estratti algali**

Gli sporofiti di *E. crinita*, *E. brachycarpa* e i gametofiti di *A. taxiformis* sono stati campionati nel Golfo di Palermo. Sono stati lavati per rimuovere detriti ed epifiti, ed essiccati ad una temperatura di 40 °C in stufa per 48 ore. I talli successivamente essiccati sono stati macinati finemente ottenendo una polvere. Da queste ultime sono stati prodotti gli estratti utilizzando 0.5 g di macinato e 10 ml di CHCl<sub>3</sub>/MeOH (2:1 v/v). Il solvente è stato rimosso successivamente mediante Rotavapor (BUCHI) e il campione ottenuto è stato conservato a -20 °C fino all'utilizzo.

##### **3.1.2 Caratterizzazione dei metaboliti presenti nei tre estratti algali mediante HPLC-MS**

L'analisi HPLC/MS è stata eseguita come precedentemente descritto (Faddetta et al., 2023). I dati dello spettrometro di massa sono stati analizzati per l'annotazione dei metaboliti utilizzando MassHunter Qualitative Analysis B.06.00 e il database Metabolomic Workbench [<https://www.metabolomicsworkbench.org/search/ms.php>].

##### **3.1.3 Valutazione del contenuto fenolico degli estratti algali CHCl<sub>3</sub>-MeOH**

Per determinare il contenuto fenolico nell'estratto di *E. brachycarpa* (EBE), *E. crinita* (ECE), *A. taxiformis* (ATE) è stato utilizzato il reagente Folin-Ciocalteu. Gli estratti sono stati solubilizzati in metanolo alla concentrazione di 1 mg/ml e la curva di calibrazione è stata preparata utilizzando soluzioni a diverse concentrazioni di acido gallico. Le letture di assorbimento dei diversi campioni sono state condotte utilizzando lo spettrofotometro (SPECORD S 600).

#### **3.2 Risultati e discussioni**

##### **3.2.1 Metaboliti presenti negli estratti algali**

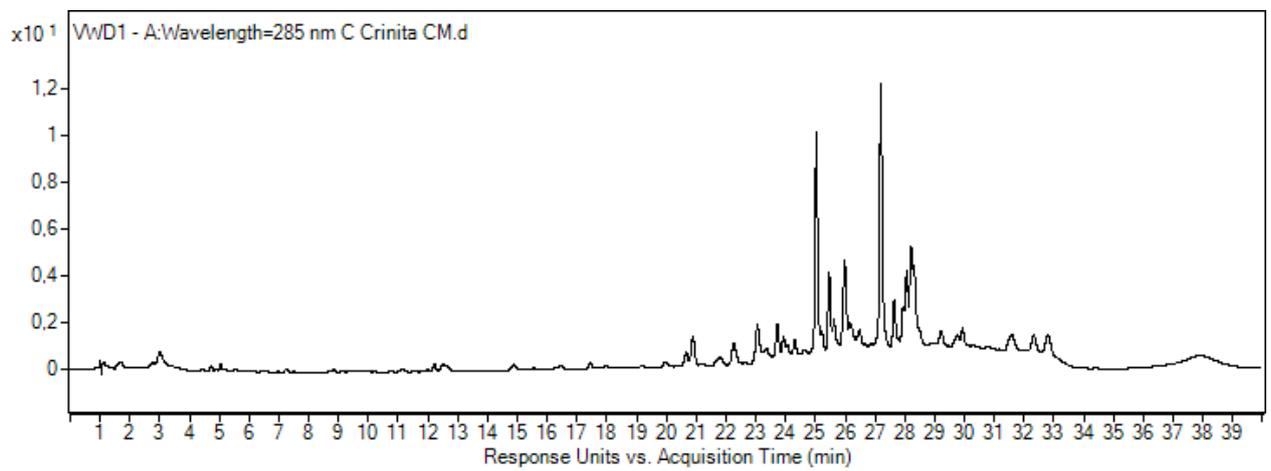
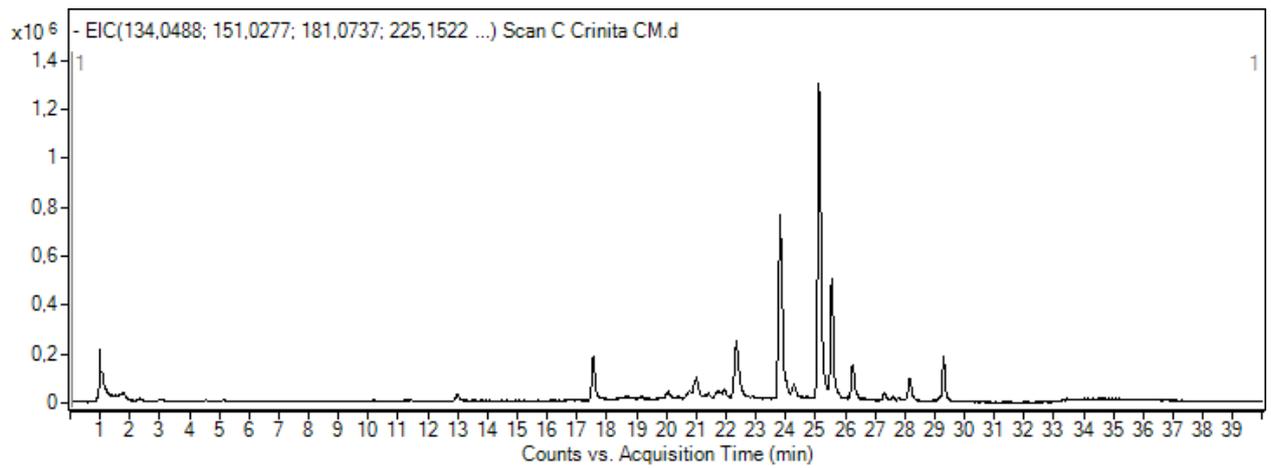
L'analisi qualitativa dei metaboliti presenti nei tre estratti algali, tramite analisi HPLC-ESI-QToF-MS in modalità negativa, ha consentito la caratterizzazione di un totale di 49 composti di cui 18 in *E. crinita* (Fig. 16), 20 in *E. brachycarpa* (Fig. 17) e 11 in *A. taxiformis* (Fig. 18). L'estratto della specie *E. crinita* in CHCl<sub>3</sub>-MeOH ha mostrato l'abbondante presenza di composti meroterpenoidi (Tab.1) (Fig. 19), a differenza degli altri estratti di EBE (Tab. 2) e ATE (Tab. 3). Questi composti come dimostrato da Amico et al. (1995) sono prodotti e presenti nel genere *Cystoseira* e i più rappresentativi sono i meroterpenoidi che possono avere strutture lineari, cicliche o riarrangiate. In accordo con i dati

riportati in letteratura da altri autori i composti caratterizzati in ECE sono meroterpenoidi lineari, presenti in diverse specie di alghe brune della famiglia delle Sargassaceae nel genere *Cystoseira sensu lato* e nel genere *Sargassum* spp. (de Sousa et al., 2017).

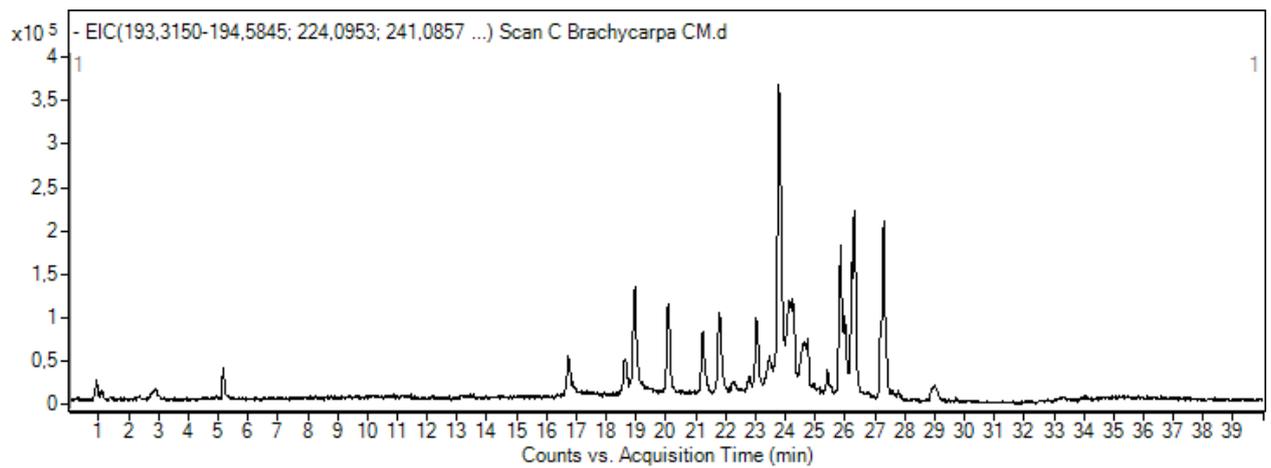
I meroditerpenoidi hanno un'origine biosintetica mista e mostrano un'ampia gamma di diversità strutturale. La loro struttura di base è costituita da un sistema di anelli recante una catena laterale diterpenoide. A livello strutturale si osservano variazioni in termini di gruppi funzionali e di saturazione/ciclizzazione della catena laterale diterpenoidica e sono stati classificati nelle alghe come: plastochinoni, cromanol, cromeni, cromoni, meroditerpenoidi ciclici, nahocoli e isonahocoli (Fernando et al., 2022b). Inoltre, la loro lipofilia e basso peso molecolare, li rendono propensi ad attraversare la barriera ematoencefalica collocando i meroditerpenoidi come potenziali candidati farmacologici come dimostrato da diversi autori (de Sousa et al., 2017).

D'altro canto, a differenza della precedente, gli estratti in CHCl<sub>3</sub>-MeOH della specie *E. brachycarpa* hanno permesso di evidenziare una composizione chimica prevalentemente lipidica (Tab. 2) (Fig. 20), che si differenzia rispetto a ECE e ATE. Questa differenza rispetto agli altri estratti algali potrebbe essere dovuta a diversi fattori, infatti, è noto che il contenuto lipidico delle alghe varia dall'1 al 5% della sostanza secca e in dipendenza dalla specie (Van Ginneken et al., 2011), dalla stagione (Gerasimenko et al. 2010a; Nomura et al., 2013) e dalla distribuzione geografica (Terasaki et al., 2009; Thinakaran et al. 2012; Nomura et al. 2013). Inoltre, in accordo ad altri autori che hanno studiato gli estratti delle macroalghe rosso-brune (e.g. *Padina australis*) i nostri risultati hanno mostrato che, tra i vari lipidi individuati in questo estratto, sono presenti alcuni derivati dell'acido palmitico (Amico V. 1995; Ilijas et al., 2009; Susanto et al., 2016; Ilijas et al., 2020). Questo risultato è di notevole importanza per la comprensione delle potenzialità degli estratti soprattutto se si considera che questi acidi grassi e i loro derivati, estratti in abbondanza per esempio anche nella microalga *Spirulina platensis* hanno avuto un'importante attività citotossica quando testati da altri autori contro le cellule di carcinoma prostatico (PC3) e adenocarcinoma mammario umano (MDA-MB-231) (Ghallab et al., 2022). Sempre nell'estratto EBE è stata caratterizzata per la prima volta abbondante presenza di ossilipine (Fig. 20) e tra questi, in accordo con quanto riportato in letteratura, sono stati trovati l'acido oxo-fitodienoico derivato ciclico 1 e gli acidi grassi idrossilati lineari 2-7 (Ritter et al., 2008). Le lunghezze del carbonio di queste ossilipine (da C<sub>16</sub> a C<sub>20</sub>) sono in linea con la stragrande maggioranza delle ossilipine derivate dal metabolismo delle lipossigenasi dei precursori degli acidi grassi polinsaturi presenti negli organismi marini, che hanno una varietà di lunghezze di carbonio da C<sub>16</sub> a C<sub>22</sub> (Gerwick e Singh, 2002). Ad eccezione del composto 1 (acido osso-fitodienoico), tutti gli altri composti appartengono alla classe degli idrossiacidi (HEPE) delle ossilipine lineari. Sebbene le ossilipine siano note in altre specie di macroalghe (Barbosa et al., 2016), a nostra conoscenza questa

è la prima volta che vengono estratte da specie del genere *Ericaria*. Inoltre, questi composti sono stati identificate nelle diatomee e vengono prodotti dopo il danno cellulare e durante il pascolo dei predatori (Ruocco et al., 2019). Nelle alghe brune è stato dimostrato che questi composti svolgono un ruolo nei meccanismi di attrazione e difesa chimica (Pohnert e Boland, 2002). L'attrazione chimica tra i gameti femminili e maschili delle alghe brune è mediata da feromoni, come l'ormosirene e il fucoserratene, che sono idrocarburi prodotti attraverso la via delle lipossigenasi (Pohnert e Boland, 2002). Per quanto riguarda la funzione delle ossilipine come meccanismo di difesa, studi recenti hanno dimostrato che in *Laminaria digitata* la formazione di ossilipine avviene specialmente negli sporofiti esposti al lipopolisaccaride (Küpper et al., 2006), indicando che queste molecole possono essere prodotte dalla macroalghe in seguito al riconoscimento di molecole associate ai patogeni. Inoltre, le ossilipine sembrano essere coinvolte anche nelle risposte allo stress abiotico come in caso di esposizione al rame in *L. digitata* che ha indotto accumulo di una serie di ossilipine complesse, che si ritiene attivino meccanismi protettivi in modo simile ai jasmonati nelle piante superiori e nelle alghe rosse (Ritter et al., 2008). Per quanto concerne infine la caratterizzazione degli estratti di *A. taxiformis*, viene riscontrata un'abbondante presenza di composti alogenati a basso peso molecolare (Tab. 3) ed in particolare di composti bromurati (Fig. 21). Questi composti alogenati possono essere volatili, grazie ai bassi pesi molecolari, costituiti da catene da uno a quattro atomi di carbonio, uno o più atomi di alogeno e altri gruppi funzionali come chetoni, alcoli, acidi carbossilici e legami insaturi (Ponte et al., 2022). In natura nelle macroalghe sono molto presenti (Rossi et al., 2017), e sono importanti dal punto di vista farmacologico perché influiscono sulla lipofilia e solubilità dei composti nella membrana cellulare, favorendo la permeazione e la diffusione del farmaco nelle cellule (Jitareanu et al., 2018). Anche in questo caso i nostri risultati sono in buon accordo con i dati riportati in letteratura in cui si riportano diversi composti bromurati prodotti dal genere *Asparagopsis* (McConnell et al., 1977; Greff et al., 2014; Hutchings et al., 2024). Uno studio recente dimostrerebbe che la biogenesi di questi composti, nel genere *Asparagopsis* sia dovuta alla presenza di geni che codifica l'enzima per la produzione dei ROS e della aloperossidasi, capaci di utilizzare come substrati idrocarburi gli acidi grassi, e permetterebbero la biosintesi di prodotti alogenati a basso peso molecolare nelle alghe marine (Thapa et al., 2020). In natura le alghe rosse aumentano la produzione di questi composti quando sottoposte a stress ambientali e ossidativi, questo fornisce un meccanismo di difesa verso gli animali marini erbivori e dai batteri patogeni (Paul et al., 2006b; Paul e Pohnert, 2011).



**Figura 16** Spettro ESI-EIC (in alto) e UV-V 285 nm (in basso) degli estratti  $\text{CHCl}_3$ -MeOH della specie *E. crinita*.



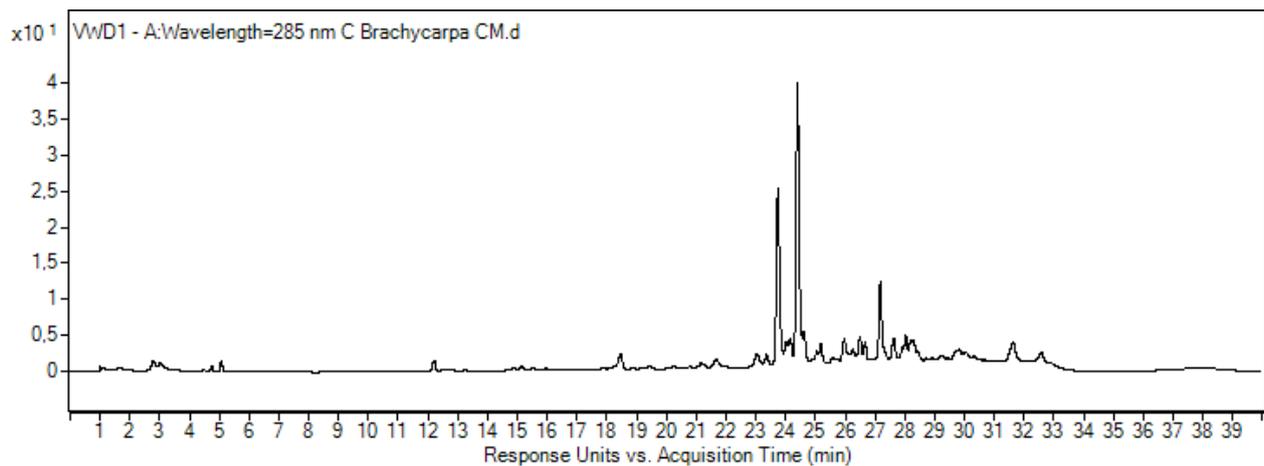


Figura 17 Spettro ESI-EIC (in alto) e UV-V 285 nm (in basso) degli estratti CHCl<sub>3</sub>-MeOH *E. brachycarpa*.

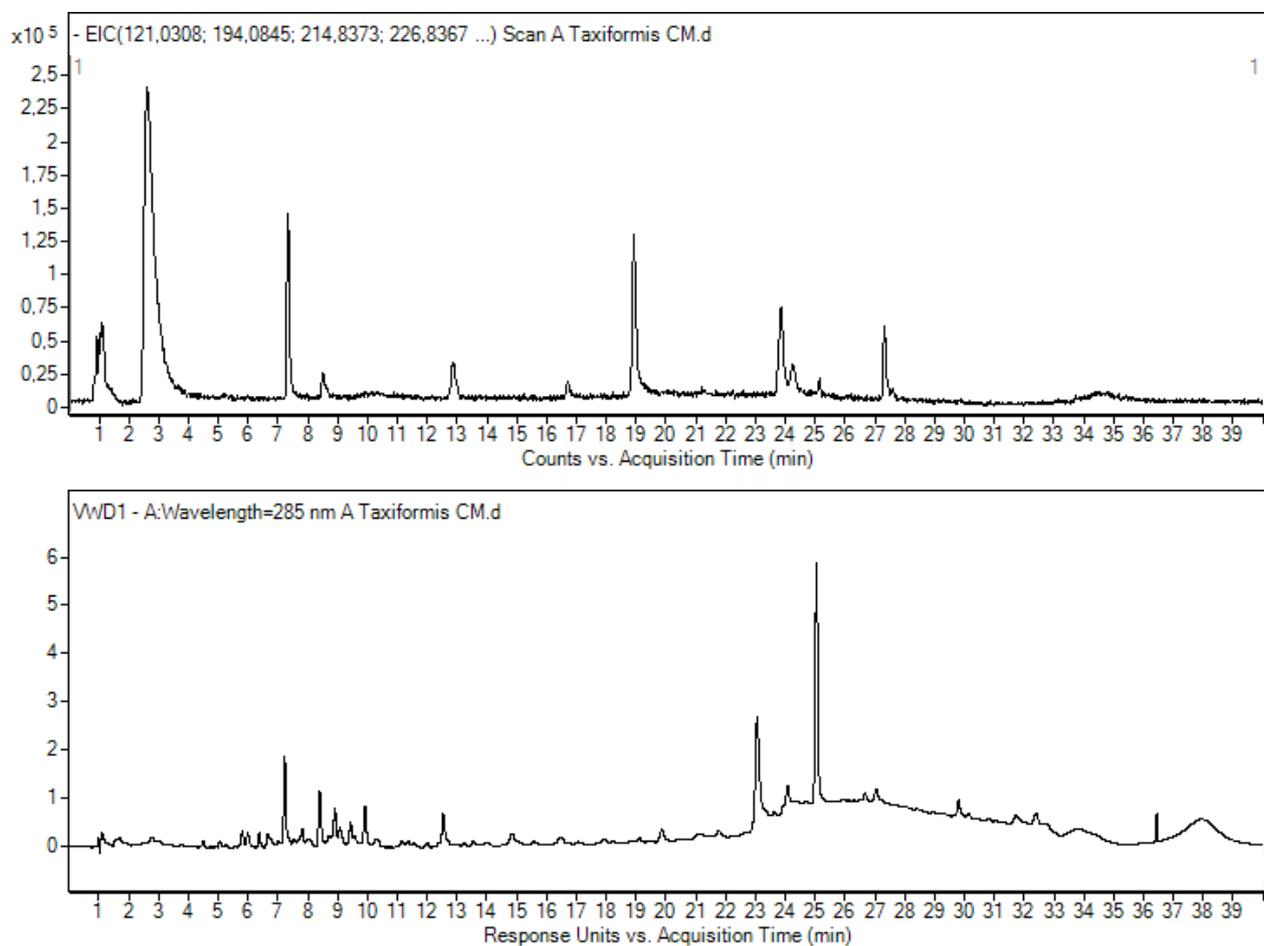
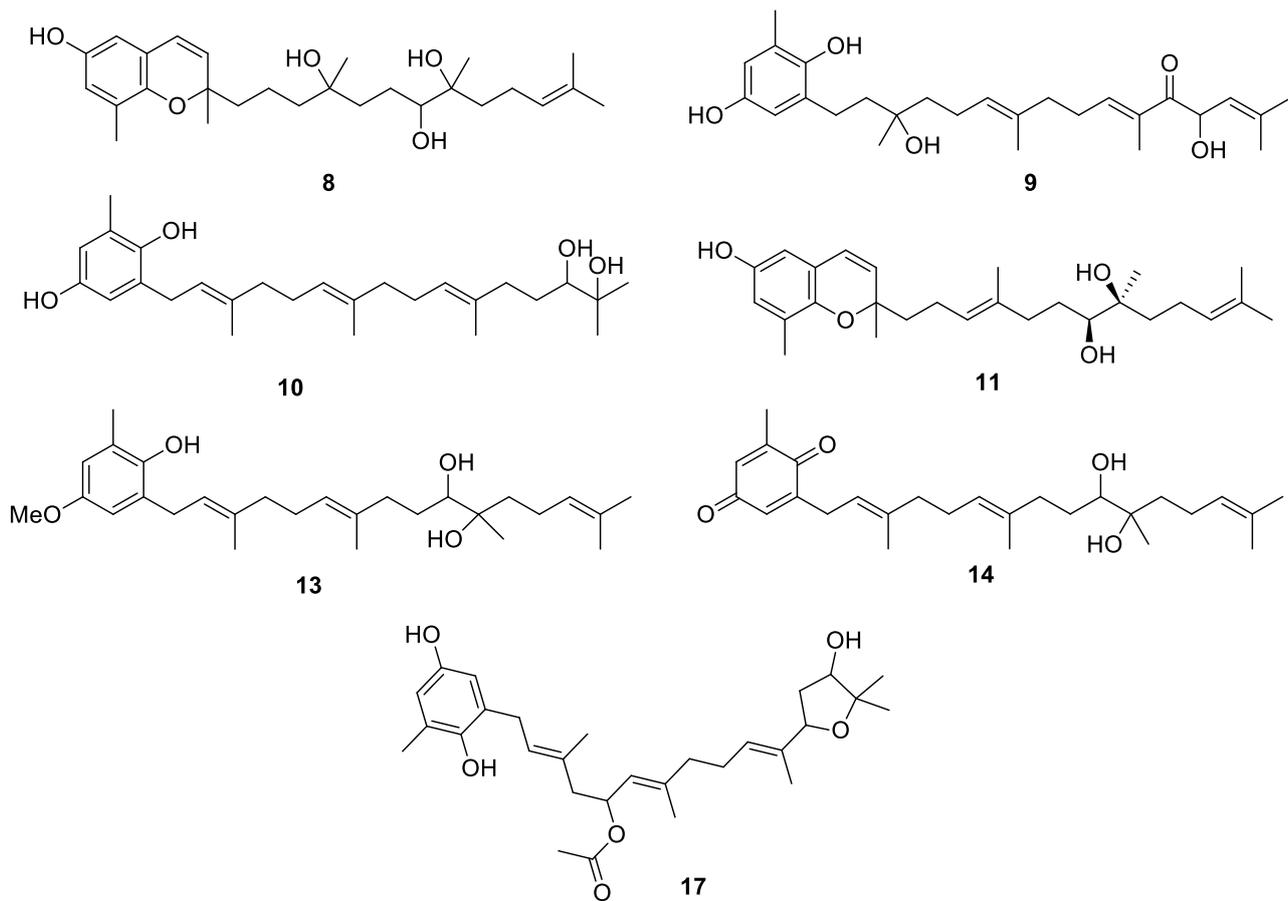


Figura 18 Spettro ESI-EIC (in alto) e UV-V 285 nm (in basso) degli estratti CHCl<sub>3</sub>-MeOH *A. taxiformis*.

Tabella 1 Caratterizzazione chimica di ECE in CHCl<sub>3</sub>-MeOH (2:1).

Specie	RT [min]	Spe. Mass [m/z]	Formula Molecolare	Nome
<i>Ericaria crinita</i>				

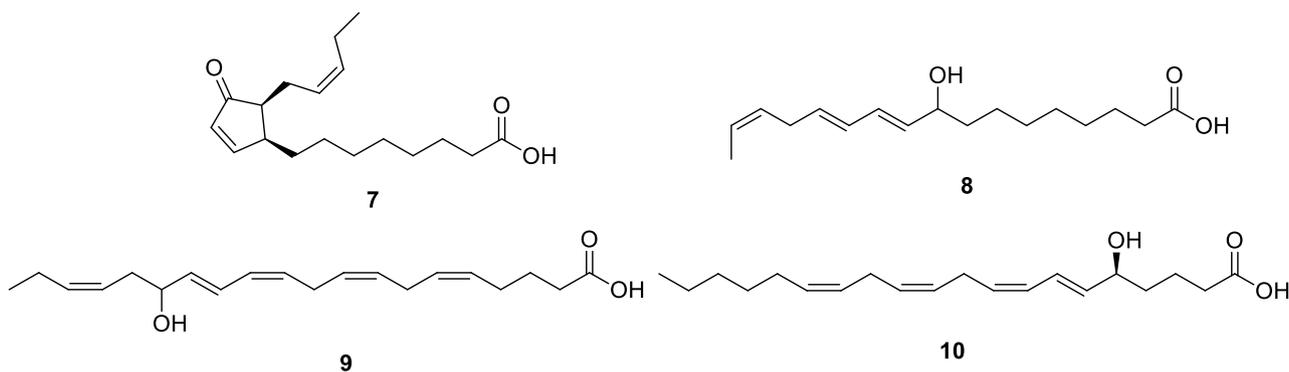
1	1.04	181.0737	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	Mannitol
2	1.12	387.1186	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	Cellobiose
3	1.77	134.0488	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>	Adenine
4	3.01	151.0277	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Xanthine
5	5.15	241.0851	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Thymidine
6	12.97	225.1522	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	Methyl dihydrojasmonate
7	16.78	286.2413	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>3</sub>	Lauroyl diethanolamide
8	17.55	445.3008	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>5</sub>	2-[(2,6,10-trimethyltrideca-2 <i>E</i> -ene-6,7,10-triol)-13-yl]-6-hydroxy-2,8-dimethyl-2 <i>H</i> -chromene
9	21.00	479.2612 [M+Cl] -	C <sub>27</sub> H <sub>40</sub> O <sub>5</sub>	(6 <i>E</i> ,10 <i>E</i> )-16-(2,5-dihydroxy-3-methylphenyl)-4,14-dihydroxy-2,6,10,14-tetramethylhexadeca-2,6,10-trien-5-one
10	22.36	429.3046	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	(2-((2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> )-10,11-dihydroxy-3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,6,14-trien-1-yl)-6-methylbenzene-1,4-diol
11	23.82	427.2904	C <sub>27</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub>	2-[(2,6,10-trimethyltrideca-2,10 <i>E</i> -diene-6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> -diol)-13-yl]-6-hydroxy-2,8-dimethyl-2 <i>H</i> -chromene
12	24.28	455.2821 [M+Cl] -	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>7</sub>	<i>D</i> -Mannitol, 1-hexadecanoate
13	25.11	443.3215	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> O <sub>4</sub>	(10 <i>E</i> ,14 <i>E</i> )-16-(2-hydroxy-5-methoxy-3-methylphenyl)-2,6,10,14-tetramethylhexadeca-2,10,14-triene-6,7-diol
14	25.55	427.2900	C <sub>27</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub>	2-((2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> )-10,11-dihydroxy-3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,6,14-trien-1-yl)-6-methylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione
15	26.28	297.2463	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	Hydroxyoleic acid
16	27.32	367.2677	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	1,3-Benzenediol, 5-(7,10,13,16-nonadecatetraenyl) -, ( <i>all-Z</i> )
17	28.15	483.2830	C <sub>29</sub> H <sub>40</sub> O <sub>6</sub>	1,4-Benzendiol, 2-[5-(acetyloxy)-3,7-dimethyl-11-(tetrahydro-4-hydroxy-5,5-dimethyl-2-furanyl)-2,6,10-dodecatrienyl]-6-methyl-
18	29.28	609.1809	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	Hesperidin



**Figura 19** Schema Strutture dei meroterpeni identificati.

**Tabella 2 Caratterizzazione chimica di EBE in CHCl<sub>3</sub>-MeOH (2:1).**

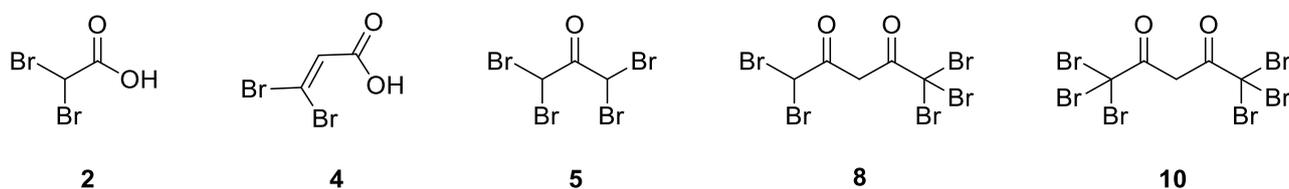
<i>Ericaria brachycarpa</i>					
1	1.09	193.815 [M+Cl] -	FeCl <sub>3</sub>	Inorganic salt	
2	2.9	243.0645	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	Uridine	
3	5.14	241.0857	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Thymidine	
4	16.74	322.2194 [M+Cl] -	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>9</sub> S	N-acetyl-6-O-sulfo-D-glucosamine	
5	18.63	224.0953	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>	3-Hydroxytyrosine ethyl ester	
6	18.95	194.0845	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>	Tyrosine methyl ester	
7	20.09	291.1999	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	Oxo-phytodienoic acid	
8	21.29	293.2160	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	Hydroxy-octadecatrienoic acid	
9	21.80	317.2158	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	Hydroxy-eicosapentaenoic acid	
10	23.04	319.2314	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	Hydroxy-eicosatetraenoic acid	
11	23.51	317.2158	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	Hydroxy-eicosapentaenoic acid isomer	
12	23.81	555.2903	C <sub>32</sub> H <sub>44</sub> O <sub>8</sub>	Cucurbitacin	
13	24.09	555.2903	C <sub>32</sub> H <sub>44</sub> O <sub>8</sub>	Cucurbitacin isomer	
14	24.26	455.2829 [M+Cl] -	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>7</sub>	D-Glucitol monopalmitate	
15	24.60	535.2521 [M+Cl] -	C <sub>29</sub> H <sub>40</sub> O <sub>7</sub>	Cholesta-4,7-diene-3,6,22-trione, 2-(acetyloxy) - 14,20-dihydroxy-,	
16	24.73	481.2989 [M+Cl] -	C <sub>24</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	Sorbitol monooleate	
17	25.82	271.2311	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	Hydroxypalmitic acid	
18	26.00	356.1909	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	Tripeptide His-Ile-Ser	
19	26.33	297.2472	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	Hydroxyoleic acid	
20	27.29	367.2684	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	1,3-Benzenediol, 5-(7,10,13,16-nonadecatetraenyl) -, ( <i>all-Z</i> ) -	



**Figura 20** Schema Struttura delle ossilipine identificate.

**Tabella 3** Caratterizzazione chimica di ATE in CHCl<sub>3</sub>-MeOH (2:1).

<i>Asparagopsis taxiformis</i>					
1	1.09	371.6188	FeBr <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Inorganic salt	
2	2.64	214.8373	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Dibromoacetic acid	
3	7.32	121.0308	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	Benzoic Acid	
4	8.50	226.8367	C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,3-dibromoacrylic acid	
5	10.03	368.6792	C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> Br <sub>4</sub> O	tetrabromo acetone	
6	12.83	388.8223	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> I <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2-HYDROXY-3,5-DIODOBENZOIC ACID	
7	18.92	194.0845	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>	Tyrosine methyl ester	
8	21.26	488.6034	C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> Br <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	pentabromoacetylacetone	
9	23.81	555.2903	C <sub>32</sub> H <sub>44</sub> O <sub>8</sub>	Cucurbitacin	
10	25.16	566.5148	C <sub>5</sub> H <sub>2</sub> Br <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	hexabromoacetylacetone	
11	27.30	367.2628	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	1,3-Benzenediol, 5-(7,10,13,16-nonadecatetraenyl) -, ( <i>all-Z</i> ) -	

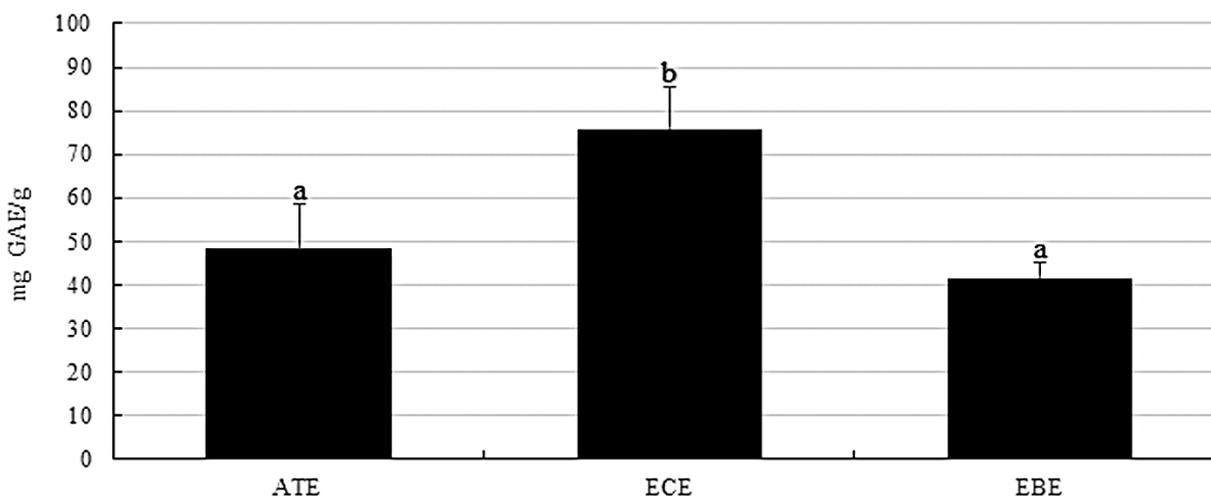


**Figura 21** Schema Strutture dei composti bromurati identificati.

### 3.2.2 Contenuto fenolico degli estratti algali

In merito alla valutazione del contenuto fenolico degli estratti algali, i risultati ottenuti hanno mostrato valori pari a: 48.3 mg GAE/g in ATE; 75.8 mg GAE/g in ECE e 41.5 mg GAE/g in EBE (Fig. 22). Il contenuto fenolico è risultato significativamente più alto nell'estratto di *E. crinita* ( $p < 0.001$ ), rispetto agli estratti di *Ericaria brachycarpa* e *Asparagopsis taxiformis*. D'altro canto, il contenuto fenolico è risultato simile tra gli estratti di ATE e EBE. I risultati ottenuti sono in accordo con Čagalj et al., (2022) che, analizzando l'estratto della specie *Cystoseira compressa* in 50% di etanolo 1:10 (v/v) come solvente di estrazione, hanno osservato un contenuto fenolico totale (CFT) compreso tra 48.2 e 83.4 mg GAE/g. La presenza dei composti fenolici negli estratti algali potrebbe conferire a questi ultimi importanti proprietà antiossidanti ed antinfiammatorie (Kazłowska et al., 2010; Kruk et al., 2022; Mauro et al., 2023).

Le differenze riscontrate nei nostri estratti, in accordo con la letteratura scientifica, potrebbero essere dovute ai cambiamenti stagionali e ambientali (temperatura, salinità, intensità della luce, erbivori) (Generalčić Mekinić et al., 2019), alla distribuzione geografica (Mancuso et al., 2019) o dipendere dalla specie considerata (Mannino et al., 2017).



**Figura 22** Contenuto fenolico di ATE; ECE, EBE. Le differenze significative sono indicate con lettere diverse (Tukey HSD). <sup>a</sup> $P > 0.05$ ; <sup>b</sup> $P \leq 0.001$ .

## 4. Valutazione dell'attività antimicrobica contro patogeni di origine alimentare

### 4.1 Materiali e Metodi

Gli estratti EBE, ECE, ATE sono stati testati contro sei ceppi di *Staphylococcus aureus* (ATCC 33862, 1313-MRSA, 4 ADI MRSA, 14 LUMRSA, E36GI MRSA e C38 /249,1-MSSA) e sei ceppi di *Listeria monocytogenes* (ATCC 19114, 129, 182, 1 BO, 188 e 140). Ad eccezione dei ceppi dell'American Type Culture Collection (ATCC), tutti gli altri ceppi appartengono alla collezione di colture del laboratorio di Microbiologia Agraria dell'Università degli Studi di Palermo e sono stati isolati da matrici alimentari o feci umane. Tutti i batteri sono stati sottoposti a subcoltura in brodo BHI (Condalab) incubato a 37°C per 24 ore. Il test antimicrobico è stato condotto mediante il metodo di diffusione del disco come descritto da Vandepitte et al. (2003) e Pinteus et al. (2015). Ciascun ceppo batterico è stato inoculato in BHI soft agar (0.7% p/v<sup>-1</sup>) (strato superiore), con una densità cellulare di circa 10<sup>7</sup> CFU/ml (Kelmanson et al., 2000), versato su H<sub>2</sub>O Agar (2 %, w/v<sup>-1</sup>) utilizzato come mezzo di supporto (strato inferiore). Dischi di carta sterili (Wathman n.1) del diametro di 6 mm, sono stati imbevuti di estratti algali, precedentemente sciolti e diluiti a diverse concentrazioni in DMSO (0.1 e 1 mg/ml), sono stati posti sopra il doppio strato di agar. Gli estratti tal quali sono stati preparati mettendo i dischi di carta a diretto contatto con gli estratti fino a completa colorazione degli stessi. La sensibilità degli stafilococchi e delle listerie agli estratti algali è stata valutata dopo 24 ore a 37°C misurando con un calibro il diametro dell'alone attorno ai dischi. La streptomina (5% w/v<sup>-1</sup>) e il DMSO sono stati utilizzati rispettivamente come controllo positivo (CP) e negativo (CN). Gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

### 4.2 Risultati e discussioni

Gli estratti di macroalghe marine sono noti per le loro numerose proprietà antimicrobiche (Pinteus et al., 2015; Avila-Romero et al., 2023). In merito a questo, l'attività antibatterica è stata attribuita agli acidi grassi prodotti dalle macroalghe capaci di inibire la catena di trasporto degli elettroni e la fosforilazione ossidativa dei batteri esposti, causando la perforazione e conseguente rottura della parete cellulare, di diverse specie di Gram-positivi e negativi (El Shafay et al., 2016; Shannon et al., 2016; Kasanah et al., 2019). In questo lavoro, è stata studiata l'attività antimicrobica degli estratti di sporofiti e gametofiti di *E. crinite* ed *E. brachycarpa* e *A. taxiformis* (Tab. 4) rispettivamente contro *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Per quanto riguarda gli estratti di EBE, la dose di 1000 µg/disco (EBE1000) si è rivelata altamente efficace contro tutti e sei i ceppi di *L. monocytogenes* con un diametro dell'area di inibizione attorno al disco di carta compreso tra 6.4 e 12 mm. L'attività

antimicrobica più elevata è stata registrata contro il ceppo *L. monocytogenes* ATCC 19114 (12 mm). Lo stesso estratto di *E. brachycarpa* ad un decimo della dose (100 µg/disco, EBE100) ha mostrato un'attività significativamente inferiore e l'inibizione è stata valutata positiva solo contro i ceppi ATCC 19114 e 182. Risultati simili sono stati ottenuti con EBE tal quale (EBETQ) che ha manifestato attività inibitoria solo contro i ceppi ATCC 19114, 129, 182 ceppi. Gli estratti ATE, alla dose di 1000 µg/disco (ATE1000), si sono rivelati altamente efficaci contro i ceppi di *L. monocytogenes* con un diametro dell'area di inibizione compreso tra 8 e 10 mm contro i ceppi 182 e 1 BO. L'ATE alla dose di 100 µg/disco (ATE100) ha inibito solo il ceppo ATCC 19114. Importanti attività inibitorie sono state registrate con EBE e ATE contro i ceppi di *S. aureus*. In particolare, EBE100 ha mostrato attività contro tutti i ceppi di *S. aureus* testati con un diametro dell'area di inibizione compreso tra 10 e 12 mm per tutti i ceppi testati. L'EBE 1000 ha mostrato un'attività inibitrice più consistente, con un alone di 12-15 mm. L'attività più elevata (diametro della zona di inibizione di 16 mm) è stata registrata rispetto a *S. aureus* 4 ADI-MRSA (Fig. 23). L'EBTQ ha avuto un'attività simile all'EBE100 con una zona di inibizione di 8-10 mm. L'attività di EBE nei confronti dei diversi ceppi testati può essere dovuta alla presenza dei diversi acidi grassi e delle ossilipine nell'estratto. Composti simili hanno mostrato attività antifungina (Sjögren et al., 2003), e un forte effetto sinergico sull'azione antimicrobica dell'acido oleico (18:1), linoleico (18:2) e linolenico (18:3) contro: *S. aureus* e *Kocuria kristinae*, *Helicobacter pylori* (Sun al., 2003). Mentre altri lipidi sono risultati efficaci contro *Neisseria gonorroae*, *S. aureus* (McGaw et al., 2002; Yoon et al., 2018). Un grande vantaggio dei lipidi antimicrobici è che difficilmente riescono a innescare meccanismi di resistenza nei microbi (Ebada et al., 2010), poiché è stato dimostrato che i batteri possono crescere nel terreno di coltura in presenza di questi lipidi, in concentrazioni subletali, fino a un anno senza sviluppare resistenza (Davies et al., 2010).

Saggiando gli estratti di ATE hanno mostrato i migliori risultati in termini di area di inibizione. Infatti, ATE100 ha determinato un'area di inibizione di appena 6.4-10 mm, ma ATE1000 ha inibito la crescita di *S. aureus* in modo più consistente, con un'area di inibizione fino a 20 mm in presenza dei ceppi ATCC 33862, 4 ADI MRSA e E36GI MRSA. L'estratto tal quale di *A. taxiformis* (ATETQ) ha generato un'area di inibizione di 18 mm con il ceppo indicatore *S. aureus* ATCC 33862.

Questi risultati hanno mostrato che gli estratti di *A. taxiformis* ed *E. brachycarpa* sono in grado di esercitare un'importante attività antimicrobica contro i ceppi di *L. monocytogenes* e, soprattutto, *S. aureus*. Le specie di *L. monocytogenes* e *S. aureus* sono tra i più rilevanti patogeni di origine alimentare trasferiti all'uomo attraverso l'ingestione di cibo (Le Loir et al., 2003; Miceli e Settanni, 2019). La specie *L. monocytogenes* è responsabile della listeriosi, che è un'infezione rara ma grave degli esseri umani con un tasso di mortalità del 20-30% (Swaminathan e Gerner-Smidt et al., 2007;

Allerbergerand et al., 2010), mentre *S. aureus* causa malattie in tutto il mondo provocando solamente negli Stati Uniti 2,41 milioni di infezioni ogni anno (Scallan et al., 2011). Potenzialmente la dose suggerita degli estratti capace di inibire la crescita di *S. aureus* e *L. monocytogenes* è di 1000 µg/disco in DMSO (Fig. 23). Le attività limitate registrate con gli estratti tal quali probabilmente dipendono dall'assenza di DMSO. Questo solvente ha un effetto coadiuvante favorendo la veicolazione delle molecole presenti negli estratti contro i batteri (David, 1972). Tuttavia, l'applicazione di estratti privi di solventi nel settore alimentare permetterebbe di aumentare la conservazione degli alimenti con prodotti innovativi e di origine naturale. Inoltre, i componenti lipofili di diversi alimenti possono aumentare l'effetto antimicrobico degli estratti algali testati nel presente studio.



**Figura 23** Aloni di inibizione vs ceppi di *S. aureus* (dose 1000 µg/disco).

**Tabella 4** Attività antimicrobica (aloni di inibizione in mm) degli estratti delle tre macroalghe a differenti concentrazioni (TQ, 100 e 1000µg/disco).

	EBE 100	EBE 1000	EBETQ	ECE 100	ECE 1000	ECETQ	ATE 100	ATE 1000	ATEEQ	CP	CN
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114	10±1.0	12±1.0	9±1.0	-	-	-	6*±0.1	9±1.0	9±1.0	35±1.0	-
<i>L. monocytogenes</i> 129	-	8±0.4	8±1.4	-	-	-	-	8±1.4	8±1.4	34±1.4	-
<i>L. monocytogenes</i> 182	9±1.0	10±1.4	6*±0.3	-	6*±0.1	-	-	10±1.1	8±0.4	36±1.0	-
<i>L. monocytogenes</i> 1 BO	-	6*±0.3	-	-	-	-	-	10±1.0	10±1.0	35±1.0	-
<i>L. monocytogenes</i> 188	-	6*±0.2	-	-	6*±0.2	-	-	8±0.4	8±0.4	34±1.0	-
<i>L. monocytogenes</i> 140	-	6*±0.2	-	-	-	-	-	8±0.4	6*±0.1	36±1.2	-
<i>S. aureus</i> ATCC 33862	10±1.0	12±0.6	8±0.6	-	-	-	6*±0.1	20±0.6	18±0.8	33±1.0	-
<i>S. aureus</i> 1313-MRSA	12±1.0	13±1.0	10±1.0	-	-	-	10±0.4	11±1.0	10±1.0	24±1.0	-
<i>S. aureus</i> 4 ADI MRSA	12±1.0	16±0.4	10±1.0	-	-	-	8±0.4	20±1.0	8±0.6	31±1.0	-
<i>S. aureus</i> E36GI MRSA	10±1.0	13±1.0	10±1.0	-	-	-	8±0.4	20±0.4	12±1.4	31±0.6	-
<i>S. aureus</i> C38/249,1-MSSA	10±1.0	15±0.4	10±1.0	-	-	-	9±0.4	16±1.4	15±1.1	32±1.4	-
<i>S. aureus</i> 14 LUMRSA	11±1.0	12±0.4	9±0.6	-	-	-	9±0.6	9±0.4	6*±0.3	32±0.6	-

(-) attività nulla

(\*) attività pari a 6.4 mm alone di inibizione

## 5. Valutazione dell'attività citotossica degli estratti di macroalghe

### 5.1 Materiali e metodi

#### 5.1.1 Attività Emolitica vs Eritrociti di Mammifero

I saggi di attività emolitica di EBE, ECE, ATE sono stati eseguiti incubando i campioni con eritrociti di montone.

Prima dell'utilizzo gli eritrociti sono stati risospesi in PBS (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 30 mM, NaCl 0.11 M) e centrifugati a 400 g per 10 minuti, il pellet è stato recuperato e risospeso in ISO Ca<sup>2+</sup> (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7.4) alla concentrazione dell'1% (8×10<sup>6</sup> eritrociti freschi). Gli eritrociti sono stati forniti dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri". Per effettuare il saggio di attività citotossica, 100 µl di campione sono stati incubati con 100 µl di eritrociti (1%) a 37 °C per 60 minuti. In seguito, i campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 400g ad una temperatura di 4°C. La quantità di emoglobina rilasciata nel surnatante è stata valutata alla lunghezza d'onda di 541 nm utilizzando lo spettrofotometro (GloMax®-Multi Detection System; Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). I saggi descritti sono stati svolti in triplicato. Per calcolare il grado di emolisi è stata utilizzata la seguente formula:

$$\frac{Abs\ campione - Abs\ eritrociti}{Abs\ emolisi} * 100$$

1. Abs campione è il valore di assorbanza misurato per ogni campione
2. Abs eritrociti è il valore di assorbanza misurato incubando gli eritrociti solo con ISO-Ca<sup>2+</sup>
3. Abs emolisi è il valore di assorbanza relativo all'emolisi totale ottenuta incubando solo gli eritrociti successivamente risospesi in acqua distillata.

I risultati sono stati espressi come media ± DS e gli esperimenti sono stati condotti in triplicato. I confronti statistici sono stati eseguiti utilizzando l'analisi a una via (ANOVA). In tutti i casi, la significatività è stata considerata per valori di  $p < 0.05$ .

#### 5.1.2 Attività citotossica vs linee cellulari SH-SY5Y

Le cellule di neuroblastoma indifferenziate (SH-SY5Y) sono state coltivate, in fiasche T25 contenenti terreno di coltura (DMEM/F12; 1:1) integrato con siero bovino fetale al 10% (Fetal Bovine Serum, FBS 10270-106 ThermoFisher Scientific), 100 U/ml di penicillina, 100 U/ml di streptomina (30-002-CI Corning), 2 mM di L-glutamina (ECB3000D EuroClone) e mantenuti a 37°C in atmosfera umidificata composta per il 95% da aria e per il 5% da CO<sub>2</sub>. Il mezzo di coltura cellulare è stato

cambiato ogni 72 ore e le cellule sono state sotto coltivate una volta raggiunto il valore dell'85-90%. Le cellule sono state differenziate un giorno dopo la piastratura sostituendo il mezzo di crescita con mezzo di differenziazione contenente terreno Neurobasal (21103-049 ThermoFisher Scientific), supplementato con B27 al 2% (ThermoFisher Scientific 17504-044), penicillina/streptomina (100 U/ml), Glutamax 1% (35050-038 ThermoFisher Scientific) e acido trans-retinoico 10 $\mu$ M (tRA, R2625 Sigma-Aldrich). Il mezzo di differenziazione cellulare è stato cambiato ogni 3 giorni e lo sviluppo della morfologia è stato monitorato ogni giorno per un massimo di 11 giorni.

Le cellule indifferenziate e differenziate sono state seminate rispettivamente alla densità di 20.000 cellule/pozzetto e 14.000 cellule/pozzetto su piastre da 96 pozzetti in un volume finale di 100  $\mu$ l/pozzetto e successivamente esposte a diverse dosi di EBE (1, 10, 40, 50  $\mu$ g/ml). Inoltre, è stato effettuato un esperimento di time-course in cui le cellule sono state esposte alla dose di 40  $\mu$ g/ml per 24, 48 e 72 ore. In tutti gli esperimenti, i gruppi controllo hanno ricevuto solo un volume uguale di solvente.

Per testare gli effetti tossici dell'EBE è stata realizzata una curva dose-risposta. In particolare, le cellule sono state esposte per 24 ore a diverse concentrazioni comprese tra 1 e 200  $\mu$ g/ml. Ciascun trattamento è stato eseguito in tre esperimenti indipendenti con 4 repliche per condizione. I dati sono stati analizzati utilizzando GraphPad Prism 9.0.2. software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA), i valori EC<sub>50</sub> e NOEC sono stati determinati e utilizzati per scegliere le concentrazioni di esposizione per gli esperimenti successivi.

Il saggio MTT è stato utilizzato per valutare la vitalità cellulare misurando la quantità di formazano viola in seguito alla riduzione del 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 0,5 mg/ml, Sigma-Aldrich) dopo 3 ore di incubazione a 37°C. L'assorbanza è stata misurata a 570 nm utilizzando lo spettrofotometro per micropiastre (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO) dopo aver sciolto i cristalli di formazano con DMSO (100  $\mu$ l/pozzetto).

#### ***5.1.2.1 Elettroforesi e analisi Western blot***

Le cellule SH-SY5Y indifferenziate sono state coltivate ad una densità di 20000 cellule/pozzetto su piastre da 96 pozzetti in un volume finale di 100  $\mu$ l/pozzetto. Per ciascuna condizione sperimentale, 4 pozzetti sono stati estratti e omogeneizzati in tampone di saggio di radio-immunoprecipitazione fredda (RIPA) (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton, SDS 0.1% a pH 7.4), integrato con un cocktail di inibitori della proteasi (Sigma-Aldrich P8340) e fosfatasi (Sigma-Aldrich P5726). I campioni sono stati sonicati (30 pulsazioni/min), e quantificati mediante il metodo Lowry (Lowry et al. 1951) e conservati a -80°C fino al loro utilizzo. Per ciascun campione 60  $\mu$ g di estratto e il marker (PageRuler™ Prestain Protein Ladder 26617 ThermoFisher Scientific) sono stati caricati su gel di

poliacrilammide al 10% e trasferiti elettroforeticamente su membrana di nitrocellulosa (GE10600002 Amersham™ Protran®). La membrana è stata incubata con una soluzione bloccante contenete (TBS1X, 0.1% Tween-20, 5% p/v latte in polvere senza grassi) per 1 ora, e successivamente overnight a 4°C con l'anticorpo primario specifico. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: Hsp60 (H3524 Sigma-Aldrich) 1:500, Caspasi 7 (9491 Cell Signaling) 1:1000, LC3 (L8918 Sigma-Aldrich) 1:1000, GADD153 (sc-7351 S. Cruz Biotechnology) 1:300,  $\beta$ -actina (sc-47778 S. Cruz Biotechnology) 1:10000. Al termine dell'incubazione, le membrane sono state lavate tre volte per 10 minuti con TBS/T e incubate per 1 ora a temperatura ambiente con anticorpi anti-IgG specifici coniugati con perossidasi di rafano diluiti 1: 10 (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology) (sc-2005 Santa Cruz Biotechnology). Dopo tre lavaggi con TBS-T e 2 lavaggi in TBS, le membrane sono state incubate per 5 minuti con il reagente per chemiluminescenza (SuperSignal™ West Pico PLUS, ThermoFisher Scientific) e sviluppate con iBright FL1500 Imaging System (ThermoFisher Scientific). La valutazione densitometrica delle bande è stata eseguita misurando la O.D. (optical absorbance) a 425 nm, utilizzando il software iBright FL1500.

### **5.1.2.2 Saggio di frammentazione del DNA**

La frammentazione del DNA è stata analizzata mediante saggio TUNEL (etichettatura del nick-end dUTP mediato da TdT) (Promega) come descritto da Chiarelli et al. (2022). I controlli positivi sono stati pretrattati con DNAasi prima del test. I controlli negativi sono stati incubati con una miscela nucleotidica (fluoresceina 12-dUTP) senza l'enzima TdT. La cromatina marcata frammentata è stata osservata al 20X utilizzando un microscopio a fluorescenza (Olympus BX50). L'analisi quantitativa è stata effettuata utilizzando il software ImageJ 1.46r dopo l'acquisizione tramite una fotocamera digitale (Nikon Sight DS-U1).

### **5.1.2.3 Analisi statistica**

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando GraphPad Prism 9.0.2. software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). La quantificazione della densità ottica delle bande di Western blot è stata espressa come unità arbitraria, con controlli pari a 1. La quantificazione della vitalità cellulare è stata espressa come percentuale con gruppo controllo pari al 100%. Per i dati distribuiti normalmente, le valutazioni statistiche sono state eseguite mediante ANOVA a una via, seguita dal test Tukey Post-Hoc e i relativi risultati sono stati presentati come media  $\pm$  DS. Differenze in  $P < 0.05$  sono state considerate statisticamente significative.

## **5.1.3 Attività citotossica vs linee cellulari HepG2**

La vitalità cellulare è stata valutata con saggio dell'MTT. Le cellule HepG2 a crescita esponenziale sono state seminate in piastre da 96 pozzetti ad una concentrazione di 5500 cellule/pozzetto e, dopo l'adesione notturna, trattamenti con diverse concentrazioni di EBE, ECE, ATE sono stati applicati per 24 ore. Dopo l'aggiunta di MTT e la solubilizzazione cellulare, l'assorbanza del formazano disciolto è stata misurata alla lunghezza d'onda di 550 nm.

La quantificazione della vitalità cellulare è stata espressa come percentuale, con gruppo di controllo pari al 100%. Per i dati distribuiti normalmente, le valutazioni statistiche sono state eseguite mediante

### **5.1.3.1 Analisi statistica**

La quantificazione della vitalità cellulare è stata espressa come percentuale, con gruppo di controllo pari al 100%. Per i dati distribuiti normalmente, le valutazioni statistiche sono state eseguite mediante ANOVA a una via, seguita dal test Tukey Post-Hoc e i relativi risultati sono stati presentati come media  $\pm$  DS. In tutti i casi, i risultati erano considerati significativi per livelli di  $p < 0.05$ .

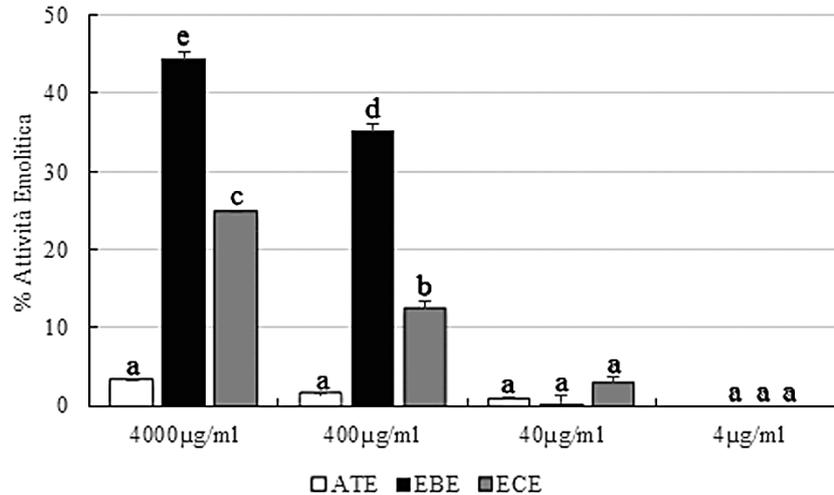
## 5.2 Risultati e discussioni

### 5.2.1 Attività Emolitica vs Eritrociti di Mammifero

Gli estratti di EBE, ECE, ATE, in presenza di eritrociti di mammifero hanno prodotto un'attività emolitica dose dipendente (Tab. 5). Le concentrazioni di 4000 e 400 ( $\mu\text{g/ml}$ ) di EBE hanno mostrato la maggiore attività rispettivamente pari a  $44.4\% \pm 1.40$  e  $35.1\% \pm 1.7$  (Fig. 24). Nella famiglia di macroalghe brune delle Sargassaceae (di cui *E. brachycarpa* fa parte) ci sono composti lipidici capaci di esprimere attività emolitica in modo dose dipendente come, ad esempio, nel genere *Sargassum* spp., i cui estratti alle concentrazioni di 25-100  $\mu\text{g/ml}$  hanno dato attività simile a EBE (Mishra and Arthanari, 2023). Mentre alle concentrazioni più basse (40 e 4  $\mu\text{g/ml}$ ) EBE ha avuto una bassissima attività emolitica ( $< 5\%$ ). Uno studio condotto su *Laminaria cichorioides* ha dimostrato come alle concentrazioni di 20 e 0.2  $\mu\text{g/ml}$  le frazioni lipidiche degli estratti di questa macroalga hanno avuto attività emolitica simile a quella ivi riportata (Gerasimenko et al., 2010b). I risultati dell'estratto ECE alle concentrazioni di 4000 e 400 ( $\mu\text{g/ml}$ ) hanno dato maggiore attività rispettivamente pari a  $24.7 \pm 0.4\%$  e  $12.5 \pm 0.9\%$  (Tab. 5), se pur inferiore ( $\text{EBE}_{4000} > \text{ECE}_{4000}$  ( $p < 0.0001$ );  $\text{EBE}_{400} > \text{ECE}_{400}$  ( $p < 0.0001$ )) rispettivamente a EBE. Mentre alle concentrazioni più basse (40 e 4  $\mu\text{g/ml}$ ) ECE ha avuto attività simile a EBE (Fig. 24), in accordo con altri autori (Gerasimenko et al., 2010b). A differenza di EBE e ECE l'estratto ATE a tutte le concentrazioni testate (4000-400-40- e 4  $\mu\text{g/ml}$ ) non ha mai dato attività emolitica superiore al 5% (Tab. 5; Fig. 24). Risultati simili sono stati ottenuti con estratti di *Portieria hornemannii*, una specie di macroalga rossa, la cui citotossicità verso eritrociti umani, non è mai stata superiore al 6% sebbene le concentrazioni testate fossero inferiori (250-1000  $\mu\text{g/ml}$ ) (Unnikrishnan et al., 2023). Alle concentrazioni più alte (4000 e 400  $\mu\text{g/ml}$ ) ATE ha avuto attività emolitica rispettivamente del  $3.1 \pm 0.2\%$  e  $0.9 \pm 0.1\%$  (Tab.5). A queste concentrazioni ATE ha avuto attività emolitica differente rispetto a EBE ( $p < 0.0001$ ) e ECE ( $p < 0.0001$ ), mentre alle concentrazioni più basse ATE ha avuto attività emolitica simile a EBE e ECE inferiore al 5% (Fig. 24).

**Tabella 5** Attività emolitica estratti EBE, ECE, ATE

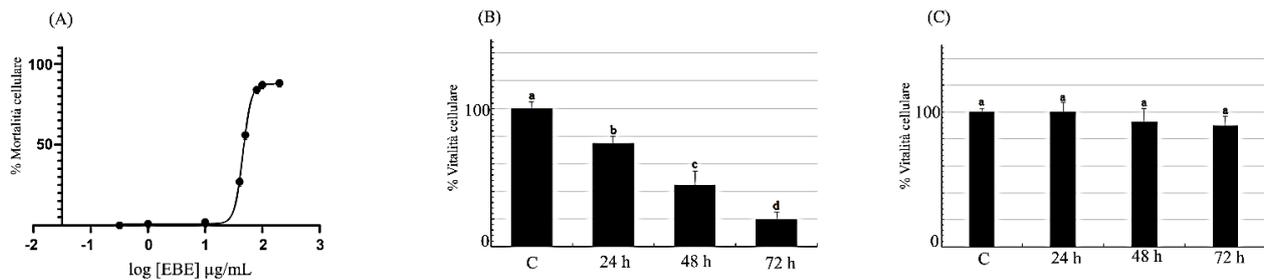
	<b>EBE</b>	<b>ECE</b>	<b>ATE</b>
<b>4000 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	$44.4 \pm 1.4$	$24.7 \pm 0.4$	$3.1 \pm 0.2$
<b>400 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	$35.1 \pm 1.7$	$12.5 \pm 0.9$	$1.5 \pm 0.1$
<b>40 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	$0.3 \pm 0.5$	$2.9 \pm 0.7$	$0.9 \pm 0.1$
<b>4 <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	0	0	0



**Figura 24** Attività emolitica estratti di ATE, EBE, ECE. Le differenze significative sono indicate con lettere diverse (Tukey HSD). <sup>a</sup> $P > 0.05$ ; <sup>b</sup> $P \leq 0.001$ ; <sup>cde</sup> $P \leq 0.0001$ .

### 5.2.2 Attività citotossica EBE vs linee cellulari SH-SY5Y

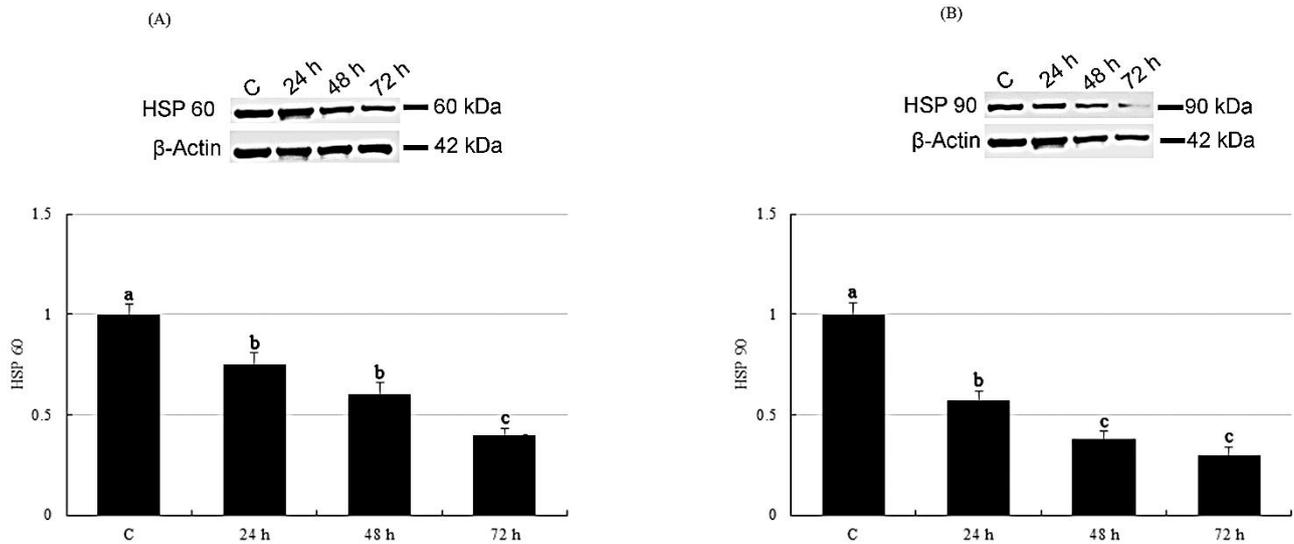
Per la valutazione dell'attività citotossica verso cellule SH-SY5Y sono stati utilizzati gli estratti di EBE perché dei tre estratti (EBE, ECE, ATE) è stato quello che ha mostrato maggiore attività citotossica (vedi sopra). L'effetto dell'EBE sulla vitalità delle SH-SY5Y è stato valutato dopo 24 ore di esposizione mediante il test MTT. Come mostrato nella Fig. 25, l'EBE non ha effetti tossici sulle cellule SH-SY5Y a concentrazioni inferiori a 10 µg/ml, mentre al di sopra di questa dose è stata osservata una diminuzione della vitalità cellulare. Le curve dose-risposta (Fig. 25-A) hanno mostrato un valore  $EC_{50}$  di 45.8 µg/ml ( $R^2 = 0.9998$ ) e un valore NOEC di 14.4 µg/ml. Diversamente, non è stato osservato alcun effetto tossico significativo a concentrazioni inferiori o pari a 40 µg/ml (EBE 40) in cellule SH-SY5Y opportunamente differenziate per 11 gg. Per le indagini successive è pertanto, stata scelta la concentrazione di 40 µg/ml che è stata la stessa che ha dato una bassa attività emolitica (vedi sopra attività emolitica estratti). L'esperimento di time-course effettuato ha mostrato una significativa e progressiva riduzione della vitalità cellulare sul fenotipo indifferenziato SH-SY5Y che raggiunge il suo massimo effetto a 72h con una percentuale di mortalità del 72% (Fig. 25-B). Contrariamente, non è stato osservato alcun effetto tossico sulle cellule differenziate (Fig. 25-C). Tali dati dimostrano che l'estratto di *E. brachycarpa* contenente ossilipine ha un effetto tossico specifico sul fenotipo proliferante, analogamente diversi autori, utilizzando l'estratto di *Fucus vesiculosus* verso cellule differenziate, hanno registrato una bassa attività citotossica, dimostrando che la proliferazione cellulare è un prerequisito dell'efficacia degli estratti di macroalghe (Geisen et al., 2015; Nova et al., 2024). Inoltre, diversi autori hanno precedentemente mostrato gli effetti tossici delle ossilipine su differenti linee cellulari tumorali (Cohen e Flescher, 2009; Christensen, 2020), suggerendo un loro potenziale utilizzo a scopi terapeutici come farmaci antitumorali.



**Figura 25** A) Curve dose-risposta in base all'aumento delle concentrazioni di EBE per percentuali cellule SH-SY5Y indifferenziate morte. B) Analisi dell'andamento temporale della vitalità cellulare in seguito all'esposizione a EBE 40 per 24, 48 e 72 ore in: cellule SH-SY5Y indifferenziate e C) cellule SH-SY5Y differenziate. Le differenze significative sono indicate con lettere diverse (Tukey HSD). <sup>a</sup> $P > 0.05$ ; <sup>b</sup> $P \leq 0.001$ ; <sup>cd</sup> $P \leq 0.0001$ .

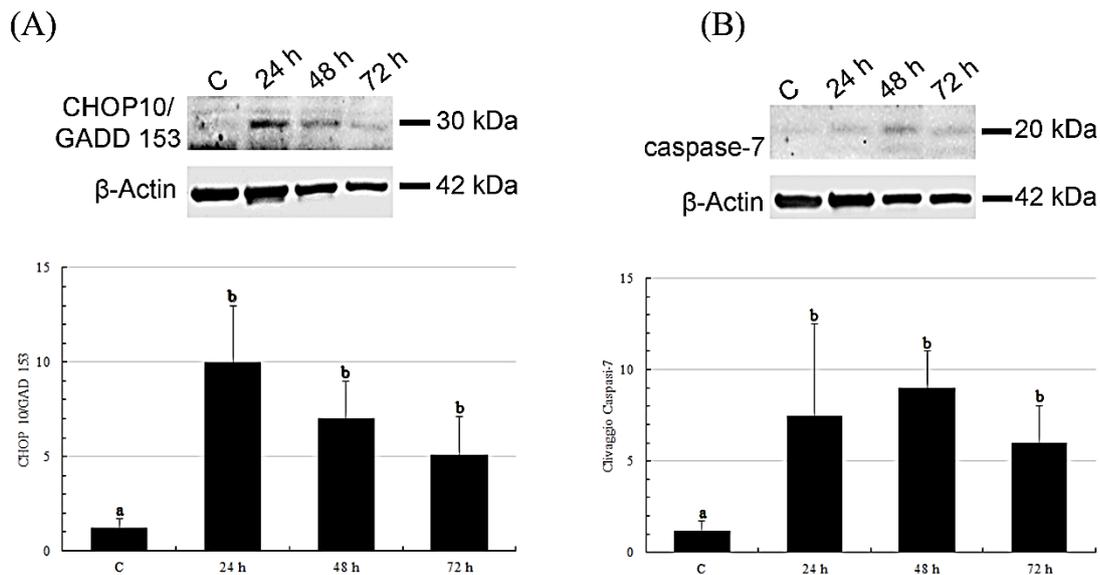
### 5.2.2.2 Elettroforesi, Western blot e Frammentazione del DNA

Come mostrato nelle Figura 26 A e B, il trattamento con EBE 40 induce in cellule SH-SY5Y indifferenziate una significativa “down-regulation” di due importanti proteine note per il loro ruolo nel mantenimento della struttura delle proteine in diverse condizioni di stress (Hu et al., 2022), HSP60 e HSP90. Nel dettaglio, l'HSP60 mostra una riduzione significativa ( $p < 0.001$ ) del 26% a partire da 24 ore e raggiunge una riduzione del 60% a 72 ore ( $p < 0.0001$ ). I livelli di proteina HSP90 hanno mostrato una significativa riduzione progressiva dal 43% a 24 ore fino all'84% a 72 ore ( $p < 0.0001$ ). Come è noto in letteratura, entrambe svolgono un ruolo chiave nella tumorigenesi regolando l'omeostasi proteica in risposta allo stress e gli inibitori di questi chaperon sono ampiamente considerati come terapie antitumorali (Park et al., 2020; Zhou et al., 2020). La forte e progressiva riduzione sia di HSP60 che di HSP90 in risposta al trattamento EBE rivela un nuovo meccanismo alla base della potenziale attività antineoplastica di questo estratto di macroalghe contenente ossilipine. L'inibizione di HSP60 e HSP90, associata alla mancanza di espressione di HSP70 nelle cellule SH-SY5Y, come precedentemente dimostrato da altri autori (Scordino et al., 2023) potrebbe portare all'accumulo di proteine non ripiegate o mal ripiegate nel reticolo endoplasmatico, innescando l'attivazione di un meccanismo di morte programmata noto come apoptosi indotta da stress del reticolo endoplasmatico (Read et al., 2021) che potrebbe stare alla base della mortalità osservata nelle cellule SH-SY5Y.



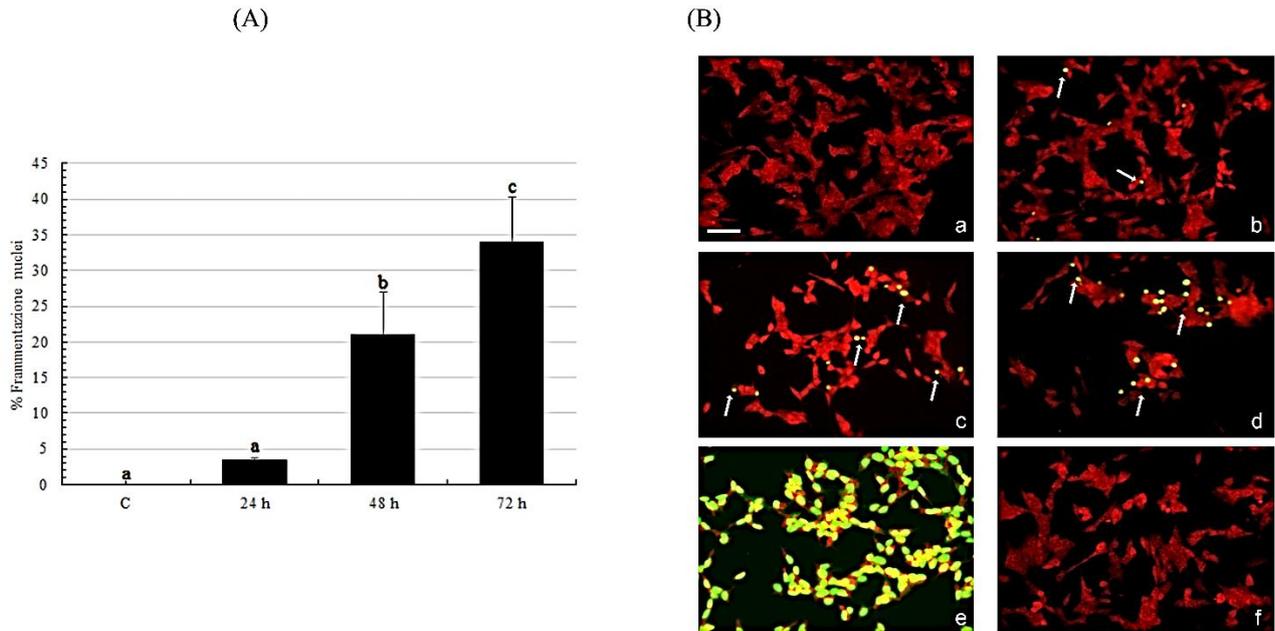
**Figura 26** Analisi Western blot dei livelli proteici per A) HSP60 e B) HSP90 dopo esposizione a EBE 40 in cellule SH-SY5Y. Le differenze significative sono indicate con lettere diverse (Tukey HSD). <sup>a</sup> $P > 0.05$ ; <sup>b</sup> $P \leq 0.001$ ; <sup>c</sup> $P \leq 0.0001$ .

Allo stesso modo, l'EBE ha avuto un effetto significativo sull'espressione di CHOP-10/GADD153 ( $p < 0.001$ ) (Fig. 27-A) e sull'espressione della caspasi-7 ( $p < 0.001$ ) nelle cellule SH-SY5Y indifferenziate (Fig. 27-B). L'analisi WB ha mostrato che i livelli della proteina CHOP-10/GADD153, non rilevabile nel gruppo controllo (Fig. 27), è 10 volte maggiore dopo il trattamento con EBE 40 a 24 ore. Analogamente, i livelli proteici della forma attiva della caspasi-7, non rilevabili nel gruppo di controllo, mostrano un incremento significativo a 48 ore e 72 ore dal trattamento (Fig. 27-B). Tali dati dimostrano che, il trattamento con EBE produce un aumento significativo di CHOP/GADD153, una proteina coinvolta nell'apoptosi mediata dallo stress del reticolo endoplasmatico (ER) (Oyadomari e Mori 2004), e la conseguente attivazione della Caspasi-7.



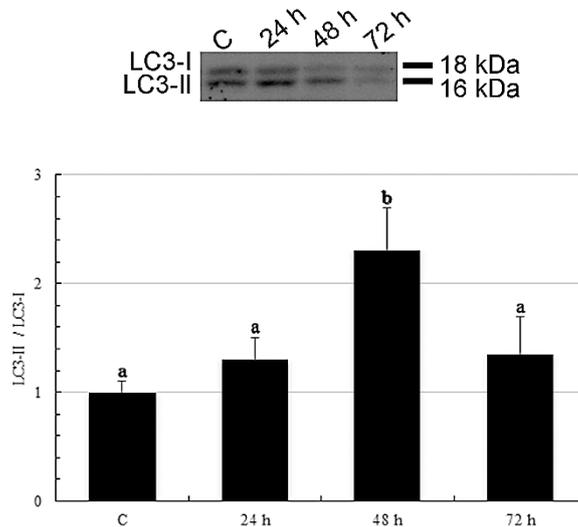
**Figura 27** Induzione dell'apoptosi nelle cellule SH-SY5Y. Analisi Western blot dei livelli proteici: A) CHOP10/GADD153 B) cleaved caspase-7 in cellule SH-SY5Y esposte a EBE 40. Le differenze significative sono indicate con lettere diverse (Tukey HSD).  $^bP \leq 0.001$ .

A conferma dei risultati ottenuti mediante western blot. L'esposizione a EBE ( $p < 0.0001$ ) ha portato ad un aumento significativo della quantità di DNA frammentato apoptotico nelle cellule SH-SY5Y indifferenziate. Come mostrato in Figura 28, nessun segnale di DNA frammentato è stato rilevato nelle cellule di controllo. Le cellule esposte a EBE 40 hanno mostrato invece un incremento tempo dipendente di nuclei frammentati con percentuali pari al 3.5%, 21% e 34% rispettivamente dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento (Fig. 28).



**Figura 28** A) Gli istogrammi riportano la quantificazione della fluorescenza correlata al DNA frammentato in cellule SH-SY5Y. Le differenze significative sono indicate con lettere diverse (Tukey HSD). B) Immagini di celle SH-SY5Y. Controllo (a) e cellule esposte a EBE 40 a 24 (b), 48 (c) e 72 h (d). Cellule di controllo positivo (e). Celle di controllo negativo (f). Barra = 60  $\mu\text{m}$ . <sup>a</sup> $P > 0.05$ ; <sup>b</sup> $P \leq 0.001$ ; <sup>c</sup> $P \leq 0.0001$ .

L'analisi WB ha mostrato che il trattamento con EBE 40 ha indotto autofagia nelle cellule SH-SY5Y indifferenziate ( $p < 0.0001$ ), come mostrato dal significativo aumento dei livelli di LC3 dopo un'esposizione di 48 ore (Fig. 29).

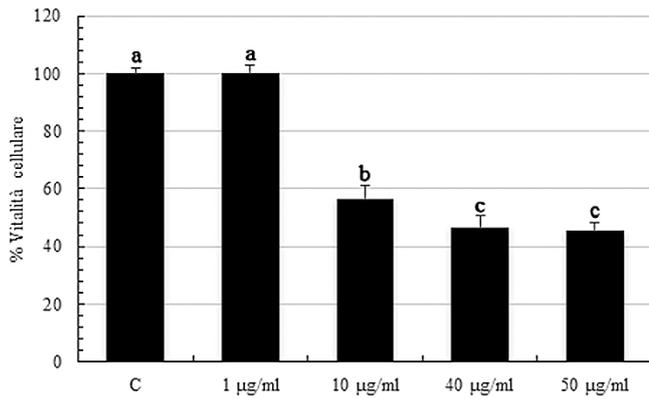


**Figura 29** Analisi Western blot dei livelli proteici per LC3 dopo esposizione a EBE 40 in cellule SH-SY5Y. Le differenze significative sono indicate con lettere diverse (Tukey HSD). <sup>a</sup> $P > 0.05$ ; <sup>b</sup> $P \leq 0.001$ .

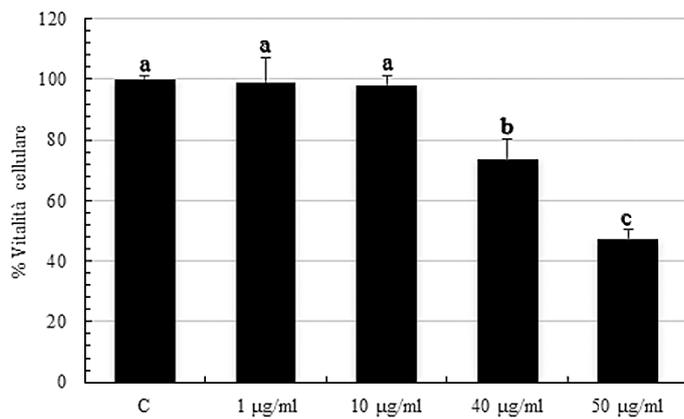
L'attivazione dell'apoptosi è stata confermata anche dall'aumento della percentuale di DNA frammentato. È interessante notare che abbiamo osservato un aumento dell'espressione di LC3 (Fig. 29) in risposta al trattamento EBE per 48 ore, suggerendo l'induzione dell'autofagia, un processo che può essere stimolato da diversi tipi di stress cellulare, incluso lo stress ER. Tuttavia, il ruolo dell'autofagia indotta dallo stress ER è controverso e probabilmente dipende dall'entità dello stress ER (Rashid et al., 2015). Sebbene la maggior parte degli studi indichi che l'autofagia è un processo cellulare conservato che mantiene l'omeostasi cellulare, esercitando funzioni pro-sopravvivenza in seguito allo stress del RE, è stato anche dimostrato che l'autofagia e l'apoptosi spesso si verificano nella stessa cellula, principalmente in una sequenza in cui l'autofagia precede e facilita l'apoptosi (Gump e Thorburn, 2011; Song et al, 2017). In questo caso, l'aumento del processo autofagico in risposta al trattamento EBE può indicare un tentativo di proliferazione delle cellule per evitare di essere uccise, o l'effetto di un intenso stress ER che porta all'apoptosi cellulare dipendente dall'autofagia. Pertanto, sono necessarie ulteriori ricerche per chiarire la complessa interazione tra autofagia e apoptosi nelle cellule SH-SY5Y esposte a EBE.

### **5.2.3 Attività citotossica EBE, ECE, ATE vs linee cellulari HepG2**

Al fine di stabilire gli effetti degli estratti EBE, ECE, ATE sulla vitalità verso linee cellulari di HepG2, abbiamo eseguito un test di sensibilità cellulare MTT (3-(4,5-dimetiltiazol 2-il) -2,5-difeniltetrazolio bromuro) dopo 24 ore di esposizione a diverse concentrazioni. L'EBE ha avuto un effetto dose-dipendente sulla vitalità delle cellule HepG2 ( $p < 0.0001$ ) le curve dose-risposta hanno mostrato un valore  $EC_{50}$  di 43.1  $\mu\text{g/ml}$  e non ha avuto effetti tossici sulle cellule HepG2 a concentrazioni fino a 1  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 30). Come accennato in precedenza, è stato dimostrato che EBE ha avuto attività antitumorale verso le linee cellulari SH-SY5Y, promuovendone l'apoptosi. Testando EBE alle stesse concentrazioni verso linee cellulari HepG2, ha avuto attività citotossica, dimostrando e confermando da diversi autori, che le ossilipine presenti in questo estratto agiscono a largo spettro verso diverse linee tumorali (Cohen e Flescher, 2009; Christensen, 2020). L'estratto ECE ha avuto attività citotossica alle concentrazioni testate mostrando un valore di  $EC_{50}$  di 47.2  $\mu\text{g/ml}$ , e non ha avuto attività a concentrazioni fino a 10  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 31). Questi risultati sono in accordo con Abu-Khudir et al., 2021, i quali saggiando gli estratti in metanolo (80%) di *E. crinita* hanno causato la morte delle cellule (per apoptosi) dell'adenocarcinoma mammario umano (positivo per il recettore degli estrogeni (MCF-7)) ed epatico (HepG2). ATE alle concentrazioni testate non ha dato attività.



**Figura 30** Analisi dell'andamento della vitalità cellulare in seguito all'esposizione alle concentrazioni di EBE (1-10-40-50 µg/ml) per 24 ore in HepG2. Le differenze significative sono indicate con lettere diverse (Tukey HSD). <sup>a</sup> $P > 0.05$ ; <sup>b</sup> $P \leq 0.001$ ; <sup>c</sup> $P \leq 0.0001$ .



**Figura 31** ECE Analisi dell'andamento della vitalità cellulare in seguito all'esposizione alle concentrazioni di ECE (1-10-40-50 µg/ml) per 24 ore in HepG2. Le differenze significative sono indicate con lettere diverse (Tukey HSD). <sup>a</sup> $P > 0.05$ ; <sup>b</sup> $P \leq 0.001$ ; <sup>c</sup> $P \leq 0.0001$ .

## **6. Valutazione dell'attività miorilassante estratti di *A. taxiformis* su colon di *Rattus norvegicus***

### **6.1 Materiali e metodi**

Gli esperimenti sono stati condotti su strip di colon provenienti da 10 ratti Wistar adulti di tre mesi di età. I ratti sono stati tenuti in locali a temperatura ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ) ed umidità (60%) controllata e con alternato periodo di luce-buio della durata di 12 ore. Gli animali sono stati pre-anestetizzati con etere e successivamente sacrificati mediante dislocazione cervicale. L'addome è stato immediatamente aperto segmenti di colon sono stati rimossi e posti in una soluzione di Krebs costituita da NaCl 119 mM, KCl 4.5 mM,  $\text{MgSO}_4$  2.5mM,  $\text{NaHCO}_3$  2.5 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2 mM,  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM, glucosio 11.1 mM.

Il contenuto dei segmenti intestinali isolati è stato delicatamente lavato con la soluzione Krebs ed i preparati di colon, posti in una vaschetta di dissezione sono stati aperti e tagliati trasversalmente in modo da ricavare strips di muscolatura circolare lunghe circa 15 mm. Ciascuna strip è stata sospesa nei quattro canali in vetro di un bagno per organo isolato (Fig. 32), contenenti ognuno 10 ml di soluzione Krebs ossigenata (95% di  $\text{O}_2$  e 5% di  $\text{CO}_2$ ).

L'ossigeno è stato fornito per mezzo di una bombola collegata a collettori specifici presenti sulla parte inferiore di ogni singolo canale. Inoltre, i canali erano immersi in una vasca in vetroresina termostata che consentiva il mantenimento della soluzione Krebs ad una temperatura costante di  $37^\circ\text{C}$ .

Il montaggio di ciascuna strip in un singolo canale si è realizzato in due fasi:

1. fissazione dell'estremità distale ad un piccolo gancio di vetro presente all'interno di ogni singolo canale;
2. fissazione dell'estremità prossimale, mediante un filo di seta, ad un trasduttore di forza isometrica.

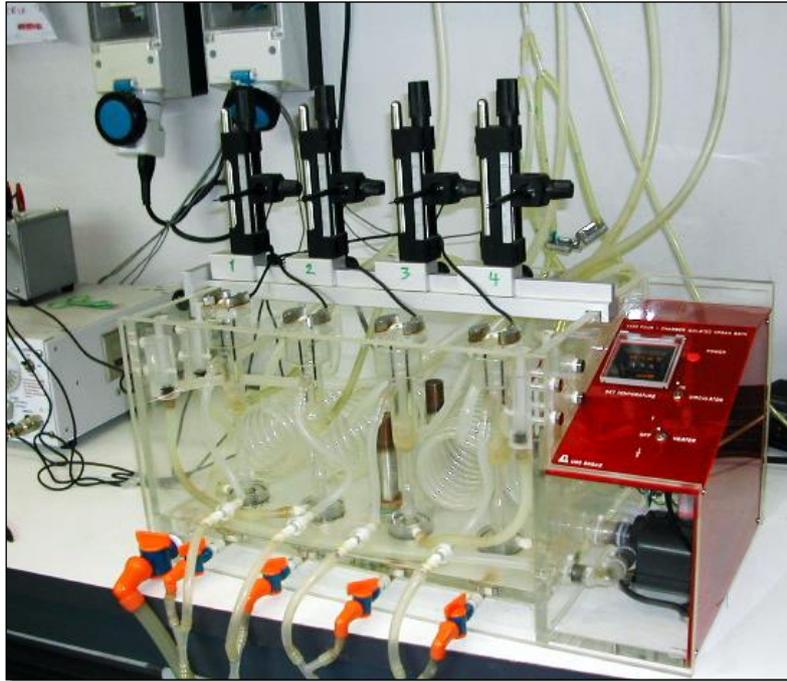
Il trasduttore di forza isometrica (Fig. 33) (tipo Fort 10, Ugo Basile, Biological Research Apparatus, Camerino VA, Italy) permetteva di fornire in uscita, in modo proporzionale alla forza applicata in entrata, un voltaggio lineare con bassissime deflessioni.

Le preparazioni sono state sottoposte ad una tensione iniziale di 1 g e lasciate ad equilibrare per i successivi 30 min. Al termine del periodo di equilibrio le preparazioni sono state saggiate con carbacolo (CCh, 10  $\mu\text{M}$ ) per verificare se esse fossero in grado di contrarsi. Negli strip di muscolatura circolare si osservava, una risposta contrattile al CCh di circa  $1.9 \pm 0.6$  g.

L'attività meccanica, espressione dell'attività della muscolatura circolare, è stata digitalizzata su un convertitore A/D Power Lab/400 (Ugo Basile, Biological Research Apparatus), registrata su un personal computer (collegato tramite interfaccia SCASI al convertitore A/D) ed analizzata utilizzando

il programma Chart 4 elaborato dalla stessa ditta Power Lab fornitrice del convertitore A/D.

La stimolazione elettrica dei neuroni intramurali (EFS) è stata effettuata mediante uno stimolatore elettrico Grass S88 (Grass Instruments CO., Quincy, Mass., USA) attraverso una unità di isolamento SIU 5 ad accoppiamento diretto collocata tra lo stimolatore e gli elettrodi di stimolazione per ridurre gli artefatti e per evitare danni allo stesso stimolatore. Il SIU 5 contiene un oscillatore a radio frequenza (RF) che è modulato dall'uscita dallo stesso stimolatore.



**Figura 32** Bagno per organi isolati a quattro canali



**Figura 33** a) Trasduttori di forza, ove è possibile notare il gancio superiore (Gancio Sup.); b) Primo piano di un canale in cui si osserva il gancio inferiore (Gancio Inf.) e gli sbocchi per la miscela  $O_2/CO_2$  e per il drenaggio.

Le stimolazioni (0.5 ms, 8 Hz, 150 V), in treni di 10 sec., sono state applicate per mezzo di un paio di elettrodi di platino.

Per esaminare le contrazioni colinergiche, alla soluzione di Krebs è stata aggiunta la neostigmina (1  $\mu$ M), inibitore dell'acetilcolinesterasi, per potenziare la neurotrasmissione colinergica e quindi la EFS è stata eseguita a intervalli di 5 minuti e sono state osservate risposte stabili e riproducibili per ore.

Per poter valutare gli effetti di ATE sulla trasmissione colinergica l'EFS è stata ripetuta in presenza di concentrazioni crescenti non cumulative di ATE. Il tempo di contatto per ciascuna concentrazione era di 10 minuti. In una seconda serie di esperimenti, i nostri preparati sono stati pretrattati con L-NAME (N $\omega$ -Nitro-L-arginine methyl ester, 100  $\mu$ M) e 1H- [1,2,4] Oxadiazolo[4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ, 5  $\mu$ M), inibitori del pathway nitrgico che inibiscono la sintesi dell'ossido nitrico e la guanilato ciclasi solubile rispettivamente, prima di ripetere la somministrazione di ATE e le EFS.

In tutti gli esperimenti l'ATE è stato sciolto in DMSO ad una concentrazione finale dello 0.01%.

### 6.1.1 Analisi dei dati

Tutti i dati sono riportati come medie  $\pm$  S.D. "n" indica il numero di preparati sui quali sono state eseguite le osservazioni. L'ampiezza delle contrazioni spontanee e delle risposte contrattili a CCh sono state espresse in valore assoluto (mg).

L'ampiezza delle e risposte eccitatorie evocate da EFS è stata espressa come percentuale della risposta a CCh (10  $\mu$ M). La significatività statistica è stata valutata utilizzando ANOVA a una via seguita dal test t di Bonferroni (PRISM, versione 6.0; GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA). In tutti i casi, i dati sono stati considerati significativi per livelli di  $p < 0.05$ .

## 6.2 Risultati e discussioni

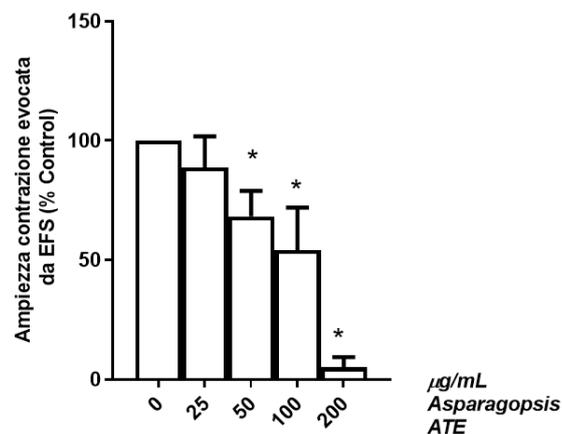
Le Strip di muscolatura circolare di colon distale di ratto montati nel bagno per organo isolato mostravano un'attività meccanica  $490.3 \pm 4.2$  mg e una frequenza di  $4.2 \pm 1.5$  cpm. (n=11).

La stimolazione elettrica di campo induce un effetto eccitatorio consistente in una contrazione muscolare la cui ampiezza a 8 Hz. L'ampiezza massima di tale risposta era circa di  $1.15 \pm 0.3$  g (n=11). La risposta alla EFS era antagonizzata dal pretrattamento dei preparati con TTX (1  $\mu$ M, n=5) e ciò ne indica l'origine neurale, inoltre, tali risposte erano abolite in presenza di atropina (1  $\mu$ M, n=4) antagonista dei recettori colinergici muscarinici, indicando che l'acetilcolina rilasciata dalle terminazioni nervose enteriche, è responsabile delle contrazioni evocate.

Occasionalmente è stato osservato un rilassamento muscolare iniziale, di ridotta ampiezza, nella risposta all'EFS che veniva abolito in presenza di L-NAME (100 mM), inibitore della Ossido nitrico (NO) sintasi, suggerendo che NO il principale neurotrasmettitore enterico inibitore era coinvolto nella

risposta inibitoria evocata da EFS. Per valutare un possibile effetto di ATE sulla attività spontanea e/o sulla risposta contrattile evocata da stimolazione elettrica (EFS) abbiamo analizzato gli effetti indotti dalla somministrazione esogena di ATE sia sulla normale attività contrattile che sulle risposte eccitatorie evocate dalla EFS.

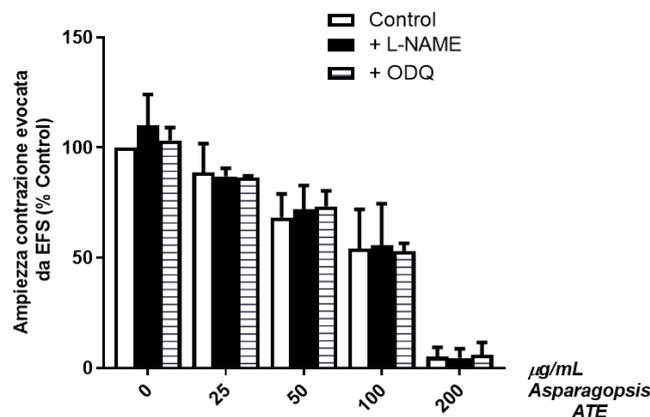
La somministrazione cumulativa di ATE (25-200  $\mu\text{g/ml}$ ) non modificava significativamente né l'ampiezza né la frequenza delle contrazioni spontanee in nessuno dei preparati soltanto occasionalmente la più alta concentrazione induceva una riduzione del 20% dell'attività spontanea. Nei nostri preparati ATE che, come detto sopra, per sé non induceva alcun cambiamento della attività contrattile spontanea, dopo circa 5 min dalla somministrazione riduceva l'ampiezza delle contrazioni evocate da EFS in maniera dose dipendente (n=5) (Fig. 34).



**Figura 34** Istogramma che mostra gli effetti di ATE (25-200  $\mu\text{g/ml}$ ) sull'ampiezza delle contrazioni evocate da EFS a frequenza di stimolazione 8 Hz (0.5 ms, voltaggio sovramassimale per 10 sec, n=5). I dati sono espressi come media  $\pm$  S.D.\* $P < 0.05$  rispetto al controllo

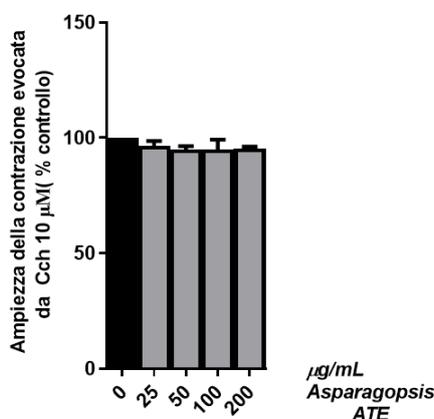
Per valutare se vi fosse un coinvolgimento di NO il principale mediatore inibitore intestinale, prima di ripetere la somministrazione con ATE e misurare la EFS, il colon è stato pretrattato con L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ) e ODQ (5  $\mu\text{M}$ ), inibitori del pathway nitrgico che inibiscono la sintesi dell'ossido nitrico, e la guanilato ciclastasi solubile.

Nessuno dei due inibitori modificava l'effetto di ATE sulla EFS escludendo un coinvolgimento del pathway di NO (Fig. 35).



**Figura 35** Istogramma che mostra gli effetti di ATE (25-200 µg/ml) sull'ampiezza delle contrazioni evocate da EFS a frequenza di stimolazione 8 Hz (0.5 ms, voltaggio sovramassimale per 10 sec, n=4), da sola o in presenza di (100 µM) L-NAME, inibitore sintesi NO o in presenza di (5 µM) ODQ, inibitore della guanilato ciclasi, in strips di colon di ratto. I dati sono espressi come media ± S.D di n=4-5.

Probabilmente tale effetto sembrava dipendere da una modulazione pregiunzionale del rilascio di Acetilcolina, ovvero da un effetto postgiunzionale, come antagonista dei recettori muscarinici dal momento che diversi estratti naturali sono in grado di inibire la risposta colinergica modificando la responsività del muscolo al neurotrasmettitore. A tale fine è stata valutata se la somministrazione di ATE modificasse in qualche modo la risposta contrattile evocata dal CCh (10 µM), agonista colinergico muscarinico. La somministrazione di CCh (10 µM) induceva una contrazione muscolare di circa  $1.9 \pm 0.2$  g (n=5) che non veniva modificata in presenza di ATE (Fig. 36), indicando quindi un effetto pregiunzionale di modulazione del rilascio del neurotrasmettitore.



**Figure 36** istogramma che mostra gli effetti di ATE (25-200 µg/ml) sull'ampiezza delle contrazioni evocate da CCh (10 µM) sul colon di ratto. I dati sono espressi come media ± S.D.

Questi risultati sembrano in accordo con studi condotti su topi in cui è stato dimostrato come gli estratti di *Gracilaria caudata* riescono ad inibire la diarrea indotta da olio di ricino del 49,1 % (Costa et al., 2016), mentre del 63,2 % nella specie *Hypnea musciformis* (Sousa et al., 2016). Tuttavia negli studi citati l'effetto era attribuito a composti solforati polisaccaridici presenti negli estratti delle macroalghe rosse, capaci di esprimere attività anti-enteropooling, riducendo la motilità intestinale e bloccando i recettori muscarinici, agendo di fatto come antagonisti verso i recettori dell'acetilcolina (Leódido et al., 2017), i dati di questa ricerca invece escluderebbero un'interazione diretta con i recettori muscarinici e suggerirebbero invece una azione neuromodulatrice sulle terminazioni enteriche del colon di ratto. Ulteriori studi potrebbero permettere di chiarire il meccanismo di azione di ATE e i possibili contributi dei fitocomposti in esso contenuto.

## **7. Valutazione dell'attività immunomodulante di estratti di *E. brachycarpa*, *E. crinita*, *A. taxiformis* sul riccio di mare *A. lixula*.**

### **7.1 Materiali e Metodi**

#### **7.1.1 Animali**

Tenuto conto delle linee guida sugli animali da laboratorio per la revisione etica del benessere degli animali (GB/T 35.892–2018) esemplari adulti (90) di *Arbacia lixula* (Tabella 1), sono stati raccolti in prossimità dell'infralitorale (circa 1-6 metri di profondità), nel Golfo di Castellamare (Balestrate, Trappeto) e stabulati fino al loro utilizzo, a una temperatura di 18°C in vasche da 150 litri. L'acqua di mare è stata preparata utilizzando il kit HI-Tech Reef Salt. I sali sono stati sciolti in acqua deionizzata per ottenere una salinità di 38–39‰ e un pH pari a  $8.1 \pm 0.1$ . Settimanalmente sono stati sostituiti volumi d'acqua di 10-20 L.

#### **7.1.2 Piano sperimentale**

Per la valutazione dell'attività immunomodulante degli estratti di macroalghe su riccio di mare sono stati effettuati tre set sperimentali con tre diverse macroalghe: *E. brachycarpa*, *E. crinita*, *A. taxiformis*. Per ogni set rispettivamente sono stati creati tre gruppi di ricci: I, II e III come mostrato nella Figura 37, scegliendo casualmente gli individui dalle vasche di stabulazione. Per tutti i trattamenti descritti di seguito sono stati utilizzati 3 ricci.

GRUPPO I Costituito da:

- Ricci trattati con solo ACF (10 mM CaCl<sub>2</sub>, 14 mM KCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 398 mM NaCl, 1.7 mM Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub>, 25 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- Ricci trattati con ACF+DMSO
- Ricci trattati con ACF+LPS. 2 µg di LPS per millilitro di Fluido Celomatico di Riccio (FCR) simulando un'infezione da batteri gram-negativi. Il lipopolisaccaride (LPS) è stato sospeso in ACF e successivamente iniettato direttamente attraverso la membrana peristomale nella cavità celomatica del riccio di mare (Terwillinger et al. 2007).
- Ricci senza puntura

Nei ricci tratti con ACF, ACF+DMSO e ACF+LPS i volumi iniettati erano pari a 100 µl.

GRUPPO II costituito da:

- Ricci trattati con EBE
- Ricci trattati con ECE

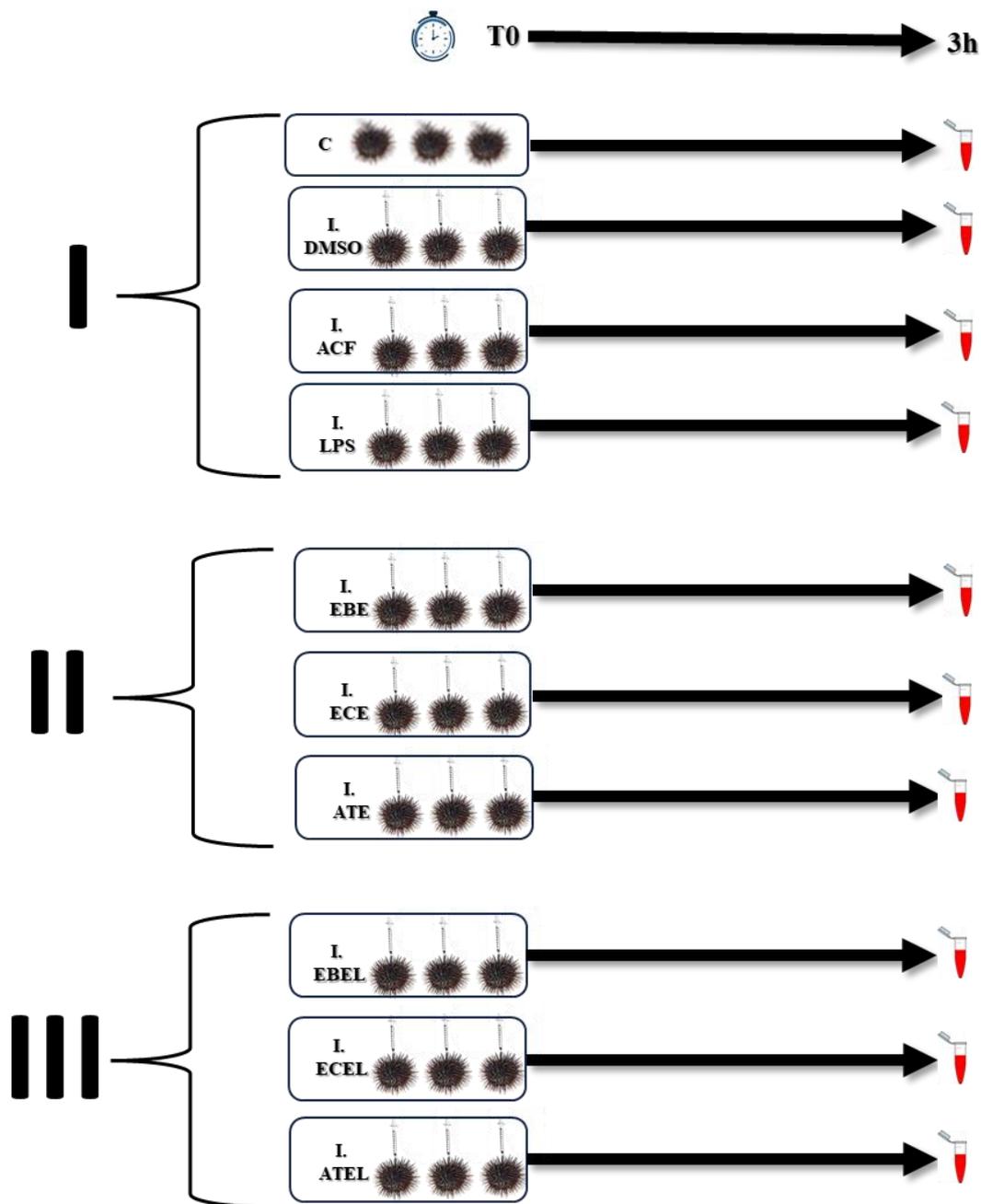
- Ricci trattati con ATE

Rispettivamente i trattamenti con gli estratti delle alghe sono stati effettuati sciogliendo gli estratti algali in DMSO e iniettando ogni estratto alla concentrazione di 40 µg/ml FCR, portati al volume di 100 µl con ACF.

GRUPPO III costituito da:

- Ricci trattati con EBEL
- Ricci trattati con ECEL
- Ricci trattati con ATEL

Rispettivamente i ricci sono stati iniettati con 40 µg di estratto algale + 2 µg di LPS/ml FCR e portati al volume di 100 µl con ACF.



**Figura 37** Piano sperimentale per la valutazione dell'attività immunomodulante degli estratti di *E. brachycarpa*, *E. crinita*, *A. taxiformis* sul riccio di mare *A. lixula*.

Dopo 3 h dal trattamento il fluido celomatico degli animali è stato prelevato in anticoagulante isosmotico (ISO-EDTA: 20 mM Tris, 0.5 M NaCl, 30 mM EDTA a pH 7.5) in rapporto ISO-EDTA/FCR di 1:5. Successivamente un'aliquota è stata prelevata per effettuare le conte cellulari, totali e differenziali, utilizzando la camera di Neubauer. Il campione rimanente è stato centrifugato a 400 g per 10 minuti a 4°C. Il surnatante (fluido celomatico privo di cellule) e i pellet ottenuti sono stati conservati a -80 °C. I pellet cellulari (90) sono stati potterati in RIPA BUFFER 1X addizionato con cocktail di antiproteasi 1:200 per 5 minuti, sonicati 90 s e centrifugati a 18000 g per 10 min a 10 °C. I lisati cellulari ottenuti sono stati conservati a -20 °C.

### 7.1.3 Analisi biochimiche sui lisati cellulari e sui cell-free.

I livelli di ROS e GSH sono stati misurati mediante l'uso di sonde fluorescenti seguendo il protocollo di Bjedov et al. (2021). L'analisi è stata condotta utilizzando il lettore di piastra Promega™ GloMax® (Milano, Italia) settato ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 485 nm e di emissione di 530 nm. Ciascuna analisi è stata condotta in parallelo ed in triplicato calibrando e azzerando lo strumento su campioni controllo bianco e di autofluorescenza (controllo bianco in assenza di campione e controllo autofluorescenza privo di sonda). Il contenuto di GSH è stato valutato mediante l'uso del colorante 5-Clorometil fluoresceina diacetato (CellTracker Green CMFDA Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Cat. No. c2925). Brevemente, 2 µl di surnatante e lisato cellulare dei campioni del I, II e III gruppo di *A. lixula* sono stati miscelati con 93 µl di tampone fosfato (0.1 M pH 7.2) e 5 µl di soluzione di lavoro CellTracker Green CMFDA (10 µM in DMSO). Successivamente, la fluorescenza è stata misurata dopo un'incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente e al buio, sottraendo i valori del bianco e dell'autofluorescenza dai dati ottenuti.

Il livello di ROS è stato valutato utilizzando la sonda Clorometil-2',7'-dicloro diidro fluoresceina diacetato (CM-H<sub>2</sub>DCFDA Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Cat. No. c6827). In breve, 5 µl di surnatante e di lisato cellulare dei campioni sono stati miscelati con 85 µl di tampone fosfato (0.1 M pH 7.2) e 10 µl di soluzione di lavoro CM-H<sub>2</sub>DCFDA (10 µM in DMSO). La preparazione del controllo bianco e di autofluorescenza, nonché delle condizioni di incubazione sono le stesse descritte sopra. I valori di fluorescenza misurati di ciascun campione sono stati normalizzati per contenuto proteico, opportunamente dosato utilizzando il metodo di Bradford.

Il livello di NO nei surnatanti è stato valutato mediante saggio colorimetrico utilizzando il reattivo di Griess (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). In sintesi, 100 µl di surnatante, ottenuto mediante centrifugazione a 14.000 rpm per 30 minuti a 4°C, sono stati incubati con uguale volume di reagente di Griess (1% sulfanilamide in 5% acido fosforico e 0.1% N-(1-naftil) - etilendiammina). Dopo l'incubazione della miscela di reazione per 10 minuti a temperatura ambiente, l'assorbanza è stata determinata spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda di 520 nm utilizzando il lettore di piastra Promega™ GloMax®.

### 7.1.4 Concentrazione proteica e saggi enzimatici

La concentrazione proteica è stata misurata su tutti i campioni utilizzando il metodo Bradford (Bradford, 1976) rilevando l'assorbanza dei campioni a 595 nm.

L'attività esterasica è stata valutata su tutti i campioni incubando 100 µl di campione con 100 µl di tampone (substrato di nitrofenil-miristato da 0.4 mM in tampone di bicarbonato di ammonio da 100 mM contenente Triton X-100 allo 0.5%, pH 7.8, 30 °C) (Ross et al., 2000).

L'attività della fosfatasi alcalina è stata misurata secondo Ross et al. (2000), incubando 100 µl di campione con 100 µl di tampone (4 mM p-nitrofenil fosfato liquido in 100 mM di bicarbonato di ammonio contenente 1 mM di MgCl<sub>2</sub>, pH 7.8, 30 °C). Sia per l'esterasi che per la fosfatasi, l'Abs è stata valutata a 405 nm per 1 ora ogni 5 minuti.

L'attività enzimatica è espressa in U/µg e calcolata come:

$$(Abs/min) \times (1000/Eb) \times (Vf/Vi)$$

con  $Eb_{fosfatasi} = 18.4$ .  $Eb_{esterasi} = 16.4$ .

Un'unità di attività è stata definita come la quantità di enzima necessaria per rilasciare 1µmol di pnitrofenolo prodotto in 1 minuto.

### 7.1.5 Analisi statistica

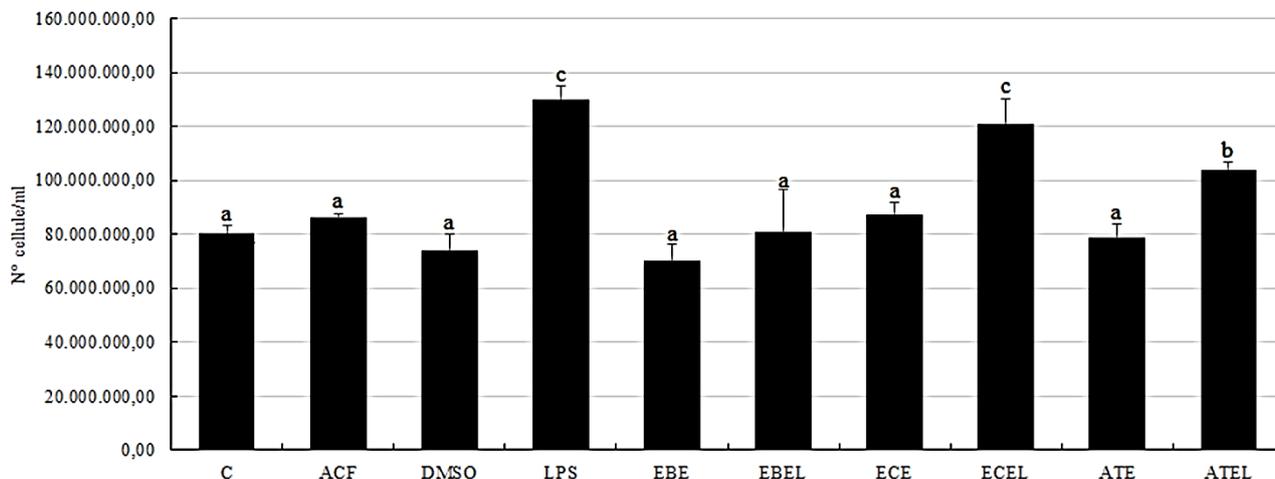
I risultati sono stati espressi come media ± DS. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato. I confronti statistici sono stati eseguiti utilizzando l'analisi ANOVA a una via, seguita dalla correzione di Tukey per confronti multipli utilizzando Prism 9.5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). In tutti i casi, i risultati sono stati considerati significativi per livelli di  $p < 0.05$ .

## 7.2 Risultati e discussioni

### 7.2.1 Conte cellulari

Nei fluidi celomatici dei ricci sono state eseguite le conte cellulari totali (CCT) (Fig. 38). In tutti i set sperimentali, le CCT dei ricci controllo (ACF, DMSO e senza puntura) non hanno mostrato cambiamenti significativi. Tuttavia, in tutti i casi il trattamento con LPS ha aumentato significativamente le CCT ( $p < 0.0001$ ) rispetto ai ricci controllo (Fig. 38). Questo risultato era in accordo con altri autori, i quali hanno valutato la risposta immunitaria in seguito alle iniezioni di LPS (alla stessa concentrazione di 2 µg/ml FCR) in *Paracentrotus lividus* dopo 3 ore (Chiaramonte et al. 2019) confermando che l'LPS potrebbe attivare una reazione di tipo infiammatorio e quindi meccanismi immunitari di tipo umorale e cellulare (Parrinello et al., 2007; Parrinello et al., 2008; Arizza et al., 2009). A conferma di ciò, Clow et al., (2004) trattando con LPS (2 µg/ml) la specie *Strongylocentrotus purpuratus* hanno osservato un aumento dell'espressione di un omologo del complemento C3 (SpC3), capace di agire come un'opsonina umorale comportando anche un aumento significativo dell'attività fagocitica, di un singolo tipo di celomociti (fagociti poligonali) che presumibilmente esprimono i recettori SpC3. Anche in *Asterias rubens* l'iniezione con LPS (1 mg/ml) ha provocato l'aumento significativo del numero totale dei celomociti e dell'attività fagocitica (Holm et al., 2008). Per quanto concerne invece i ricci trattati con alga e LPS simultaneamente i nostri risultati hanno mostrato in tutti i casi una diminuzione del numero di celomociti rispetto al trattamento

con solo LPS sebbene il dato fosse significativo solo nel caso di EBEL e ATEL ( $p < 0.0001$  e  $p < 0.001$ ). Questo potrebbe dipendere da una capacità degli estratti algali di ridurre l'effetto proinfiammatorio indotto da LPS e descritto in precedenza. In particolare, è noto che l'attività antiinfiammatoria esercitata da EBE probabilmente sia dovuta alla composizione lipidica di questo estratto, all'interno del quale ci sono composti come l'acido palmitico capaci di esprimere attività antiinfiammatoria attraverso l'inibizione dell'attività enzimatica proinfiammatoria delle Ciclossigenasi-2 (COX<sub>2</sub>) (da Costa et al., 2021; Jaworowska et al., 2022). Per quanto concerne invece l'attività di ATE, questa è dovuta probabilmente alla presenza di composti bromurati. Questo è in accordo con altri autori, i quali testando estratti di *Asparagopsis armata* hanno osservato l'inibizione degli enzimi proinfiammatori della elastasi e fosfolipasi A2 (Oumaskour et al., 2013). Infine, a conferma di quanto detto sopra, ossia del probabile effetto infiammatorio causato dall'LPS e del probabile effetto antiinfiammatorio causato dall'alga nel trattamento simultaneo per quanto concerne i trattamenti con i singoli estratti algali (EBE, ECE, ATE) i nostri risultati non hanno mostrato cambiamenti significativi rispetto ai ricci controllo (Fig. 38). Questo suggerisce che i soli estratti algali alle concentrazioni testate non influenzano il numero totale dei celomociti circolanti ma svolgono un ruolo fondamentale nella riduzione del processo infiammatorio causato dall'LPS.



**Figura 38** Conta totale dei celomociti di *A. lixula* dopo 3 ore. Trattamento con EBE; ECE e ATE. Nel set sperimentale sono riportati il controllo senza puntura, il controllo ACF, il controllo DMSO, i trattati con LPS, con alga (EBE, ECE, ATE) e con LPS+alga (EBEL, ECEL e ATEL). I dati sono espressi come media  $\pm$  DS. Le differenze significative sono indicate con lettere diverse (Tukey HSD). <sup>a</sup> $P > 0.05$ ; <sup>b</sup> $P \leq 0.001$ ; <sup>c</sup> $P \leq 0.0001$ .

### 7.2.2. ROS, Nitriti, GSH

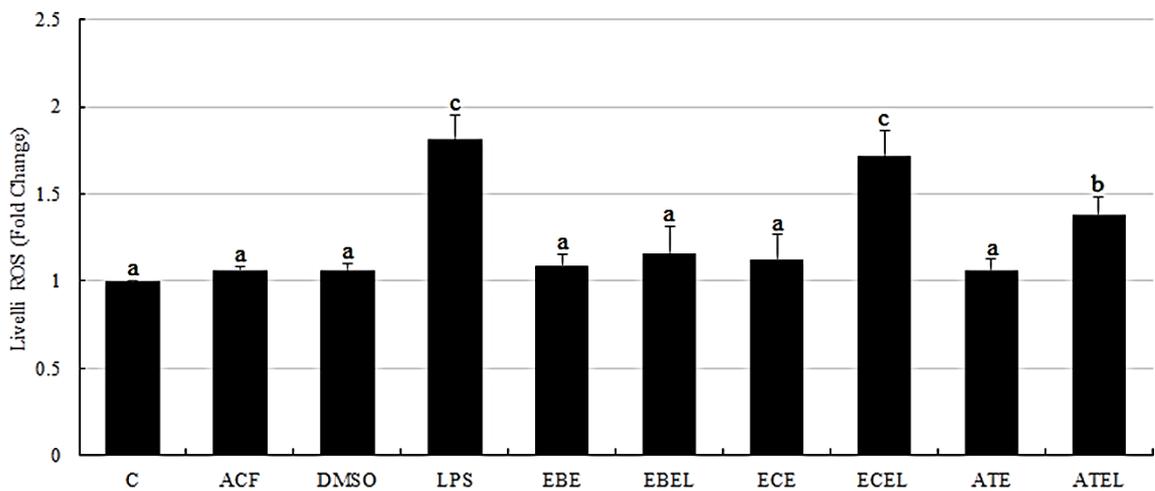
Le variazioni dei livelli di ROS sono state valutate nel lisato cellulare e nel cell-free. Sia nei lisati cellulari che nei cell-free, per tutti i set sperimentali il trattamento con LPS ha aumentato significativamente il livello dei ROS ( $p < 0.0001$ ) rispetto a quanto trovato nei ricci controllo (Fig. 39; A per i lisati cellulari e B per i cell free). Questo incremento dei livelli di ROS potrebbe essere dovuto al riconoscimento da parte dei celomociti dei profili molecolari associati al patogeno (PAMPs). Infatti, è noto che, quando i fagociti riconoscono i PAMPs si attivano e compiono la fagocitosi di particelle o materiale xenobiotico. Questo fenomeno è accompagnato dal “burst” respiratorio, un meccanismo biomolecolare mediante il quale i fagociti attivati producono e rilasciano ROS capaci esprimere attività antimicrobiche (Ito et al., 1992; Hibino et al., 2006).

Per quanto concerne i livelli dei ROS nei lisati cellulari, i risultati sono riassunti nella (Fig. 39-A). In tutti i trattamenti tra i controlli non sono stati osservati cambiamenti significativi. Incrementi significativi ( $p < 0.0001$ ) sono stati tuttavia osservati rispetto ai controlli quando gli individui venivano trattati con solo LPS. D’altro canto, quando gli animali venivano trattati con i soli estratti algali i livelli di ROS non mostravano cambiamenti significativi rispetto ai controlli. In definitiva quando gli animali venivano trattati simultaneamente con gli estratti algali e LPS si osservavano decrementi significativi nei livelli di ROS rispetto agli animali trattati con solo LPS soprattutto nel caso di EBEL e ATEL ( $p < 0.0001$ ). EBEL in particolare ha mostrato notevoli potenzialità per riportare i livelli di ROS simili ai livelli dei controlli. ECEL e ATEL, invece sebbene riducessero un possibile effetto infiammatorio indotto dall’LPS non ripristinavano i valori di ROS rispetto ai controlli.

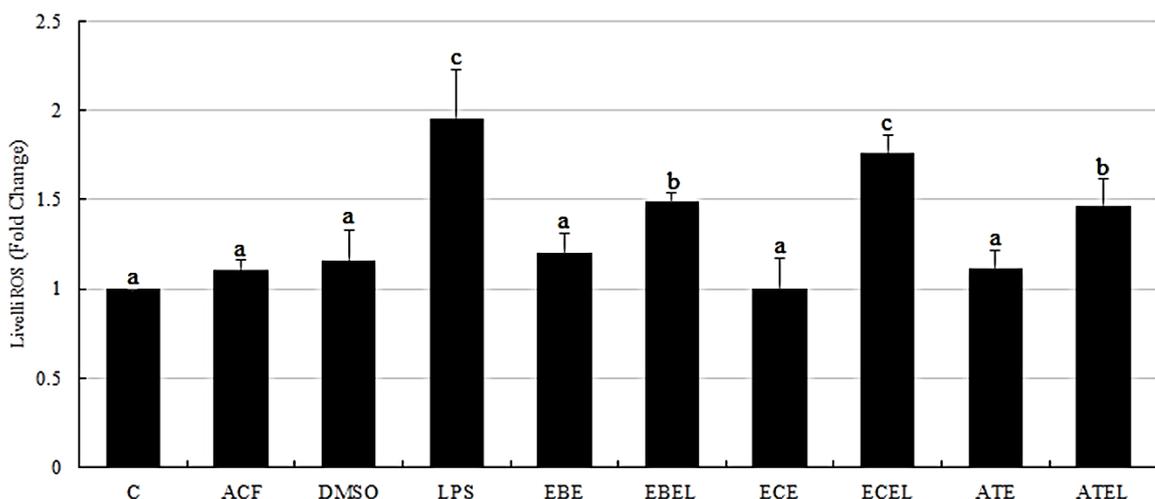
La riduzione significativa ( $p < 0.0001$ ) di livelli di ROS potrebbe essere dovuta ai composti lipidici presenti in EBE, e ai bromurati in ATE. Per quanto concerne EBE, risultati simili sono stati ottenuti saggiando un norisoprenoide (apo-9-fucoxantinone) isolato dagli estratti di *Sargassum muticum* che è stato capace di regola l’infiammazione inibendo l’attivazione di NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) e sopprimendo I $\kappa$ B- $\alpha$  nei macrofagi (linea cellulare RAW264.7) attivati dal LPS (Remya et al, 2022). Uno strumento diagnostico per valutare l’attività antinfiammatoria dei composti è l’emolisi di globuli rossi (Mounnissamy et al., 2007). Infatti, numerosi farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) agiscono preservando l’integrità lisosomiale delle cellule, consentendo il blocco o rilascio di enzimi lisosomiali coinvolti nel processo infiammatorio (Mounnissamy et al., 2007; Chaitanya et al., 2011). Shafay et al., (2021) utilizzando questo saggio con estratti di macroalghe rosse (*in vitro*), hanno rilevato un’attività antinfiammatoria paragonabile a quella del diclofenac. I nostri risultati sono in accordo con questi autori in quanto in ATE sono presenti composti simili a quelli testati da questi autori.

Nel cell-free i nostri risultati hanno mostrato decrementi significativi ( $p < 0.0001$ ) dei livelli di ROS nel caso di EBEL (Fig. 39-B) e ATEL (Fig. 39; B) rispetto al trattamento con solo LPS. Questa attività è dovuta ai composti presenti in EBE e ATE. In EBE sono presenti composti lipidici probabilmente capaci di esprimere questa attività inibitoria nel rilascio di ROS a livello plasmatico come dimostrato da Sharma et al., 2023. Questi autori utilizzando composti lipidici ottenuti dalla macroalga bruna *Padina tetrastromatica*, hanno assistito a una diminuzione significativa del livello dei ROS nel plasma di topo. Per quanto riguarda l'attività di ATE, questa in accordo con altri autori, potrebbe essere dovuta alla presenza di numerosi composti bromurati discussi in precedenza (Khani et al., 2023).

(A)

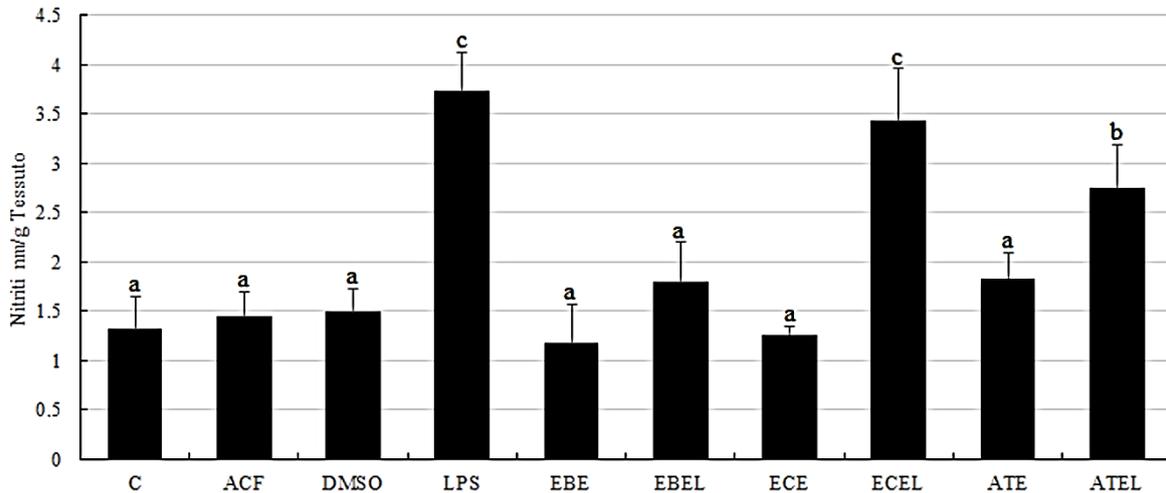


(B)



**Figura 39** Livello dei ROS di *A. lixula* dopo 3 ore nel lisato cellulare: A) e nel cell-free B) rispettivamente dopo il trattamento con solo LPS, con sola alga (EBE, ECE e ATE) e con LPS+alga (EBEL, ECEL e ATEL). I dati sono espressi come media  $\pm$  DS. Le differenze statisticamente significative sono indicate con lettere diverse (Tukey HSD). <sup>a</sup> $P > 0.05$ ; <sup>b</sup> $P \leq 0.001$ ; <sup>c</sup> $P \leq 0.0001$ .

Negli invertebrati la prima prova del ruolo dell'ossido nitrico (NO) come molecola immunocita-effettrice è stata fornita da Radomsky et al. (1991) nella specie *Limulus polyphemus*. Il nostro studio ha interessato per la prima volta l'analisi dei livelli NO nel cell-free di *A. lixula* in seguito a trattamenti con LPS ed estratti di macroalghe. Nel lisato cellulare, queste valutazioni non sono state effettuate per problemi di interferenza colorimetrica dovuta alla tipica colorazione rossa dei celomociti lisati. Per quanto concerne il cell-free, i trattamenti con LPS in tutti i set sperimentali (Fig. 40) aumentavano significativamente il livello dei NO rispetto ai ricci controllo ( $p < 0.0001$ ). NO svolge un ruolo importante nell'eliminazione degli agenti patogeni (Laroux et al., 2001; Rodríguez-Ramos et al., 2010; Ellis et al., 2011), infatti è noto che la sua produzione e rilascio a livello umorale può essere indotta in seguito all'attacco di microrganismi per la difesa dell'ospite (Müller et al., 2006; Colasanti et al., 2010). I nostri risultati sono in accordo con diversi autori, i quali esponendo (*in vitro*) emociti di *Panulirus argus* con LPS, hanno mostrato l'incremento dell'attività e dell'espressione genica dell'ossido nitrico sintasi (Rodríguez-Ramos et al., 2010). Ciò comporta l'aumento significativo dei livelli di NO a livello umorale come visto in diversi invertebrati (Müller et al., 2006; Costa et al., 2008; Costa et al., 2009; Colasanti et al., 2010). Trattando i ricci con alga+LPS simultaneamente i nostri risultati hanno mostrato in tutti i casi una diminuzione rispetto al trattamento con il solo LPS sebbene il dato fosse significativo solo nel caso di EBEL e ATEL ( $p < 0.0001$  e  $p < 0.001$ ). A conferma di quanto detto per i livelli di ROS, i composti lipidici presenti nell'estratto EBE mostrato la potenzialità di ridurre l'effetto infiammatorio prodotto da LPS riportando i livelli di NO simili ai ricci controllo (Fig. 40). L'effetto osservato sui livelli di NO è probabilmente dovuto alla presenza di lipidi nell'estratto di EBE (Conde et al., 2021). L'attività di ATE (Fig. 40) invece è in accordo con i risultati ottenuti da Choi et al., (2018), i quali saggiando un bromofenolo (Bis 3-bromo-4,5-diidrossibenzil) isolato dalla specie di macroalga rossa *Polysiphonia morrowii* hanno rilevato la riduzione del processo infiammatorio (indotto da LPS), riducendo in modo significativo i livelli di NO in cellule macrofaghe RAW 264.7.

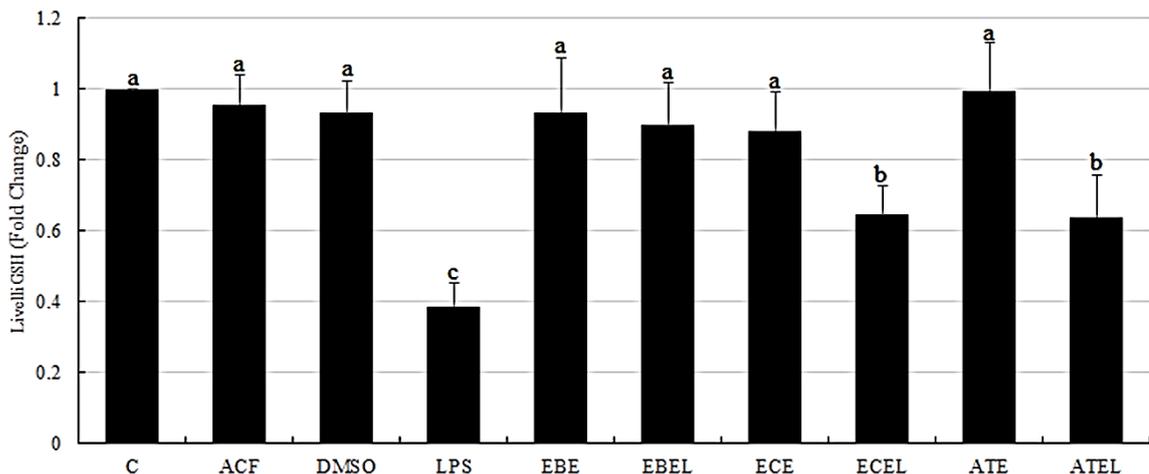


**Figura 40** Livello del NO in *A. lixula* dopo 3 ore. Trattamento con EBE, ECE e ATE. Nel set sperimentale sono riportati il controllo senza puntura, il controllo ACF, il controllo DMSO, i trattati con LPS, con alga (EBE, ECE, ATE) e con LPS+alga (EBEL, ECEL e ATEL). I dati sono espressi come media  $\pm$  DS. Le differenze statisticamente significative sono indicate con lettere diverse (Tukey HSD). <sup>a</sup> $P > 0.05$ ; <sup>b</sup> $P \leq 0.001$ ; <sup>c</sup> $P \leq 0.0001$ .

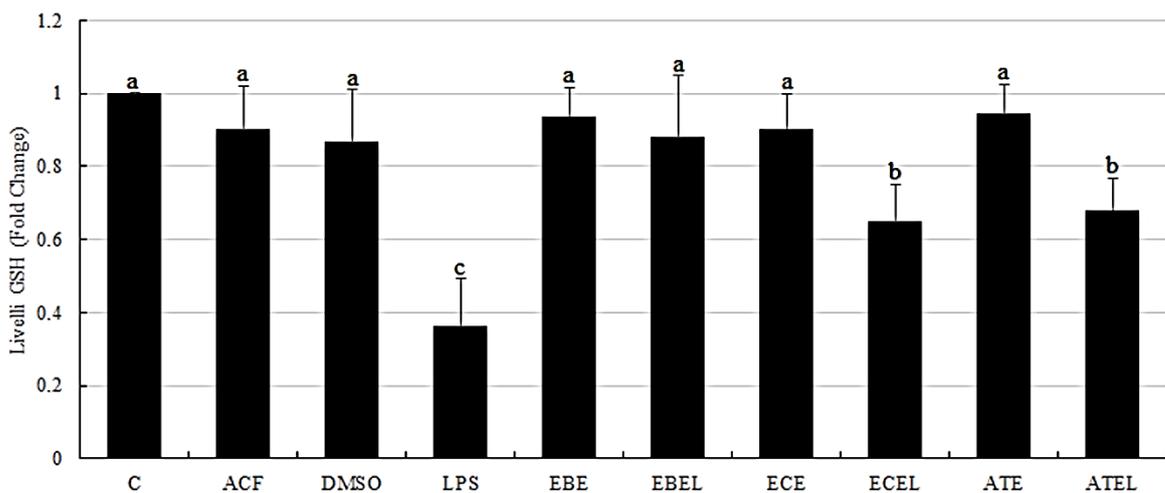
Il glutatione (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cisteinilglicina; GSH) è ampiamente distribuito in natura ed è presente praticamente in tutte le cellule animali a concentrazioni elevate (0.1-10 mM) (Dolphin et al., 1989; Meister, 1995). Rappresenta uno strumento di difesa per il mantenimento dell'omeostasi redox esplicando attività antiossidante come osservato da Ferreira-Cravo et al., (2023). Le variazioni dei livelli di GSH sono state valutate nel lisato cellulare e nel cell-free. Per quanto riguarda sia lisati cellulari che i cell-free, in tutti i set sperimentali il trattamento con LPS ha diminuito significativamente il livello dei GSH ( $p < 0.0001$ ) rispetto ai ricci controllo (Fig. 41-A per i lisati cellulari e B per i cell free). L'attivazione del sistema immunitario causata dal LPS comporta l'aumento dello stress ossidativo confermato dall'incremento dei livelli di ROS (osservato in precedenza) e conseguentemente la deplezione dei livelli di GSH (Dobashi et al., 2001; Mauro et al., 2023). I ricci trattati con alga e LPS simultaneamente hanno mostrato in tutti i casi incrementi dei livelli di GSH rispetto al trattamento con il solo LPS (Fig. 41-A, B), ECEL (Fig. 41-A, B) e ATEL (Fig. 41-A, B). Nel lisato cellulare e nel cell-free si è assistito a un aumento significativo ( $p < 0.0001$ ) del livello del GSH negli animali trattati con i singoli estratti algali rispetto a quelli trattati con solo LPS e mantenendo valori simili ai controlli. Questo potrebbe essere dovuto ai composti lipidici presenti in EBE, i meroterpenoidi in ECE e i bromurati in ATE, che regolano il processo infiammatorio sia livello cellulare che umorale nel riccio di mare *A. lixula*. Di fatto EBE potrebbe rigenerare il GSH consumato come osservato da altri autori nelle macroalghe brune ricche di composti di natura lipidica (Rahima et al., 2021). Infatti, alcuni autori utilizzando alcuni composti (Florotannini) prodotti dalle specie *Fucus vesiculosus* e *Ascophyllum nodosum*, hanno rilevato una diminuzione dei ROS intracellulari e della perossidazione lipidica e un miglioramento dei livelli di

GSH e delle attività enzimatiche della GSH-perossidasi, GSH-reduttasi e GSH-S-transferasi (Queguineur et al. 2012, Catarino et al. 2017). I composti meroterpenici contenuti in ECE a differenza dei saggi biochimici precedenti sembrerebbero avere avuto effetto sulla rigenerazione del GSH (Fig. 41-A, B), probabilmente questa attività è data da diversi meroterpeni presenti in ECE, i quali riescono ad esercitare numerose proprietà antiossidanti a livello cellulare ( $p < 0.001$ ) e umorale ( $p < 0.001$ ) (Fisch et al., 2003; Abu-Khudir et al., 2021; Lukova et al., 2023). I composti bromurati contenuti in ATE agirebbero nella regolazione dell'inflammation riducendo i livelli di ROS e di NO, rigenerando il GSH nel lisato cellulare e nel cell-free (Fig. 41-A e B) nei ricci esposti al LPS. Attività analoghe sono state registrate in cheratinociti trattati con un bromofenolo (Bromo-4,5-diidrossibenzaldeide) isolato da *Polysiphonia morrowii* il quale ha favorito la rigenerazione del GSH e la riduzione del processo infiammatorio (Jayasinghe et al., 2022).

(A)



(B)

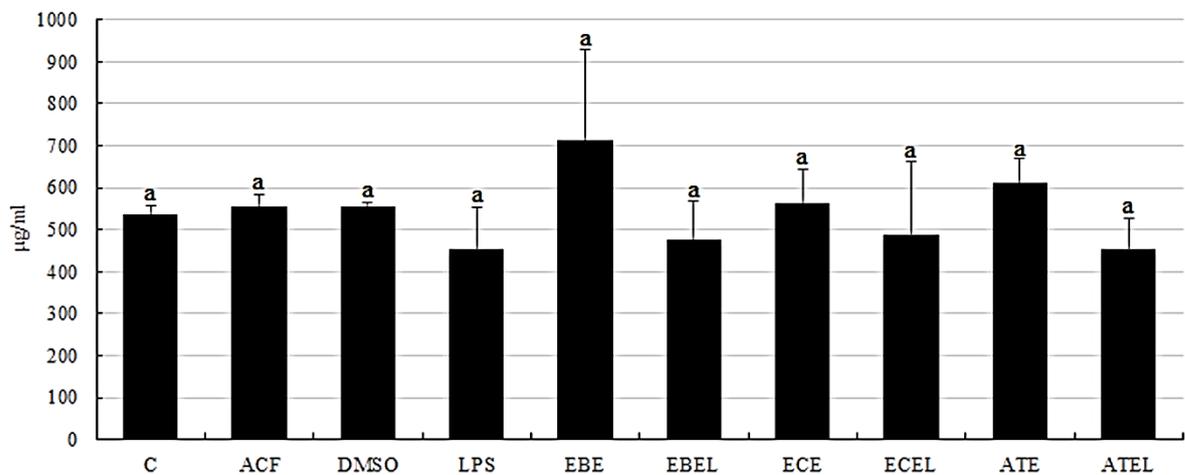


**Figura 41** Livello del GSH di *A. lixula* dopo 3 ore nel lisato cellulare: A) e nel cell-free B), rispettivamente dopo il trattamento con solo LPS, con sola alga (EBE, ECE e ATE) e con LPS+alga (EBEL, ECEL e ATEL). I dati sono espressi come media  $\pm$  DS. Le differenze statisticamente significative sono indicate con lettere diverse (Tukey HSD). <sup>a</sup> $P > 0.05$ ; <sup>b</sup> $P \leq 0.001$ ; <sup>c</sup> $P \leq 0.0001$ .

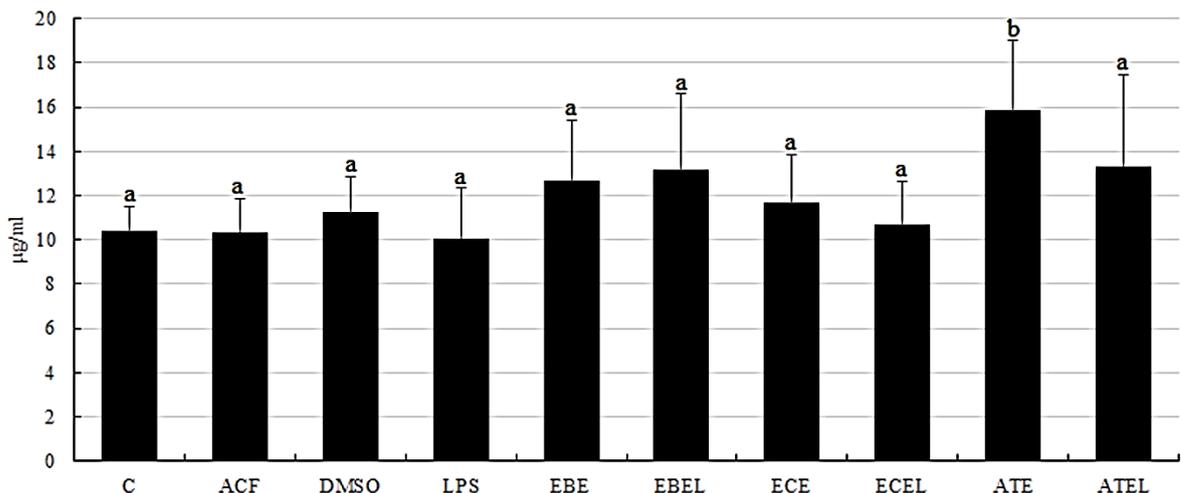
### 7.2.3 Concentrazione proteica, esterasi, fosfatasi alcalina

Nei lisati cellulari (Fig. 42-A) e nei cell-free (B) dei ricci sono state valutate le concentrazioni proteiche totali. Tutte le prove sperimentali non hanno mostrato cambiamenti rispetto ai controlli ad eccezione dei livelli di proteine nel cell-free degli individui trattati con solo ATE ( $p < 0.001$ ). Questo risultato potrebbe essere in accordo con la capacità dei composti bromurati, presenti in ATE, di inibire le endoproteasi del riccio di mare. Infatti, studi condotti con un composto bromurato (complesso mono-bromomaleimide) hanno dimostrato come questo potesse inibire l'attività della peptidasi papaina (Rudolf et al., 2012).

(A)



(B)

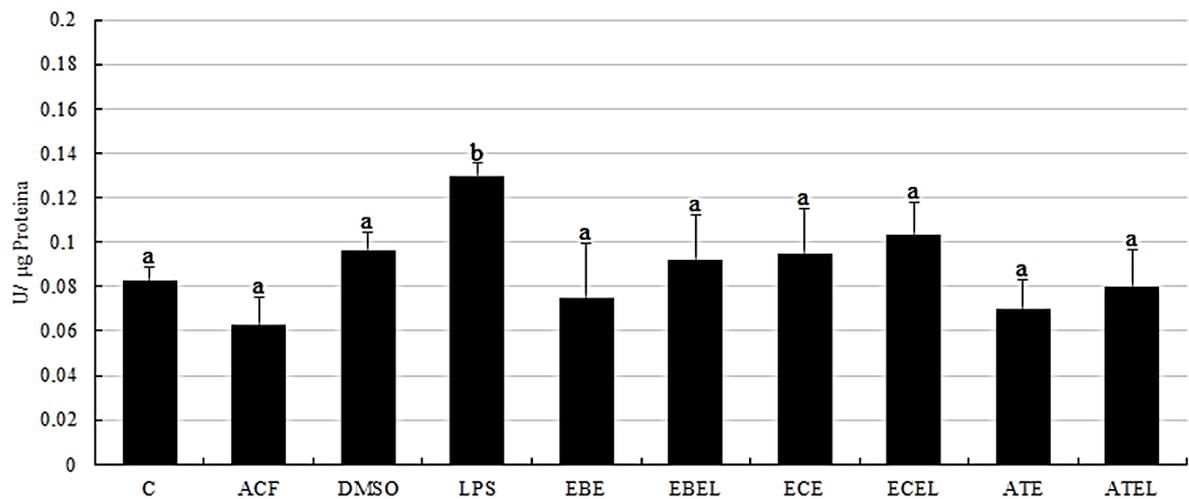


**Figura 42** Livello di proteine totali di *A. lixula* dopo 3 ore nel lisato cellulare: A) B) e C) e nel cell-free D), E) e F) rispettivamente dopo il trattamento con solo LPS, con sola alga (EBE, ECE e ATE) e con LPS+alga (EBEL, ECEL e ATEL). I dati sono espressi come media  $\pm$  DS. Le differenze statisticamente significative sono indicate con lettere diverse (Tukey HSD). <sup>a</sup> $P > 0.05$ ; <sup>b</sup> $P \leq 0.001$ .

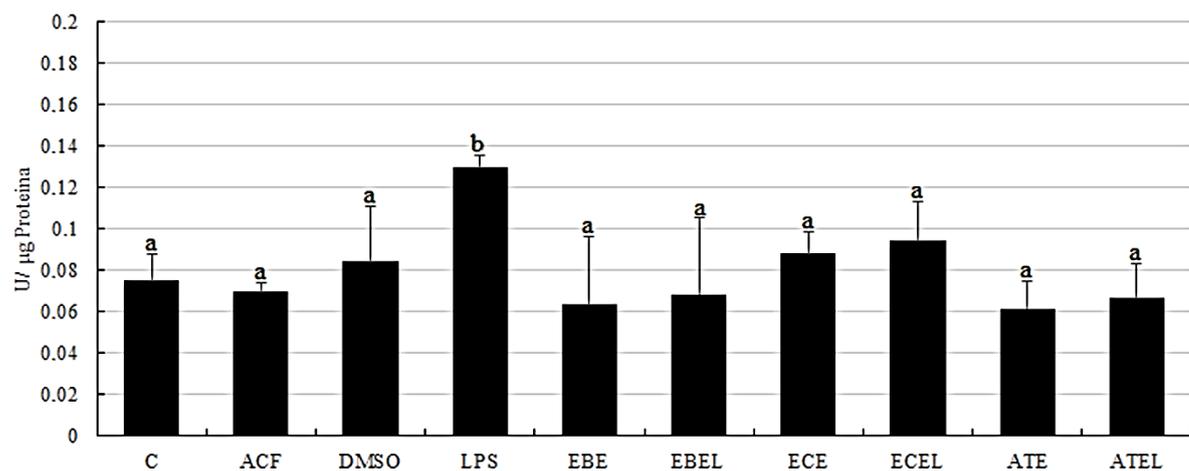
Numerosi studi scientifici indicano come le attività enzimatiche endogene negli invertebrati siano coinvolte nella risposta immunitaria (Chen et al., 2007; Solé et al., 2010; Parisi et al., 2017; Torres-Duarte et al., 2019; Vazzana et al., 2020). In questo studio è stata valutata l'attività esterasica nel lisato cellulare e nel cell-free dei ricci trattati. In tutti i set sperimentali il trattamento con LPS ha aumentato significativamente l'attività dell'esterasi ( $p < 0.001$ ) rispetto ai ricci controllo (Fig. 43-A per i lisati cellulari e B per i cell free).

Le esterasi sono enzimi lisosomiali coinvolti nella degradazione intracellulare di elementi patogeni o estranei (Gagnaire et al., 2004), l'incremento dell'attività di questi enzimi, è considerato un biomarker del processo infiammatorio (Hubbard et al., 2008). I ricci esposti al LPS hanno aumentato l'attività di questo enzima in accordo con altri autori (Xian et al., 2013). Il trattamento dell'alga + LPS ha mostrato in tutti i casi una riduzione dell'attività esterasica rispetto ai ricci trattati solo con LPS se pur significativa solamente nel cell-free dei ricci trattati con EBE (Fig. 43-B) ( $p < 0,001$ ), ECE (Fig.43-B) ( $p < 0.001$ ), ATE (Fig. 43-B) ( $p < 0.001$ ). In accordo con altri autori gli acidi grassi polinsaturi presenti in EBE agirebbero come mediatori dell'infiammazione regolando l'attività esterasica a livello umorale (Fig. 43-B) (Yammine et al., 2020). Per quanto concerne invece l'estratto ECE, questo sembrerebbe aver mostrato attività inibente dell'enzima esterasi, probabilmente grazie ai diversi meroterpeni presenti (Fisch et al., 2003; Shishido et al., 2013; Abu-Khudir et al., 2021; Lukova et al., 2023). Inoltre, l'attività registrata potrebbe essere in accordo anche con lo studio condotto su un meroterpenoide (territrem B), prodotto da *Aspergillus terreus*, che è stato capace di inibire irreversibilmente alcune esterasi umane (Chen et al., 1999). L'estratto ATE come mostrato in precedenza esplicherebbe attività riducendo in modo significativo l'attività dell'esterasi nel cell-free (Fig. 43-B). Questa attività potrebbe essere dovuta ai composti bromurati che sono presenti in essa contenuti (Barber et al., 1999; Al-Adilah et al., 2022) come osservato da altri che hanno testato un composto bromurato (Tetrabromobisfenolo-A) dimostrandone la capacità di ridurre la formazione dei ROS e l'attività esterasica nei granulociti neutrofili umani (Myhre et al., 2000).

(A)



(B)



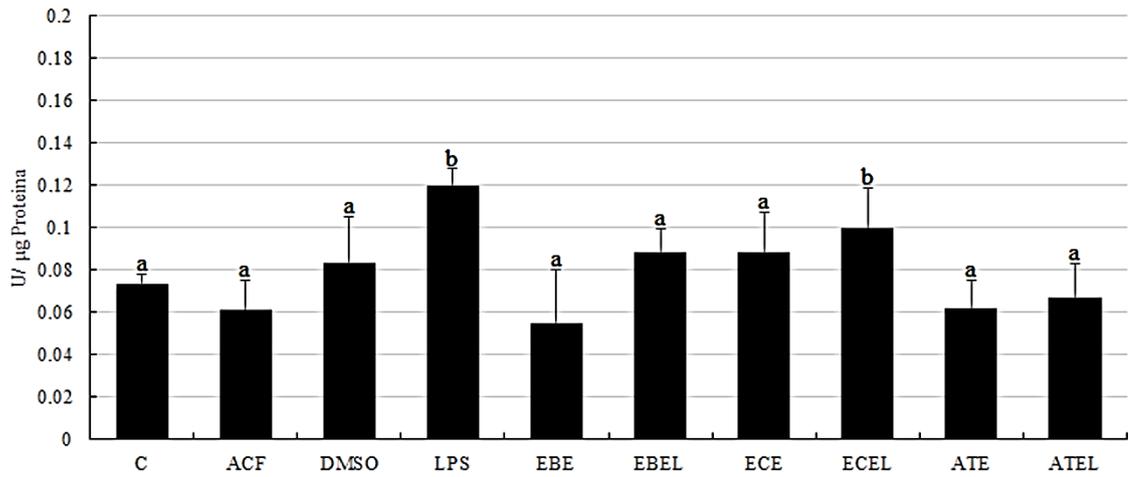
**Figura 43** Attività enzimatica (esterasi) in *A. lixula* dopo 3 ore nel lisato cellulare: A) e nel cell-free B), rispettivamente dopo il trattamento con solo LPS, con sola alga (EBE, ECE e ATE) e con LPS+alga (EBEL, ECEL e ATEL). I dati sono espressi come media  $\pm$  DS. Le differenze statisticamente significative sono indicate con lettere diverse (Tukey HSD). <sup>a</sup> $P > 0.05$ ; <sup>b</sup> $P \leq 0.001$ .

Studi condotti sugli organismi marini dimostrano come l'attività della fosfatasi alcalina sia direttamente correlata allo stress ambientale (Seitkhalieva et al., 2016). Infatti, questo enzima aumenta la sua attività negli organismi che sono sottoposti a diversi stress ambientale (Wang et al., 2008a, 2008b; Mazorra et al., 2002; Jing et al., 2006; Vazzana et al., 2020). Durante questa ricerca è stata valutata l'attività della fosfatasi alcalina (FA) nel lisato cellulare e nel cell-free di *A. lixula*. Per quanto riguarda i lisati cellulari che i cell-free, in tutti i set sperimentali il trattamento con LPS ha aumentato significativamente l'attività della FA ( $p < 0.001$ ) rispetto ai ricci controllo (Fig. 44-A per i lisati cellulari e B per i cell free) in accordo con la letteratura (Fukushima et al., 1998). Il trattamento dell'alga+ LPS ha mostrato in tutti i casi una riduzione dell'attività FA rispetto ai ricci trattati solo con LPS se pur significativa solamente nel lisato cellulare dei ricci trattati con EBEL (Fig. 44-B) e

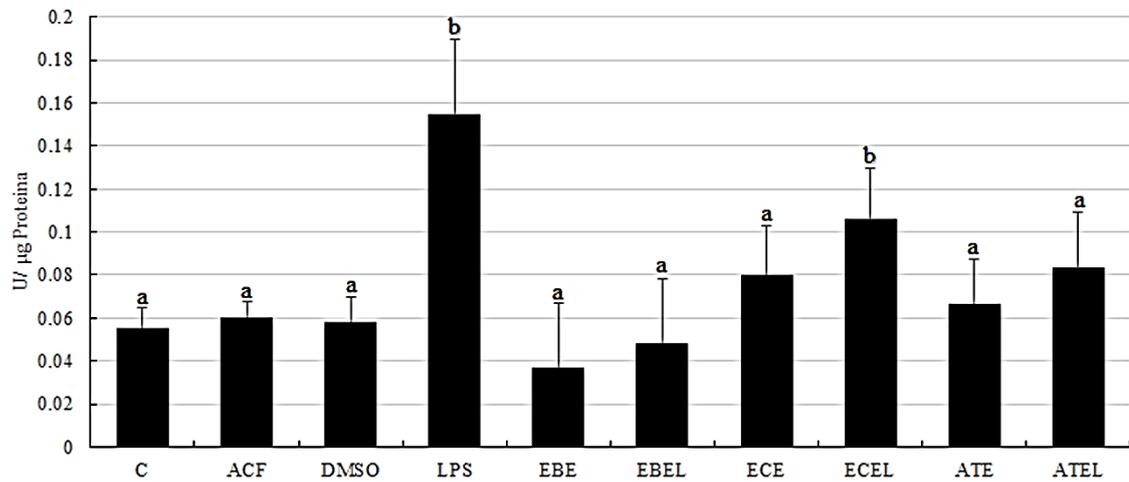
ATEL (Fig. 44-A) ( $p < 0.001$ ). Come già dimostrato in precedenza EBE esplicherebbe attività antinfiammatoria regolando il processo infiammatorio prodotto dal LPS. La sua attività probabilmente è dovuta alla presenza dei numerosi acidi grassi poli-insaturi capaci di regolare il processo infiammatorio e di ridurre l'attività della FA (Gil, 2002; Camuesco et al., 2005). Nello stesso modo i composti presenti nell'estratto ATE hanno ridotto l'attività di FA in accordo con altri autori, i quali testando un estratto acquoso di *Gracilaria corticata* hanno registrato un effetto epatoprotettivo e la riduzione dell'attività di FA a livello epatico nei ratti Wistar (Sampathkumar et al., 2008). Nel cell-free il trattamento dell'alga+LPS ha mostrato in tutti i casi riduzione dell'attività della FA rispetto ai ricci trattati solo con LPS se pur significativi solamente nei ricci trattati con EBEL e ATEL (Fig. 44-B) ( $p > 0.001$ ).

L'attività mostrata dai lipidi presenti in EBE sarebbe in accordo con altri autori, i quali testando un complesso silibina-vitamina E-fosfolipidi hanno mostrato una riduzione dell'attività di FA a livello sierico in pazienti affetti da infezione da Epatite C (Falasca et al., 2008). L'estratto ATE esplicherebbe attività riducendo il processo infiammatorio prodotto dal LPS riportando i livelli di FA simili ai controlli non trattati (Fig. 44-B). Questa attività potrebbe essere dovuta alla presenza dei composti bromurati presenti in ATE come dimostrato in diversi studi in cui questi composti sono in grado di inibire le attività delle fosfatasi (Wolf et al., 1967; Pathak et al., 2022).

(A)



(B)



**Figura 44** Attività enzimatica (Fosfatasi alcalina) in *A. lixula* dopo 3 ore nel lisato cellulare: A) e nel cell-free B) rispettivamente dopo il trattamento con solo LPS, con sola alga (EBE, ECE e ATE) e con LPS+alga (EBEL, ECEL e ATEL). I dati sono espressi come media  $\pm$  DS. Le differenze statisticamente significative sono indicate con lettere diverse (Tukey HSD). <sup>a</sup> $P > 0.05$ ; <sup>b</sup> $P \leq 0.001$ .

## 8. Valutazione dell'attività embriotossica dell'estratto di *E. brachycarpa* in *A. lixula*.

### 8.1 Materiali e metodi

#### 8.1.1 Campionamento, fecondazione e trattamento di *A. lixula*

Gli individui adulti di *A. lixula* sono stati raccolti mensilmente da marzo a giugno 2023, durante il loro picco riproduttivo principale (Wangensteen et al., 2013) in scogliere rocciose poco profonde (2-8 m). Per ogni esperimento, 10 ricci di mare di taglia adulta (peso  $41.1 \pm 6.4$  g) sono stati stabulati nelle vasche presso il Dipartimento STEBICEF. I gameti sono stati prelevati da 3 maschi e 3 femmine ed esaminati al microscopio per selezionare quelli di maggiore qualità per procedere alla fecondazione, come precedentemente descritto (Martino et al., 2021). L'acqua di mare utilizzata è stata raccolta nella stessa area e filtrata (acqua di mare filtrata Millipore da  $0.22 \mu\text{m}$ , (AMMF)). Dieci minuti dopo la fecondazione, è stato controllato il successo di fecondazione mediante esame al microscopio ottimale se  $>95\%$ . Dopo tre risciacqui in AMMF, 20 ml di uova fecondate (4000 uova/ml) sono stati posti in piastre Petri da 20 mm ed esposti a diverse concentrazioni di EBE (1, 4, 10, 20 e  $40 \mu\text{g/ml}$ , (EBE 1, EBE 4, EBE 10, EBE 20 ed EBE 40). Ogni esperimento è stato condotto in triplicato. Gli embrioni sono stati coltivati a  $18^\circ\text{C}$ , con tre endpoint di sviluppo per ciascun trattamento:

- 24 ore (G, gastrule)
- 48 ore (ePl, plutei precoci)
- 72 ore (lPl, plutei tardivi).

Come è illustrato nella Figura 45 (A) la linea nera indica gli embrioni che non hanno ricevuto il trattamento con EBE, mentre la linea in grigio indica il trattamento con EBE 1, EBE 4, EBE 10, EBE 20 ed EBE 40 degli embrioni alle diverse ore.

La linea 9 rappresenta l'esperimento di recupero, con embrioni allevati per 24 ore nel trattamento EBE 40 e poi passati in AMMF fino all'endpoint di 72 ore (Fig. 45-A). Per determinare se il DMSO avesse effetto sullo sviluppo, gli embrioni controllo sono stati esposti alle stesse concentrazioni utilizzate per saggiare EBE (EBE 1/4/10/20/40).

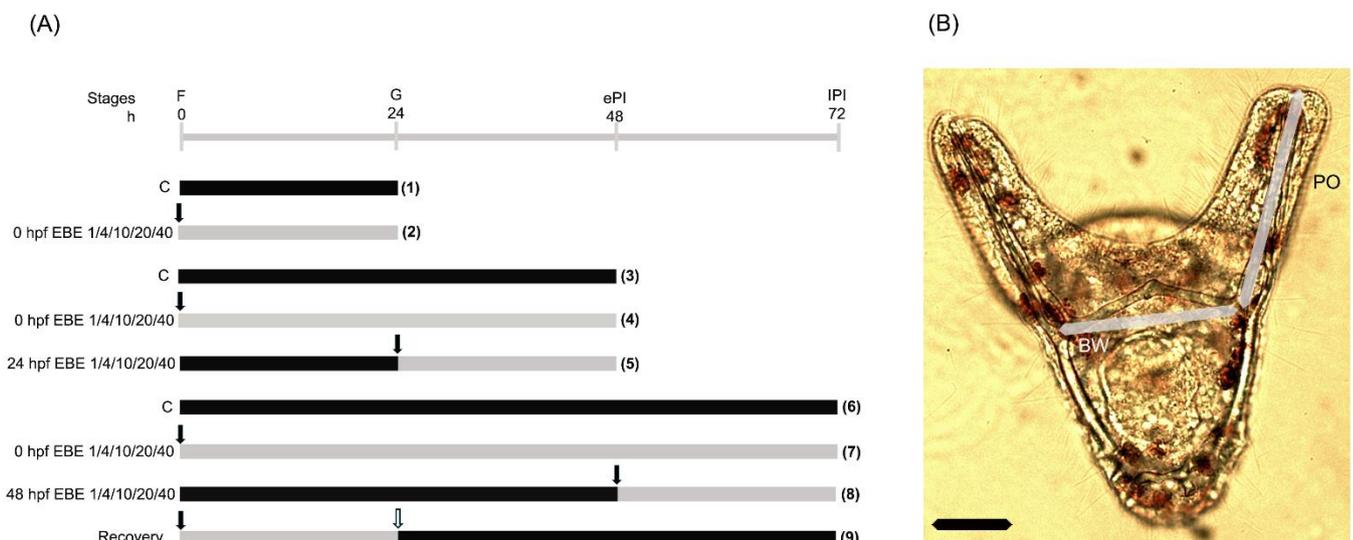
### 8.1.2 Analisi morfologica degli embrioni di riccio di mare

Ogni 24 ore, 100 embrioni sono stati campionati, esaminati al microscopio (Leica DCF420 C), e fotografati utilizzando una fotocamera digitale per valutare lo sviluppo normale/anormale degli embrioni. Sono stati conteggiati un totale di 100 embrioni per ciascuna piastra (fatto in triplicato). Poiché i controlli e gli embrioni esposti alle dosi più basse di EBE (EBE 1 e 4) hanno raggiunto lo stadio di gastrula a 24 ore e lo stadio di echinopluteo a quattro bracci prealimentazione a 48-72 ore, sono stati utilizzati tre parametri morfologici:

- il diametro completo a 24 ore.
- la lunghezza del braccio post-orale (PO) 48 e 72 ore
- la larghezza del corpo larvale (BW) 48 e 72 ore

per confrontare la capacità di crescita e di calcificazione degli embrioni utilizzando ImageJ (ver 1.46 r) sono stati misurati 11 embrioni per ogni trattamento (Fig. 45-B).

La lunghezza del braccio post-orale rappresenta una metrica ben nota della crescita e della calcificazione dell'echinopluteo e il BW è stato utilizzato per analizzare i cambiamenti nella forma larvale in risposta all'esposizione a EBE (Byrne et al., 2013; Martino et al., 2021; Wangenstein et al., 2013). Non è stato possibile ottenere queste misure morfometriche alle dosi più elevate (EBE 10, 20 e 40) perché gli embrioni presentavano importanti aberrazioni dello sviluppo.



**Figura 45** Disegno schematico del piano sperimentale utilizzato per testare gli effetti di EBE negli embrioni di *A. lixula*. Bastoncini neri, colture in AMMF; bastoncini grigi, colture in AMMF contenenti EBE. F, fecondazione; G, gastrula; ePl, pluteo precoce; IPl, pluteo tardivo. Le frecce nere indicano l'inizio dell'esposizione all'EBE nei diversi trattamenti; la freccia bianca indica l'inizio della ripresa in AMMF. B) Caratteristiche morfologiche misurate su plutei di *A. lixula*: BW, larghezza del corpo; PO, bastoncino scheletrico post-orale. Barra: 50 μm.

### 8.1.3 Curve dose-risposta

Per valutare la sensibilità degli embrioni di *A. lixula* all'esposizione di EBE, sono state create tre curve dose-risposta per i trattamenti degli embrioni a 0 hpf, 24 hpf e 48 hpf. I dati sono stati raccolti da tre esperimenti indipendenti e ripetuti rispettivamente tre volte (n=9). L'intervallo delle concentrazioni testate è stato scelto per coprire una curva di anomalia completa 0-100%, con dosi comprese tra 0 e 40 µg/ml. Le curve dose-risposta dei tre trattamenti sono state calcolate valutando le percentuali di embrioni anomali rispetto a concentrazioni crescenti di EBE. Sono stati determinati due parametri ecotossicologici: EC<sub>50</sub> e NOEC. Questi valori sono stati utilizzati per scegliere le concentrazioni per gli esperimenti successivi.

### 8.1.4 Elettroforesi e Western blot

L'analisi elettroforetica e il western blot sono stati eseguiti seguendo il protocollo di Chiarelli et al. (2022). I pellet di embrioni sono stati ottenuti dopo centrifugazione di 5 ml di coltura di embrioni a 1000 r.p.m, per 1 minuto. L'estrazione delle proteine è stata eseguita utilizzando un tampone di lisi (urea 7 M, CHAPS al 2% e DTT 10 mM) contenente una miscela di inibitori della proteasi (Sigma-Aldrich, P8340). Dopo la determinazione del contenuto proteico, utilizzando il metodo Bradford, 25 µg di proteine sono stati separati mediante SDS-PAGE al 13%. Per identificare il peso molecolare delle proteine separate elettroforeticamente è stato utilizzato un marcatore di peso molecolare (PageRuler, Fermentas, SM0671). Le proteine sono state quindi trasferite in membrane di nitrocellulosa da 0.45 µm, a 200 mA per 1 ora. Per controllare che il trasferimento fosse avvenuto il gel è stato colorato con Blue di Comassie 0.5% per 30 minuti e poi decolorato. Il filtro, come controprova, è stato colorato con rosso di Poinceau per 2 minuti e poi decolorato con acqua distillata. Le membrane sono state quindi incubate con i seguenti anticorpi: anti-HSP60 (Sigma-Aldrich H3524); anti-LC3 (Sigma-Aldrich, L8918); anti-p62/SQSTM1 (Sigma-Aldrich, P0068); anti-GADD 153 (R-20) (Santa Cruz Biotechnology, sc-793); anti-caspasi-7 (Cell Signaling Technology, 9491) e anti-actina (Sigma-Aldrich, A5060) diluiti rispettivamente: 1:500; 1:750; 1:500; 1:300; 1:500; 1:500 (incubazione over-night, 12 ore) in una soluzione di *blocking*: 5% di latte magro liofilizzato. Come anticorpi secondari, sono stati utilizzati anti-rabbit o anti-mouse IgG legato alla perossidasi (GE Healthcare, NA934; GE Healthcare, NA931) diluiti 1:2500 con TBS-T. L'acquisizione delle immagini è stata eseguita utilizzando il sistema VersaDoc MP Imaging Systems (Bio-Rad), dopo incubazione delle membrane di nitrocellulosa con il kit chemiluminescente Immun Star™ WesternC™ (Bio-Rad), al fine di visualizzare le bande proteiche. Le intensità delle bande sono state valutate tramite densitometria ottica utilizzando il software Quantity One v.4.6.6 (Bio-Rad) e la normalizzazione è stata effettuata in base all'intensità della banda di actina, utilizzata come controllo

del caricamento. I dati sono stati presentati come media  $\pm$  SD.

### **8.1.5 Saggio di frammentazione del DNA**

La frammentazione del DNA è stata analizzata mediante saggio TUNEL (Promega), come descritto da Chiarelli et al. (2022). I controlli positivi sono stati pretrattati con DNase prima del test TUNEL. I controlli negativi sono stati incubati con una miscela nucleotidica (fluorescein 12-dUTP), senza l'enzima TdT. La cromatina frammentata marcata è stata osservata al 20X utilizzando un microscopio a fluorescenza (Olympus BX50). L'analisi quantitativa è stata effettuata utilizzando il software ImageJ 1.46r dopo l'acquisizione tramite una fotocamera digitale (Nikon Sight DS-U1).

### **8.1.6 Analisi statistica**

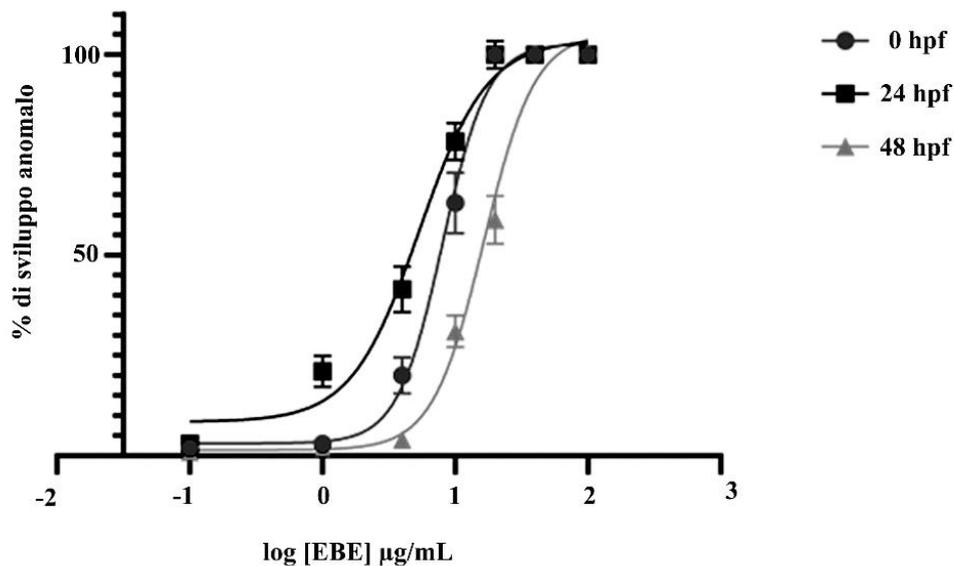
I dati percentuali per ciascuna delle categorie morfologiche e i dati sulla lunghezza del braccio posteriore e sulla larghezza del corpo sono stati analizzati mediante analisi della varianza a due vie (ANOVA) con la concentrazione di EBE e il tempo di inizio dell'esposizione come fattori fissi. I risultati WB quantificati come intensità della banda proteica e i risultati del test TUNEL riportati come unità arbitrarie della quantità totale di DNA frammentato sono stati analizzati in modo simile mediante ANOVA a due vie. Il test HSD di Tukey è stato utilizzato come test post-hoc per il confronto delle medie. L'omogeneità della varianza è stata verificata e confermata utilizzando il test di Levene. Le analisi sono state eseguite utilizzando il software Statistica 13.2 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). In tutti i risultati sono stati considerati significativi con livelli di  $p < 0.05$ .

## **8.2 Risultati e discussioni**

### **8.2.1 Curve dose-risposta**

Per stabilire la risposta degli embrioni di *A. lixula* a EBE, diversi trattamenti sono stati eseguiti aggiungendo EBE subito dopo la fecondazione (0 hpf) o a 24 e 48 hpf, quindi rispettivamente allo stadio di gastrula o pluteo, per verificare se la sensibilità degli embrioni all'esposizione a EBE differiva iniziando l'esposizione a diversi stadi di sviluppo (vedi Fig. 45; A). L'esposizione a EBE ha avuto un significativo effetto dose-dipendente sullo sviluppo degli embrioni di *A. lixula* ( $F_{17, 36} = 581.2$ ,  $p < 0.0001$ ), così come lo stadio di sviluppo in cui sono state iniziate le esposizioni ( $F_{17, 36} = 128.4$ ,  $p < 0.0001$ ) e la loro interazione (EBE x hpf:  $F_{17,36} = 43.8$ ;  $p < 0.0001$ ). L'esposizione dalla fecondazione ha ridotto significativamente i livelli di larve normalmente sviluppate in parallelo con l'aumento della concentrazione di EBE del 19.6, 63 e 100%, rispettivamente per l'esposizione a EBE 4, 10 e 20. Sorprendentemente, il trattamento con EBE 1 da 24 hpf ha prodotto già il 21% di embrioni anomali, mentre questa dose non ha avuto alcun effetto nei trattamenti 0 e 48 hpf. Al contrario, mentre

per il trattamento 0 e 24 hpf abbiamo sono stati ottenuti il 100% di embrioni anomali con EBE 20, nel trattamento 48 hpf EBE 20 si è verificata una riduzione dei livelli di larve normalmente sviluppate del 58.8%. Le curve dose-risposta, ottenute mostrano le percentuali di sviluppo anomalo rispetto alla concentrazione utilizzata, sono mostrate nella Figura 46 e hanno dato come risultato un valore EC<sub>50</sub> di 8.0 µg/ml per il trattamento 0 hpf ( $R^2= 0.9948$ ), 5.3 µg/ml per il trattamento da 24 hpf ( $R^2= 0.9868$ ) e 16.4 µg/ml per il trattamento da 48 hpf ( $R^2= 0.9903$ ) (Fig. 46), mentre i valori NOEC erano rispettivamente 0.5, 0.1 e 0.7 µg/ml.



**Figura 46** Curve dose-risposta in base all'aumento delle concentrazioni di EBE per percentuali di embrioni anomali esposti a EBE da 0, 24 e 48 hpf.

Per interpretare il motivo per cui questa alga dovrebbe produrre tossine naturali con effetto tossico sugli embrioni di riccio di mare, dobbiamo considerare le interazioni ecologiche tra queste due specie, con l'alga che produce sostanze chimiche contro i suoi erbivori e gli embrioni di riccio di mare che adottano strategie molecolari per rispondere a queste tossine naturali ambientali. Il loro rilascio nell'ambiente marino può indurre problemi riproduttivi ed effetti teratogeni sui loro predatori, inclusi copepodi e ricci di mare (Ruocco et al., 2019; Lauritano e Ianora 2020). Le ossilipine sono i probabili agenti di questo fallimento riproduttivo in *A. lixula*, in modo simile all'azione di arresto della crescita generata dalle ossilipine derivate dalle diatomee sulla riproduzione di *P. lividus* e dei copepodi (Miralto et al., 1999; Varrella et al., 2014). Poiché *A. lixula* normalmente sfrutta *E. brachycarpa* presente nel suo ambiente, l'effetto dannoso sugli embrioni ma non sugli adulti suggerisce che potrebbe esserci una maggiore vulnerabilità degli embrioni, come nel caso dei copepodi che

pascolano le diatomee ma gli embrioni sono vulnerabili alle ossilipine prodotte dalle stesse alghe pascolate (Koski et al., 1998). Inoltre, estratti di diverse alghe brune, tra cui *Ericaria crinita*, hanno mostrato effetti larvicidi contro le larve di diversi insetti (Fouda et al., 2022; Aly et al., 2023), suggerendo un loro potenziale come risorse naturali per la produzione di insetticidi.

### 8.2.2 Analisi morfologica degli embrioni di riccio di mare

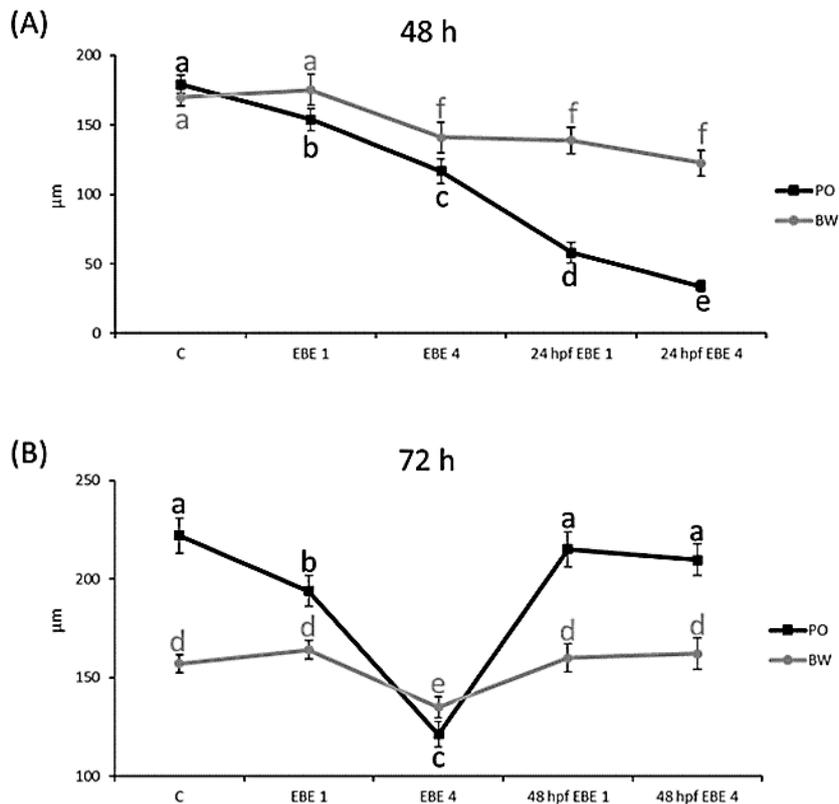
Le due concentrazioni di EBE inferiori ai valori dell'EC<sub>50</sub> (EBE 1 e 4) non hanno mostrato alcun effetto fino alla gastrulazione (24 ore), poiché sia i controlli che i trattati hanno raggiunto tutte le tappe fondamentali della gastrula nei tempi corretti, inclusa la deposizione dello scheletro. Non è stata riscontrata nessuna variazione nel diametro delle gastrule fra i controlli e i trattati. A 48 e 72 ore i controlli erano plutei che mostravano una complessa struttura scheletrica (Fig. 47-A, B). Poiché la maggior parte degli embrioni esposti a basse dosi mostravano uno sviluppo ritardato con una diminuzione delle dimensioni (Fig. 47-B), è stato possibile misurare la loro dimensione, misurando PO e BW per confrontare con controlli la capacità delle larve trattate rispetto ai controlli di crescere e calcificare correttamente (vedere Fig. 48-B).

Nelle larve controllo, abbiamo riscontrato un aumento del 25% del PO, da  $178.6 \pm 12.8 \mu\text{m}$  a 48 ore a  $221.9 \pm 20 \mu\text{m}$  a 72 ore, dimostrando che la crescita dei plutei durante lo sviluppo è dovuta principalmente legata all'aumento della lunghezza e non della larghezza (Fig. 47-A, B).

A 48 ore, l'esposizione a EBE ha influenzato significativamente sia PO ( $F_{5,60} = 193.1, p < 0.0001$ ) che BW ( $F_{5,60} = 28.2; p < 0.0001$ ), nonché lo stadio di sviluppo in cui sono state avviate le esposizioni (PO:  $F_{5,60} = 165, p < 0.0001$ ; BW:  $F_{5,60} = 12, p < 0.001$ ) e l'interazione tra i due fattori (PO:  $F_{5,60} = 42.5, p < 0.0005$ ; BW:  $F_{5,60} = 14.75, p < 0.0005$ ). Rispetto ai controlli, le larve esposte dalla fecondazione a EBE 1 e 4 mostravano una diminuzione di PO rispettivamente del 15% ( $153.9 \pm 30.6 \mu\text{m}$ ) e del 36% ( $116.7 \pm 30.4 \mu\text{m}$ ) a 48 ore, (Fig. 47-A). La massima riduzione di PO è stata osservata nei trattamenti 24 hpf a 48 ore, ovvero il 68% a EBE 1 ( $58.1 \pm 5.5 \mu\text{m}$ ) e l'87% a EBE 4 ( $23.9 \pm 7.08 \mu\text{m}$ ) se confrontato con i controlli a 48 ore. Per quanto riguarda BW, abbiamo riscontrato una riduzione significativa del 17% a EBE 4 a 48 ore ( $141.6 \pm 8,4 \mu\text{m}$ ), ma non a EBE 1, se confrontato con i plutei di controllo a 48 ore ( $170.4 \pm 11.42 \mu\text{m}$ ). Nei trattamenti 24 hpf si è verificata una riduzione significativa del 23% a EBE 1 ( $138,8 \pm 12,9 \mu\text{m}$ ) e una riduzione del 32% a EBE 4 ( $122.5 \pm 15.1 \mu\text{m}$ ; Fig. 47-A).

A 72 ore, l'esposizione a EBE ha influenzato significativamente sia su PO ( $F_{5,60} = 45,4, p < 0.0001$ ) che su BW ( $F_{5,60} = 14.8; p < 0.0001$ ), nonché sullo stadio di sviluppo in cui sono iniziate le esposizioni (PO:  $F_{5,60} = 77.2, p < 0.0001$ ; BW:  $F_{5,60} = 4.31, p < 0.05$ ) e l'interazione tra i due fattori (PO:  $F_{5,60} = 49.5, p < 0.0001$ ; BW:  $F_{5,60} = 14.7, p < 0.0001$ ). A 72 ore, le larve nei trattamenti 0 hpf EBE 1 e 4

mostravano una riduzione del PO rispettivamente del 13% ( $193.9 \pm 15.7 \mu\text{m}$ ) e del 46% ( $121.2 \pm 13.7 \mu\text{m}$ ), rispetto ai controlli ( $156.9 \pm 8.9 \mu\text{m}$ ) (Fig. 47-B). Per quanto riguarda BW, è stata osservata una riduzione significativa del 21% a EBE 4 ( $135.1 \pm 9.4 \mu\text{m}$ ), mentre nessuna differenza è stata riscontrata a EBE 1 (Fig. 47-B). Non abbiamo riscontrato nessuna differenza nei trattamenti 48 hpf EBE 1 e 4 né per PO né per BW (Fig. 47).



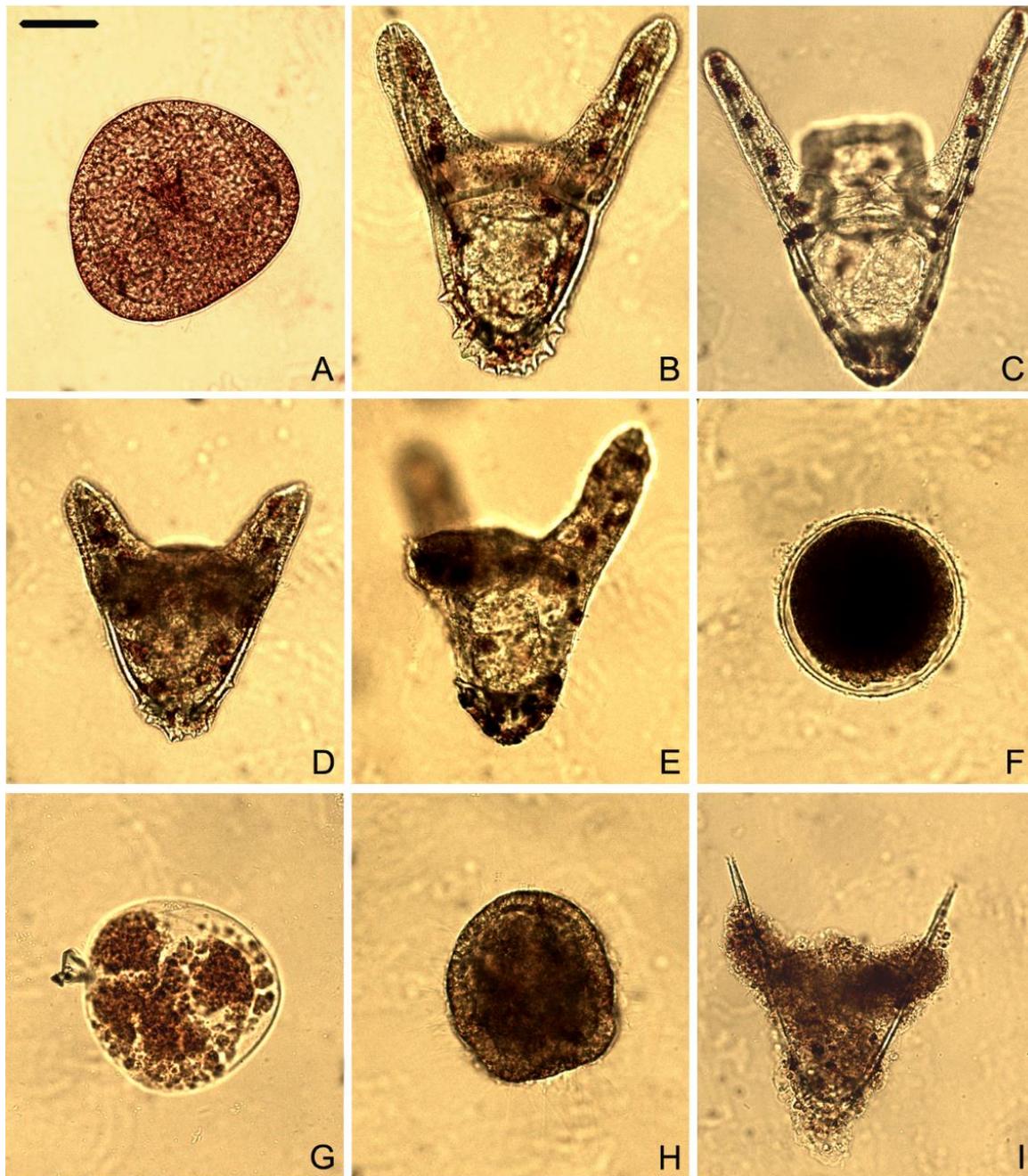
**Figura 47** Lunghezza del braccio larvale post-orale e larghezza del corpo misurate a 48 (A) e 72 ore (B) in risposta all'esposizione a EBE. Le differenze significative sono indicate con lettere diverse (Tukey HSD). <sup>a</sup> $P > 0.05$ ; <sup>b</sup> $P \leq 0.001$ ; <sup>cdef</sup> $P \leq 0.0001$ .

Il fatto che EBE sia in grado di indurre un marcato ritardo nello sviluppo a concentrazioni inferiori ai valori  $EC_{50}$ , cioè EBE 1 e 4, è stata una scoperta molto importante. Abbiamo quantificato questo ritardo misurando la diminuzione di PO e BW e abbiamo poi utilizzato questi valori come indicatore della capacità di costruzione dello scheletro larvale (Byrne et al., 2013). I nostri risultati hanno mostrato un'importante riduzione della lunghezza del PO per i trattati dalla fecondazione rispetto ai controlli, rappresentando una minaccia per la capacità delle larve di alimentarsi e nuotare, e dunque di raggiungere la metamorfosi (Byrne et al., 2013; Martino et al., 2021). Sorprendentemente, la massima riduzione della lunghezza della PO è stata osservata nei trattamenti a 24 hpf a 48 ore, mentre non è stata riscontrata nessuna differenza nei trattamenti EBE 1 e 4 a 48 hpf per PO e il BW.

### ***8.2.2.1 Valutazioni dell'effetto di EBE ad alte concentrazioni***

Le concentrazioni EBE 10, 20 e 40 hanno mostrato un blocco della prima scissione in modo dose-dipendente. Solo il 37% degli embrioni esposti a EBE 10 è stato in grado di raggiungere normalmente lo stadio di pluteo a 48 ore, mentre il 33% erano embrioni ritardati o anormali (Fig. 48-D, E) e il 30% mostrava inibizione della scissione (Fig. 48-F). I trattamenti con la dose più alta (EBE 40) hanno mostrato un blocco del 100% della prima scissione e dopo 48 ore è stato possibile riconoscere il disassemblaggio e la formazione dei corpi apoptotici negli embrioni degenerati (Fig. 48-G).

Nell'esperimento di recupero, gli embrioni esposti a EBE 40 mostrano un'inibizione del 100% del clivaggio indicando che il danno prodotto da EBE 40 è irreversibile (il fenotipo mostrato in Fig. 48-F). Risultati simili sono stati ottenuti nei trattamenti con EBE 40 a 24 e 48 hpf, dove EBE ha bloccato totalmente lo sviluppo delle larve, mostrando tossicità acuta (Fig. 48-H) e chiari segni del processo apoptotico, attraverso il distacco dei corpi apoptotici dalla struttura scheletrica dei plutei degenerati (Fig. 48-I).



**Figura 48** Embrioni controllo (A-C); ed embrioni esposti a EBE (D-I). A) embrione controllo a 24 ore; B) embrione controllo a 48 ore; C) embrione controllo a 72 ore; D) embrione ritardato a 48 ore; E) embrione malformato a 48 ore; F) zigote con segmentazione bloccata a 24 ore; G) disassemblaggio e formazione dei corpi apoptotici a 72 ore; H) tossicità acuta nel trattamento con 24 hpf EBE 40; I) morte cellulare per apoptosi dei plutei a 48 hpf. Bar = 60  $\mu$ M in A-B, D-H; 75  $\mu$ M in C, I.

Possiamo concludere che EBE 40 ha un effetto tossico sugli embrioni di *A. lixula*. L'estratto EBE potrebbe agire come antimitotico, bloccando la segmentazione degli embrioni come già dimostrato da diversi autori testando estratti e composti tossici (ossilipine e derivati) delle microalghe diatomee su embrioni di riccio di mare (Orvain et al., 2015; Ruocco et al., 2016). I nostri risultati forniscono prove morfologiche degli effetti tossici dell'estratto di *E. brachycarpa* contenente ossilipine sugli embrioni e sulle larve di *A. lixula*. La diversità delle ossilipine nella struttura chimica e gli effetti

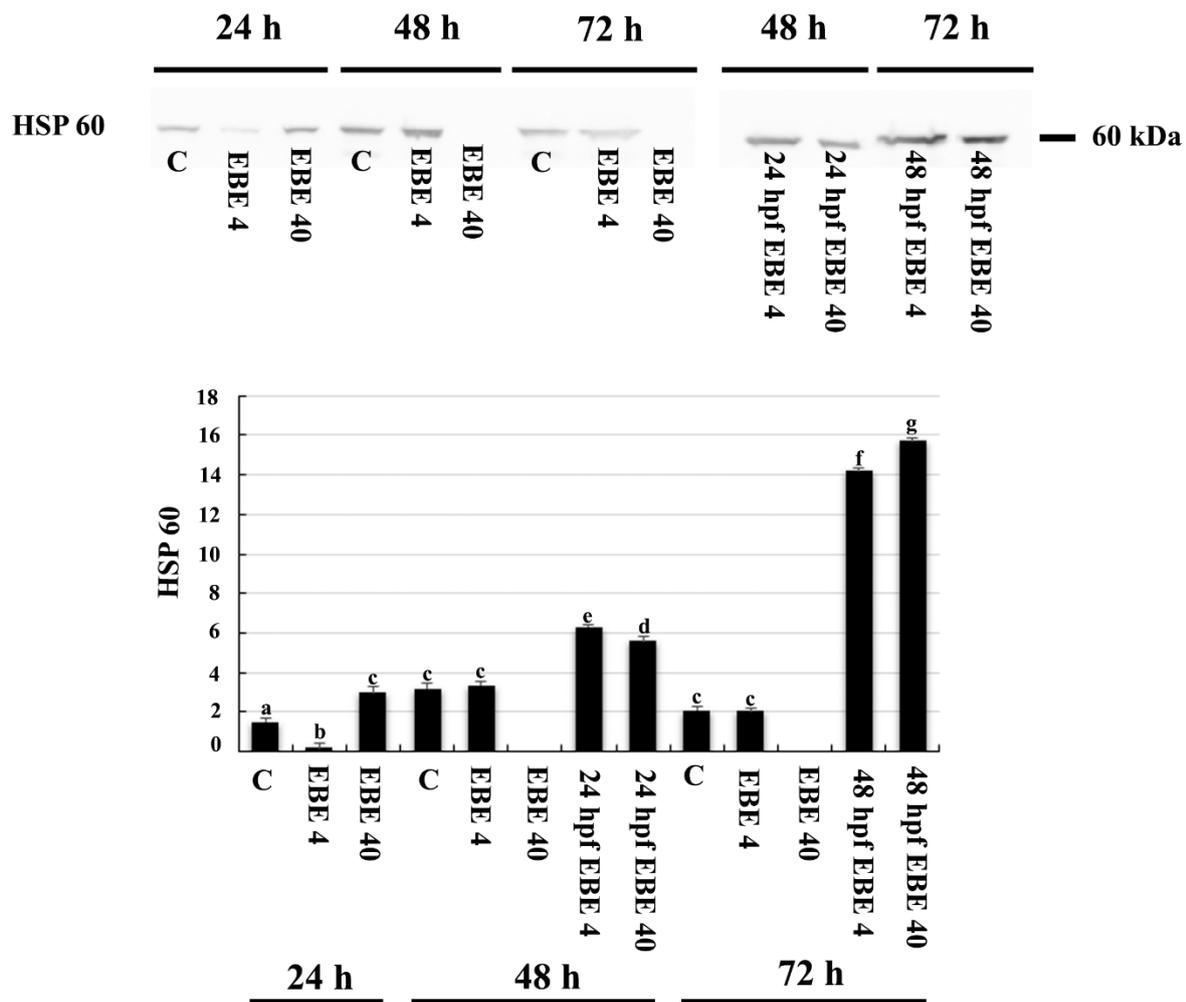
biologici associati le rendono particolarmente promettenti per strategie terapeutiche, come ampiamente osservato per le ossilipine derivate da piante e microalghe (Blasio e Balzano, 2021; Savchenko et al., 2022), mentre esistono solo pochi studi sulla le proprietà benefiche delle ossilipine derivate dalle macroalghe (Barbosa et al., 2016). Poiché le macroalghe possono secernere i loro metaboliti secondari sia per contatto diretto con i composti contenuti nelle ghiandole epidermiche e nei tricomi secretori, sia attraverso masse d'acqua (Gomes et al., 2017), è probabile che embrioni e larve di riccio di mare possano entrare in contatto diretto con queste molecole.

### 8.2.3 Elettroforesi, Western blot e frammentazione del DNA

Sono stati utilizzati diversi biomarcatori per rilevare l'attivazione della risposta allo stress cellulare all'EBE negli embrioni di *A. lixula*, dimostrando che essa dipendeva fortemente dalla finestra di esposizione durante lo sviluppo embrionale. I primi meccanismi di risposta allo stress cellulare attivati sono stati mediati dall'induzione di HSP60, analogamente ai risultati ottenuti in seguito alla risposta allo stress cellulare di embrioni di *P. lividus* esposti a fattori di stress ambientali (Matranga et al., 2013; Chiarelli et al., 2016). Le larve esposte dallo stadio di pluteo avevano un'induzione di HSP60 maggiore rispetto alle larve esposte dallo stadio di gastrula, probabilmente dovuto ad una migliore resistenza dei plutei.

Sia l'esposizione a EBE ( $F_{12,26} = 387.8; p < 0.0001$ ) che lo stadio di sviluppo in cui sono state iniziate le esposizioni ( $F_{12,26} = 248.2; p < 0.0001$ ) hanno avuto un effetto significativo sull'espressione di HSP60, così come la loro interazione (EBE x hpf:  $F_{12,26} = 108.5; p < 0.0001$ ). Sebbene non sia stato osservato alcun aumento dei livelli di HSP60 a EBE 4, i trattamenti con EBE 40 hanno indotto un aumento dei livelli di proteina HSP 60 a 24 ore mentre, sorprendentemente, la proteina non era presente a 48 e 72 ore (Fig. 49), suggerendo l'attivazione di altri processi. Al contrario, nei trattamenti 24 e 48 hpf, entrambe le concentrazioni di EBE causavano un aumento nei livelli di HSP60 di circa 2 volte maggiori se esposti dallo stadio di gastrula e di circa 5 volte maggiori se esposti dallo stadio di pluteo, rispetto ai trattamenti 48 hpf ad entrambe le concentrazioni.

Questi risultati sono in accordo con la sensibilità fase-specifica dello sviluppo evidenziata dalle tre curve dose-risposta, confermando le gastrule come lo stadio più sensibile all'estratto con la  $EC_{50}$  più bassa (5.4  $\mu\text{g/ml}$ ) e i plutei come lo stadio più resistente con un  $EC_{50}$  pari a 16.5  $\mu\text{g/ml}$ , probabilmente per via dello sviluppo incompleto delle gastrule e dei loro meccanismi protettivi non ottimali, come ad esempio l'induzione di HSP e autofagia (vedi sotto).



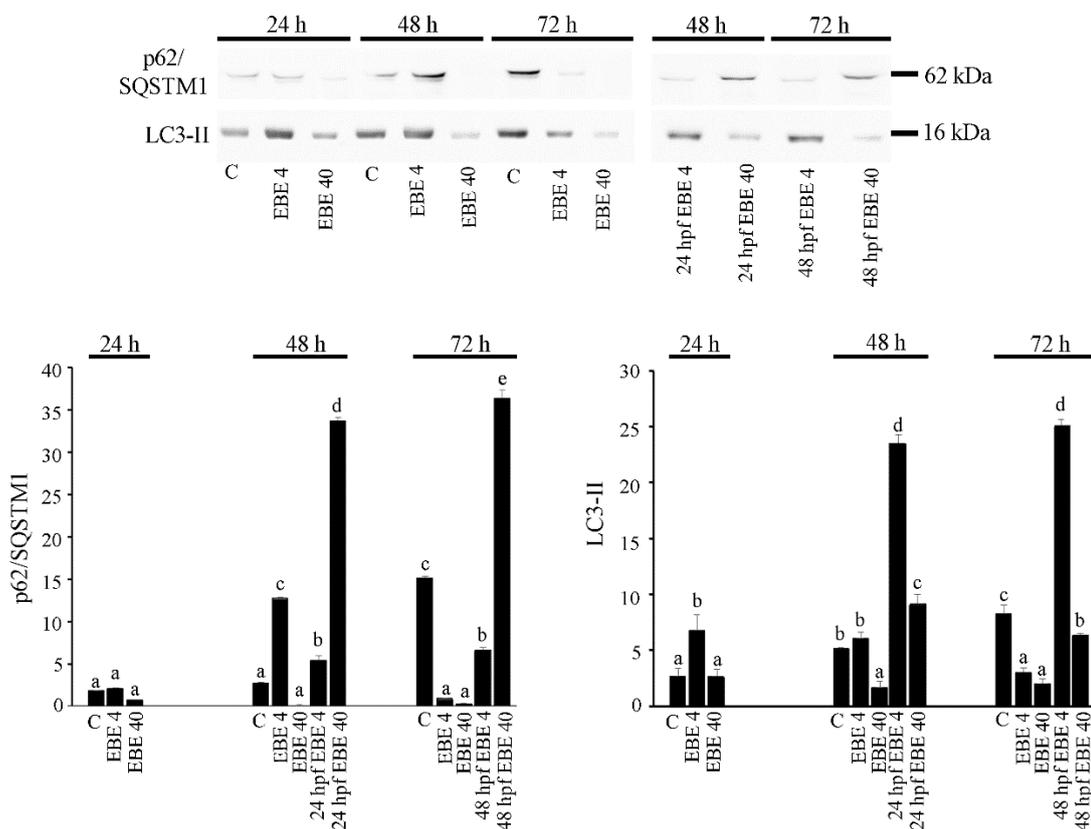
**Figura 49** Analisi Western blot dei livelli proteici di HSP60 negli embrioni di riccio di mare. Le differenze statisticamente significative sono indicate con lettere diverse (Tukey HSD). <sup>a</sup> $P > 0.05$ ; <sup>b</sup> $P \leq 0.001$ ; <sup>cdefg</sup> $P \leq 0.0001$ .

Inoltre, abbiamo valutato due marker dell'autofagia (p62/SQSTM1 e LC3), per verificare l'attivazione di questo processo negli embrioni trattati con EBE.

L'esposizione a EBE ha influenzato significativamente la loro espressione (LC3:  $F_{12,26} = 609.3$ ,  $p < 0.0001$ ; p62:  $F_{12,26} = 969.3$ ,  $p < 0.0001$ ), così come il tempo di inizio dell'esposizione (LC3:  $F_{12,26} = 246.2$ ,  $p < 0.0001$ ; p62:  $F_{12,26} = 1004.1$ ,  $p < 0.0001$ ) e la loro interazione (LC3-II:  $F_{12,26} = 177.6$ ,  $p < 0.0001$ ; p62:  $F_{12,26} = 530$ ,  $p < 0.0001$ ). Le due proteine hanno mostrato profili di espressione simili, essendo down-regolate nei trattamenti 0 hpf EBE 40 (Fig. 50). Nei trattamenti iniziati agli stadi di gastrula e pluteo queste proteine hanno mostrato andamenti opposti, poiché LC3-II era maggiormente espresso a EBE 4 con un aumento di circa 4 volte, mentre p62/SQSTM1 era espresso maggiormente a EBE 40 con un aumento di circa 12 volte a 48 ore e un aumento di 2.4 volte a 72 ore (Fig. 50).

Come dimostrato dai marcatori LC3-II e p62/SQSTM1, l'autofagia è stata indotta in modo sostenuto

in entrambi i trattamenti 24 e 48 hpf, indicando lo “sforzo” delle gastrule e dei plutei di rimuovere metaboliti tossici, proteine *misfolded* e organelli danneggiati. L'aumento dell'espressione di LC3-II in risposta al trattamento EBE per 48 ore, suggerisce l'induzione dell'autofagia, un processo che può essere stimolato da diversi tipi di stress cellulari, incluso lo stress ER. Tuttavia, il ruolo dell'autofagia indotta dallo stress ER è controverso e probabilmente dipende dall'entità dello stress ER (Rashid et al., 2015). Sebbene la maggior parte degli studi indichi che l'autofagia è un processo cellulare conservato che mantiene l'omeostasi cellulare, esercitando funzioni pro-sopravvivenza in seguito allo stress del RE, è stato anche dimostrato che l'autofagia e l'apoptosi spesso si verificano nella stessa cellula, principalmente in una sequenza in cui l'autofagia precede e facilita l'apoptosi (Gump e Thorburn, 2011; Song et al, 2017).



**Figura 50** Analisi Western blot dei livelli proteici per: p62/SQSTM1 (sinistra) e LC3 (destra) negli embrioni di riccio di mare. Le differenze significative sono indicate con lettere diverse (Tukey HSD). <sup>a</sup>P > 0.05; <sup>b</sup>P ≤ 0.001; <sup>cde</sup>P ≤ 0.0001.

L'induzione dell'apoptosi è stata osservata mediante l'utilizzo di due marcatori: la cleaved caspase-7, nota per svolgere un ruolo chiave nella fase di esecuzione dell'apoptosi, e CHOP-10/GADD153, la cui maggiore espressione è collegata all'arresto del ciclo cellulare che porta all'apoptosi.

Sia l'esposizione all'EBE ( $F_{12,26} = 946,9$   $p < 0.001$ ) che i trattamenti hpf ( $F_{12,26} = 680,9$ ;  $p < 0.0001$ ) hanno avuto un effetto significativo sull'espressione della cleaved caspase-7, così come sulla loro interazione (EBE x hpf:  $F_{12,26} = 593,9$ ;  $p < 0.0001$ ). Sebbene nella maggior parte dei trattamenti fossero presenti solo bassi livelli di proteina, rispetto ai controlli gli embrioni esposti a EBE 40 hanno mostrato un aumento dei livelli di cleaved caspase-7 pari a 13 volte a 48 ore e a 108 volte a 72 ore, (Fig. 51-A). Anche gli embrioni nei trattamenti 24 e 48 hpf EBE 40 hanno avuto rispettivamente un aumento di 57 e 17 volte (Fig. 51-A), dimostrando la marcata induzione della fase esecutrice dell'apoptosi in tutti i trattamenti EBE 40.

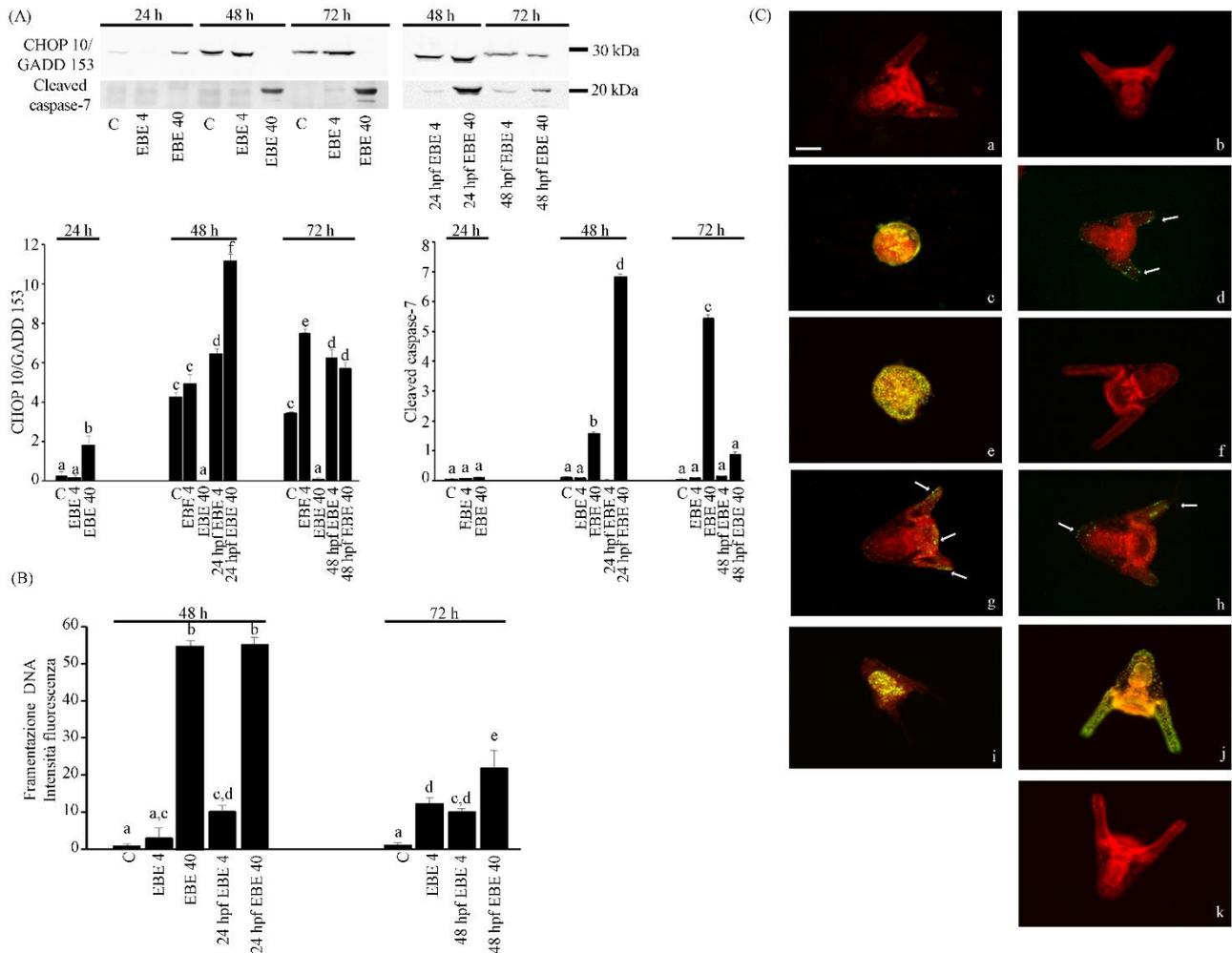
Per quanto riguarda l'espressione di CHOP-10/GADD153, l'analisi WB ha mostrato che l'esposizione a EBE ( $F_{12,26} = 105,5$ ;  $p < 0.0001$ ) e lo stadio di sviluppo in cui sono state iniziate le esposizioni ( $F_{12,26} = 87,5$ ;  $p < 0.0001$ ) hanno avuto un effetto significativo sui suoi livelli, nonché sulla loro interazione (EBE x hpf:  $F_{12,26} = 27,2$ ;  $p < 0.0001$ ). La proteina CHOP-10/GADD153 era maggiormente espressa a EBE 40 a 24 ore, mentre non era presente a 48 e 72 ore (Fig. 51-A). Invece, abbiamo rilevato una marcata espressione di cleaved caspase-7, probabilmente perché l'azione di CHOP-10/GADD153 nell'arresto del ciclo cellulare è temporalmente precedente a quello dell'attivazione della cleaved caspase-7. Nei trattamenti 24 e 48 hpf abbiamo osservato un incremento dei livelli di CHOP-10/GADD153 ad entrambe le concentrazioni (Fig. 51-A). È stato anche osservato un aumento di 2 volte nel trattamento EBE 4 a 72 ore rispetto ai controlli a 72 ore (Fig. 51-A).

È stata valutata anche la quantità e la localizzazione del DNA frammentato apoptotico tramite la tecnica TUNEL. I risultati hanno confermato i dati WB sull'apoptosi. La Figura 51 (B-C) mostra sezioni ottiche equatoriali di larve rappresentative a 48/72 ore e l'istogramma riporta la quantità di DNA frammentato apoptotico. Sia l'esposizione all'EBE ( $F_{9,20} = 578$ ;  $p < 0.0001$ ) che lo stadio di sviluppo in cui sono state iniziate le esposizioni ( $F_{9,20} = 93,4$ ;  $p < 0.0001$ ) hanno avuto un effetto significativo sulla quantità di DNA frammentato apoptotico, così come sulla loro interazione (EBE x hpf:  $F_{9,20} = 50,3$ ;  $p < 0.0001$ ). Come precedentemente riportato per le larve di *P. lividus*, bassi livelli di DNA frammentato apoptotico sono stati riscontrati nei controlli sia a 48 che a 72 ore (Chiarelli et al., 2021; Martino et al., 2021, vedere Fig. 51), indicando livelli basali di apoptosi fisiologica. Mentre non era presente alcuna differenza tra controlli e larve nel trattamento EBE 4 a 48 ore, è stato evidenziato un aumento significativo pari a 10 volte a 72 ore, segno distintivo di un'attivazione dell'apoptosi tempo-dipendente (Fig. 51-B). Nessun segnale della cleaved-caspasi-7 è stato evidenziato dall'analisi WB nel trattamento EBE 4 a 72 ore poiché le cellule erano in uno stadio

avanzato di apoptosi, dove il ruolo della cleaved caspasi-7 è già terminato ma il DNA frammentato è ancora presente e visibile. Sorprendentemente, il trattamento con EBE 40 a 48 ore ha determinato un aumento di 55 volte rispetto ai controlli, indicando la presenza di apoptosi avanzata (Fig. 48-B). Non è stato possibile analizzare il trattamento con EBE 40 a 72 ore mediante TUNEL perché gli embrioni erano disassemblati in piccoli corpi apoptotici.

Gli embrioni esposti dagli stadi gastrula e pluteo hanno avuto un aumento dose-dipendente della frammentazione della cromatina, con un aumento significativo di 10 e 54 volte nei trattamenti EBE 4 e 40 da 24 hpf, e un aumento significativo di 9.5 e 20.5 volte nei trattamenti 48 hpf EBE 4 e 40 rispettivamente (Fig. 51-B).

Indipendentemente dal tempo di inizio dell'esposizione, gli embrioni esposti a EBE 4 mostravano nuclei apoptotici con DNA frammentato solo in un gruppo ristretto di cellule (Fig. 51-C). Questa apoptosi selettiva a basse dosi (EBE 4) ha interessato solo alcune cellule, probabilmente le più danneggiate, per preservare il programma di sviluppo poiché altre cellule possono trarre beneficio dai materiali liberati dalle cellule apoptotiche, ad es. amminoacidi e substrati per l'ATP (Somero, 2020), come è stato osservato negli embrioni di *P. lividus* esposti al vanadio e all'esposizione combinata di gadolinio e aumento della temperatura (Chiarelli et al., 2021; Martino et al., 2021). Invece gli embrioni esposti a EBE 40 mostravano un'apoptosi diffusa in tutto l'embrione (Fig. 51-C), portando a morte.



**Figura 51** Induzione dell'apoptosi negli embrioni di riccio di mare. Analisi Western blot dei livelli proteici per CHOP10/GADD153 e cleaved caspase-7 in A) embrioni di riccio di mare. Gli istogrammi riportano la quantificazione della fluorescenza correlata al DNA frammentato in embrioni di riccio di mare. Le differenze statisticamente significative sono indicate con lettere diverse (Tukey HSD),  $^aP > 0.05$ ;  $^bP \leq 0.001$ ;  $^{cdef}P \leq 0.0001$ . Sovrapposizione dei segnali relativi ai nuclei totali colorati con ioduro di propidio e nuclei con frammentazione del DNA (vedi punti luminosi indicati dalle frecce) che mostrano: C) Immagini di embrioni rappresentativi a 48 (a-e) e 72 h (f-i) di sviluppo. Embrione controllo a 48 ore (a); embrioni esposti a 48 ore: EBE 4 (b); EBE 40(c); 24 cv EBE 4(d); 24 cv EBE 40(e); embrione controllo a 72 ore (f); embrioni esposti a 72 ore: EBE 4 (g); EBE 40(h); 24 hpf EBE 4 (i). Embrione controllo positivo (j). Embrione controllo negativo (k). Bar = 60  $\mu$ m.

## **9. Valutazione dell'attività di pascolo di *A. lixula* sulle macroalghe *E. crinita* e *Caulerpa taxifolia* var. *disticophylla*.**

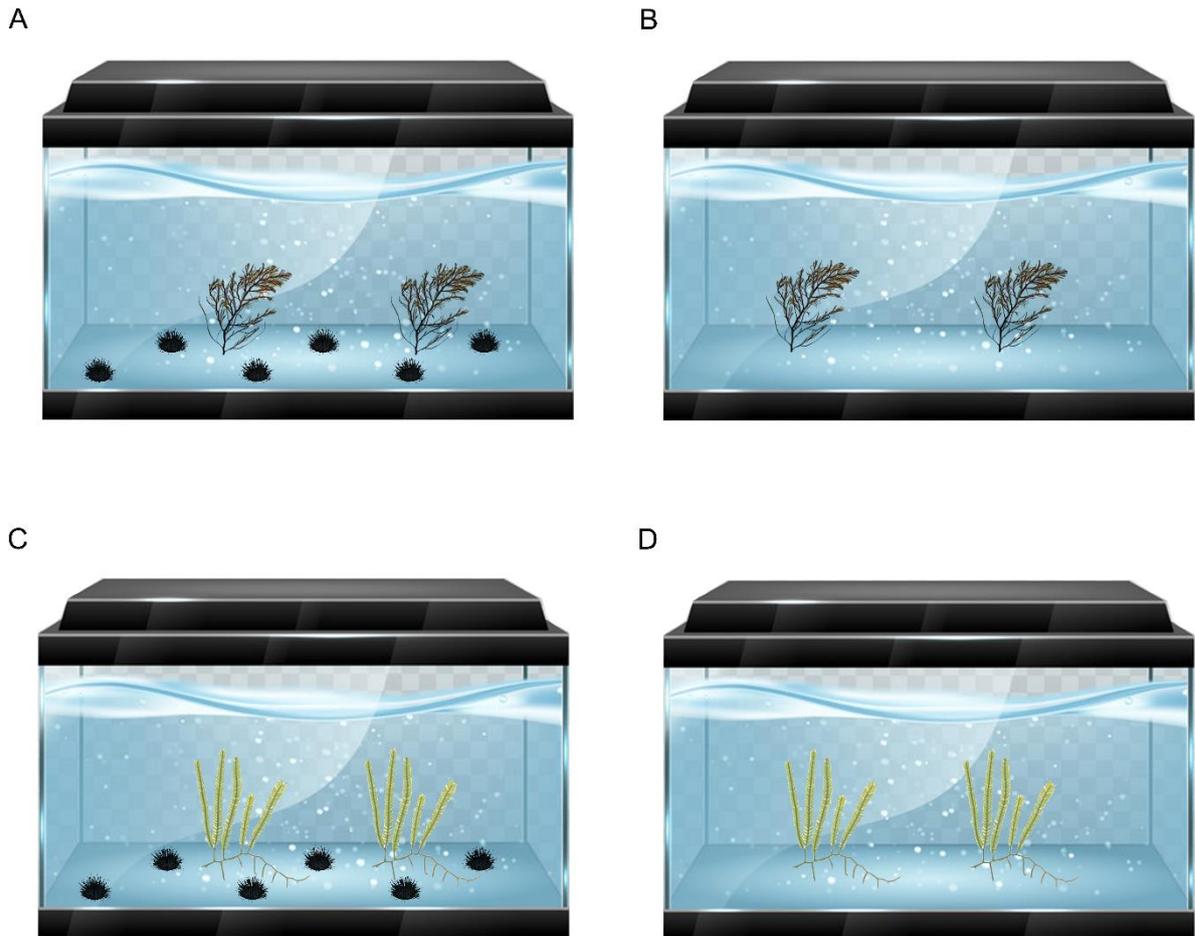
### **9.1 Materiali e metodi**

#### **9.1.1 Campionamento di ricci e macroalghe**

Esemplari adulti di *Arbacia lixula* (35-50 cm di diametro; 40-50 g di peso), sono stati raccolti in modo casuale in prossimità dell'infralitorale, tra 1 e 6 metri di profondità, nella costa Nord-Orientale di Malta (Baia di San Paolo) e stabulati nelle vasche presenti nell'acquario nazionale di Malta (Malta National Aquarium), in condizione di salinità e temperatura controllate. Dopo il periodo di acclimatazione, prima degli esperimenti, gli animali non sono stati alimentati per 2 settimane (Agnetta et al., 2015). Le macroalghe sono state campionate nella costa Nord-Orientale di Malta (Baia di San Paolo; Sliema) (profondità 0-6 m). *Ericaria crinita* è stata campionata in pozze di scogliera mentre *Caulerpa taxifolia* var. *disticophylla* in substrati sabbiosi. I talli raccolti sono stati trasportati in vaschette refrigerate, pesati e successivamente posizionati nelle vasche di stabulazione riproponendo un modello di copertura dei siti naturali (circa 35 g specie algale/ vasca 100 L) (Agnetta et al., 2015).

#### **9.1.2 Piano sperimentale**

L'esperimento ha avuto come scopo la valutazione del comportamento alimentare ovvero la capacità dei ricci di mare della specie *A. lixula* di consumare i talli di *Ericaria crinita* (specie autoctona) e di *C. taxifolia* var. *disticophylla* (specie alloctona). Ogni acquario aveva una dimensione di 100 L e una densità di ricci di 20 individui/m<sup>2</sup>, secondo lo schema riportato nella Figura 52. Nelle vasche controllo sono stati messi solo i talli (35 g) di *E. crinita* e di *C. taxifolia* var. *disticophylla* per valutare lo stato di salute (ovvero la perdita di peso) in assenza di ricci di mare. Nelle vasche sperimentali sono stati inseriti i ricci di mare e le alghe. I ricci sono stati lasciati al pascolo fino al completo consumo dei talli delle alghe, o comunque per un periodo massimo di 30 giorni. Per stimare il consumo e l'effettiva attività di pascolo delle due specie di macroalghe sono stati pesati i talli all'inizio dell'esperimento e alla fine. Durante l'esperimento tutti gli organismi sono stati mantenuti con acqua di mare con un fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 ore di buio, ad una temperatura di 20 °C per l'intera durata dell'esperimento.



**Figura 52** Schema di stabulazione nelle vasche, per la valutazione dell'attività di pascolo dei ricci nei confronti macroalga *Ericaria crinita* (autoctona) e *Caulerpa taxifolia* var. *disticophylla* (alloctona). A) *E. crinita* con ricci, B) Controllo *E. crinita*, C) *C. taxifolia* var. *disticophylla*, D) Controllo *C. taxifolia* var. *disticophylla*.

### 9.1.3 Analisi statistica

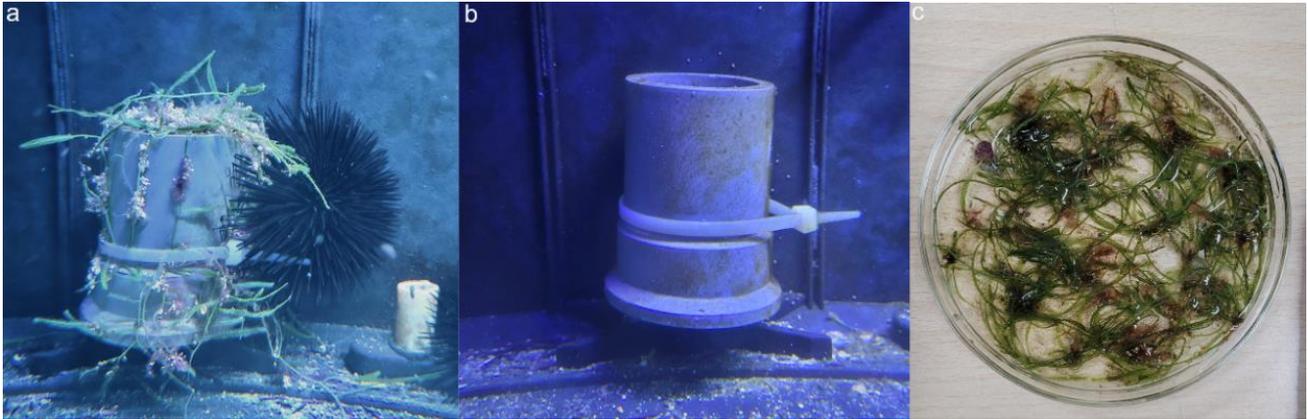
I dati percentuali per ciascuna gruppo sono stati analizzati mediante analisi della varianza unidirezionale (ANOVA), e il test HSD di Tukey è stato utilizzato come test post-hoc per il confronto delle medie. In tutti i casi, i risultati sono stati considerati significativi per valori di  $p < 0.05$ .

## 9.2 Risultati e discussioni

I fattori che influenzano la biologia alimentare degli echinoidea sono stati a lungo oggetto di interesse nella letteratura dell'ecologia marina. Ciò è dovuto al fatto che il pascolo dei ricci di mare è spesso responsabile della distruzione delle macroalge erette contribuendo alla formazione di ecosistemi sterili negli ambienti marini poco profondi (Lawrence, 2013).

Gli esperimenti hanno avuto lo scopo di valutare l'effettiva attività di pascolo dell'organismo modello *A. lixula*, uno dei responsabili della degradazione dei Cistoserieteti ad aree a basso indice di biodiversità (Bulleri et al., 1999; Bonaviri et al., 2011; Bulleri, 2013).

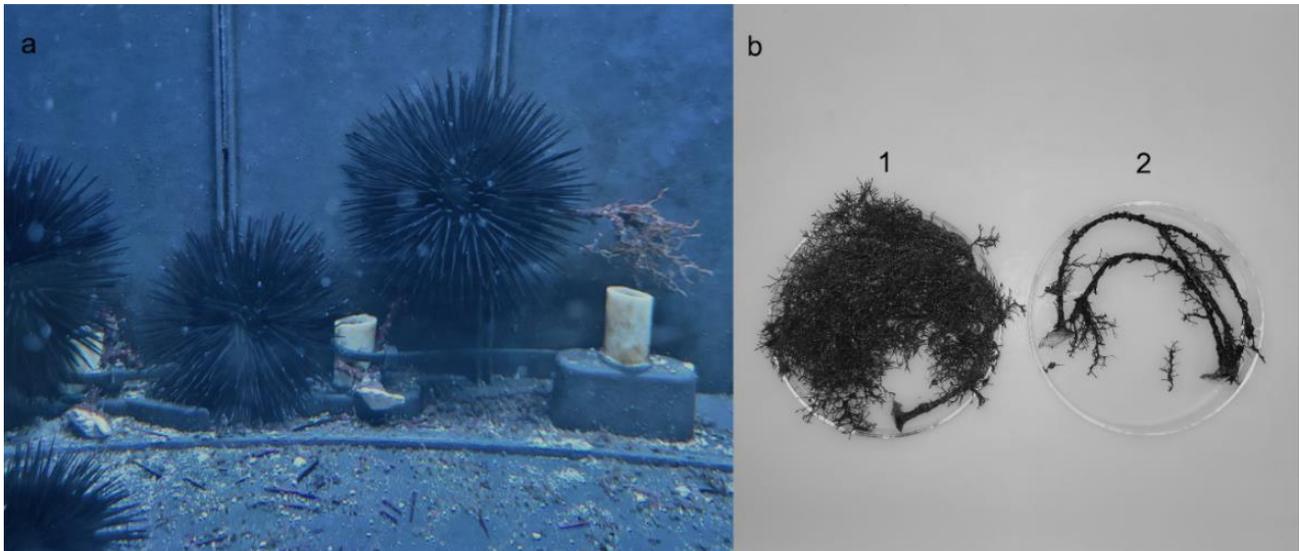
I risultati dimostrano che la specie di *A. lixula* ha consumato il 100% (30-35 g) dei talli di *C. taxifolia* var. *disticophylla* in un periodo di  $23 \pm 1$  giorni. Come mostrato in Figura 53 (a) al Tempo 0 (T0) i ricci tenuti a digiuno per 2 settimane hanno iniziato a pascolare i talli della specie alloctona dopo circa 20 minuti dall'inizio degli esperimenti consumando completamente i talli dopo  $23 \pm 1$  giorni (Fig. 53-b).



**Figura 53** Attività di pascolo di *A. lixula* vs *Caulerpa taxifolia* var. *disticophylla* a) Valutazione pascolo Tempo T0; b) valutazione pascolo Tempo TF c) Controllo Tempo TF.

Per quanto riguarda la specie autoctona *E. crinita*, il consumo da parte di *A. lixula* è stato valutato per un periodo massimo di 30 giorni, all'interno del quale si è registrato un consumo del  $72.4 \pm 2.3$  % del tallo complessivo della specie (Fig. 54-b2). Il pascolo dei ricci ha interessato principalmente le fronde del tallo di *E. crinita*. Il riccio di mare, *A. lixula* è conosciuto per essere una specie onnivora, ma tendente al carnivoro (Wangensteen et al. 2011; Trenzado et al. 2012; Agnetta et al. 2015), ed è noto che mantiene e provoca l'espansione di substrati aridi, insieme alle specie di riccio di mare spesso co-presenti *Paracentrotus lividus* (Alves et al. 2001). Il riccio *A. lixula* è conosciuto per assumere un comportamento raschiante consumando organismi appena insediati (Gianguzza e Bonaviri 2013), mentre i nostri risultati dimostrano come *A. lixula* in funzione del contesto ecologico in cui si trova può assumere, oltre al comportamento raschiante, comportamenti simili a quelli già visti nella specie *P. lividus* (Agnetta et al., 2015), arrampicandosi sulle fronde delle macroalghe erette consumandole (Fig. 54-a). In accordo con altri autori è noto che la plasticità comportamentale di questa specie causa un importante impatto sugli ecosistemi bentonici marini, paragonandola a un ingegnere degli ecosistemi marini (Wangensteen et al. 2012). Inoltre, trascorse le 2 settimane di digiuno i ricci hanno iniziato ad alimentarsi del tallo dopo tre giorni, assumendo un comportamento diverso rispetto alla specie *C. taxifolia* var. *disticophylla* ( $p < 0.0001$ ) dove invece i ricci hanno iniziato ad alimentarsi dopo pochi minuti (Fig. 54-a). Inoltre, sono state osservate differenze significative nell'attività di

pascolo nelle due differenti specie, anche per quanto riguarda il consumo in relazioni ai giorni ( $p < 0.0001$ ) e del consumo percentuale dei talli ( $p < 0.0001$ ) dimostrando che *E. crinita* risultati meno appetibile rispetto a *C. taxifolia* var. *disticophylla*.



**Figura 54** a) *A. lixula* che pascola il tallo *E. crinita*. b) Talli di *E. crinita* al Tempo TF (30 gg); b1) Talli Vasca Controllo; b2) Talli Vasca Test con ricci.

La scelta alimentare è ampiamente riconosciuta nei ricci di mare, che mostrano una forte selezione per alcune specie di alghe rispetto ad altre (Frantzis e Gremare, 1992), ma anche una certa variabilità dei comportamenti alimentari a livello spazio-temporale (Konar e Estes, 2003; Flukes et al., 2012). I nostri risultati ci dimostrano che il consumo di macroalghe da parte di *A. lixula* è specie specifica e può cambiare al variare della specie. Agnetta et al., (2015) conducendo un esperimento analogo con alcune specie di Cistoseiree (*Cystoseira brachycarpa* var. *balearica* e *Cystoseira compressa*) non hanno registrato alcuna attività di pascolo di *A. lixula* verso queste specie di macroalghe limitandosi solamente ad assumere il comportamento raschiante. I nostri risultati invece ci suggeriscono che il pascolo di *A. lixula* non solo cambia in base a gruppi di macroalghe differenti (brune e verdi) ma anche all'interno dello stesso genere nelle Cistoseire. Il fatto che ci siano queste differenze sull'attività di pascolo all'interno delle Cistoseire può essere dovuto alla diversità dei composti prodotti e presenti in *E. brachycarpa* e *E. crinita* (vedi sopra la caratterizzazione chimica degli estratti). Probabilmente Agnetta et al., (2015), non hanno assistito al consumo dei talli da parte di *A. lixula* perché la specie *E. brachycarpa* producendo un numero elevato di ossilipine rispetto a *E. crinita*, risulti più tossica e meno appetibile nei confronti dei ricci. Questo aprirebbe un nuovo scenario suggerendo come le interazioni interspecifiche tra *A. lixula* e le macroalghe erette autoctone, possa cambiare in base alla specie, e che esistono degli strumenti di difesa che le Cistoseire mettono in atto per difendersi dal pascolo dei ricci di mare, non solamente limitando lo sviluppo embrionale dei ricci (vedi sopra attività embriotossica) ma anche regolandone l'attività di pascolo.

## 10. Conclusioni

Le attività di ricerca svolte durante il triennio hanno permesso di caratterizzare i composti: lipidici lineari (ossilipine) in EBE, meroterpenoidi in ECE e bromurati in ATE e di quantificare il potere antiossidante nei diversi tre estratti di macroalghe. I saggi antimicrobici hanno mostrato come EBE e ATE riescono ad esercitare un'importante attività inibente in diversi ceppi patogeni di *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. L'attività emolitica di EBE, ECE e ATE è stata bassa in tutte e tre gli estratti. Successivamente è stata valutata l'attività antinfiammatoria di EBE, ECE e ATE nel riccio di mare *A. lixula*. I risultati ottenuti dimostrano che i tre estratti riescono a regolare in processo infiammatorio prodotto dal LPS, diminuendo il numero totale dei leucociti circolanti, l'attività enzimatiche di esterasi e fosfatasi alcalina e i marcatori dell'infiammazione dell'ossido nitrico e dei ROS. Inoltre, sembrerebbero che EBE, ECE, ATE siano coinvolti nella rigenerazione del GSH nei ricci di mare *A. lixula*. Gli esperimenti condotti sugli embrioni mostrano un'attività embriotossica esercitata da EBE sulle larve nei diversi stadi di sviluppo, causando la morte (apoptosi) di tutti gli embrioni trattati di *A. lixula*. A concentrazione più basse EBE causa il ritardo dello sviluppo embrionale nei ricci, come mostrato dalle variazioni significative della PO e del BW nei plutei trattati. Dalle analisi dell'attività antitumorale su linee cellulari di neuroblastoma SH-SY5Y e di epatocarcinoma HepG2, è emerso che EBE possiede importanti proprietà citotossiche verso cellule ad alto tasso proliferativo. In particolare, testando EBE alle stesse concentrazioni su linee cellulari di SH-SY5Y (differenziate e indifferenziate), causa la morte, inducendo l'apoptosi, solamente nelle cellule tumorali indifferenziate, mentre in quelle differenziate non si è registrata attività citotossica, indicando un potenziale utilizzo, delle molecole presenti in EBE, nel settore oncologico per la formulazione di farmaci ad azione chemioterapica. I saggi condotti con ATE hanno dimostrato come questo estratto riesca ad esprimere attività antispasmodica sulla muscolatura liscia del colon di (*ex vivo*) *Rattus norvegicus* suggerendo che questa attività di ATE sia dovuta all'azione neuromodulatrice sulle terminazioni enteriche del colon di ratto. In fine, lo studio che ha riguardato la valutazione dell'attività di pascolo del riccio di mare *A. lixula* sulle specie di macroalghe *E. crinita* e *Caulerpa taxifolia* var. *disticophilla* è emerso che *A. lixula* è in grado di pascolare su entrambe le specie di macroalghe, mostrando una preferenza per quella alloctona. Questo risultato fornisce una base importante per comprendere il possibile ruolo di *A. lixula* nel contenimento della diffusione delle macroalghe aliene. Inoltre, i risultati ottenuti sulle diverse proprietà biologiche dei tre estratti macroalgali suggeriscono le potenziali applicazioni per la formulazione di farmaci ad azione terapeutica antinfiammatoria, antitumorale, antispasmodica intestinale e antibiotica o nella creazione di prodotti nell'industria alimentare e zootecnica, capaci di migliorare il tenore in antiossidanti negli alimenti o di migliorare la shelf-life.

## Abbreviazioni

Acqua di mare microfiltrata (AMMF)  
American Type Culture Collection (ATCC)  
Assorbanza (Abs)  
ATE +LPS (ATEL)  
ATE tal quale (ATEQ)  
Braccio post-orale (PO)  
Brain Heart Infusion (BHI)  
Carbacolo (CCh)  
Contenuto fenolico totale (CFT)  
Controllo Positivo (CP)  
Controllo Negativo (CN)  
Densità ottica (O.D.)  
Dimetilsolfossido (DMSO)  
EBE +LPS (EBEL)  
EBE tal quale (EBETQ)  
ECE +LPS (ECEL)  
*Asparagopsis taxiformis* Estratto (ATE)  
*Ericaria crinita* Estratto (ECE)  
*Ericaria brachycarpa* Estratto (EBE)  
Equivalenti Acido Gallico (GAE)  
Fluido Celomatico Riccio (FCR)  
Fluido Celomico Artificiale (ACF)  
Inibitore solubile della guanilil ciclastasi (GCODQ)  
Larghezza del corpo larvale (BW)  
Lipopolisaccaride di *Escherichia coli* 055: B5 (LPS)  
Ossido nitrico (NO)  
Specie reattive dell'ossigeno (ROS)

## Partecipazione a Congressi:

**Badalamenti, R.**, Palumbo Piccionello, A., Settanni, L., Mauro, M., Vazzana, M., Attanzio A., Restivo, I., Vizzini, A., Arizza, V. 2023. Biological activities of the extracts from macroalgae *Carpodesmia crinita*, *Carpodesmia brachycarpa*, *Asparagopsis taxiformis*. In “First STeBICeF Young Researcher Workshop”. I giovani ricercatori del Dipartimento raccontano le loro ricerche alla comunità. Book of abstract. (Poster). Palermo. 12 gennaio 2023.

Mauro, M., Mario Lo Valvo, Vizzini, A., Vazzana, M., Radovic, S. **Badalamenti, R.** Arizza, V. 2023. Environmental DNA: a possible tool to evaluate the vertebrate biodiversity using water samples of three sicilian lake. Unione Zoologica Italiana (Poster). Palermo. 19-22 settembre 2023.

Palumbo Piccionello, A., **Badalamenti, R.**, Attanzio, A., Mauro, M., Restivo, I., Vizzini A., Vazzana, M., Tesoriere, L., Arizza, V. 2023. Macroalga Extract effects on biochemical responses of sea urchins *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758). Unione Zoologica Italiana (Poster). Palermo. 19-22 settembre 2023.

## Comunicazioni a Congressi:

**Badalamenti, R.**, Rosselli, S., Mannino, A.M., Arizza, V. 2021. Caratterizzazione dei metaboliti secondari di *Carpodesmia crinita* e saggi biologici su *Arbacia Lixula*". GIOVANI RICERCATORI UNDER 35» DELL'UNIONE ZOOLOGICA ITALIANA ETS. (online). 15 settembre 2021.

**Badalamenti, R.**, Palumbo Piccionello, A., Settanni, L., Luca, Mauro, M., Attanzio, A., Restivo, I., Vizzini, A., Vazzana, M., Arizza, V. 2023. Chemical characterization and biological properties of macroalgae extracts. Journal of biological research. Società Italia di Biologia Sperimentale. Trieste. 12-15 aprile 2023.

Mauro, M., Vazzana, M., Vizzini, A., Luparello, C., Abruscato, G., **Badalamenti, R.** Arizza, V. 2023. Anthropic impact, bioactive molecules, sustainable development, my keyword? Biodiversity! In First STeBICeF Young Researcher Workshop. I giovani ricercatori del Dipartimento raccontano le loro ricerche alla comunità. Book of Abstract. Palermo. 12 gennaio 2023.

**Badalamenti, R.**, Martino, C., Chiarelli, R., Palumbo Piccionello, A., Mauro, M., Arizza, V., Vazzana, M. 2024. Effects of *Ericaria brachycarpa* extract on the development of *Arbacia lixula* sea urchin embryos. Journal of biological research. Società Italia di Biologia Sperimentale. L'Aquila. 25-28 aprile 2024.

Martino, C., **Badalamenti, R.**, Frinchi M., Chiarelli, R., Palumbo Piccionello, A., Urone, G., Mauro, M., Arizza, V., Luparello, C., Di Liberto., V. Mudò, G., Vazzana, M. Mining biodiversity: How a mediterranean seaweed extract induces death from marine embryos to human cancer cells. Convegno scientifico sulla biodiversità- Palermo. 20-21-maggio 2024.

Martino, C., **Badalamenti, R.**, Chiarelli, R., Palumbo Piccionello, A., Mauro, M., Arizza, V., Vazzana, M. 2024. The Toxic effect of an oxylipins-containing macroalgae extract on sea urchin reproduction. International Echinoderm Conference. Tenerife. 15-19 luglio 2024.

## **Pubblicazioni scientifiche:**

Tiralongo, F., **Badalamenti, R.**, Arizza, V., Prieto, L., Lo Brutto, S. 2022. The Portuguese Man of War has always entered the Mediterranean sea-Strandings, sightings, and museum collections. *Frontiers in Marine Science*, 9, 856979.

Mauro, M., Vazzana, M., Attanzio, A., Gurrieri, E., Restivo, I., **Badalamenti, R.**, Corazza, E., Sallemi, S., Russello, S., Fabbrizio, A., Vizzini, A., Tesoriere, L., D'Emanuele, D., Gargano, C., Badalamenti, G., Di Grigoli, A., Di Stefano, V., Bellini, P., Arizza, V. 2023. The Effects of Red-Grape Seed and Pomace-Flour Dietary Supplementation on Broiler Chickens. *Sustainability*, 15(23), 16289.

Mauro, M., Lo Valvo, M., Vazzana, M., Radovic, S., Vizzini, A., **Badalamenti, R.**, Hornsby, L. B. Arizza, V. 2023. Environmental DNA: The First Snapshot of the Vertebrate Biodiversity in Three Sicilian Lakes. *Animals*, 13(23), 3687.

Martino, C., **Badalamenti, R.**, Frinchi, M., Chiarelli, R., Piccionello, A. P., Urone, G., Arizza, V., Vazzana, M. 2024. The stunting effect of an oxylipins-containing macroalgae extract on sea urchin reproduction and neuroblastoma cells viability. *Chemosphere*, 142278.

## **Manoscritti in fase di sottomissione:**

**Badalamenti, R.**, Settanni, L., Mauro, M., Vazzana, M., Vizzini, A., Arizza V. Palumbo Piccionello, A. Extracts of *Ericaria crinita*, *Ericaria brachycarpa* and *Asparagopsis taxiformis* characterization and antimicrobial activity against foodborne pathogens.

**Badalamenti, R.**, Vazzana, M., Martino C., Vizzini, A., Queiroz V., Custódio, R. M., Arizza V., Mauro, M. Regenerative activity of the Mediterranean land snail *Cornu aspersum* (Müller, 1774).

Mauro, M., Attanzio, A., Di Grigoli, A., Buzzanca, C., Di Stefano, V., Restivo, I., Maniaci, G., D'Amico, A., Ponte, M. L., Gurrieri, E., Fabbrizio, A., Sallemi, S., Tesoriere, L., Longo, F., **Badalamenti, R.**, Vizzini, A., Vazzana, M., Arizza, V. Influence of dietary supplementation of red grape pomace and seeds in hickens feed: nutrition value and antioxidant status of meat.

## REFERENZE BIBLIOGRAFICHE

- Abbott, D. W., Aasen, I. M., Beauchemin, K. A., Grondahl, F., Gruninger, R., Hayes, M., Xing, X. 2020. Seaweed and seaweed bioactives for mitigation of enteric methane: challenges and opportunities. *Animals*, 10 (12), 2432.
- Abdelrheem, D. A., Rahman, A. A., Elsayed, K. N., Abd El-Mageed, H. R., Mohamed, H. S., Ahmed, S. A. 2021. Isolation, characterization, *in vitro* anticancer activity, dft calculations, molecular docking, bioactivity score, drug-likeness and admet studies of eight phytoconstituents from brown alga *Sargassum platycarpum*. *Journal of molecular structure*, 1225, 129245.
- Abka-Khajouci, R., Tounsi, L., Shahabi, N., Patel, A. K., Abdelkafi, S., Michaud, P. 2022. Structures, properties, and applications of alginates. *Marine drugs*, 20(6), 364.
- Abourriche, A., Charrouf, M., Berrada, M., Bennamara, A., Chaib, N., Francisco, C. 1999. Antimicrobial activities and cytotoxicity of the brown algae *Cystoseira tamariscifolia*. *Fitoterapia*.;70(6):611-4.
- Abu-Khudir, R., Ismail, G. A., Diab, T. 2021. Antimicrobial, antioxidant, and anti-tumor activities of *Sargassum linearifolium* and *Cystoseira crinita* from Egyptian Mediterranean Coast. *Nutrition and cancer*, 73(5), 829-844.
- Acheson, D. W., and Luccioli, S. 2004. Mucosal immune responses. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 18(2), 387-404.
- Agarwal, M., Parameswari, R. P., Vasanthi, H. R., Das, D. K. 2012. Dynamic action of carotenoids in cardioprotection and maintenance of cardiac health. *Molecules*, 17(4), 4755-4769.
- Agatonovic-Kustrin, S., Morton, D. W. 2022. Anti-Inflammatory Compounds Derived from Marine Macroalgae. In *Marine Biochemistry* (pp. 229-245). CRC Press.
- Ageenko, N.V., Kiselev, K.V.; Odintsova, N.A. 2022. Quinoid Pigments of Sea Urchins *Scaphechinus mirabilis* and *Strongylocentrotus intermedius*: Biological Activity and Potential Applications. *Mar. Drugs*, 20, 611.
- Agnello, M., Filosto, S., Scudiero, R., Rinaldi, A.M., Roccheri, M.C., 2007. Cadmium induces an apoptotic response in sea urchin embryos. *Cell Stress Chaperones* 12, 44e50.
- Agetta, D., Badalamenti, F., Ceccherelli, G., Di Trapani, F., Bonaviri, C., Gianguzza, P. 2015. Role of two co-occurring Mediterranean sea urchins in the formation of barren from *Cystoseira* canopy. *Estuarine, coastal and shelf science*, 152, 73-77.
- Aguirre-Martínez, G. V., Owuor, M. A., Garrido-Pérez, C., Salamanca, M. J., Del Valls, T. A., Martín-Díaz, M. L. 2015. Are standard tests sensitive enough to evaluate effects of human pharmaceuticals in aquatic biota? Facing changes in research approaches when performing risk assessment of drugs. *Chemosphere*, 120, 75-85.
- Ahmad, B.T., Rudd, D., Smith, J., Kotiw, M., Mouatt, P., Seymour, L.M., Liu, L., Benkendorff, K. Anti-inflammatory activity and structure-activity relationships of brominated indoles from a marine mollusc. *Mar. Drugs* 2017, 15, 133.
- Ahn, S., Ardon, H. A. M., Campbell, P. H., Gonzalez, G. M., Parker, K. K. 2019. Alfalfa nanofibers for dermal wound healing. *ACS applied materials and interfaces*, 11(37), 33535-33547.
- Aitougouane, M., El Alaoui-Talibi, Z., Rchid, H., Fendri, I., Abdelkafi, S., El-Hadj, M. D. O., El Modafar, C. 2023. Elicitor Activity of Low-Molecular-Weight Alginates Obtained by Oxidative Degradation of Alginates Extracted from *Sargassum muticum* and *Cystoseira myriophylloides*. *Marine drugs*, 21(5), 301.
- Akhtar, N., Syakir Ishak, M. I., Bhawani, S. A., Umar, K. 2021. Various natural and anthropogenic factors responsible for water quality degradation: A review. *Water*, 13(19), 2660.
- Al-Adilah, H., Feiters, M. C., Carpenter, L. J., Kumari, P., Carrano, C. J., Al-Bader, D., Küpper, F. C. 2022. Halogens in seaweeds: Biological and environmental significance. *Phycology*, 2(1), 132-171.
- Alghazeer, R., Whida, F., Abduehrman, E., Gammoudi, F., Azwai, S. 2013. Screening of antibacterial activity in marine green, red and brown macroalgae from the western coast of Libya.
- Al-Khayri, J. M., Sahana, G. R., Nagella, P., Joseph, B. V., Alessa, F. M., Al-Mssallem, M. Q. 2022. Flavonoids as potential anti-inflammatory molecules: A review. *Molecules*, 27(9), 2901.
- Allen, R. L., George, A. N., Miranda, E., Phillips, T. M., Crawford, J. M., Kiehart, D. P., McClay, D. R. 2022. Wound repair in sea urchin larvae involves pigment cells and blastocoelar cells. *Developmental biology*, 491, 56-65.
- Almeida, J. A., Barreto, R. E., Novelli, E. L., Castro, F. J., Moron, S. E. 2009. Oxidative stress biomarkers and aggressive behavior in fish exposed to aquatic cadmium contamination. *Neotropical ichthyology*, 7, 103-108.

- Alves C., Silva J., Pinteus, S., Gaspar, H., Alpoim, M.C., Botana LM, Pedrosa R. 2018. From marine origin to therapeutics: the antitumor potential of marine algaederived compounds. *Front Pharmacol.* 9:777.
- Aly, S.H., Elissawy, A.M., Salah, D., Alfuhaid, N.A., Zyaan, O.H., Mohamed, H.I., Singab, A.N.B., Farag, S.M., 2023. Phytochemical Investigation of Three. *Mar. Drugs* 21.
- Amato, A., Terzo, S., Marchesa, P., Maffongelli, A., Martorana, M., Scoglio, S., Mulè, F. 2021. Spasmolytic Effects of Aphanizomenon Flos Aquae (AFA) Extract on the Human Colon Contractility. *Nutrients*, 13(10), 3445.
- Amico, V. 1995. Marine brown algae of family Cystoseiraceae: Chemistry and chemotaxonomy. *Phytochemistry* 39, 1257-1279.
- Anand, P., Kunnumakara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai, O.S., Sung, B., Aggarwal, B.B. 2008. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res.*; 25(9):2097–116.
- Andreakis, N., Procaccini, G., Kooistra, W. 2004. *Asparagopsis taxiformis* and *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta): Genetic and morphological identification of Mediterranean populations. *Eur. J. Phycol.* 39, 273–283.
- Angerer, L. M., and Angerer, R. C. 2000. Animal–vegetal axis patterning mechanisms in the early sea urchin embryo. *Developmental biology*, 218(1), 1-12.
- Anheyer, D., Frawley, J., Koch, A. K., Lauche, R., Langhorst, J., Dobos, G., Cramer, H. 2017. Herbal medicines for gastrointestinal disorders in children and adolescents: a systematic review. *Pediatrics*, 139(6).
- Apostolova, E., Lukova, P., Baldzhieva, A., Delattre, C., Molinié, R., Petit, E., Kokova, V. 2022. Structural characterization and *in vivo* anti-inflammatory activity of fucoidan from *Cystoseira crinita* (Desf.) Borry. *Marine drugs*, 20(11), 714.
- Apostolova, E., Lukova, P., Baldzhieva, A., Katsarov, P., Nikolova, M., Iliev, I., Peychev, L., Trica, B., Oancea, F., Delattre, C., et al. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of fucoidan: A review. *Polymers* 2020, 12, 2338.
- Arizza, V., and Parrinello, D. 2009. Inflammatory hemocytes in *Ciona intestinalis* innate immune response. *Invertebrate Survival Journal*, 6(1 (Suppl)), S58-S66.
- Arnone, M. I., Byrne, M. and Martinez, P. 2015. Echinodermata. *Evolutionary developmental biology of invertebrates 6: Deuterostomia*, 1-58.
- Asadi-Samani, M., Rafieian-Kopaei, M., Azimi, N. 2013. Gundelia: a systematic review of medicinal and molecular perspective. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 16(21), 1238-1247.
- Ashour, M., Wink, M., Gershenson, J. 2010. Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. *Annual plant reviews volume 40: biochemistry of plant secondary metabolism*, 258-303.
- Avila-Romero, M., García-Bores, A. M., Garduño-Solorzano, G., Avila-Acevedo, J. G., Serrano-Parrales, R., Orozco-Martínez, J., Hernandez-Delgado, T. 2023. Antimicrobial activity of some macroalgae of the Veracruzano Reef System (SAV), Mexico. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(1), 103496.
- Babich, O., Sukhikh, S., Larina, V., Kalashnikova, O., Kashirskikh, E., Prosekov, A., Dolganyuk, V. 2022. Algae: Study of edible and biologically active fractions, their properties, and applications. *Plants*, 11(6), 780.
- Baldrian, B. and Wanninger, A. 2015. Maria Ina Arnone, Maria Byrne, and Pedro Martinez. *Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates 6: Deuterostomia*, 1.
- Ballesteros, E. 1990a. Structure and dynamics of north-western Mediterranean phytobenthic communities: a conceptual model. *Oecol. Aquat.* 10: 223-242.
- Ballesteros, E. 1992. Els vegetals i la zonació litoral: espècies, comunitats i factors que influeixen en la seva distribució. *Arxius de la Secció de Ciències*, 101. Institut d'Estudis Catalans, Barcelona, 613 pp.
- Banskota, A. H., Stefanova, R., Sperker, S., Melanson, R., Osborne, J. A., O'Leary, S. J. 2013. Five new galactolipids from the freshwater microalga *Porphyridium aerugineum* and their nitric oxide inhibitory activity. *Journal of applied phycology*, 25, 951-960.
- Baeza, I., and De la Fuente, M. 2013. The Role of Polyphenols in Menopause. *Nutrition and Diet in Menopause*, 51-63.
- Barata, C., Solayan, A., Porte, C. 2004. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquatic toxicology*, 66(2), 125-139.
- Barbalace, M. C., Malaguti, M., Giusti, L., Lucacchini, A., Hrelia, S., Angeloni, C. 2019. Anti-inflammatory activities of marine algae in neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12), 3061.
- Barber, D., Correll, L., Ehrich, M. 1999. Comparison of two *in vitro* activation systems for protoxicant organophosphorous esterase inhibitors. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 47(1), 16-22.

- Barbosa, M., Valentão, P., Andrade, P. B. 2016. Biologically active oxylipins from enzymatic and nonenzymatic routes in macroalgae. *Marine drugs*, 14(1), 23.
- Barreira, J. C. and Ferreira, I. C. 2015. Steroids in natural matrices: Chemical features and bioactive properties. *Biotechnology of bioactive compounds: Sources and applications*, 395-431.
- Barrett, J., Anderson, J. M. 1977. Thylakoid membrane fragments with different chlorophyll A, chlorophyll C and fucoxanthin compositions isolated from the brown seaweed *Ecklonia radiata*. *Plant science letters*, 9(3), 275-283.
- Barrett, N. J., Harper, E. M., Last, K. S., Reinardy, H. C., Peck, L. S. 2024. Behavioural and physiological impacts of low salinity on the sea urchin *Echinus esculentus*. *Journal of Experimental Biology*, 227(2).
- Basopo, N., Mumbamarwo, L. T., Mnkandla, D., Naik, Y. S. 2014. Pollutant mixtures as stressors of selected enzyme activities of the aquatic snail *Helisoma duryi*. *J. Environ. Chem. Ecotoxicol*, 6(4), 26-33.
- Beale, D. J., Jones, O. A., Bose, U., Broadbent, J. A., Walsh, T. K., Van De Kamp, J., Bissett, A. 2022. Omics-based ecosurveillance for the assessment of ecosystem function, health, and resilience. *Emerging topics in life sciences*, 6(2), 185-199.
- Beissner, R. S., Guilford, W. J., Coates, R. M., Hager, L. P. 1981. Synthesis of brominated heptanones and bromoform by a bromoperoxidase of marine origin. *Biochemistry*, 20(13), 3724-3731.
- Bellissimo, G., Rull Lluch, J., Tomasello, A., Calvo, S. 2014. The community of *Cystoseira brachycarpa* J. Agardh emend. Giaccone (Fucales, Phaeophyceae) in a shallow hydrothermal vent area of the Aeolian Islands (Tyrrhenian Sea, Italy). *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 148(1), 21-26.
- Benkendorff, K., Rudd, D., Nongmaithem, B.D., Liu, L., Young, F., Edwards, V., Avila, C., Abbott, C.A. 2015. Are the traditional medical uses of Muricidae molluscs substantiated by their pharmacological properties and bioactive compounds? *Mar. Drugs*, 13, 5237–5275.
- Benslima, A., Sellimi, S., Hamdi, M., Nasri, R., Jridi, M., Cot, D., Zouari, N. 2021. The brown seaweed *Cystoseira schiffneri* as a source of sodium alginate: Chemical and structural characterization, and antioxidant activities. *Food bioscience*, 40, 100873.
- Berber, I., Avşar, C., Koyuncu, H. 2015. Antimicrobial and antioxidant activities of *Cystoseira crinita* Duby and *Ulva intestinalis* Linnaeus from the coastal region of Sinop, Turkey. *Journal of Coastal Life Medicine*, 3(6), 441-445.
- Bhaduri, D., Sihi, D., Bhowmik, A., Verma, B. C., Munda, S., Dari, B. 2022. A review on effective soil health bio-indicators for ecosystem restoration and sustainability. *Frontiers in Microbiology*, 13, 938481.
- Bhakuni, D. S., Dhawan, B. N., Garg, H. S., Goel, A. K., Mehrotra, B. N., Srimal, R. C., Srivastava, M. N. 1992. Bioactivity of marine organisms: Part VI--Screening of some marine flora from Indian coasts. *Indian journal of experimental biology*, 30(6), 512-517.
- Bhatt, T., and Patel, K. 2020. Carotenoids: potent to prevent diseases review. *Natural Products and Bioprospecting*, 10, 109-117.
- Bigagli, E., D'Ambrosio, M., Cinci, L., Niccolai, A., Biondi, N., Rodolfi, L., Luceri, C. 2021. A comparative *in vitro* evaluation of the anti-inflammatory effects of a *Tisochrysis lutea* extract and fucoxanthin. *Marine Drugs*, 19(6), 334.
- Bilal, M., Iqbal, H. M. 2019. Marine seaweed polysaccharides-based engineered cues for the modern biomedical sector. *Marine drugs*, 18(1), 7.
- Birnie-Gauvin, K., Costantini, D., Cooke, S. J., Willmore, W. G. 2017. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: a review. *Fish and Fisheries*, 18(5), 928-942.
- Biris-Dorhoi, E. S., Michiu, D., Pop, C. R., Rotar, A. M., Tofana, M., Pop, O. L., Farcas, A. C. 2020. Macroalgae—A sustainable source of chemical compounds with biological activities. *Nutrients*, 12(10), 3085.
- Bischof, K., Rautenberger, R. 2012. Seaweed responses to environmental stress: reactive oxygen and antioxidative strategies. In *Seaweed biology: Novel insights into ecophysiology, ecology, and utilization* (pp. 109-132). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Bjedov, D., Mikuška, A., Lackmann, C., Begović, L., Mikuška, T., Velki, M. 2021. Application of Non-Destructive Methods : Biomarker Assays in Blood of White Stork (*Ciconia ciconia*) Nestlings. *Animals*, 11, 2341.
- Blasio, M., Balzano, S., 2021. Fatty Acids Derivatives from Eukaryotic Microalgae, Pathways and Potential Applications. *Front. Microbiol.* 12, 718933.
- Blunt, J. W., Carroll, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A., Prinsep, M. R. 2018. Marine natural products. *Natural product reports*, 35(1), 8-53.

- Bodenstein, L. 2020. Simulations of sea urchin early development delineate the role of oriented cell division in the morula-to-blastula transition. *Mechanisms of development*, 162, 103606.
- Bonaventura, R., and Matranga, V. 2017. Overview of the molecular defense systems used by sea urchin embryos to cope with UV radiation. *Marine environmental research*, 128, 25-35.
- Boudouresque C.F. 1972. Recherches de bionomie analytique, structurale et expérimentale sur les peuplements benthiques sciaphiles de Méditerranée Occidentale (fraction algale): le sous-strate sciaphile d'un peuplement photophile de mode calme, le peuplement à *Cystoseira crinita*. *Bull. Musée Hist. Nat. Marseille* 32: 253-263.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brachet, J. and Alexandre, H. 2012. *Introduction to molecular embryology*. Springer Science Business Media.
- Braun, N., de Lima, R. L., Baldisserotto, B., Dafre, A. L., de Oliveira Nuñez, A. P. 2010. Growth, biochemical and physiological responses of *Salminus brasiliensis* with different stocking densities and handling. *Aquaculture*, 301(1-4), 22-30.
- Breeman, A.M. 1988. Relative importance of temperature and other factors in determining geographic boundaries of seaweeds experimental and phenological evidence. *Helgol Meeresunters.* 42:199–24.
- Brune, K., Patrignani, P. 2015. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Pain Res.* 8, 105.
- Bueno, L., Fioramonti, J., Delvaux, M., Frexinos, J. 1997. Mediators and pharmacology of visceral sensitivity: from basic to clinical investigations. *Gastroenterology*, 112(5), 1714-1743.
- Bukola, D., Zaid, A., Olalekan, E. I., Falilu, A. 2015. Consequences of anthropogenic activities on fish and the aquatic environment. *Poultry, Fisheries and Wildlife Sciences*, 3(2), 1-12.
- Burke, R. D., Myers, R. L., Sexton, T. L., Jackson, C. 1991. Cell movements during the initial phase of gastrulation in the sea urchin embryo. *Developmental biology*, 146(2), 542-557.
- Bureson, B.J., Moore, R.E., Roller, P.P. 1976. Volatile halogen compounds in the alga *Asparagopsis taxiformis* (Rhodophyta). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 24: 856-861.
- Burri, B. J. 1997. Beta-carotene and human health: a review of current research. *Nutrition Research*, 17(3), 547-580.
- Buscaino, G., Ceraulo, M., Giacalone, V. M., Papale, E., Gregorietti, M., Mazzola, S., Vazzana, M. 2019. Effects of watergun on echinoderms: biochemical changes on sea urchin (*Arbacia lixula*) and sea cucumber (*Holothuria tubulosa*). In *The Effects of Noise on Aquatic life* (pp. 18-18).
- Butler, A., Carter-Franklin, J. N. 2004. The role of vanadium bromoperoxidase in the biosynthesis of halogenated marine natural products. *Natural Product Reports*, 21(1), 180-188.
- Butler, A. and Sandy, M. 2009. Mechanistic considerations of halogenating enzymes. *Nature*, 460(7257), 848-854.
- Buttino, I., Miralto, A., Ianora, A., Romano, G., Poulet, S. A. 1999. Water-soluble extracts of the diatom *Thalassiosira rotula* induce aberrations in embryonic tubulin organisation of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Marine Biology*, 134, 147-154.
- Byrne, M., Lamare, M., Winter, D., Dworjany, S. A., Uthicke, S. 2013. The stunting effect of a high CO<sub>2</sub> ocean on calcification and development in sea urchin larvae, a synthesis from the tropics to the poles. *Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Sciences*, 368(1627), 20120439.
- Cabrita, M. T., Vale, C., Rauter, A. P. 2010. Halogenated compounds from marine algae. *Marine drugs*, 8(8), 2301-2317.
- Čagalj, M., Skroza, D., Razola-Díaz, M. D. C., Verardo, V., Bassi, D., Frlita, R., Šimat, V. 2022. Variations in the composition, antioxidant, and antimicrobial activities of *Cystoseira compressa* during seasonal growth. *Marine Drugs*, 20(1), 64.
- Cargill, G., Salin, B., Lubin, S., Kohler, F., Coste, T., Rautureau, J. 1992. Effect of phloroglucinol on rectosigmoid motility stimulated by a test meal. Study in patients with irritable bowel syndrome. *Presse Medicale (Paris, France)*, 21(1), 19-23.
- Cairns, J., Pratt, J. R. 1989. The scientific basis of bioassays. *Hydrobiologia*, 188, 5-20.
- Caldwell, G. S., Bentley, M. G., Olive, P. J. 2003. The use of a brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes. *Toxicon*, 42(3), 301-306.

- Camer-Pesci, B., Laird, D. W., van Keulen, M., Vadiveloo, A., Chalmers, M., Moheimani, N. R. 2023. Opportunities of *Asparagopsis* sp. cultivation to reduce methanogenesis in ruminants: A critical review. *Algal Research*, 103308.
- Campanale, J. P., Gökirmak, T., Espinoza, J. A., Oulhen, N., Wessel, G. M., and Hamdoun, A. 2014. Migration of sea urchin primordial germ cells. *Developmental Dynamics*, 243(7), 917-927.
- Camuesco, D., Gálvez, J., Nieto, A., Comalada, M., Rodríguez-Cabezas, M. E., Concha, A., Zarzuelo, A. 2005. Dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, attenuates colonic inflammation in rats with DSS-induced colitis. *The Journal of nutrition*, 135(4), 687-694.
- Capone, D. G., Zehr, J. P., Paerl, H. W., Bergman, B., and Carpenter, E. J. 1997. *Trichodesmium*, a globally significant marine cyanobacterium. *Science*, 276(5316), 1221-1229.
- Carmichael, W. W., Boyer, G. L. 2016. Health impacts from cyanobacteria harmful algae blooms: Implications for the North American Great Lakes. *Harmful algae*, 54, 194-212.
- Carocho, M., and Ferreira, I. C. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, 51, 15-25.
- Carvalho, A. M., Heimfarth, L., Pereira, E. W. M., Oliveira, F. S., Menezes, I. R., Coutinho, H. D., Quintans-Júnior, L. J. 2020. Phytol, a chlorophyll component, produces antihyperalgesic, anti-inflammatory, and antiarthritic effects: Possible NFκB pathway involvement and reduced levels of the proinflammatory cytokines TNF-α and IL-6. *Journal of Natural Products*, 83(4), 1107-1117.
- Casano, C., Roccheri, M.C., Maenza, L., Migliore, S., Gianguzza, F., 2003. Sea urchin deciliation induces thermoresistance and activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Cell Stress Chaperones* 8, 70–75.
- Catarino, M. D., Silva, A. M., Cardoso, S. M. 2017. Fucaceae: A source of bioactive phlorotannins. *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1327.
- Caulier, G., Hamel, J. F., Mercier, A. 2020. From coelomocytes to colored aggregates: cellular components and processes involved in the immune response of the holothuroid *Cucumaria frondosa*. *The Biological Bulletin*, 239(2), 95-114.
- Cavalcante-Silva, L. H. A., Correia, A. C. D. C., Sousa, J. C. F., Barbosa-Filho, J. M., Santos, B. V. D. O., de Miranda, G. E. C., Cavalcante, F. D. A. 2016. Involvement of β adrenergic receptors in spasmolytic effect of caulerpine on guinea pig ileum. *Natural Product Research*, 30(22), 2605-2610.
- Cembella, A. D. 2003. Chemical ecology of eukaryotic microalgae in marine ecosystems. *Phycologia*, 42(4), 420-447.
- Chaitanya, G. V., Cromer, W. E., Wells, S. R., Jennings, M. H., Couraud, P. O., Romero, I. A., Alexander, J. S. 2011. Gliovascular and cytokine interactions modulate brain endothelial barrier *in vitro*. *Journal of neuroinflammation*, 8, 1-16.
- Chen, J.W.; Luo, Y.L.; Hwang, M.J.; Peng, F.C.; Ling, K.H.J. Territrem B, a tremorgenic mycotoxin that inhibits acetylcholinesterase with a noncovalent yet irreversible binding mechanism. *Biol. Chem.* 1999, 274, 34916–34923.
- Chen, M., Yang, H., Delaporte, M., Zhao, S. 2007. Immune condition of *Chlamys farreri* in response to acute temperature challenge. *Aquaculture*, 271(1-4), 479-487.
- Chan, P. Matanjun, S.M. Yasir, T.S. Tan. 2015. Antioxidant activities and polyphenolics of various solvent extracts of red seaweed, *Gracilaria changii*, *J. Appl. Phycol.* 27 2377e2386.
- Chen, L., Liu, P., Feng, X., Ma, C. 2017. Salidroside suppressing LPS-induced myocardial injury by inhibiting ROS-mediated PI 3K/Akt/mTOR pathway *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(12), 3178-3189.
- Chen, Y. W., Shie, M. Y., Hsiao, C. H., Liang, Y. C., Wang, B., Chen, I. W. P. 2020. Synthesis of high-quality monolayer tungsten disulfide with chlorophylls and its application for enhancing bone regeneration. *npj 2D Materials and Applications*, 4(1), 34.
- Chen, R., Wang, M., Keasling, J. D., Hu, T., Yin, X. 2024. Expanding the structural diversity of terpenes by synthetic biology approaches. *Trends in Biotechnology*.
- Chia, F. S., Xing, J. 1996. Echinoderm coelomocytes. *ZOOLOGICAL STUDIES-TAIPEI-*, 35, 231-254.
- Chiaromonte, M., Inguglia, L., Vazzana, M., Deidun, A., Arizza, V. 2019. Stress and immune response to bacterial LPS in the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Fish Shellfish Immunology*, 92, 384-394.
- Chiarelli R, Agnello M, Roccheri MC 2011. Sea urchin embryos as a model system for studying autophagy induced by cadmium stress. *Autophagy* 7:1028–1034.
- Chiarelli, R., Agnello, M., Bosco, L., Roccheri, M.C., 2014a. Sea urchin embryos exposed to cadmium as an experimental model for studying the relationship between autophagy and apoptosis. *Mar. Environ. Res.* 93, 47–55.

- Chiarelli, R., Roccheri, M. C. 2014b. Marine invertebrates as bioindicators of heavy metal pollution.
- Chiarelli, R., Martino, C., Agnello, M., Bosco, L., Roccheri, M. C. 2016. Autophagy as a defense strategy against stress: focus on *Paracentrotus lividus* sea urchin embryos exposed to cadmium. *Cell Stress and Chaperones*, 21(1), 19-27.
- Chiarelli, R., Martino, C., Roccheri, M. C. 2019. Cadmium stress effects indicating marine pollution in different species of sea urchin employed as environmental bioindicators. *Cell Stress and Chaperones*, 24(4), 675-687.
- Chiarelli, R., Martino, C., Roccheri, M. C., Cancemi, P. 2021. Toxic effects induced by vanadium on sea urchin embryos. *Chemosphere*, 274, 129843.
- Chiarelli, R., Scudiero, R., Memoli, V., Roccheri, M. C., Martino, C. 2022. Toxicity of Vanadium during Development of Sea Urchin Embryos : Bioaccumulation, Calcium Depletion, ERK Modulation and Cell-Selective Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 6239.
- Choi, Y. K., Ye, B. R., Kim, J., Kim, M. S., Lee, W. W., Ahn, G. N., Heo, S. J. 2018. Bis (3-bromo-4, 5-dihydroxybenzyl) ether, a novel bromophenol from the marine red alga *Polysiphonia morrowii* that suppresses LPS-induced inflammatory response by inhibiting ROS-mediated ERK signaling pathway in RAW 264.7 macrophages. *Biomedicine and pharmacotherapy*, 103, 1170-1177.
- Cholaraj, R., Venkatachalam, R. 2024. Investigation of antioxidant and anticancer potential of fucoidan (*in vitro* and *in silico*) from brown seaweed *Padina boergesenii*. *Algal Research*, 79, 103442.
- Chovatiya, R., and Medzhitov, R. 2014. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Molecular cell*, 54(2), 281-288.
- Chowdhury, S., Dubey, V. K., Choudhury, S., Das, A., Jeengar, D., Sujatha, B., Kumar, V. 2023. Insects as bioindicator: A hidden gem for environmental monitoring. *Frontiers in Environmental Science*, 11.
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., Florou-Paneri, P. 2013. Functional properties of carotenoids originating from algae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(1), 5-11.
- Christensen, L. P. 2020. Bioactive C<sub>17</sub> and C<sub>18</sub> acetylenic oxylipins from terrestrial plants as potential lead compounds for anticancer drug development. *Molecules*, 25(11), 2568.
- Christianson, D. W. 2017. Structural and chemical biology of terpenoid cyclases. *Chemical reviews*, 117(17), 11570-11648.
- Chualáin, F. N., Maggs, C. A., Saunders, G. W., Guiry, M. D. 2004. The invasive genus *Asparagopsis* (bonnemaisoniaceae, rhodophyta): molecular systematics, morphology, and ecophysiology of falkenbergia isolates 1. *Journal of Phycology*, 40(6), 1112-1126.
- Cian, R. E., Hernández-Chirlaque, C., Gámez-Belmonte, R., Drago, S. R., Sánchez de Medina, F., Martínez-Augustin, O. 2018. Green alga *Ulva* spp. hydrolysates and their peptide fractions regulate cytokine production in splenic macrophages and lymphocytes involving the TLR4-NFκB/MAPK pathways. *Marine drugs*, 16(7), 235.
- Clow, L. A., Raftos, D. A., Gross, P. S., Smith, L. C. 2004. The sea urchin complement homologue, SpC3, functions as an opsonin. *Journal of Experimental Biology*, 207, 2147-2155.
- Coffelt, S.B. de Visser, K.E. 2015, 'Immune-mediated mechanisms influencing the efficacy of anticancer therapie, *Trends in Immunology*, 36(4), pp.198-216.
- Cohen, S., Flescher, E., 2009. Methyl jasmonate: a plant stress hormone as an anti-cancer drug. *Phytochem.* 70, 1600-1609.
- Colasanti, M., Persichini, T., Venturini, G. 2010. Nitric oxide pathway in lower metazoans. *Nitric Oxide*, 23(2), 94-100.
- Conde TA, Zabetakis I, Tsoupras A, Medina I, Costa M, Silva J, Neves B, Domingues P, Domingues MR. Microalgal Lipid Extracts Have Potential to Modulate the Inflammatory Response: A Critical Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(18):9825.
- Conway, A. F., Iselsrud, D., Conway, F. 1984. Sea urchin development. In *tested studies for laboratory teaching, Proceedings of the Third Workshop/conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE)*, 4, 53-89.
- Cooper, C. M. 1993. Biological effects of agriculturally derived surface water pollutants on aquatic systems—a review. *Journal of environmental quality*, 22(3), 402-408.
- Coronel, J., Pinos, I., Amengual, J. 2019. β-carotene in obesity research: technical considerations and status of the field. *Nutrients*, 11(4), 842.
- Correia, A. C. C., Macêdo, C. L., Monteiro, F. S., Souza, F. H. T., Pessôa, H. L. F., Miranda, G. D., Silva, B. A. 2011. Evaluation of hemolytic and spasmolytic activities of *Sargassum polyceratum* Montagne (Sargassaceae). In *Poisoning by plants, mycotoxins, and related toxins*. 670-675. Wallingford UK: CABI.

- Correia-da-Silva, M., Sousa, E., Pinto, M. M., Kijjoo, A. 2017. Anticancer and cancer preventive compounds from edible marine organisms. In *Seminars in cancer biology*, 46, 55-64. Academic Press.
- Costa, D. S., Araújo, T. S., Sousa, N. A., Souza, L. K., Pacífico, D. M., Sousa, F. B. M., Medeiros, J. V. R. 2016. Sulphated polysaccharide isolated from the seaweed *Gracilaria caudata* exerts an antidiarrhoeal effect in rodents. *Basic and clinical pharmacology and toxicology*, 118(6), 440-448.
- Costa, M. M., Novoa, B., Figueras, A. 2008. Influence of  $\beta$ -glucans on the immune responses of carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Fish and shellfish immunology*, 24(5), 498-505.
- Costa, M. M., Prado-Álvarez, M., Gestal, C., Li, H., Roch, P., Novoa, B., Figueras, A. 2009. Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. *Fish and shellfish immunology*, 26(3), 515-523.
- Coteur, G., Warnau, M., Jangoux, M., Dubois, P. 2002. Reactive oxygen species (ROS) production by amoebocytes of *Asterias rubens* (Echinodermata). *Fish and Shellfish Immunology*, 12(3), 187-200.
- Cross, C.E., Halliwell, B., Borish, E.T., Pryor, W.A., Ames, B.N., Saul, R.L., McCord, J.M., and Harman, D. 1987. Oxygen radicals and human disease. *Ann. Int. Med.* 107, 526–545.
- Cuervo, A. M. 2004. Autophagy: in sickness and in health. *Trends in cell biology*, 14(2), 70-77.
- Currie, D. R., McArthur, M. A., Cohen, B. F. 2000. Reproduction and distribution of the invasive European fanworm *Sabella spallanzanii* (Polychaeta: Sabellidae) in Port Phillip Bay, Victoria, Australia. *Marine Biology*, 136(4), 645-656.
- da Costa, E., Melo, T., Reis, M., Domingues, P., Calado, R., Abreu, M. H., Domingues, M. R. 2021. Polar lipids composition, antioxidant, and anti-inflammatory activities of the atlantic red seaweed *Grateloupia turuturu*. *Marine drugs*, 19(8), 414.
- Dadashkhan, S., Irani, S., Bonakdar, S., Ghalandari, B. 2021. P75 and S100 gene expression induced by cell-imprinted substrate and beta-carotene to nerve tissue engineering. *Journal of Applied Polymer Science*, 138(26), 50624.
- Dashwood, R. 1997. Chlorophylls as anticarcinogens. *International journal of oncology*, 10(4), 721-727.
- David, N. A. 1972. The pharmacology of dimethyl sulfoxide. *Annual review of pharmacology*, 12(1), 353-374.
- Davies, J., Davies, D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 417–433.
- De Boer, E., Tromp, M. G. M., Plat, H., Krenn, G. E., Wever, R. 1986. Vanadium (V) as an essential element for haloperoxidase activity in marine brown algae: purification and characterization of a vanadium (V)-containing bromoperoxidase from *Laminaria saccharina*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 872(1-2), 104-115.
- de Santiago, W. G. A., Muñoz-Alvarez, A. I., Díaz-Martínez, J. P., Benítez-Villalobos, F. 2023. Resemblances in the early development of two sea urchins: *Toxopneustes roseus* (Euechinoidea: Echinacea) and *Rhyncholampas pacificus* (Euechinoidea: Irregularia) from different habitats in the southern Mexican Pacific. *Developmental Biology*, 499, 1-9.
- de Sousa, C. B., Gangadhar, K. N., Macridachis, J., Pavao, M., Morais, T. R., Campino, L., Lago, J. H. G. 2017. *Cystoseira* algae (Fucaceae): Update on their chemical entities and biological activities. *Tetrahedron: Asymmetry*, 28(11), 1486-1505.
- de Souza Vandenberghe, L. P., Karp, S. G., Pagnoncelli, M. G. B., von Linsingen Tavares, M., Junior, N. L., Diestra, K. V., Soccol, C. R. 2020. Classification of enzymes and catalytic properties. In *Biomass, biofuels, biochemicals* (11-30). Elsevier.
- Delile, A.R. 1813. *Florae Aegyptiacae illustratio*. In *Description de l’Egypte ou recueil des observations et des recherches qui ont été faites en Egypte pendant l’expédition de l’armée française (1798–1801)*; Anon, Ed.; Histoire naturelle: Paris: France, 2, pp. 49–82.
- Della Pietà, F., Breschi, M. C., Scatizzi, R., Cinelli, F. 1995. Relaxing activity of two linear diterpenes from *Cystoseira brachycarpa* var. *balearica* on the contractions of intestinal preparations. *Planta medica*, 61(06), 493-496.
- Dembitsky, V. M., Srebnik, M. 2002. Natural halogenated fatty acids: their analogues and derivatives. *Progress in Lipid Research*, 41(4), 315-367.
- Demirci-Cekic, S., Özkan, G., Avan, A. N., Uzunboy, S., Çapanoğlu, E., Apak, R. 2022. Biomarkers of oxidative stress and antioxidant defense. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 209, 114477.
- Demirel, Z., Yilmaz-Koz, F. F., Karabay-Yavasoglu, U. N., Ozdemir, G., Sukatar, A. 2009. Antimicrobial and antioxidant activity of brown algae from the Aegean Sea. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 74(6), 619-628.

- Dettleff, P., Villagra, M., González, J., Fuentes, M., Estrada, J. M., Valenzuela, C., Valdés, J. A. 2020. Effect of bacterial LPS, poly I: C and temperature on the immune response of coelomocytes in short term cultures of red sea urchin (*Loxechinus albus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 107, 187-193.
- Dewick, P.M. 2002. Medicinal natural products: A biosynthetic approach. 2nd ed., John Wiley and Sons, Chichester, UK. 507 pp.
- Di Giulio, R. T., Washburn, P. C., Wenning, R. J., Winston, G. W., Jewell, C. S. 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 8(12), 1103-1123.
- Din, N. A. S., Mohd Alayudin, A. S., Sofian-Seng, N. S., Rahman, H. A., Mohd Razali, N. S., Lim, S. J., Wan Mustapha, W. A. 2022. Brown algae as functional food source of fucoxanthin: A review. *Foods*, 11(15), 2235.
- D'Ippolito, G., Iadicicco, O., Romano, G., Fontana, A. 2002. Detection of short-chain aldehydes in marine organisms: the diatom *Thalassiosira rotula*. *Tetrahedron Letters*, 43(35), 6137-6140.
- D'Ippolito, G., Nuzzo, G., Sardo, A., Manzo, E., Gallo, C., Fontana, A. 2018. Lipoxygenases and lipoxygenase products in marine diatoms. In *Methods in enzymology*, 605, 69-100. Academic Press.
- Do, J. W., Saravanan, M., Nam, S. E., Lim, H. J., Rhee, J. S. 2019. Waterborne manganese modulates immunity, biochemical, and antioxidant parameters in the blood of red seabream and black rockfish. *Fish and Shellfish Immunology*, 88, 546-555.
- Dobashi, K., Aihara, M., Araki, T., Shimizu, Y., Utsugi, M., Iizuka, K., Mori, M. 2001. Regulation of LPS induced IL-12 production by IFN- $\gamma$  and IL-4 through intracellular glutathione status in human alveolar macrophages. *Clinical and Experimental Immunology*, 124(2), 290-296.
- Doll, P. C., Caballes, C. F., Hoey, A. S., Uthicke, S., Ling, S. D., Pratchett, M. S. 2022. Larval settlement in echinoderms: a review of processes and patterns. *Oceanography and Marine Biology*, 433-494.
- Dolmatova, L. S., Eliseykina, M. G., Timchenko, N. F., Kovaleva, A. L., Shitkova, O. A. 2003. Generation of reactive oxygen species in different fractions of the coelomocytes of holothurian *Eupentacta fraudatrix* in response to the thermostable toxin of *Yersinia pseudotuberculosis in vitro*. *Chinese journal of oceanology and limnology*, 21(4), 293-304.
- Dolphin, D., Poulson, R., Avramovic, O. 1989. Glutathione: Chemical, biochemical, and medical aspects. New York: Wiley.
- Domaszewska-Szostek, A., Puzianowska-Kuźnicka, M., Kuryłowicz, A. 2021. Flavonoids in skin senescence prevention and treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6814.
- Domingues, I., Agra, A. R., Monaghan, K., Soares, A. M., Nogueira, A. J. 2010. Cholinesterase and glutathione-S-transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(1), 5-18.
- Donachy, J. E., Watabe, N., Showman, R. M. 1990. Alkaline phosphatase and carbonic anhydrase activity associated with arm regeneration in the seastar *Asterias forbesi*. *Marine Biology*, 105, 471-476.
- dos Santos, M. A. Z., de Freitas, S. C., Berneira, L. M., Mansilla, A., Astorga-España, M. S., Colepicolo, P., de Pereira, C. M. P. 2019. Pigment concentration, photosynthetic performance, and fatty acid profile of sub-Antarctic brown macroalgae in different phases of development from the Magellan Region, Chile. *Journal of Applied Phycology*, 31, 2629-2642.
- Duan, X.J., Zhang, W.W., Li, X.M., Wang, B.G. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chem* 2006; 95: 37-43.
- Duarte, C. V. G. 2016. Biomedical properties of *Cystoseira* species: insights into nutra-and pharmaceutical applications (Doctoral dissertation, Universidade do Algarve (Portugal)).
- Ebada, S.S., Lin, W., Proksch, P. Bioactive sesterterpenes and triterpenes from marine sponges: Occurrence and pharmacological significance. *Mar. Drugs* 2010, 8, 313–346.
- Ekambaram, P., Narayanan, M., Jayachandran, T. 2014. Changes in oxidative stress and antioxidant status in stressed fish brain. *International Journal of Science and Research*, 3(5), 164-170.
- El Hattab, M., Genta-Jouve, G., Bouzidi, N., Ortalo-Magne, A., Hellio, C., Marechal, J. P., Culioli, G. 2015. Cystophloroketals A–E, unusual phloroglucinol–meroterpenoid hybrids from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. *Journal of natural products*, 78(7), 1663-1670.
- El Shafay, S. M., Ali, S. S., El-Sheekh, M. M. 2016. Antimicrobial activity of some seaweed's species from red sea, against multidrug resistant bacteria. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 42(1), 65-74.

- El Wahidi, M., El Amraoui, B., El Amraoui, M., Bamhaoud, T. 2015. Screening of antimicrobial activity of macroalgae extracts from the Moroccan Atlantic coast. In *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 73, No. 3, 190-196. Elsevier Masson.
- El-Beltagi, H. S., Mohamed, A. A., Mohamed, H. I., Ramadan, K. M., Barqawi, A. A., Mansour, A. T. 2022. Phytochemical and potential properties of seaweeds and their recent applications: A review. *Marine drugs*, 20(6), 342.
- Ellis, R. P., Parry, H., Spicer, J. I., Hutchinson, T. H., Pipe, R. K., Widdicombe, S. 2011. Immunological function in marine invertebrates: responses to environmental perturbation. *Fish and shellfish immunology*, 30(6), 1209-1222.
- Elrefaey, A. A. K., El-Gamal, A. D., Hamed, S. M., El-Belely, E. F. 2022. Algae-mediated biosynthesis of zinc oxide nanoparticles from *Cystoseira crinite* (Fucales; Sargassaceae) and its antimicrobial and antioxidant activities. *Egyptian Journal of Chemistry*, 65(4), 231-240.
- El-Sheekh, M., Fathy, A. A., Saber, H., Saber, A. A. 2023. Medicinal and pharmaceutical applications of seaweeds. *Egyptian Journal of Botany*, 63(1), 1-29.
- Emanuele, S., Notaro, A., Palumbo Piccionello, A., Maggio, A., Lauricella, M., D'Anneo, A., Cernigliaro, C., Calvaruso, G., Giuliano, M. 2018. Sicilian Litchi Fruit Extracts Induce Autophagy versus Apoptosis Switch in Human Colon Cancer Cells. *Nutrients*, 10, 1490.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N. 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current topics in medicinal chemistry*, 1(6), 529-539.
- Ercolano G, De Cicco P, Ianaro A. New drugs from the sea: pro-apoptotic activity of sponges and algae derived compounds. *Mar Drugs*. 2019;17(1):31.
- Eroglu, A., Dogan, Z., Kanak, E. G., Atli, G. Ü. L. İ., Canli, M. U. S. T. A. F. A. 2015. Effects of heavy metals (Cd, Cu, Cr, Pb, Zn) on fish glutathione metabolism. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 3229-3237.
- Faddetta, T., Polito, G., Abbate, L., Alibrandi, P., Zerbo, M., Caldiero, C., Gallo, G. 2023. Bioactive metabolite survey of actinobacteria showing plant growth promoting traits to develop novel biofertilizers. *Metabolites*, 13(3), 374.
- Falasca, K., Ucciferri, C., Mancino, P., Vitacolonna, E., De Tullio, D., Pizzigallo, E., Vecchiet, J. 2008. Treatment with silybin-vitamin E-phospholipid complex in patients with hepatitis C infection. *Journal of medical virology*, 80(11), 1900-1906.
- Fariman, G. A., Shastan, S. J., Zahedi, M. M. 2016. Seasonal variation of total lipid, fatty acids, fucoxanthin content, and antioxidant properties of two tropical brown algae (*Nizamuddinia zanardinii* and *Cystoseira indica*) from Iran. *Journal of Applied Phycology*, 28, 1323-1331.
- Feder, M. E., Hofmann, G. E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual review of physiology*, 61(1), 243-282.
- Feldmann, J. 1942. Recherches sur les Bonnemaisoniacées et leur alternance de générations. *Ann. Sci. Nat. Bot. Series*, 11, 75-175.
- Fell, H. B. 1972. Phylum Echinodermata. In *Textbook of zoology (776-837)*. Palgrave, London.
- Felter, S. P., Zhang, X., Thompson, C. 2021. Butylated hydroxyanisole: Carcinogenic food additive to be avoided or harmless antioxidant important to protect food supply. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 121, 104887.
- Fenaux, L. 1968. Maturation des gonades et cycle saisonnier des larves chez *A. lixula*, *P. lividus* et *P. microtuberculatus* à Villefranche-Sur-Mer. *Vie Milieu Ser A Biol Mar* 19:1-52.
- Ferlay, J. S. E. M., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Bray, F. 2012. Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase. *Globocan*, 2013(1), 11.
- Fernando, I. P. S., Fernando, P. W. P., Kim, T., Ahn, G. 2022b. Structural diversity, biosynthesis, and health-promoting properties of brown algal meroditerpenoids. *Critical Reviews in Biotechnology*, 42(8), 1238-1259.
- Fernando, I. P. S., Lee, W., Ahn, G. 2022a. Marine algal flavonoids and phlorotannins; an intriguing frontier of biofunctional secondary metabolites. *Critical reviews in biotechnology*, 42(1), 23-45.
- Fernando, I. S., Kim, M., Son, K. T., Jeong, Y., Jeon, Y. J. 2016. Antioxidant activity of marine algal polyphenolic compounds: a mechanistic approach. *Journal of medicinal food*, 19(7), 615-628.
- Ferreira-Cravo M, Moreira DC, Hermes-Lima M. Glutathione Depletion Disrupts Redox Homeostasis in an Anoxia-Tolerant Invertebrate. *Antioxidants*. 2023; 12(6):1197.
- Figueiredo, J. R. B. 2023. Chlorophyll derivatives with anti-obesity activity.
- Filosto, S., Roccheri, M.C., Bonaventura, R., Matranga, V., 2008. Environmentally relevant cadmium concentrations affect

- development and induce apoptosis of *Paracentrotus lividus* larvae cultured *in vitro*. *Cell Biol. Toxicol.* 24, 603e610.
- Finkel, T., and Holbrook, N. J. 2000. Oxidants, oxidative stress, and the biology of ageing. *nature*, 408(6809), 239-247.
- Fisch, K. M., Böhm, V., Wright, A. D., König, G. M. 2003. Antioxidative Meroterpenoids from the Brown Alga *Cystoseira crinita*. *Journal of Natural Products*, 66(7), 968-975.
- Fitton, J. H. 2003. Brown marine algae: A survey of therapeutic potentials. *Alternative Complementary Therapies*, 9(1), 29-33.
- Fleming, D. W., Cochi, S. L., MacDonald, K. L., Brondum, J., Hayes, P. S., Plikaytis, B. D., Reingold, A. L. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New England journal of medicine*, 312(7), 404-407.
- Foon, T.S., Ai, L.A., Kuppusamy, P., Yusoff, M.M., Govindan, N. 2013. Studies on invitro antioxidant activity of marine edible seaweeds from the east coastal region of Peninsular Malaysia using different extraction methods. *J Coast Life Med*, 1: 193-8.
- Ford, A. C., Talley, N. J., Spiegel, B. M., Foxx-Orenstein, A. E., Schiller, L., Quigley, E. M., Moayyedi, P. 2008. Effect of fibre, antispasmodics, and peppermint oil in the treatment of irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Bmj*, 337.
- Forget, J., Beliaeff, B., Bocquene, G. 2003. Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. *Aquatic Toxicology*, 62(3), 195-204.
- Forio, M. A. E., Goethals, P. L. 2020. An integrated approach of multi-community monitoring and assessment of aquatic ecosystems to support sustainable development. *Sustainability*, 12(14), 5603.
- Formery, L., Wakefield, A., Gesson, M., Toisoul, L., Lhomond, G., Gilletta, L., Croce, J. C. 2022. Developmental atlas of the indirect-developing sea urchin *Paracentrotus lividus*: From fertilization to juvenile stages. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 966408.
- Fouda, A., Eid, A. M., Abdel-Rahman, M. A., El-Belely, E. F., Awad, M. A., Hassan, S. E. D., Hamza, M. F. 2022. Enhanced antimicrobial, cytotoxicity, larvicidal, and repellence activities of brown algae, *Cystoseira crinita*-mediated green synthesis of magnesium oxide nanoparticles. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 849921.
- Franco, L., Romero, D., García-Navarro, J. A., Teles, M., Tvarijonaviciute, A. 2016. Esterase activity (EA), total oxidant status (TOS) and total antioxidant capacity (TAC) in gills of *Mytilus galloprovincialis* exposed to pollutants: Analytical validation and effects evaluation by single and mixed heavy metal exposure. *Marine Pollution Bulletin*, 102(1), 30-35.
- Freile-Peigrín, Y., Robledo, D. 2013. Bioactive phenolic compounds from algae. *Bioactive compounds from marine foods: plant and animal sources*, 113-129.
- Frieri, Marianne, Krishan Kumar, and Anthony Boutin. 2017. "Antibiotic resistance." *Journal of infection and public health* 10.4: 369-378.
- Frinchi, M., Scaduto, P., Cappello, F., Belluardo, N., Mudò, G. 2018. Heat shock protein (Hsp) regulation by muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) activation in the rat hippocampus. *Journal of Cellular Physiology*, 233(8), 6107-6116.
- Fukumoto, L.R., Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. agric Food Chem.* 48:3597-3604.
- Fukushima, K., Sasaki, I., Takahashi, K. I., Naito, H., Ogawa, H., Sato, S., Matsuno, S. 1998. Lipopolysaccharide exhibits synergistic enhancement of butyrate-induced and retinoic acid-mediated alkaline phosphatase activity on small intestinal epithelial cell line, IEC-6. *Digestion*, 59(6), 683-688.
- Fung, A., Hamid, N., Lu, J. 2013. Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida*. *Food chemistry*, 136(2), 1055-1062.
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Renault, T. 2004. *In vitro* effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 16(4), 501-512.
- Gallo, A., Murano, C., Notariale, R., Caramiello, D., Tosti, E., Cecchini Gualandi, S., Boni, R. 2023. Immune and Reproductive Biomarkers in Female Sea Urchins *Paracentrotus lividus* under Heat Stress. *Biomolecules*, 13(8), 1216.
- Galloway, T. S., Millward, N., Browne, M. A., Depledge, M. H. 2002. Rapid assessment of organophosphorous/carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 61(3-4), 169-180.
- García-Bueno, B., Caso, J. R., Leza, J. C. 2008. Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32(6), 1136-1151.

- García-Velasco, N., Carrero, J. A., Urionabarrenetxea, E., Doni, L., Zaldibar, B., Izagirre, U., Soto, M. 2023. Innovative *in vivo* and *in vitro* bioassays for the establishment of toxicity thresholds of pollutants in sediment quality assessment using polychaetes and their immune cells. *Chemosphere*, 311, 136935.
- Garreta, A. G. (Ed.). 2000. Flora phycologica ibérica: Fucales (Vol. 1). Editum.
- Gaylord, B., Hodin, J., Ferner, M. C. 2013. Turbulent shear spurs settlement in larval sea urchins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17), 6901-6906.
- Geisen, U., Zenthoefer, M., Peipp, M., Kerber, J., Plenge, J., Managò, A., Kalthoff, H. 2015. Molecular mechanisms by which a *Fucus vesiculosus* extract mediates cell cycle inhibition and cell death in pancreatic cancer cells. *Marine drugs*, 13(7), 4470-4491.
- Generalić Mekinić, I., Skroza, D., Šimat, V., Hamed, I., Čagalj, M., Popović Perković, Z. 2019. Phenolic content of brown algae (Pheophyceae) species: Extraction, identification, and quantification. *Biomolecules*, 9(6), 244.
- Geng, C., Tian, Y., Shang, Y., Wang, L., Jiang, Y., Chang, Y. 2016. Effect of acute salinity stress on ion homeostasis, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and histological structure in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *SpringerPlus*, 5, 1-17.
- Genovese, G., Faggio, C., Gugliandolo, C., Torre, A., Spano, A., Morabito, M., Maugeri, T. L. 2012. *In vitro* evaluation of antibacterial activity of *Asparagopsis taxiformis* from the Straits of Messina against pathogens relevant in aquaculture. *Marine environmental research*, 73, 1-6.
- Genovese, G., Romeo, O., Morabito, M., Alessi, D., Criseo, G., Faggio, C. 2013. Activity of ethanolic extracts of *Asparagopsis taxiformis* against the major molecular types of *Cryptococcus neoformans/C. gattii* complex. *Afr J Microbiol Res*, 7, 2662-2667.
- Gerasimenko, N. I., Busarova, N. G., Moiseenko, O. P. 2010a. Seasonal changes in the content of lipids, fatty acids, and pigments in brown alga *Costaria costata*. *Russian journal of plant physiology*, 57, 205-211.
- Gerasimenko, N. I., Chaykina, E. L., Busarova, N. G., Anisimov, M. M. 2010b. Antimicrobial and hemolytic activity of low-molecular metabolites of brown seaweed *Laminaria cichorioides* (Miyabe). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46, 426-430.
- Gerwick, W. H., Singh, I. P. 2002. Structural diversity of marine oxylipins. In *Lipid Biotechnology*, 291-323. CRC Press.
- Gething, M. J. (Ed.). 1997. *Guidebook to molecular chaperones and protein-folding catalysts*. OUP Oxford.
- Ghallab, D. S., Shawky, E., Ibrahim, R. S., Mohyeldin, M. M. 2022. Comprehensive metabolomics unveil the discriminatory metabolites of some Mediterranean Sea marine algae in relation to their cytotoxic activities. *Scientific reports*, 12(1), 8094.
- Ghasemi, P. A., Momeni, M., Bahmani, M. 2013. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Kurd tribe in Dehloran and Abdanan districts, Ilam province, Iran. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10(2), 368-385.
- Gianguzza, P., Bonaviri, C. 2013. *Arbacia*. In *Developments in aquaculture and fisheries science*, 38,275-283. Elsevier.
- Gianguzza, P. 2020. *Arbacia*. In *Developments in aquaculture and fisheries science*, 3, 419-429. Elsevier.
- Giese, B., Laturus, F., Adams, F. C., Wiencke, C. 1999. Release of volatile iodinated C<sub>1</sub>– C<sub>4</sub> hydrocarbons by marine macroalgae from various climate zones. *Environmental science and technology*, 33(14), 2432-2439.
- Gil, A. 2002. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomedicine pharmacotherapy*, 56(8), 388-396.
- Giudice, G. 2012. *Developmental biology of the sea urchin embryo*. Elsevier.
- Glazman-Kuśnierczyk, H., Matuszyk, J., Radzikowski, C. 1992. Antitumor Activity Evaluation of Bromine-Substituted Analogues of Ifosfamide. I. Stereodifferentiation of Biological Effects and Selection of the Most Potent Compounds. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 14(4), 883-911.
- Goedken, M., and De Guise, S. 2004. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish and Shellfish Immunology*, 16(4), 539-552.
- Goldstone, J. V., Hamdoun, A., Cole, B. J., Howard-Ashby, M., Nebert, D. W., Scally, M., Stegeman, J. J. 2006. The chemical defense: environmental sensing and response genes in the *Strongylocentrotus purpuratus* genome. *Developmental biology*, 300(1), 366-384.
- Gomes, M.P., Garcia, Q.S., Barreto, L.C., Pimenta, L.P.S., Matheus, M.T., Figueredo, C.C., 2017. Allelopathy: An overview from micro-to macroscopic organisms, from cells to environments, and the perspectives in a climate-changing world. *Biologia* 72, 113–129.

- Gomez-Zavaglia, A., Prieto Lage, M. A., Jimenez-Lopez, C., Mejuto, J. C., Simal-Gandara, J. 2019. The potential of seaweeds as a source of functional ingredients of prebiotic and antioxidant value. *Antioxidants*, 8(9), 406.
- Gonçalves, A. M., Rocha, C. P., Marques, J. C., Gonçalves, F. J. 2021. Enzymes as useful biomarkers to assess the response of freshwater communities to pesticide exposure—A review. *Ecological Indicators*, 122, 107303.
- González-Suárez, D., Hernández, J. C. 2022. Early developmental stages of the sea urchin *Sphaerechinus granularis* (Lamarck, 1816) (Echinoidea: Toxopneustidae). *Marine Biology Research*, 18(3-4), 266-277.
- Graiff, A., Ruth, W., Kragl, U. Karsten, U. 2016, 'Chemical characterisation and quantification of the brown algal storage compound laminarin—A new methodological approach', *Journal of Applied Phycology*, 28(1), pp.533-543.
- Greff, S., Zubia, M., Genta-Jouve, G., Massi, L., Perez, T., Thomas, O. P. 2014. Mahorones, highly brominated cyclopentenones from the red alga *Asparagopsis taxiformis*. *Journal of natural products*, 77(5), 1150-1155.
- Grimvall, A., De Leer, E. W. (Eds.). 1995. Naturally-produced organohalogens (Vol. 1). Springer Science and Business Media.
- Grune, T., Lietz, G., Palou, A., Ross, A. C., Stahl, W., Tang, G., Biesalski, H. K. 2010.  $\beta$ -Carotene is an important vitamin A source for humans. *The Journal of nutrition*, 140(12), 2268S-2285S.
- Gump, J. M., Thorburn, A. 2011. Autophagy and apoptosis: what is the connection? *Trends in cell biology*, 21(7), 387-392.
- Gusev, E., and Zhuravleva, Y. 2022. Inflammation: A new look at an old problem. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4596.
- Gustafson, T., Wolpert, L. 1963. The cellular basis of morphogenesis and sea urchin development. *International review of cytology*, 15, 139-214.
- Gustafson, T., Wolpert, L. 1967. Cellular movement and contact in sea urchin morphogenesis. *Biological Reviews*, 42(3), 442-498.
- Gustafson, T., Toneby, M. I. 1971. How genes control morphogenesis. *American scientist*, 59(4), 452-462.
- Guvatova, Z., Dalina, A., Marusich, E., Pudova, E., Snezhkina, A., Krasnov, G., Moskalev, A. 2020. Protective effects of carotenoid fucoxanthin in fibroblasts cellular senescence. *Mechanisms of Ageing and Development*, 189, 111260.
- Habeebullah, S. F. K., Alagarsamy, S. 2023. Bioactive Secondary Metabolites from Marine Macroalgae. In *Algal Metabolites*, 339-400. Apple Academic Press.
- Häder, D. P., Helbling, E. W., Williamson, C. E., Worrest, R. C. 2011. Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 10(2), 242-260.
- Hadj Ammar, H., Lajili, S., Ben Said, R., Le Cerf, D., Bouraoui, A., Majdoub, H. 2015. Physico-chemical characterization and pharmacological evaluation of sulfated polysaccharides from three species of Mediterranean brown algae of the genus *Cystoseira*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23, 1-8.
- Hallek, M. 2019, 'Chronic lymphocytic leukaemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment', *American Journal of Haematology*, 94(11), 1266-1287.
- Halliwell, B., Zentella, A., Gomez, E. O., Kershenovich, D. 1997. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutrition reviews*, 55(1), S44.
- Hamdoun, A., Epel, D. 2007. Embryo stability and vulnerability in an always changing world. *Proceedings of the national academy of sciences*, 104(6), 1745-1750.
- Hannam, M. L., Hagger, J. A., Jones, M. B., Galloway, T. S. 2008. Characterisation of esterases as potential biomarkers of pesticide exposure in the lugworm *Arenicola marina* (Annelida: Polychaeta). *Environmental Pollution*, 152(2), 342-350.
- Hansen, E., Even, Y., Genevieve, A. M. 2004. The  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -unsaturated aldehyde 2-trans-4-trans-decadienal disturbs DNA replication and mitotic events in early sea urchin embryos. *Toxicological Sciences*, 81(1), 190-197.
- Harris, L. G., Eddy, S. D. 2015. Sea urchin ecology and biology. *Echinoderm aquaculture*, 1-24.
- Hay, M. E. 1996. Marine chemical ecology: what is known and what is next? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 200(1-2), 103-134.
- Hayes, M., Ferruzzi, M. G. 2020. Update on the bioavailability and chemo preventative mechanisms of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition research*, 81, 19-37.
- Hedrick, R. P. 1998. Relationships of the host, pathogen, and environment: implications for diseases of cultured and wild fish populations. *Journal of Aquatic Animal Health*, 10(2), 107-111.

- Hellou, J., Ross, N. W., Moon, T. W. 2012. Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 2007-2023.
- Henry, J. J. 1998. The development of dorsoventral and bilateral axial properties in sea urchin embryos. In *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 9, 43-52. Academic Press.
- Hernroth, B., Tassidis, H., Baden, S. P. 2020. Immunosuppression of aquatic organisms exposed to elevated levels of manganese: From global to molecular perspective. *Developmental and Comparative Immunology*, 104, 103536.
- Hibino, T., Loza-Coll, M., Messier, C., Majeske, A. J., Cohen, A. H., Terwilliger, D. P., Rast, J. P. 2006. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Developmental biology*, 300(1), 349-365.
- Hinegardner, R. T. Growth and development of the laboratory cultured sea urchin. *Biol. Bull.* 137:465-475; 1969.
- Hoffmann, L., Renard, R. Demoulin, V., 1992 – Phenology, growth, and biomass of *Cystoseira balearica* in Calvi (Corsica). *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 80: 249-254.
- Hof-Mussler, S. 1990. Ätherische Öle. *Pharmakologische Untersuchungen zur spasmolytischen Wirkung ätherischer Öle.* Dtsch Apoth, (130), 2407-2410.
- Hofstra, D., Schoelynck, J., Ferrell, J., Coetzee, J., de Winton, M., Bickel, T. O., Gross, E. M. 2020. On the move: New insights on the ecology and management of native and alien macrophytes. *Aquatic Botany*, 162, 103190.
- Holland, N. D. 2020. Digestive system in regular sea urchins. In *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 43, 147-163.
- Holm, K., Dupont, S., Skold, H., Stenius, A., Thorndyke, M., Hernroth, B. 2008. Induced cell proliferation in putative haematopoietic tissues of the sea star, *Asterias rubens* (L.). *Journal of Experimental Biology*, 211, 2551-2558.
- Holtmann, G., Shah, A., Morrison, M. 2018. Pathophysiology of functional gastrointestinal disorders: a holistic overview. *Digestive Diseases*, 35(Suppl. 1), 5-13.
- Hook, S. E., Gallagher, E. P., Batley, G. E. 2014. The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. *Integrated environmental assessment and management*, 10(3), 327-341.
- Hu, C., Yang, J., Qi, Z., Wu, H., Wang, B., Zou, F., Mei, H., Liu, J., Wang, W., Liu, Q., 2022. Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *Med. Comm.* 3, e161.
- Huang, X., Lin, D., Ning, K., Sui, Y., Hu, M., Lu, W., Wang, Y. 2016. Hemocyte responses of the thick shell mussel *Mytilus coruscus* exposed to nano-TiO<sub>2</sub> and seawater acidification. *Aquatic Toxicology*, 180, 1-10.
- Hubbard, R. E., O'Mahony, M. S., Calver, B. L., Woodhouse, K. W. 2008. Plasma esterases and inflammation in ageing and frailty. *European journal of clinical pharmacology*, 64, 895-900.
- Hutchings, J. L., Grebneva, Y., Dilmetz, S. J., Pincher, D. W., Hoffmann, P. 2024. Analytical methods for the analysis of bromoform in red seaweed *Asparagopsis armata* and *Asparagopsis taxiformis*—A review. *Algal Research*, 103478.
- Hwang, J., Choi, D., Han, S., Choi, J., Hong, J. 2019. An assessment of the toxicity of polypropylene microplastics in human derived cells. *Science of the Total Environment*, 684, 657-669.
- Ilijas, I., R Arma, N., Rante, H., Saleh, L., Itabashi, Y. 2020. Fatty acid composition of individual polar lipids extracted from the brown seaweed *Padina australis*. <http://www.bioflux.com.ro/aacl>.
- Ilijas, M. I., Indy, J. R., Yasui, H., Itabashi, Y., 2009. Lipid class and fatty acid composition of a little-known and rarely collected alga *Exophyllum wentii* Weber-van Bosse from Bali Island, Indonesia. *Journal of Oleo Science* 110(3):103-110.
- Ito, T., Matsutani, T., Mori, K., Nomura, T. 1992. Phagocytosis and hydrogen peroxide production by phagocytes of the sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 16(4), 287-294.
- Jafri, W., Yakoob, J., Hussain, S., Jafri, N., Islam, M. 2006. Phloroglucinol in irritable bowel syndrome. *Journal of Pakistan Medical Association*, 56(1), 5.
- Jan, G., Kahan, M., Ahmad, M., Iqbal, Z., Afzal, A., Afzal, M., Gul, F. 2011. Nutritional analysis, micronutrients, and chlorophyll. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(12), 2452-2456.
- Jaswir, I., Monsur, H. A. 2011. Anti-inflammatory compounds of macro algae origin: A review. *J. Med. Plants Res*, 5(33), 7146-7154.
- Javed, A., Hussain, M. B., Tahir, A., Waheed, M., Anwar, A., Shariati, M. A., Pasalar, M. 2021. Pharmacological applications of phlorotannins: A comprehensive review. *Current Drug Discovery Technologies*, 18(2), 282-292.

- Jaworowska, A., and Murtaza, A. 2022. Seaweed derived lipids are a potential anti-inflammatory agent: A review. *International journal of environmental research and public health*, 20(1), 730.
- Jayasinghe, A. M. K., Han, E. J., Kirindage, K. G. I. S., Fernando, I. P. S., Kim, E. A., Kim, J., Ahn, G. 2022. 3-bromo-4, 5-dihydroxybenzaldehyde isolated from *Polysiphonia morrowii* suppresses TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -stimulated inflammation and deterioration of skin barrier in HaCaT keratinocytes. *Marine Drugs*, 20(9), 563.
- Jeong, J. W., Hwang, S. J., Han, M. H., Lee, D. S., Yoo, J. S., Choi, I. W., Choi, Y. H. 2017. Fucoidan inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 macrophages and zebrafish larvae. *Molecular Cellular Toxicology*, 13, 405-417.
- Jimenez-Lopez, C., Pereira, A. G., Lourenço-Lopes, C., García-Oliveira, P., Cassani, L., Fraga-Corral, M., Simal-Gandara, J. 2021. Main bioactive phenolic compounds in marine algae and their mechanisms of action supporting potential health benefits. *Food chemistry*, 341, 128262.
- Jing, G., Li, Y., Xie, L., Zhang, R. 2006. Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 144(2), 184-190.
- Jitareanu, A., Tataringa, G., Zbancioc, A. M., Trifan, A. 2018. Bromination-A versatile tool for drugs optimization. *The Medical-Surgical Journal*, 122(3), 614-626.
- Joshi, S., Kumari, R., Upasani, V. N. 2018. Applications of algae in cosmetics: An overview. *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol*, 7(2), 1269.
- Jozefczak, M., Remans, T., Vangronsveld, J., Cuypers, A. 2012. Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *International journal of molecular sciences*, 13(3), 3145-3175.
- Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J., Pérez-Lebeña, E. 2021. The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids, and proteins) and induced pathologies. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4642.
- Julião, D. R., Afonso, C., Gomes-Bispo, A., Bandarra, N. M., Cardoso, C. 2021. The effect of drying on undervalued brown and red seaweed species: Bioactivity alterations. *Phycological Research*, 69(4), 246-257.
- Kadim, M. K., and Risjani, Y. 2022. Biomarker for monitoring heavy metal pollution in aquatic environment: An overview toward molecular perspectives. *Emerging Contaminants*, 8, 195-205.
- Kalasariya, H. S., Pereira, L., Patel, N. B. 2022. Pioneering role of marine macroalgae in cosmeceuticals. *Phycology*, 2(1), 172-203.
- Kaliaperumal, N. 2003. Products from seaweeds. *SDMRI Research Publication*, 3, 33-42.
- Kamenarska, Z., Serkedjieva, J., Najdenski, H., Stefanov, K., Tsvetkova, I., Dimitrova-Konaklieva, S., Popov, S. 2009. Antibacterial, antiviral, and cytotoxic activities of some red and brown seaweeds from the Black Sea.
- Kang, Y. R., Park, J., Jung, S. K., Chang, Y. H. 2018. Synthesis, characterization, and functional properties of chlorophylls, pheophytins, and Zn-pheophytins. *Food chemistry*, 245, 943-950.
- Kant, G., Pandey, A., Shekhar, H., Srivastava, S. 2023. Enhanced bio-synthesis of isoprene via modifying mevalonate and methylerythritol phosphate pathways for industrial application: a review. *Process Biochemistry*.
- Kasanah, N. Amelia, W., Mukminin, A., Triyanto, Isnansetyo, A. Antibacterial activity of Indonesian red algae *Gracilaria edulis* against bacterial fish pathogens and characterization of active fractions. *Nat. Prod. Res.* 2019, 33, 3303–3307.
- Kataoka, C., Kashiwada, S. 2021. Ecological risks due to immunotoxicological effects on aquatic organisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8305.
- Kaur, S., Mayanglambam, P., Bajwan, D., Thakur, N. 2022. Chemotherapy and its adverse effects-A systematic review. *International Journal of Nursing Education and Research*, 10(4), 399-402.
- Kawata, A., Murakami, Y., Suzuki, S., Fujisawa, S. 2018. Anti-inflammatory activity of  $\beta$ -carotene, lycopene and tri-n-butylborane, a scavenger of reactive oxygen species. *In vivo*, 32(2), 255-264.
- Kazlauskas, R. P. T. M., Murphy, P. T., Quinn, R. J., Wells, R. J. 1977. A new class of halogenated lactones from the red alga *Delisea fimbriata* (Bonnemaisoniaceae). *Tetrahedron letters*, 18(1), 37-40.
- Kazłowska, K., Hsu, T., Hou, C. C., Yang, W. C., Tsai, G. J. 2010. Anti-inflammatory properties of phenolic compounds and crude extract from *Porphyra dentata*. *Journal of ethnopharmacology*, 128(1), 123-130.
- Kazmi, S. S. U. H., Wang, Y. Y. L., Cai, Y. E., Wang, Z. 2022. Temperature effects in single or combined with chemicals to the aquatic organisms: an overview of thermo-chemical stress. *Ecological Indicators*, 143, 109354.

- Kelman, D., Posner, E.K., McDermid, K.J., Tabandera, N.K., Wright, P.R., Wright, A.D. Antioxidant activity of Hawaiian marine algae. *Mar Drugs* 2012; 10: 403-16.
- Kelmanson, J. E., Jäger, A. K., van Staden, J. 2000. Zulu medicinal plants with antibacterial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 69(3), 241-246.
- Khan, A. A., Iadarola, M., Yang, H. Y. T., Dionne, R. A. 2007a. Expression of COX-1 and COX-2 in a clinical model of acute inflammation. *The Journal of Pain*, 8(4), 349-354.
- Khan, M.N.A., Cho, J.Y., Lee, M.C., Kang, J.Y., Park, N.G., Fujii, H. Hong, Y.K. 2007b. Isolation of two anti-inflammatory and one pro-inflammatory polyunsaturated fatty acids from the brown seaweed *Undaria pinnatifida*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(17), 6984-6988.
- Khani, L., Martin, L., Pułaski, L. 2023. Cellular and physiological mechanisms of halogenated and organophosphorus flame-retardant toxicity. *Science of The Total Environment*, 165272.
- Kim, J. H., Park, H. J., Kim, D. H., Oh, C. W., Lee, J. S., Kang, J. C. 2019. Changes in hematological parameters and heat shock proteins in juvenile sablefish depending on water temperature stress. *Journal of Aquatic Animal Health*, 31(2), 147-153.
- Kinley, R. D., de Nys, R., Vucko, M. J., Machado, L., Tomkins, N. W. 2016. The red macroalgae *Asparagopsis taxiformis* is a potent natural antimethanogenic that reduces methane production during *in vitro* fermentation with rumen fluid. *Animal Production Science*, 56(3), 282-289.
- Kinley, R. D., Martinez-Fernandez, G., Matthews, M. K., de Nys, R., Magnusson, M., Tomkins, N. W. 2020. Mitigating the carbon footprint and improving productivity of ruminant livestock agriculture using a red seaweed. *Journal of Cleaner production*, 259, 120836.
- Kiselev, K. V., Ageenko, N. V., Kurilenko, V. V. 2013. Involvement of the cell-specific pigment genes pks and sult in bacterial defense response of sea urchins *Strongylocentrotus intermedius*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 103(2), 121-132.
- Kladi, M., Vagias, C., Roussis, V. 2004. Volatile halogenated metabolites from marine red algae. *Phytochemistry Reviews*, 3, 337-366.
- Klick, S. 1993. The release of volatile halocarbons to seawater by untreated and heavy metal exposed samples of the brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *Marine chemistry*, 42(3-4), 211-221.
- Klionsky, D. J., and Emr, S. D. 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 290(5497), 1717-1721.
- Kokova, V., Lukova, P., Baldzhieva, A., Katsarov, P., Delattre, C., Molinié, R., Apostolova, E. 2023. Extraction, Structural Characterization, and *in vivo* Anti-Inflammatory Effect of Alginate from *Cystoseira crinita* (Desf.) Borry Harvested in the Bulgarian Black Sea. *Marine drugs*, 21(4), 245.
- Kominami, T., Takata, H. 2004. Gastrulation in the sea urchin embryo: a model system for analyzing the morphogenesis of a monolayered epithelium. *Development, growth and differentiation*, 46(4), 309-326.
- Kopac, M. J. 1941. Disintegration of the fertilization membrane of *Arbacia* by the action of an “enzyme.” *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 18(2), 215-220.
- Koski, M., Klein, B.W., Schogt, N., 1998. Effect of food quality on rate of growth and development of the pelagic copepod *Pseudocalanus elongatus* (Copepoda, Calanoida). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 170:169–187.
- Kruk, J., Aboul-Enein, B. H., Duchnik, E., Marchlewicz, M. 2022. Antioxidative properties of phenolic compounds and their effect on oxidative stress induced by severe physical exercise. *The Journal of Physiological Sciences*, 72(1), 19.
- Ktari, L., Ismail, A., Selmi, H., Hmani, I., Bour, M. E. 2022. Biological potential of the alien red alga *Asparagopsis taxiformis* and characterization of its culturable associated bacteria. *Journal of Applied Phycology*, 34(6), 2769-2782.
- Kuklina, I., Kouba, A., Kozák, P. 2013. Real-time monitoring of water quality using fish and crayfish as bio-indicators: a review. *Environmental monitoring and assessment*, 185, 5043-5053.
- Kumar, S., and Pandey, A. K. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The scientific world journal*, 2013.
- Kumari, R., Singh, A., Yadav, A. N. 2021. Fungal enzymes: degradation and detoxification of organic and inorganic pollutants. *Recent Trends in Mycological Research: Volume 2: Environmental and Industrial Perspective*, 99-125.
- Küpper, F. C., Gaquerel, E., Boneberg, E. M., Morath, S., Salaün, J. P., Potin, P. 2006. Early events in the perception of lipopolysaccharides in the brown alga *Laminaria digitata* include an oxidative burst and activation of fatty acid oxidation

- cascades. *Journal of experimental botany*, 57(9), 1991-1999.
- Lacroix, I., Hurault-Delarue, C., Kessler, S., Guitard, C., Vidal, S., Albouy-Cossard, C., Damase-Michel, C. 2011. First epidemiologic data about phloroglucinol exposure during first trimester of pregnancy. *Gynecologie, Obstetrique and Fertilité*, 39(12), 694-697.
- Lakhani, S. A., Masud, A., Kuida, K., Porter Jr, G. A., Booth, C. J., Mehal, W. Z., Flavell, R. A. 2006. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*, 311(5762), 847-851.
- Lallès, J. P. 2014. Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects. *Nutrition reviews*, 72(2), 82-94.
- Lam, P. K. 2009. Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean Coastal Management*, 52(7), 348-354.
- Lamattina, L., García-Mata, C., Graziano, M., Pagnussat, G. 2003. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annual review of plant biology*, 54(1), 109-136.
- Lamkanfi, M., Kanneganti, T. D. 2010. Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *The international journal of biochemistry and cell biology*, 42(1), 21-24.
- Landén, N. X., Li, D., Ståhle, M. 2016. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73, 3861-3885.
- Laroux, F. S., Pavlick, K. P., Hines, I. N., Kawachi, S., Harada, H., Bharwani, S., Grisham, M. B. 2001. Role of nitric oxide in inflammation. *Acta Physiologica Scandinavica*, 173(1), 113-118.
- Lauritano, C., Ianora, A. 2020. Chemical defense in marine organisms. *Marine drugs*, 18(10), 518.
- Lazaraki, G., Chatzimavroudis, G., Katsinelos, P. 2014. Recent advances in pharmacological treatment of irritable bowel syndrome. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(27), 8867.
- Le Goïc, N., Hégaret, H., Boulais, M., Béguel, J. P., Lambert, C., Fabioux, C., Soudant, P. 2014. Flow cytometric assessment of morphology, viability, and production of reactive oxygen species of *Crassostrea gigas* oocytes. Application to Toxic dinoflagellate (*Alexandrium minutum*) exposure. *Cytometry Part A*, 85(12), 1049-1056.
- Le Loir, Yves, Florence Baron, and Michel Gautier. "Staphylococcus aureus and food poisoning." *Genetics and molecular research: GMR* 2.1 (2003): 63-76.
- Le Pape, M. A., Grua-Priol, J., Prost, C., Demaimay, M. 2004. Optimization of dynamic headspace extraction of the edible red algae *Palmaria palmata* and identification of the volatile components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 550-556.
- Le Verge-Serandour, M., Turlier, H. 2022. Blastocoel morphogenesis: a biophysics perspective. In *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 130, 12-23. Academic Press.
- Lee SeungHong, L. S., Ko ChangIk, K. C., Ahn GinNae, A. G., You SangGuan, Y. S., Kim JinSoo, K. J., Heu MinSoo, H. M., Jeon YouJin, J. Y. 2012. Molecular characteristics and anti-inflammatory activity of the fucoidan extracted from *Ecklonia cava*. 89, 599-606.
- Legrand, C., Rengefors, K., Fistarol, G. O., Graneli, E. 2003. Allelopathy in phytoplankton-biochemical, ecological, and evolutionary aspects. *Phycologia*, 42(4), 406-419.
- Leódido, A. C. M., Costa, L. E., Araújo, T. S., Costa, D. S., Sousa, N. A., Souza, L. K., Medeiros, J. V. R. 2017. Anti-diarrhoeal therapeutic potential and safety assessment of sulphated polysaccharide fraction from *Gracilaria intermedia* seaweed in mice. *International journal of biological macromolecules*, 97, 34-45.
- Leonard, J. R., Klocke, B. J., D'sa, C., Flavell, R. A., Roth, K. A. 2002. Strain-dependent neurodevelopmental abnormalities in caspase-3-deficient mice. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 61(8), 673-677.
- Levisson, M., van der Oost, J., Kengen, S. W. 2009. Carboxylic ester hydrolases from hyperthermophiles. *Extremophiles*, 13, 567-581.
- Li H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem* 2007; 102: 771-6.
- Li, D. M., Zhou, D. Y., Zhu, B. W., Miao, L., Qin, L., Dong, X. P., Murata, Y. 2013. Extraction, structural characterization, and antioxidant activity of polyhydroxylated 1, 4-naphthoquinone pigments from spines of sea urchin *Glyptocidaris crenularis* and *Strongylocentrotus intermedius*. *European food research and technology*, 237, 331-339.
- Li, X., Norman, H. C., Kinley, R. D., Laurence, M., Wilmot, M., Bender, H., Tomkins, N. 2016. *Asparagopsis taxiformis* decreases enteric methane production from sheep. *Animal Production Science*, 58(4), 681-688.
- Li, Y., Sun, S., Pu, X., Yang, Y., Zhu, F., Zhang, S., Xu, N. 2018. Evaluation of antimicrobial activities of seaweed

- resources from Zhejiang Coast, China. *Sustainability*, 10(7), 2158.
- Liao, P., Hemmerlin, A., Bach, T. J., Chye, M. L. 2016. The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production. *Biotechnology advances*, 34(5), 697-713.
- Liu, L., Heinrich, M., Myers, S., Dworjanyan, S. A. 2012. Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in traditional Chinese medicine: a phytochemical and pharmacological review. *J Ethnopharmacol*, 142, 591-619.
- Liu, M., Li, W., Chen, Y., Wan, X., Wang, J. 2020. Fucoxanthin: A promising compound for human inflammation-related diseases. *Life sciences*, 255, 117850.
- Liu, Z., Li, M., Yi, Q., Wang, L., Song, L. 2018. The neuroendocrine-immune regulation in response to environmental stress in marine bivalves. *Frontiers in Physiology*, 9, 1456.
- Livingstone, D. R. 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine pollution bulletin*, 42(8), 656-666.
- Logan, C. Y., McClay, D. R. 1999. Lineages that give rise to endoderm and mesoderm in the sea urchin embryo. *Cell lineage and fate determination*, 41-57.
- Lomartire, S., Marques, J. C., Gonçalves, A. M. 2021. Biomarkers based tools to assess environmental and chemical stressors in aquatic systems. *Ecological Indicators*, 122, 107207.
- Lourenço-Lopes, C., Fraga-Corral, M., Jimenez-Lopez, C., Carpena, M., Pereira, A. G., García-Oliveira, P., Simal-Gandara, J. 2021. Biological action mechanisms of fucoxanthin extracted from algae for application in food and cosmetic industries. *Trends in Food Science and Technology*, 117, 163-181.
- Louvel, D., Delvaux, M., Staumont, G. H. I. S. L. A. I. N., Camman, F. R. A. N. C. O. I. S., Fioramonti, J., Bueno, L., Frexinos, J. 1996. Intracolonic injection of glycerol: a model for abdominal pain in irritable bowel syndrome? *Gastroenterology*, 110(2), 351-361.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lukova, P., Apostolova, E., Baldzhieva, A., Murdjeva, M., Kokova, V. 2023. Fucoidan from *Ericaria crinita* Alleviates Inflammation in Rat Paw Edema, Downregulates Pro-Inflammatory Cytokine Levels, and Shows Antioxidant Activity. *Biomedicines*, 11(9), 2511.
- Lundberg, J. O., Weitzberg, E., Gladwin, M. T. 2008. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature reviews Drug discovery*, 7(2), 156-167.
- Lushchak, V. I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology*, 101(1), 13-30.
- Lyons, D. C., Kaltenbach, S. L., McClay, D. R. 2012. Morphogenesis in sea urchin embryos: linking cellular events to gene regulatory network states. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(2), 231-252.
- Machado, L., Magnusson, M., Paul, N. A., Kinley, R., de Nys, R., Tomkins, N. 2016a. Identification of bioactives from the red seaweed *Asparagopsis taxiformis* that promote antimethanogenic activity *in vitro*. *Journal of Applied Phycology*, 28, 3117-3126.
- Machado, L., Magnusson, M., Paul, N. A., Kinley, R., de Nys, R., Tomkins, N. 2016b. Dose-response effects of *Asparagopsis taxiformis* and *Oedogonium* sp. on *in vitro* fermentation and methane production. *Journal of Applied Phycology*, 28, 1443-1452.
- Machado, L., Tomkins, N., Magnusson, M., Midgley, D. J., de Nys, R., Rosewarne, C. P. 2018. *In vitro* response of rumen microbiota to the antimethanogenic red macroalga *Asparagopsis taxiformis*. *Microbial ecology*, 75, 811-818.
- Machado, S., González-Ballesteros, N., Gonçalves, A., Magalhães, L., Sárria Pereira de Passos, M., Rodríguez-Argüelles, M. C., Castro Gomes, A. 2021. Toxicity *in vitro* and in zebrafish embryonic development of gold nanoparticles biosynthesized using *Cystoseira* macroalgae extracts. *International Journal of Nanomedicine*, 5017-5036.
- Magnusson, M., Vucko, M. J., Neoh, T. L., de Nys, R. 2020. Using oil immersion to deliver a naturally-derived, stable bromoform product from the red seaweed *Asparagopsis taxiformis*. *Algal Research*, 51, 102065.
- Mahboob, S. 2013. Environmental pollution of heavy metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. *Life Sci. J*, 10, 336-347.
- Makrinos, D. L., and Bowden, T. J. 2016. Natural environmental impacts on teleost immune function. *Fish and Shellfish Immunology*, 53, 50-57.
- Malico, A. A., Calzini, M. A., Gayen, A. K., Williams, G. J. 2020. Synthetic biology, combinatorial biosynthesis, and

- chemo-enzymatic synthesis of isoprenoids. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology: Official Journal of the Society for Industrial Microbiology and Biotechnology*, 47(9-10), 675-702.
- Malik, D. S., Sharma, A. K., Sharma, A. K., Thakur, R., Sharma, M. 2020. A review on impact of water pollution on freshwater fish species and their aquatic environment. *Advances in environmental pollution management: wastewater impacts and treatment technologies*, 1, 10-28.
- Mancuso, F. P., Messina, C. M., Santulli, A., Laudicella, V. A., Giommi, C., Sarà, G., Airoidi, L. 2019. Influence of ambient temperature on the photosynthetic activity and phenolic content of the intertidal *Cystoseira compressa* along the Italian coastline. *Journal of Applied Phycology*, 31, 3069-3076.
- Manilal, A., Sugathan, S., Joseph, S., George, K. S., Shakir, C., Lipton, A. P. 2010. Antimicrobial potential of marine organisms collected from the southwest coast of India against multiresistant human and shrimp pathogens. *Scientia Marina*, 74(2), 287-296.
- Manley, S. L. 2002. Phyto-genesis of halomethanes: A product of selection or a metabolic accident? *Biogeochemistry*, 60(2), 163-180.
- Mannino, A. M., Vaglica, V., Oddo, E. 2017. Interspecific variation in total phenolic content in temperate brown algae. *Journal of Biological Research-Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale*, 90(1).
- Mansur, A. A. F. 2022. Evaluation of the anticancer and anti-inflammatory potential of the brown seaweed *Cystoseira* (Doctoral dissertation, University of Plymouth).
- Mapelli-Brahm, P., Gómez-Villegas, P., Gonda, M. L., León-Vaz, A., León, R., Mildemberger, J., Meléndez-Martínez, A. J. 2023. Microalgae, seaweeds and aquatic bacteria, archaea, and yeasts: Sources of carotenoids with potential antioxidant and anti-inflammatory health-promoting actions in the sustainability era. *Marine Drugs*, 21(6), 340.
- Marcelino, G., Machate, D. J., Freitas, K. D. C., Hiane, P. A., Maldonado, I. R., Pott, A., Guimarães, R. D. C. A. 2020.  $\beta$ -Carotene: Preventive role for type 2 diabetes mellitus and obesity: A review. *Molecules*, 25(24), 5803.
- Marcogliese, D. J. 2008. The impact of climate change on the parasites and infectious diseases of aquatic animals. *Rev Sci Tech*, 27(2), 467-484.
- Margolick, J. B., Markham, R. B., Scott, A. L. 2014. The immune system and host defense against infections. *Infectious disease epidemiology: theory and practice*, 317-43.
- Marí, M., Morales, A., Colell, A., García-Ruiz, C., Fernández-Checa, J. C. 2009. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxidants and redox signaling*, 11(11), 2685-2700.
- Marine Macro Alga: Separation of the Compound that Interrupts Bacterial Communication. *Marine drugs*. 2013; 11: 253-265.
- Marrone, V., Piscopo, M., Romano, G., Ianora, A., Palumbo, A., Costantini, M., 2012. Defense against toxic diatom aldehydes in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *PLoS One* 7, e31750.
- Martik, M. L., McClay, D. R. 2014. Gut Development in the Sea Urchin. *Translational Research and Discovery in Gastroenterology: Organogenesis to Disease*, 241.
- Martino, C., Costa, C., Roccheri, M. C., Koop, D., Scudiero, R., Byrne, M. 2018. Gadolinium perturbs expression of skeletogenic genes, calcium uptake and larval development in phylogenetically distant sea urchin species. *Aquatic Toxicology*, 194, 57-66.
- Martino, C., Byrne, M., Roccheri, M. C., Chiarelli, R. 2021. Interactive effects of increased temperature and gadolinium pollution in *Paracentrotus lividus* sea urchin embryos: A climate change perspective. *Aquatic Toxicology*, 232, 105750.
- Martiniakova, M., Babikova, M., Omelka, R. 2020. Pharmacological agents and natural compounds: available treatments for osteoporosis. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 71(3).
- Martins, T., Barros, A. N., Rosa, E., Antunes, L. 2023. Enhancing health benefits through chlorophylls and chlorophyll-rich agro-food: A comprehensive review. *Molecules*, 28(14), 5344.
- Mateo, R., Beyer, W. N., Spann, J. W., Hoffman, D. J. 2003. Relation of fatty acid composition in lead-exposed mallards to fat mobilization, lipid peroxidation and alkaline phosphatase activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 135(4), 451-458.
- Matos, G. S., Pereira, S. G., Genisheva, Z. A., Gomes, A. M., Teixeira, J. A., Rocha, C. M. 2021. Advances in extraction methods to recover added-value compounds from seaweeds: sustainability and functionality. *Foods*, 10(3), 516.
- Matranga, V., Toia, G., Bonaventura, R., Müller, W. E. 2000. Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes. *Cell stress and chaperones*, 5(2), 113.

- Matranga, V., Pinsino, A., Bonaventura, R., Costa, C., Karakostis, K., Martino, C., Russo, R., Zito, F., 2013. Cellular and molecular bases of biomineralization in sea urchin embryos. *Cah. Biol. Mar.* 54, 467–478.
- Mauro, M., Queiroz, V., Arizza, V., Campobello, D., Custódio, M. R., Chiamonte, M., Vazzana, M. 2021. Humoral responses during wound healing in *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1788). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 253, 110550.
- Mauro, M., Arizza, V., Arculeo, M., Attanzio, A., Pinto, P., Chirco, P., Vazzana, M. 2022. Haemolympathic parameters in two aquaculture Crustacean species *Cherax destructor* (Clark, 1836) and *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868). *Animals*, 12(5), 543.
- Mauro, M., Vazzana, M., Attanzio, A., Gurrieri, E., Restivo, I., Badalamenti, R., Arizza, V. 2023. The Effects of Red-Grape Seed and Pomace-Flour Dietary Supplementation on Broiler Chickens. *Sustainability*, 15(23), 16289.
- Mayer, A. M. S., Gustafson, K. R. 2006. Marine pharmacology in 2003–2004. Antitumour and cytotoxic compounds. *European Journal of Cancer*, 42, 2241–2270.
- Mazorra, M. T., Rubio, J. A., Blasco, J. 2002. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: kinetic characteristics and effects of heavy metals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 131(2), 241–249.
- McCarthy, S. D. S., Rafferty, S. P., Frost, P. C. 2010. Responses of alkaline phosphatase activity to phosphorus stress in *Daphnia magna*. *Journal of Experimental Biology*, 213(2), 256–261.
- McClay, D. R., Warner, J., Martik, M., Miranda, E., Slota, L. 2020. Gastrulation in the sea urchin. *Current topics in developmental biology*, 136, 195–218.
- McComb, R. B., Bowers Jr, G. N., Posen, S. 2013. Alkaline phosphatase. Springer Science and Business Media.
- McConnell, O., Fenical, W. 1977. Halogen chemistry of the red alga *Asparagopsis*. *Phytochemistry*, 16(3), 367–374.
- McConnell, O. J., Fenical, W. 1980. Halogen chemistry of the red alga *Bonnemaisonia*. *Phytochemistry*, 19(2), 233–247.
- McGaw, L. J., Jäger, A. K., Van Staden, J. 2002. Antibacterial effects of fatty acids and related compounds from plants. *South African journal of botany*, 68(4), 417–423.
- McIntyre, D. C. 2012. Short-Range Inter-Blastomere Signaling Specifies Ectodermal Fate and is Required for Skeletal Patterning in the Sea Urchin (Doctoral dissertation, Duke University).
- Meidel, S. K., e Scheibling, R. E. 2001. Variation in egg spawning among subpopulations of sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis*: a theoretical approach. *Marine Ecology Progress Series*, 213, 97–110.
- Meijer, L., Skaltsounis, A. L., Magiatis, P., Polychronopoulos, P., Knockaert, M., Leost, M., Greengard, P. 2003. GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chemistry and biology*, 10(12), 1255–1266.
- Meister, A. 1995. [1] Glutathione metabolism. *Methods in enzymology*, 251, 3–7.
- Mellouk, Z., Benammar, I., Krouf, D., Goudjil, M., Okbi, M., Malaisse, W. 2017. Antioxidant properties of the red alga *Asparagopsis taxiformis* collected on the North West Algerian coast. *Experimental and therapeutic medicine*, 13(6), 3281–3290.
- Meng, W., Mu, T., Sun, H., Garcia-Vaquero, M. 2021. Phlorotannins: A review of extraction methods, structural characteristics, bioactivities, bioavailability, and future trends. *Algal Research*, 60, 102484.
- Meshalkina, D., Tsvetkova, E., Orlova, A., Islamova, R., Grashina, M., Gorbach, D., Frolov, A. 2023. First insight into the neuroprotective and antibacterial effects of phlorotannins isolated from the cell walls of brown algae *Fucus vesiculosus* and *Pelvetia canaliculata*. *Antioxidants*, 12(3), 696.
- Mhadhebi, L., Laroche-Clary, A., Robert, J., Bouraoui, A. 2011. Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-oxidant activities of organic extracts from the Mediterranean seaweed, *Cystoseira crinita*. *African Journal of Biotechnology*, 10(73), 16682–16690.
- Mhadhebi, L., Mhadhebi, A., Robert, J., Bouraoui, A. 2014. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative effects of aqueous extracts of three mediterranean brown seaweeds of the genus *Cystoseira*. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 13(1), 207.
- Miceli, A., and Settanni, L. 2019. Influence of agronomic practices and pre-harvest conditions on the attachment and development of *Listeria monocytogenes* in vegetables. *Annals of Microbiology*, 69(3), 185–199.
- Michalak, I., Tiwari, R., Dhawan, M., Alagawany, M., Farag, M. R., Sharun, K., Dhama, K. 2022. Antioxidant effects of seaweeds and their active compounds on animal health and production—a review. *Veterinary Quarterly*, 42(1), 48–67.

- Migliaccio, O., Pinsino, A., Maffioli, E., Smith, A. M., Agnisola, C., Matranga, V., Palumbo, A. 2019. Living in future ocean acidification, physiological adaptive responses of the immune system of sea urchins resident at a CO<sub>2</sub> vent system. *Science of the total environment*, 672, 938-950.
- Mikami, K., Hosokawa, M. 2013. Biosynthetic pathway and health benefits of fucoxanthin, an algae-specific xanthophyll in brown seaweeds. *International journal of molecular sciences*, 14(7), 13763-13781.
- Min, B. R., Parker, D., Brauer, D., Waldrip, H., Lockard, C., Hales, K., Augyte, S. 2021. The role of seaweed as a potential dietary supplementation for enteric methane mitigation in ruminants: Challenges and opportunities. *Animal Nutrition*, 7(4), 1371-1387.
- Ming, J., Ye, J., Zhang, Y., Yang, X., Shao, X., Qiang, J., Xu, P. 2019. Dietary optimal reduced glutathione improves innate immunity, oxidative stress resistance and detoxification function of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) against microcystin-LR. *Aquaculture*, 498, 594-605.
- Minghetti, L. 2004. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 63(9), 901-910.
- Miralto, A., Barone, G., Romano, G., Poulet, S. A., Ianora, A., Russo, G. L., Buttino, I., Mazzarella, G., Laabir, M., Giacobbe, M.G., 1999. The insidious effect of diatoms on copepod reproduction. *Nature*, 402(6758), 173-176.
- Mishra, P., Kiran, N. S., Henry, D. E. 2023. Therapeutic Potential of Macroalgae and Its Beneficial Health Impacts in Aquaculture. In *Algal Metabolites*, 251-286). Apple Academic Press.
- Mishra, T., Arthanari, A. 2023. EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM SARGASSUM SP. AND THEIR BIOACTIVE POTENTIAL OF CYTOTOXICITY AND HEMOLYTIC ACTIVITIES. *Chelonian Research Foundation*, 18(2), 2197-2203.
- Mishra, V. K., Bacheti, R. K., Husen, A. 2011. Medicinal uses of chlorophyll: A critical overview. *Chlorophyll: Structure, function, and medicinal uses*, 177-196.
- Miyashita, K., Beppu, F., Hosokawa, M., Liu, X., Wang, S. 2020. Nutraceutical characteristics of the brown seaweed carotenoid fucoxanthin. *Archives of biochemistry and biophysics*, 686, 108364.
- Mohamed, A. S., El-Desoky, M. A., El-Lanam, A. A., Gad, N. S. 2020. Influence of environmental pollutants on water quality and biochemical parameters of fish tissue. *Advances in Oceanography and Marine Biology*, 1-8.
- Mohibbullah, M., Haque, M. N., Sohag, A. A. M., Hossain, M. T., Zahan, M. S., Uddin, M. J., Choi, J. S. 2022. A systematic review on marine algae-derived fucoxanthin: An update of pharmacological insights. *Marine Drugs*, 20(5), 279.
- Moigne, J. Y. 1998. Use of algae extracts as antibacterial and/or antifungal agent and composition containing same. PCT Patent Appl WO, 1998010656, A1.
- Mokolensang, J. F., Manu, L., Gunawan, W. B., Simatupang, M. F., Yudisthira, D., Farradisya, S., Nurkolis, F. 2023. Incorporation of macroalgae to fish feed lowers allergenic properties in fish: An opinion study. *Journal of Agriculture and Food Research*, 100777.
- Monson, R. K. 2013. Metabolic and gene expression controls on the production of biogenic volatile organic compounds. *Biology, controls, and models of tree volatile organic compound emissions*, 153-179.
- Monteiro, D. A., Kalinin, A. L., Rantin, F. T., McKenzie, D. J. 2021. Use of complex physiological traits as ecotoxicological biomarkers in tropical freshwater fishes. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 335(9-10), 745-760.
- Moore, M. N., Allen, J. I., McVeigh, A. 2006. Environmental prognostics: an integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Marine Environmental Research*, 61(3), 278-304.
- Moore, R. E. 1977. Volatile compounds from marine algae. *Accounts of Chemical Research*, 10(2), 40-47.
- Moore, R. M., Webb, M., Tokarczyk, R., Wever, R. 1996. Bromoperoxidase and iodoperoxidase enzymes and production of halogenated methanes in marine diatom cultures. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 101(C9), 20899-20908.
- Moosova, Z., Pekarova, M., Sindlerova, L. S., Vasicek, O., Kubala, L., Blaha, L., Adamovsky, O. 2019. Immunomodulatory effects of cyanobacterial toxin cylindrospermopsin on innate immune cells. *Chemosphere*, 226, 439-446.
- Morretta, E., Capuano, A., D'Urso, G., Voli, A., Mozzicafreddo, M., Di Gaetano, S., Casapullo, A. 2024. Identification of Mortalin as the Main Interactor of Mycalin A, a Poly-Brominated C-15 Acetogenin Sponge Metabolite, by MS-Based Proteomics. *Marine Drugs*, 22(2), 52.
- Moubayed, N. M., Al Hourri, H. J., Al Khulaifi, M. M., Al Farraj, D. A. 2017. Antimicrobial, antioxidant properties and chemical composition of seaweeds collected from Saudi Arabia (Red Sea and Arabian Gulf). *Saudi journal of biological*

- sciences, 24(1), 162-169.
- Mounnissamy, V. M., Kavimani, S., Balu, V., Quine, S. D. 2007. Evaluation of Anti-inflammatory and Membrane stabilizing property of Ethanol Extract of *Cansjera rheedii* J. Gmelin (Opiliaceae). Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics, 6(2), 235-0.
- Müller, W. E., Ushijima, H., Batel, R., Krasko, A., Borejko, A., Müller, I. M., Schröder, H. C. 2006. Novel mechanism for the radiation-induced bystander effect: Nitric oxide and ethylene determine the response in sponge cells. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 597(1-2), 62-72.
- Mumu, M., Das, A., Emran, T. B., Mitra, S., Islam, F., Roy, A., Kim, B. 2022. Fucoxanthin: A promising phytochemical on diverse pharmacological targets. Frontiers in Pharmacology, 13, 929442.
- Muralidharan, S., Mandrekar, P. 2013. Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation. Journal of leukocyte biology, 94(6), 1167-1184.
- Murano, C., Gallo, A., Nocerino, A., Macina, A., Cecchini Gualandi, S., Boni, R. 2023. Short-term thermal stress affects immune cell features in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. Animals, 13(12), 1954.
- Mydlarz, L. D., Jones, L. E., Harvell, C. D. 2006. Innate immunity, environmental drivers, and disease ecology of marine and freshwater invertebrates. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst., 37, 251-288.
- Myhre, O., Vestad, T. A., Sagstuen, E., Aarnes, H., Fonnum, F. 2000. The effects of aliphatic (n-nonane), naphthenic (1, 2, 4-trimethylcyclohexane), and aromatic (1, 2, 4-trimethylbenzene) hydrocarbons on respiratory burst in human neutrophil granulocytes. Toxicology and applied pharmacology, 167(3), 222-230.
- Nabil-Adam, A., Elnosary, M. E., Ashour, M. L., Abd El-Moneam, N. M., Shreadah, M. A. 2023. Flavonoids Biosynthesis in Plants as a Defense Mechanism: Role and Function Concerning Pharmacodynamics and Pharmacokinetic Properties. In Flavonoid Metabolism-Recent Advances and Applications in Crop Breeding. IntechOpen.
- Naiel, M. A., Alagawany, M., Patra, A. K., El-Kholy, A. I., Amer, M. S., Abd El-Hack, M. E. 2021. Beneficial impacts and health benefits of macroalgae phenolic molecules on fish production. Aquaculture, 534, 736186.
- Nathan, M., Scholten, R. 1999. The complete german commission e monographs: Therapeutic guide to herbal medicines.
- Neethu, P. V., Suthindhiran, K., Jayasri, M. A. 2017. Antioxidant and antiproliferative activity of *Asparagopsis taxiformis*. Pharmacognosy research, 9(3), 238.
- Neumann, C. S., Fujimori, D. G., Walsh, C. T. 2008. Halogenation strategies in natural product biosynthesis. Chemistry and biology, 15(2), 99-109.
- Nielsen, C. 2017. Evolution of deuterostomy—and origin of the chordates. Biological Reviews, 92(1), 316-325.
- Niinemets, Ü., Kahru, A., Mander, Ü., Nõges, P., Nõges, T., Tuvikene, A., Vasemägi, A. 2017. Interacting environmental and chemical stresses under global change in temperate aquatic ecosystems: stress responses, adaptation, and scaling. Regional environmental change, 17, 2061-2077.
- Nomura, M., Kamogawa, H., Susanto, E., Kawagoe, C., Yasui, H., Saga, N., Hosokawa, M., Miyashita, K. 2013. Seasonal variations of total lipids, fatty acid composition, and fucoxanthin contents of *Sargassum horneri* (Turner) and *Cystoseira hakodatensis* (Yendo) from the northern seashore of Japan. J Appl Phycol 25:1159–1169.
- Nordqvist, C., Chun, C. 2017. Breast Cancer: Symptoms, risk factors, and treatment. Medical News Today.
- Nova, P., Gomes, A. M., Costa-Pinto, A. R. 2024. It comes from the sea: Macroalgae-derived bioactive compounds with anti-cancer potential. Critical Reviews in Biotechnology, 44(3), 462-476.
- Nunes, N., Valente, S., Ferraz, S., Barreto, M. C., De Carvalho, M. P. 2018. Nutraceutical potential of *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trevisan extracts and assessment of a downstream purification strategy. Heliyon, 4(11).
- Nunes, N., Rosa, G. P., Ferraz, S., Barreto, M. C., de Carvalho, M. P. 2020. Fatty acid composition, TLC screening, ATR-FTIR analysis, anti-cholinesterase activity, and *in vitro* cytotoxicity to A549 tumor cell line of extracts of 3 macroalgae collected in Madeira. Journal of applied phycology, 32, 759-771.
- Nurgali, Kulmira, R. Thomas Jagoe, and Raquel Abalo. "Adverse effects of cancer chemotherapy: Anything new to improve tolerance and reduce sequelae?" Frontiers in pharmacology 9 (2018): 362658.
- Nusetti, O., Salazar-Lugo, R., Rodriguez-Grau, J., Vilas, J. 1998. Immune and biochemical responses of the polychaete *Eurythoe complanata* exposed to sublethal concentration of copper. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 119(2), 177-183.
- Ohshiro, T., Nakano, S., Takahashi, Y., Suzuki, M., Izumi, Y. 1999. Occurrence of bromoperoxidase in the marine green macro-alga, *Ulveella lens*, and emission of volatile brominated methane by the enzyme. Phytochemistry, 52(7), 1211-1215.

- Okazaki, K. Normal development to metamorphosis. Czihak, G. ed. The Sea Urchin Embryo. Biochemistry and Morphogenesis. New York Springer-Verlag; 1975: 177-232.
- Orvain, F., Martinez, A., Desoche, E., Clauquin, P. 2015. Chemical interaction between epilithic microphytobenthic biofilm and larval development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. In Proceedings of Congress on Artificial Reefs: From Materials to Ecosystems (Caen) (pp. 239-247).
- Otero, M., Cebrian, E., Francour, P., Galil, B., Savini, D. 2013. Monitoring marine invasive species in Mediterranean marine protected areas (MPAs): a strategy and practical guide for managers. IUCN, Malaga, 136.
- Olate-Gallegos, C., Barriga, A., Vergara, C., Fredes, C., García, P., Giménez, B., Robert, P. 2019. Identification of polyphenols from Chilean brown seaweeds extracts by LC-DAD-ESI-MS/MS. Journal of Aquatic Food Product Technology, 28(4), 375-391.
- Oumaskour, K. H. A. D. I. J. A., Boujaber, N. A. B. I. L. A., Etahiri, S. A. M. I. R. A., Assobhei, O. M. A. R. 2013. Anti-inflammatory and antimicrobial activities of twenty-three marine red algae from the coast of Sidi Bouzid (El Jadida-Morocco). Int. J. Pharm. Pharm. Sci, 5, 145-149.
- Oves, M., Saghir Khan, M., Huda Qari, A., Nadeen Felemban, M., Almeelbi, T. 2016. Heavy metals: biological importance and detoxification strategies. Journal of Bioremediation and Biodegradation, 7(2), 1-15.
- Oweson, C., Sköld, H., Pinsino, A., Matranga, V., Hernroth, B. 2008. Manganese effects on haematopoietic cells and circulating coelomocytes of *Asterias rubens* (Linnaeus). Aquatic Toxicology, 89(2), 75-81.
- Oyadomari, S., Mori, M., 2004. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. Cell Death Differ. 11, 381-389.
- Ozougwu, J. C. 2016. The role of reactive oxygen species and antioxidants in oxidative stress. International Journal of Research, 1(8), 1-8.
- Pádua, D., Rocha, E., Gargiulo, D. Ramos, A. A. 2015. Bioactive compounds from brown seaweeds: Phloroglucinol, fucoxanthin and fucoidan as promising therapeutic agents against breast cancer. Phytochemistry Letters, 14, 91-98.
- Palanisamy, S., Vinosha, M., Rajasekar, P., Anjali, R., Sathiyaraj, G., Marudhupandi, T., You, S. 2019. Antibacterial efficacy of a fucoidan fraction (Fu-F2) extracted from *Sargassum polycystum*. International journal of biological macromolecules, 125, 485-495.
- Pan, M. H., Chiou, Y. S., Chen, L. H., Ho, C. T. 2015. Breast cancer chemoprevention by dietary natural phenolic compounds: specific epigenetic related molecular targets. Molecular nutrition and food research, 59(1), 21-35.
- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., Raisuddin, S. 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish Wallago attu (Bl. and Schn.). Science of the total environment, 309(1-3), 105-115.
- Pang, L. Y., Hurst, E. A., Argyle, D. J. 2016. Cyclooxygenase-2: a role in cancer stem cell survival and repopulation of cancer cells during therapy. Stem cells international, 2016.
- Paolini, M., Abdel-Rahman, S. Z., Sapone, A., Pedulli, G. F., Perocco, P., Cantelli-Forti, G., Legator, M. S. 2003.  $\beta$ -Carotene: a cancer chemopreventive agent or a co-carcinogen? Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 543(3), 195-200.
- Parisi, M. G., Mauro, M., Sarà, G., Cammarata, M. 2017. Temperature increases, hypoxia, and changes in food availability affect immunological biomarkers in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. Journal of Comparative Physiology B, 187, 1117-1126.
- Park, H.K., Yoon, N.G., Lee, J.E., Hu, S., Yoon, S., Kim, S.Y., Hong, J.H., Nam, D., Chae, Y.C., Park, J.B., Kang, B.H., 2020. Unleashing the full potential of Hsp90 inhibitors as cancer therapeutics through simultaneous inactivation of Hsp90, Grp94, and TRAP1. Exp. Mol. Med. 52, 79-91.
- Parrinello, N., Arizza, V., Cammarata, M., Giaramita, F. T., Pergolizzi, M., Vazzana, M., Parrinello, D. 2007. Inducible lectins with galectin properties and human IL1 $\alpha$  epitopes opsonize yeast during the inflammatory response of the ascidian *Ciona intestinalis*. Cell and Tissue Research, 329, 379-390.
- Parrinello, N., Vizzini, A., Arizza, V., Salerno, G., Parrinello, D., Cammarata, M., Vazzana, M. 2008. Enhanced expression of a cloned and sequenced *Ciona intestinalis* TNF $\alpha$ -like (CiTNF $\alpha$ ) gene during the LPS-induced inflammatory response. Cell and tissue research, 334, 305-317.
- Parsaeimehr, A., Chen, Y. F. 2013. Algal bioactive diversities against pathogenic microbes. Microbiol Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education, 796-803.
- Pathak, K., Gogoi, U., Saikia, R., Pathak, M. P., Das, A. 2022. Marine-derived antidiabetic compounds: an insight into their sources, chemistry, SAR, and molecular mechanisms. Studies in Natural Products Chemistry, 73, 467-504.

- Paul, C., and Pohnert, G. 2011. Production and role of volatile halogenated compounds from marine algae. *Natural product reports*, 28(2), 186-195.
- Paul, N. A., Cole, L., De Nys, R., Steinberg, P. D. 2006a. Ultrastructure of the gland cells of the red alga *Asparagopsis armata* (bonnemaisoniaceae) 1. *Journal of Phycology*, 42(3), 637-645.
- Paul, N. A., de Nys, R., Steinberg, P. D. 2006b. Chemical defence against bacteria in the red alga *Asparagopsis armata*: linking structure with function. *Marine Ecology Progress Series*, 306, 87-101.
- Peixoto, M. J., Svendsen, J. C., Malte, H., Pereira, L. F., Carvalho, P., Pereira, R., Ozório, R. O. 2016. Diets supplemented with seaweed affect metabolic rate, innate immune, and antioxidant responses, but not individual growth rate in European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Applied Phycology*, 28, 2061-2071.
- Pelletier, M. C., Ebersole, J., Mulvaney, K., Rashleigh, B., Gutierrez, M. N., Chintala, M., Lane, C. 2020. Resilience of aquatic systems: review and management implications. *Aquatic sciences*, 82, 1-25.
- Peña-Llopis, S., Ferrando, M. D., Peña, J. B. 2003. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. *Aquatic Toxicology*, 65(4), 337-360.
- Peuhu, E., Paul, P., Remes, M., Holmbom, T., Eklund, P., Sjöholm, R., Eriksson, J. E. 2013. The antitumor lignan Nortrachelogenin sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced cell death by inhibition of the Akt pathway and growth factor signaling. *Biochemical pharmacology*, 86(5), 571-583.
- Phan, M. A. T., Bucknall, M., Arcot, J. 2018. Interactive effects of  $\beta$ -carotene and anthocyanins on cellular uptake, antioxidant activity and anti-inflammatory activity *in vitro* and *ex vivo*. *Journal of functional foods*, 45, 129-137.
- Piacenza, L., Zeida, A., Trujillo, M., Radi, R. 2022. The superoxide radical switch in the biology of nitric oxide and peroxynitrite. *Physiological Reviews*, 102(4), 1881-1906.
- Piazza, L., and Ceccherelli, G. 2019. Effect of sea urchin human harvest in promoting canopy forming algae restoration. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 219, 273-277.
- Pinsino, A., Turturici, G., Sconzo, G., Geraci, F. 2011. Rapid changes in heat-shock cognate 70 levels, heat-shock cognate phosphorylation state, heat-shock transcription factor, and metal transcription factor activity levels in response to heavy metal exposure during sea urchin embryonic development. *Ecotoxicology*, 20, 246-254.
- Pinsino, A., Matranga, V. 2015. Sea urchin immune cells as sentinels of environmental stress. *Developmental and Comparative Immunology*, 49(1), 198-205.
- Pinteus, S., Alves, C., Monteiro, H., Araújo, E., Horta, A., Pedrosa, R. 2015. *Asparagopsis armata* and *Sphaerococcus coronopifolius* as a natural source of antimicrobial compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(3), 445-451.
- Pistelli, L., and Giorgi, I. 2012. Antimicrobial properties of flavonoids. *Dietary phytochemicals and microbes*, 33-91.
- Pizzuto F., 1998 – Fenologia morfologica e riproduttiva di *Cystoseira brachycarpa* J. Agardh emend. Giaccone (Fucales, Fucophyceae) del litorale catanese (Sicilia orientale). *Boll. Acc. Gioenia Sci. Nat.* 30(353) 137-148.
- Pizzuto F., 1999 – On the structure, typology and periodism of a *Cystoseira brachycarpa* J. Agardh emend Giaccone community and of a *Cystoseira crinita* Duby community from the eastern coast of Sicily (Mediterranean Sea). *Plant Biosystems*, 133(1): 15-35.
- Pohnert, G., Boland, W. 2002. The oxylipin chemistry of attraction and defense in brown algae and diatoms. *Natural product reports*, 19(1), 108-122.
- Ponte, J.M.S., Seca, A.M.L., Barreto, M.C. *Asparagopsis* Genus: What We Really Know About Its Biological Activities and Chemical Composition. *Molecules*. 2022; 27(6):1787.
- Pontheaux, F., Roch, F., Morales, J., Cormier, P. 2021. Echinoderms: Focus on the sea urchin model in cellular and developmental biology. In *Handbook of Marine Model Organisms in Experimental Biology*, 307-333. CRC Press.
- Pozharitskaya, O. N., Shikov, A. N., Makarova, M. N., Ivanova, S. A., Kosman, V. M., Makarov, V. G., Ulrichová, J. 2013. Antiallergic effects of pigments isolated from green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) shells. *Planta medica*, 1698-1704.
- Prasedya, E. S., Martyasari, N. W. R., Abidin, A. S., Pebriani, S. A., Ilhami, B. T. K., Frediansyah, A., Sunarpi, H. 2020. Macroalgae *Sargassum cristaefolium* extract inhibits proinflammatory cytokine expression in BALB/C Mice. *Scientifica*, 2020.
- Pretti, C., Cognetti-Varriale, A. M. 2001. The use of biomarkers in aquatic biomonitoring: the example of esterases. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 11(4), 299-303.
- Priya, R. R., and Khora, S. S. 2023. Antioxidant potentials of polysaccharides derived from marine brown algae. In *Marine antioxidants* (pp. 433-448). Academic Press.

- Priyan Shanura Fernando, I., Kim, K. N., Kim, D., Jeon, Y. J. 2019. Algal polysaccharides: Potential bioactive substances for cosmeceutical applications. *Critical reviews in biotechnology*, 39(1), 99-113.
- Putteeraj, M., Lim, W. L., Teoh, S. L., and Yahaya, M. F. 2018. Flavonoids and its neuroprotective effects on brain ischemia and neurodegenerative diseases. *Current drug targets*, 19(14), 1710-1720.
- Qin, Y., Jiang, J., Zhao, L., Zhang, J., Wang, F. 2018. Applications of alginate as a functional food ingredient. In *Biopolymers for food design* (pp. 409-429). Academic Press.
- Quéguineur, B., Goya, L., Ramos, S., Martín, M. A., Mateos, R., Bravo, L. 2012. Phloroglucinol: Antioxidant properties and effects on cellular oxidative markers in human HepG2 cell line. *Food and chemical toxicology*, 50(8), 2886-2893.
- Queiroz, V., Muxel, S. M., Inguglia, L., Chiramonte, M., Custódio, M. R. 2021. Comparative study of coelomocytes from *Arbacia lixula* and *Lythechinus variegatus*: cell characterization and *in vivo* evidence of the physiological function of vibratile cells. *Fish and Shellfish Immunology*, 110, 1-9.
- Radomski M. W., Martin J. F., and Moncada S. 1991. Synthesis of nitric oxide by the haemocytes of the american horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol)* 334, 129-133.
- Rahima Begum, Saurav Howlader, A. N. M. Mamun-Or-Rashid, S. M. Rafiquzzaman, Ghulam Md Ashraf, Ghadeer M. Albadrani, Amany A. Sayed, Ilaria Peluso, Mohamed M. Abdel-Daim, Md. Sahab Uddin, "Antioxidant and Signal-Modulating Effects of Brown Seaweed-Derived Compounds against Oxidative Stress-Associated Pathology", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2021, Article ID 9974890, 22 pages, 2021.
- Ramírez-Gómez, F., García-Arrarás, J. E. 2010. Echinoderm immunity. *Invertebrate Survival Journal*, 7(2), 211-220.
- Raniello, R., Mollo, E., Lorenti, M., Gavagnin, M., Buia, M. C. 2007. Phytotoxic activity of caulerpenyne from the Mediterranean invasive variety of *Caulerpa racemosa*: a potential allelochemical. *Biological Invasions*, 9, 361-368.
- Rashid, H. O., Yadav, R. K., Kim, H. R., Chae, H. J. 2015. ER stress: Autophagy induction, inhibition, and selection. *Autophagy*, 11(11), 1956-1977.
- Ravichandran, J., Babu, L., Jayalakshmi, K. B., Manivel, M., Ramudu, K. N., Ponesakki, G., Stephen, N. M. 2024. Phenolic Compounds from Marine Organisms and Their Biofunctional Properties. *Science and Engineering of Polyphenols: Fundamentals and Industrial Scale Applications*, 452-478.
- Read, A., and Schröder, M. 2021. The unfolded protein response: an overview. *Biology*, 10(5), 384.
- Regal, A. L., Alves, V., Gomes, R., Matos, J., Bandarra, N. M., Afonso, C., Cardoso, C. 2020. Drying process, storage conditions, and time alter the biochemical composition and bioactivity of the anti-greenhouse seaweed *Asparagopsis taxiformis*. *European Food Research and Technology*, 246, 781-793.
- Regoli, F., Giuliani, M. E. 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Marine environmental research*, 93, 106-117.
- Remya, R. R., Samrot, A. V., Kumar, S. S., Mohanavel, V., Karthick, A., Chinnaiyan, V. K., Muhibbullah, M. 2022. Bioactive potential of brown algae. *Adsorption Science and Technology*, 2022, 1-13.
- Ren XianYun, R. X., Pan LuQing, P. L., Wang Lin, W. L. 2015. Toxic effects upon exposure to benzo [a] pyrene in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*.
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., Aggarwal, B. B. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free radical biology and medicine*, 49(11), 1603-1616.
- Ribera, M.A., Garreta, A.G., Gallardo T., Cormaci M., Furnari G., Giaccone G. 1992. Check-list of Mediterranean Seaweeds. I. Fucophyceae (Warming, 1884). *Bot. Mar.* 35: 109-130.
- Ricci, S. 2012. Phytoestrogens: characterization and biological effects.
- Rickwood, C. J., Galloway, T. S. 2004. Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect: a study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. *Aquatic Toxicology*, 67(1), 45-56.
- Ritter, A., Goullitquer, S., Salaün, J. P., Tonon, T., Correa, J. A., Potin, P. 2008. Copper stress induces biosynthesis of octadecanoid and eicosanoid oxygenated derivatives in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *New Phytologist*, 180(4), 809-821.
- Roccheri, M.C., Patti, M., Agnello, M., Gianguzza, F., Carra, E., Rinaldi, A.M., 2001. Localization of mitochondrial Hsp56 chaperonin during sea urchin development. *Beachem. Biophys. Res. Commun.* 287, 1093-1098.
- Roccheri, M.C., Agnello, M., Bonaventura, R., Matranga, V., 2004. Cadmium induces the expression of specific stress proteins in sea urchin embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 80-87.
- Rocha, F., Sugahara, L. Y., Leimann, F. V., de Oliveira, S. M., da Silva Brum, E., Calhelha, R. C., Gonçalves, O. H. 2018. Nanodispersions of beta-carotene: effects on antioxidant enzymes and cytotoxic properties. *Food and function*, 9(7), 3698-

- Rocha, D. H., Pinto, D. C., Silva, A. M. 2022. Macroalgae specialized metabolites: Evidence for their anti-inflammatory health benefits. *Marine Drugs*, 20(12), 789.
- Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., Frecha-Ferreiro, S., Vidal-Pérez, A. M., López-Hernández, J. 2010. Antioxidant compounds in edible brown seaweeds. *European Food Research and Technology*, 231, 495-498.
- Rodríguez-Ramos, T., Carpio, Y., Bolívar, J., Espinosa, G., Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., Estrada, M. P. 2010. An inducible nitric oxide synthase (NOS) is expressed in hemocytes of the spiny lobster *Panulirus argus*: cloning, characterization, and expression analysis. *Fish and shellfish immunology*, 29(3), 469-479.
- Rohmer, M. 1999. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae, and higher plants. *Natural product reports*, 16(5), 565-574.
- Rojas, J., Lemus, A., Ganesan, E. K. 1982. El ciclo vital 'in vitro' del alga marina roja *Asparagopsis taxiformis* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta). Venezuela, Universidad De Oriente. Boletín Institucional Oceanográfico, 21, 101-112.
- Romano, G., Russo, G. L., Buttino, I., Ianora, A., Miralto, A. 2003. A marine diatom-derived aldehyde induces apoptosis in copepod and sea urchin embryos. *Journal of Experimental Biology*, 206(19), 3487-3494.
- Romano, G., Miralto, A., Ianora, A. 2010. Teratogenic effects of diatom metabolites on sea urchin *Paracentrotus lividus* embryos. *Marine Drugs*, 8(4), 950-967.
- Roohinejad, S., Koubaa, M., Barba, F. J., Saljoughian, S., Amid, M., Greiner, R. 2017. Application of seaweeds to develop new food products with enhanced shelf-life, quality, and health-related beneficial properties. *Food Research International*, 99, 1066-1083.
- Roque, B. M., Brooke, C. G., Ladau, J., Polley, T., Marsh, L. J., Najafi, N., Hess, M. 2019. Effect of the macroalgae *Asparagopsis taxiformis* on methane production and rumen microbiome assemblage. *Animal Microbiome*, 1, 1-14.7.
- Roque, B. M., Venegas, M., Kinley, R. D., de Nys, R., Duarte, T. L., Yang, X., Kebreab, E. 2021. Red seaweed (*Asparagopsis taxiformis*) supplementation reduces enteric methane by over 80 percent in beef steers. *Plos one*, 16(3), e0247820.
- Ross, N. W., Firth, K. J., Wang, A., Burka, J. F., Johnson, S. C. 2000. Changes in hydrolytic enzyme activities of naive Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. *Diseases of aquatic organisms*, 41(1), 43-51.
- Rossi, R., Lessi, M., Manzini, C., Marianetti, G., Bellina, F. 2017. Synthesis and biological properties of 2 (5H)-furanones featuring bromine atoms on the heterocyclic ring and/or brominated substituents. *Current Organic Chemistry*, 21(11), 964-1018.
- Ruberto, G., Baratta, M. T., Biondi, D. M., Amico, V. 2001. Antioxidant activity of extracts of the marine algal genus *Cystoseira* in a micellar model system. *Journal of Applied Phycology*, 13, 403-407.
- Rudolf, B., Salmain, M., Fornal, E., Rybarczyk-Pirek, A. 2012. Metallo-carbonyl complexes of bromo- and dibromomaleimide: synthesis and biochemical application. *Applied Organometallic Chemistry*, 26(2), 80-85.
- Ruepert, L., Quatero, A. O., de Wit, N. J., van der Heijden, G. J., Rubin, G., Muris, J. W. 2011. Bulking agents, antispasmodics, and antidepressants for the treatment of irritable bowel syndrome. *Cochrane database of systematic reviews*, (8).
- Ruocco, N., Varrella, S., Romano, G., Ianora, A., Bentley, M. G., Somma, D., Costantini, M. 2016. Diatom-derived oxylipins induce cell death in sea urchin embryos activating caspase-8 and caspase 3/7. *Aquatic Toxicology*, 176, 128-140.
- Ruocco, N., Annunziata, C., Ianora, A., Libralato, G., Manfra, L., Costantini, S., Costantini, M. 2019. Toxicity of diatom-derived polyunsaturated aldehyde mixtures on sea urchin *Paracentrotus lividus* development. *Scientific Reports*, 9(1), 517.
- Ruocco, N., Nuzzo, G., d'Ippolito, G., Manzo, E., Sardo, A., Ianora, A., Fontana, A. 2020. Lipxygenase pathways in diatoms: occurrence and correlation with grazer toxicity in four benthic species. *Marine Drugs*, 18(1), 66.
- Russo, R., Bonaventura, R., Matranga, V., 2014. Time- and dose-dependent gene expression in sea urchin embryos exposed to UVB. *Mar. Environ. Res.* 93, 85-92.
- Saeed, M., Arain, M. A., Ali Fazlani, S., Marghazani, I. B., Umar, M., Soomro, J., Alagawany, M. 2021. A comprehensive review on the health benefits and nutritional significance of fucoidan polysaccharide derived from brown seaweeds in human, animals, and aquatic organisms. *Aquaculture Nutrition*, 27(3), 633-654.
- Safavi, S. V., Kenari, A. A., Tabarsa, M., Esmaeili, M. 2019. Effect of sulfated polysaccharides extracted from marine macroalgae (*Ulva intestinalis* and *Gracilariopsis persica*) on growth performance, fatty acid profile, and immune

- response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Phycology*, 31, 4021-4035.
- Saim, S., Sahnouni, F., Bouhadi, D., Kharbouche, S. 2021. The antimicrobial activity of two marine red algae collected from Algerian West coast. *Trends in Pharmaceutical Sciences*, 7(4), 233-242.
- Sakil, M. A., Polash, M. A. S., Tahjib-Ul-Arif, M., Hossain, M. A., Hossain, M. A. 2018. Cardioprotective molecule and bioactive compounds of some selected vegetables available in Bangladesh.
- Sala, E., Ballesteros, E., Dendrinis, P., Di Franco, A., Ferretti, F., Foley, D., Zabala, M. 2012. The structure of Mediterranean rocky reef ecosystems across environmental and human gradients, and conservation implications. *PLoS one*, 7(2), e32742.
- Sales, M., Ballesteros, E. 2009. Shallow *Cystoseira* (Fucales: Ochrophyta) assemblages thriving in sheltered areas from Menorca (NW Mediterranean): relationships with environmental factors and anthropogenic pressures. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 84: 476-482.
- Sales, M., Ballesteros, E. 2010. Long-term comparison of algal assemblages dominated by *Cystoseira crinita* (Fucales, Heterokontophyta) from Cap Corse (Corsica, North Western Mediterranean). *Eur. J. Phycol.* 45: 404-412.
- Sales M., Cebrian E., Tomas F., Ballesteros E. 2011. Pollution impacts and recovery potential in three species of the genus *Cystoseira* (Fucales, Heterokontophyta). *Estuar., Coast. Shelf Sci.* 92: 347-357
- Sales, M., Ballesteros, E. 2012. Seasonal dynamics and annual production of *Cystoseira crinita* (Fucales: Ochrophyta)-dominated assemblages from the northwestern Mediterranean. *Scientia marina*, 76(2), 391-401.
- Sampathkumar P: Potential hepatoprotective effect of aqueous extract of *Gracilaria corticata* in AFB1 induced hepatotoxicity in Wister rats. *J Biol Sci* 2008; 8(8): 1352-5.
- Sanders, B. M. 1993. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Critical reviews in Toxicology*, 23(1), 49-75.
- Sangha, J. S., Kelloway, S., Critchley, A. T., Prithiviraj, B. 2014. Seaweeds (macroalgae) and their extracts as contributors of plant productivity and quality: the status of our understanding. *Advances in botanical research*, 71, 189-219.
- Sanjeeva, K. K. A., Kim, E. A., Son, K. T., Jeon, Y. J. 2016. Bioactive properties and potentials cosmeceutical applications of phlorotannins isolated from brown seaweeds: A review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 162, 100-105.
- Saravanan, A., Kumar, P. S., Vo, D. V. N., Jeevanantham, S., Karishma, S., Yaashikaa, P. R. 2021. A review on catalytic-enzyme degradation of toxic environmental pollutants: Microbial enzymes. *Journal of Hazardous Materials*, 419, 126451.
- Sarker, S. D., Latif, Z. and Nash, R. J. 2001. Application of gradient-enhanced nuclear Overhauser effect spectroscopy (GOESY) in the structure elucidation of plant secondary metabolites. *Phytochem Anal* 12, 23-27.
- Sauvageau C. 1912 - A propos des *Cystoseira* de Banyuls et de Guéthary. *Bulletin de la Station Biologique d'Arcachon*, 17: 5-56.
- Savchenko, T., Degtyaryov, E., Radzyukevich, Y., Buryak, V., 2022. Therapeutic Potential of Plant Oxylipins. *Int. J. Mol. Sci.* 23.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Griffin, P. M. 2011. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging infectious diseases*, 17(1), 7.
- Schulz, J. B., Lindenau, J., Seyfried, J., Dichgans, J. 2000. Glutathione, oxidative stress, and neurodegeneration. *European journal of biochemistry*, 267(16), 4904-4911.
- Scordino, M., Frinchi, M., Urone, G., Nuzzo, D., Mudò, G., Di Liberto, V. 2023. Manipulation of HSP70-SOD1 Expression Modulates SH-SY5Y Differentiation and Susceptibility to Oxidative Stress-Dependent Cell Damage : Involvement in Oxotremorine-M-Mediated Neuroprotective Effects. *Antioxidants*, 12(3), 687.
- Seagraves, N. L., Crews, P. 2005. Investigation of brominated tryptophan alkaloids from two thorectidae sponges: *Thorectandra* and *Smenospongia*. *Journal of natural products*, 68(10), 1484-1488.
- Seitkalieva, A. V., Menzorova, N. I., Rasskazov, V. A. 2016. Application of different enzyme assays and biomarkers for pollution monitoring of the marine environment. *Environmental monitoring and assessment*, 188, 1-13.
- Senthebane, D.A., Rowe, A., Thomford, N.E., Shipanga, H., Munro, D., Al Mazeedi, M.A., Almazayadi, H.A., Kallmeyer, K., Dandara, C., Pepper, M.S. Parker, M.I. 2017. 'The role of tumour microenvironment in chemoresistance: To survive, keep your enemies closer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), p.1586.
- Shafay, S. E., El-Sheekh, M., Bases, E., El-Shenody, R. 2021. Antioxidant, antidiabetic, anti-inflammatory and anticancer potential of some seaweed extracts. *Food Science and Technology*, 42, e20521.
- Shakirovich Dautov, S. 2020. The embryological and larval development of the sea urchin *Diadema savignyi* (Audouin,

- 1809) (Diadematoida: Diadematidae) from the South China Sea. *Marine Biology Research*, 16(3), 166-176.
- Shannon, E., Abu-Ghannam, N. 2016. Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of pharmacological mechanisms and applications. *Marine drugs*, 14(4), 81.
- Sharifian, S., Homaei, A., Kim, S. K., Satari, M. 2018. Production of newfound alkaline phosphatases from marine organisms with potential functions and industrial applications. *Process Biochemistry*, 64, 103-115.
- Sharlaimova, N., Shabelnikov, S., Bobkov, D., Martynova, M., Bystrova, O., Petukhova, O. 2021. Coelomocyte replenishment in adult *Asterias rubens*: the possible ways. *Cell and Tissue Research*, 383, 1043-1060.
- Sharma, P. P., Chonche, M. J., Mudhol, S., Muthukumar, S. P., Baskaran, V. 2023. Anti-inflammatory efficacy of brown seaweed (*Padina tetrastromatica*) in 3T3-L1 adipocytes and low-dose LPS induced inflammation in C57BL6 mice. *Algal Research*, 71, 103027.
- Sheffield, D. J., Harry, T., Smith, A. J., Rogers, L. J. 1992. Purification and characterization of the vanadium bromoperoxidase from the macroalga *Corallina officinalis*. *Phytochemistry*, 32(1), 21-26.
- Shen, M. 2019. The Evolution of Strategies for the Development of Novel Electrophilic Reagents and the Total Synthesis of Diverse Natural Products (Doctoral dissertation, The University of Chicago).
- Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L., Jin, B. 2022. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food chemistry*, 383, 132531.
- Shishido, K. 2013. Stereocontrolled total synthesis of natural products with characteristic molecular structures and biological activities. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 61(8), 781-798.
- Shoemaker, R. H. 2006. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews Cancer*, 6(10), 813-823.
- Sies, H., Belousov, V. V., Chandel, N. S., Davies, M. J., Jones, D. P., Mann, G. E., Winterbourn, C. 2022. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(7), 499-515.
- Silva, A., Silva, S. A., Carpena, M., Garcia-Oliveira, P., Gullón, P., Barroso, M. F., Simal-Gandara, J. 2020. Macroalgae as a source of valuable antimicrobial compounds: Extraction and applications. *Antibiotics*, 9(10), 642.
- Singh, M., Pandey, J. 2023. Alkaline phosphatase as a bio-indicator of phosphorus-eutrophy in freshwater ecosystems: A review. *International Journal of Sediment Research*, 38(3), 349-360.
- Sjögren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnürer, J., Kenne, L. 2003. Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Applied and environmental microbiology*, 69(12), 7554-7557.
- Smit, A. J. 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *Journal of Applied Phycology*, 16, 245-262.
- Smith, L. C., Arizza, V., Barela Hudgell, M. A., Barone, G., Bodnar, A. G., Buckley, K. M., Sutton, E. 2018. Echinodermata: the complex immune system in echinoderms. *Advances in comparative immunology*, 409-501.
- Solé, M., Baena, M., Arnau, S., Carrasson, M., Maynou, F., Cartes, J. E. 2010. Muscular cholinesterase activities and lipid peroxidation levels as biomarkers in several Mediterranean marine fish species and their relationship with ecological variables. *Environment international*, 36(2), 202-211.
- Sadoul, B., Geffroy, B. 2019. Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes. *Journal of Fish Biology*, 94(4), 540-555.
- Somero, G.N., 2020. The cellular stress response and temperature: Function, regulation, and evolution. *J. Exp. Zool. A Ecol. Integr. Physiol.* 333, 379-397.
- Song, S., Tan, J., Miao, Y., Li, M., Zhang, Q., 2017. Crosstalk of autophagy and apoptosis: Involvement of the dual role of autophagy under ER stress. *J. Cell Physiol.* 232, 2977-2984.
- Songaila, E., Augulis, R., Gelzinis, A., Butkus, V., Gall, A., Büchel, C., Valkunas, L. 2013. Ultrafast energy transfer from chlorophyll c 2 to chlorophyll a in fucoxanthin-chlorophyll protein complex. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 4(21), 3590-3595.
- Sousa, N. A., Barros, F. C. N., Araújo, T. S., Costa, D. S., Souza, L. K. M., Sousa, F. B. M., Medeiros, J. V. R. 2016. The efficacy of a sulphated polysaccharide fraction from *Hypnea musciformis* against diarrhea in rodents. *International journal of biological macromolecules*, 86, 865-875.
- Spiering, M. J. 2015. Primer on the immune system. *Alcohol research: current reviews*, 37(2), 171.
- Stefenoni, H. A., Räisänen, S. E., Cueva, S. F., Wasson, D. E., Lage, C. F. A., Melgar, A., Hristov, A. N. 2021. Effects of the macroalga *Asparagopsis taxiformis* and oregano leaves on methane emission, rumen fermentation, and lactational

- performance of dairy cows. *Journal of dairy science*, 104(4), 4157-4173.
- Steinmeyer, J. Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Res. Ther.* 2000, 2, 379–385.
- Streftaris, N.S.; Zenetos, A. Alien marine species in the Mediterranean - the 100 ‘Worst Invasives’ and their impact. *Mediterr. Mar. Sci.* 2006, 7, 87–118.
- Subbiah, V., Xie, C., Dunshea, F. R., Barrow, C. J., Suleria, H. A. 2023. The quest for phenolic compounds from seaweed: Nutrition, biological activities, and applications. *Food Reviews International*, 39(8), 5786-5813.
- Subramoniam, A., Asha, V. V., Nair, S. A., Sasidharan, S. P., Sureshkumar, P. K., Rajendran, K. N., Ramalingam, K. 2012. Chlorophyll revisited: anti-inflammatory activities of chlorophyll a and inhibition of expression of TNF- $\alpha$  gene by the same. *Inflammation*, 35, 959-966.
- Sun, C. Q., O'Connor, C. J., Robertson, A. M. 2003. Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 36(1-2), 9-17.
- Susanto E., Suhaeli A., Abe M., 2016 Lipids, fatty acids, and fucoxanthin content from temperate and tropical brown seaweeds. *Aquatic Procedia* 7:66-75.
- Suwanmanee, G., Tantrawatpan, C., Kheolamai, P., Paraoan, L., Manochantr, S. 2023. Fucoxanthin diminishes oxidative stress damage in human placenta-derived mesenchymal stem cells through the PI3K/Akt/Nrf-2 pathway. *Scientific reports*, 13(1), 22974.
- Swaminathan, B., Gerner-Smidt, P. 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and infection*, 9(10), 1236-1243.
- Tahseen, Q. 2009. Coelomocytes: biology and possible immune functions in invertebrates with special remarks on nematodes. *International Journal of Zoology*, 2009.
- Tanaka, T., Shnimizu, M., Moriwaki, H. 2012. Cancer chemoprevention by caroteno. *Molecules*, 17(3), 3202-3242.
- Tang Soon Yew, T. S., Halliwell, B. 2010. Medicinal plants and antioxidants: what do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies?
- Tasdemir, E., Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Criollo, A., Vitale, I., Hangen, E., Kroemer, G. 2008. Methods for assessing autophagy and autophagic cell death. *Autophagosome and phagosome*, 29-76.
- Technau, U., Scholz, C. B. 2003. Origin and evolution of endoderm and mesoderm. *International Journal of Developmental Biology*, 47(7-8), 531-539.
- Terasaki, M., Hirose, A., Narayan, B., Baba, Y., Kawagoe, C., Yasui, H., Miyashita, K. 2009. Evaluation of recoverable functional lipid components of several brown seaweeds (Phaeophyta) from Japan with special reference to fucoxanthin and fucosterol contents 1. *Journal of phycology*, 45(4), 974-980.
- Terasaki, M., Kubota, A., Kojima, H., Maeda, H., Miyashita, K., Kawagoe, C., Tanaka, T. 2021. Fucoxanthin and colorectal cancer prevention. *Cancers*, 13(10), 2379.
- Terwilliger, D. P., Buckley, K. M., Brockton, V., Ritter, N. J., Smith, L. C. 2007. Distinctive expression patterns of 185/333 genes in the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*: an unexpectedly diverse family of transcripts in response to LPS,  $\beta$ -1, 3-glucan, and dsRNA. *BMC Molecular Biology*. 8(1), 16.
- Thapa, H. R., Lin, Z., Yi, D., Smith, J. E., Schmidt, E. W., Agarwal, V. 2020. Genetic and biochemical reconstitution of bromoform biosynthesis in *Asparagopsis* lends insights into seaweed reactive oxygen species enzymology. *ACS chemical biology*, 15(6), 1662-1670.
- Theiler, R., Cook, J. C., Hager, L. P., Siuda, J. F. 1978. Halohydrocarbon synthesis by bromoperoxidase. *Science*, 202(4372), 1094-1096.
- Thinakaran, T., Balamurugan, M., Sivakumar, K. 2012. Screening of phytochemical constituents qualitatively and quantitatively certain seaweeds from Gulf of Mannar biosphere reserve.
- Todd, E., 1996. Epidemiology of foodborne diseases: A worldwide review. *World health statistics quarterly. Quarterly World Health Statistics*, 50: 30-50.
- Torres-Duarte, C., Vines, C. A., Fairbairn, E., Cherr, G. N. 2019. Methods for toxicology studies in echinoderm embryos and larvae. *Methods in Cell Biology*, 150, 411-426.
- Tort, L. 2011. Stress and immune modulation in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(12), 1366-1375.
- Trica, B., Delattre, C., Gros, F., Ursu, A. V., Dobre, T., Djelveh, G., Oancea, F. 2019. Extraction and characterization of alginate from an edible brown seaweed (*Cystoseira barbata*) harvested in the Romanian Black Sea. *Marine drugs*, 17(7), 405.

- Turan, V., Oktay, K. 2014. Sexual and fertility adverse effects associated with chemotherapy treatment in women. *Expert opinion on drug safety*, 13(6), 775-783.
- Tziveleka, L. A., Tammam, M. A., Tzakou, O., Roussis, V., Ioannou, E. 2021. Metabolites with antioxidant activity from marine macroalgae. *Antioxidants*, 10(9), 1431.
- Ugokwe, C. U., Awobode, H. O. 2015. Alterations in water quality, enzyme levels and haematology of oreochromis niloticus (Nile tilapia) from River Ogun at Abeokuta Nigeria. *International Research Journal of Environmental Sciences*, 4(10), 1-9.
- Unnikrishnan, P. S., Suthindhiran, K., Jayasri, M. A. 2023. Effect of marine red algal (*Portieria hornemannii*) extracts on starch digestion rate and its possible role in diabetes management. *Aquaculture International*, 31(6), 3239-3256.
- Vacquier, V. D. 2011. Laboratory on sea urchin fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, 78(8), 553-564.
- Val, A., Platas, G., Basilio, A., Cabello, A., Gorrochategui, J., Suay, I., Peláez, F. 2001. Screening of antimicrobial activities in red, green, and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *International Microbiology*, 4, 35-40.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 64(2), 178-189.
- Van Ginneken, V. J., Helsper, J. P., de Visser, W., van Keulen, H., Brandenburg, W. A. 2011. Polyunsaturated fatty acids in various macroalgal species from north Atlantic and tropical seas. *Lipids in health and disease*, 10(1), 1-8.
- Vandepitte, J. 2003. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. World Health Organization.
- Varrella, S., Romano, G., Ianora, A., Bentley, M. G., Ruocco, N., Costantini, M., 2014. Molecular response to toxic diatom-derived aldehydes in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Mar. drugs* 12(4), 2089-2113.
- Vazzana, M., Mauro, M., Ceraulo, M., Dioguardi, M., Papale, E., Mazzola, S., Buscaino, G. 2020. Underwater high frequency noise: Biological responses in sea urchin *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology*, 242, 110650.
- Venditti, P., Gravato, C., Napolitano, G. 2022. Environmental pollutant and oxidative stress in terrestrial and aquatic organisms. *Frontiers in Physiology*, 13, 1073582.
- Verburg-Van Kemenade, B. L., Stolte, E. H., Metz, J. R., Chadzinska, M. 2009. Neuroendocrine-immune interactions in teleost fish. *Fish physiology*, 28, 313-364.
- Vergés, A., Alcoverro, T., Ballesteros, E. 2009. Role of fish herbivory in structuring the vertical distribution of canopy algae *Cystoseira* spp. in the Mediterranean Sea. *Marine ecology progress series*, 375, 1-11.
- Verma, S. K., Nisha, K., Panda, P. K., Patel, P., Kumari, P., Mallick, M. A., Das, B. 2020. Green synthesized MgO nanoparticles infer biocompatibility by reducing *in vivo* molecular nanotoxicity in embryonic zebrafish through arginine interaction elicited apoptosis. *Science of the total environment*, 713, 136521.
- Vidavsky, N., Addadi, S., Mahamid, J., Shimoni, E., Ben-Ezra, D., Shpigel, M., Addadi, L. 2014. Initial stages of calcium uptake and mineral deposition in sea urchin embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), 39-44.
- Vitale, F., Genovese, G., Bruno, F., Castelli, G., Piazza, M., Migliazzo, A., Morabito, M. 2015. Effectiveness of red alga *Asparagopsis taxiformis* extracts against *Leishmania infantum*. *Open life sciences*, 10(1).
- Vladkova, T., Georgieva, N., Staneva, A., Gospodinova, D. 2022. Recent progress in antioxidant active substances from marine biota. *Antioxidants*, 11(3), 439.
- Voronina, E., Wessel, G.M., 2001. Apoptosis in sea urchin oocytes, eggs, and early embryos. *Mol.Reprod. Dev.* 60, 553–561.
- Vranová, E., Coman, D., Gruissem, W. 2013. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annual review of plant biology*, 64, 665-700.
- Wagner, K. H., Elmadfa, I. 2003. Biological relevance of terpenoids: overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. *Annals of Nutrition and metabolism*, 47(3-4), 95-106.
- Wang, F., Yang, H., Gao, F., Liu, G. 2008. Effects of acute temperature or salinity stress on the immune response in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 151(4), 491-498.
- Wang, D.; DuBois, R.N. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene* 2010, 29, 781–788.
- Wang, J., Hu, S., Nie, S., Yu, Q., Xie, M. 2016. Reviews on mechanisms of *in vitro* antioxidant activity of polysaccharides. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- Wang, Z., Fan, X., Li, Z., Guo, L., Ren, Y., Li, Q. 2023. Comparative analysis for immune response of coelomic fluid from coelom and polian vesicle in *Apostichopus japonicus* to *Vibrio splendidus* infection. *Fish and Shellfish Immunology*

- Reports, 4, 100074.
- Wangensteen, O. S., Turon, X., García-Cisneros, A., Recasens, M., Romero, J., Palacín, C. 2011. A wolf in sheep's clothing: Carnivory in dominant sea urchins in the Mediterranean. *Marine Ecology Progress Series*, 441, 117–128.
- Wangensteen, O. S., Turon, X., Pérez-Portela, R., Palacín, C. 2012. Natural or naturalized? Phylogeography suggests that the abundant sea urchin *Arbacia lixula* is a recent colonizer of the Mediterranean. *PLoS ONE*, 7(9), 1–16.
- Wangensteen, O. S., Turon, X., Casso, M., Palacín, C. 2013. The reproductive cycle of the sea urchin *Arbacia lixula* in northwest Mediterranean: potential influence of temperature and photoperiod. *Marine Biology*, 160, 3157–3168.
- Watkins, B. A., Li, Y., Allen, K. G., Hoffmann, W. E., Seifert, M. F. 2000. Dietary ratio of (n-6)/(n-3) polyunsaturated fatty acids alters the fatty acid composition of bone compartments and biomarkers of bone formation in rats. *The Journal of nutrition*, 130(9), 2274–2284.
- Watson, S.B., Satchwill, T., and McCauley, E. 2001. Under-ice blooms and source-water odour in a nutrient-poor reservoir: biological, ecological, and applied perspectives. *Freshwater Biol.* 46:1–15.
- Watson, S.B. 2003. Cyanobacterial and eukaryotic algal odour compounds: signals or by-products? A review of their biological activity. *Phycologia* 42:332–350.
- Wei, J., Mou, C., Bao, Y., Xie, Y., Jin, H., Shen, H., Cui, W. 2021. Fucoxanthin alleviates methamphetamine-induced neurotoxicity possibly via the inhibition of interaction between Keap1 and Nrf2. *Journal of Functional Foods*, 86, 104713.
- Wever, R., Plat, H., de Boer, E. 1985. Isolation procedure and some properties of the bromoperoxidase from the seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 830(2), 181–186.
- Wheeler, J. D. 2016. Behavioral responses of invertebrate larvae to water column cues (Doctoral dissertation, Massachusetts Institute of Technology).
- Wheelock, C. E., Phillips, B. M., Anderson, B. S., Miller, J. L., Miller, M. J., Hammock, B. D. 2008. Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 195(11).
- Wichard, T., Poulet, S., Halsband-Lenk, C., Albaina, A., Harris, R., Liu, D., and Pohnert, G. 2005b. Survey of the chemical defense potential of diatoms: screening of fifty-one species for  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\lambda$ ,  $\delta$  unsaturated aldehydes. *J. Chem. Ecol.* 31:949–958.
- Williams, D. H. C., Anderson, D. T. 1975. The reproductive system, embryonic development, larval development, and metamorphosis of the sea urchin *Heliocidaris erythrogramma* (Val.) (Echinoidea: Echinometridae). *Australian Journal of Zoology*, 23(3), 371–403.
- Wingfield, J. C. 2013. Ecological processes and the ecology of stress: the impacts of abiotic environmental factors. *Functional Ecology*, 27(1), 37–44.
- Winter, J. M., Moore, B. S. 2009. Exploring the chemistry and biology of vanadium-dependent haloperoxidases. *Journal of Biological Chemistry*, 284(28), 18577–18581.
- Wolf, P. L., Horwitz, J. P., Vazquez, J., Chua, J., Pak, M. S. Y., von der Muehll, E. 1967. The indigogenic reaction for histochemical demonstration of alkaline and acid phosphatase. *Experientia*, 23, 183–185.
- Woolard, F. X., Moore, R. E., Roller, P. P. 1976. Halogenated acetamides, but-3-en-2-ols, and isopropanols from *Asparagopsis taxiformis* (Delile) Trev. *Tetrahedron*, 32(22), 2843–2846.
- Xian, J. A., Miao, Y. T., Li, B., Guo, H., Wang, A. L. 2013. Apoptosis of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) haemocytes induced by *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 164(2), 301–306.
- Xu, Z., Cao, J., Qin, X., Qiu, W., Mei, J., Xie, J. 2021. Toxic effects on bioaccumulation, hematological parameters, oxidative stress, immune responses, and tissue structure in fish exposed to ammonia nitrogen: a review. *Animals*, 11(11), 3304.
- Yaashikaa, P. R., Kumar, P. S., Jeevanantham, S., Saravanan, R. 2022. A review on bioremediation approach for heavy metal detoxification and accumulation in plants. *Environmental Pollution*, 301, 119035.
- Yadav, M., Sehrawat, N., Singh, M., Upadhyay, S. K., Aggarwal, D., Sharma, A. K. 2020. Cardioprotective and hepatoprotective potential of citrus flavonoid naringin: Status and future perspectives for health benefits. *Asian J. Biol. Life Sci*, 9(1), 1–5.
- Yamine, A., Nury, T., Vejux, A., Latruffe, N., Vervandier-Fasseur, D., Samadi, M., Lizard, G. 2020. Prevention of 7-ketocholesterol-induced overproduction of reactive oxygen species, mitochondrial dysfunction, and cell death with major nutrients (polyphenols,  $\omega$ 3 and  $\omega$ 9 unsaturated fatty acids) of the Mediterranean diet on N2a neuronal cells. *Molecules*,

- 25(10), 2296.
- Ye, Y.; Wu, W.; Shin, V.; Bruce, I.; Wong, B.; Cho, C. Dual inhibition of 5-LOX and COX-2 suppresses colon cancer formation promoted by cigarette smoke. *Carcinogenesis* 2005, 26, 827–834.
- Yegdaneh, A., Ghannadi, A., Dayani, L. 2016. Chemical constituents and biological activities of two Iranian *Cystoseira* species. *Research in pharmaceutical sciences*, 11(4), 311-317.
- Yoon, B. K., Jackman, J. A., Valle-González, E. R., Cho, N. J. 2018. Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: biological activities, experimental testing, and therapeutic applications. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1114.
- Young, D. N., McConnell, O. J., Fenical, W. 1981. *In vivo* biosynthesis of tribromoheptene oxide in *Bonnemaisonia nootkana*. *Phytochemistry*, 20(10), 2335-2337.
- Yücel, T. B. 2022. Comparison of volatile chemical components of *Cystoseira crinita* Duby by hydrodistillation (HD) and solid-phase microextraction (SPME) methods and antimicrobial and scolicidal activities of essential oil and extracts. *Turkish Journal of Chemistry*, 46(2), 378-393.
- Yui, M. A., and Bayne, C. J. 1983. Echinoderm immunology: bacterial clearance by the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *The Biological Bulletin*, 165(2), 473-486.
- Zanolla, M., Andreakis, N. 2016. Towards an integrative phylogeography of invasive marine seaweeds, based on multiple lines of evidence. *Seaweed Phylogeography: Adaptation and Evolution of Seaweeds under Environmental Change*, 187-207.
- Zarekarizi, A., Hoffmann, L., Burritt, D. 2019. Approaches for the sustainable production of fucoxanthin, a xanthophyll with potential health benefits. *Journal of applied phycology*, 31, 281-299.
- Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., Roca, M. 2019. Catabolism and bioactive properties of chlorophylls. *Current Opinion in Food Science*, 26, 94-100.
- Zhang, W., Lim, H. C., Taguchi, M., Tsao, S., Szafraniec, J., Movaghar, B., Tidrow, M. 2005. High performance InAs quantum dot infrared photodetectors (QDIP) on InP by MOCVD. In *Quantum Sensing and Nanophotonic Devices II* (Vol. 5732, pp. 326-333). SPIE.
- Zhang, H., Tang, Y., Zhang, Y., Zhang, S., Qu, J., Wang, X., Liu, Z. 2015. Fucoxanthin: A promising medicinal and nutritional ingredient. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2015.
- Zhang, Q. F., Li, Y. W., Liu, Z. H., Chen, Q. L. 2016. Reproductive toxicity of inorganic mercury exposure in adult zebrafish: Histological damage, oxidative stress, and alterations of sex hormone and gene expression in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Aquatic Toxicology*, 177, 417-424.
- Zheng, H., Zhao, Y., Guo, L. 2022. A bioactive substance derived from brown seaweeds: Phlorotannins. *Marine Drugs*, 20(12), 742.
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G. 2008. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica chimica acta*, 606(2), 135-150.
- Zhou, C., Sun, H., Zheng, C., Gao, J., Fu, Q., Hu, N., Shao, X., Zhou, Y., Xiong, J., Nie, K., Zhou, H., Shen, L., Fang, H., Lyu, J., 2018. Oncogenic HSP 60 regulates mitochondrial oxidative phosphorylation to support Erk1/2 activation during pancreatic cancer cell growth. *Cell Death Dis.* 9(2), 161.
- Zubia M, Fabre MS, Kerjean V, Lann KL, StigerPouvreau V, Fauchon M, Deslandes E. Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chem.* 2009;116(3): 693–701.

## RINGRAZIAMENTI

Esprimo la mia profonda gratitudine a tutte le persone che mi hanno sostenuto e incoraggiato lungo il percorso di questa tesi. Innanzitutto, vorrei ringraziare il mio Tutor V. Arizza e Co-Tutor A. Palumbo Piccionello i quali siete stati guida e ispirazione durante tutto mio percorso di dottorato. Desidero esprimere la mia più sincera gratitudine per il supporto e la guida che mi ha fornito durante il mio percorso di dottorato al coordinatore G. Pitarresi, la sua competenza e dedizione sono state fondamentali per il mio percorso accademico. Un ringraziamento va a tutti coloro con cui ho collaborato in particolare, la Prof.ssa Vazzana per esserci sempre stata nei momenti di bisogno accademici e personali. Alla Dott.ssa M. Mauro per avere contribuito alla mia crescita accademica e personale durante questo lungo percorso, e alla Dott.ssa C. Martino per l'importante contributo dato alla mia ricerca. Un ringraziamento al gruppo di ricerca di malta e in particolare al Prof. Alan Deidun il quale è stato il mio supervisore durante il periodo all'estero, ma anche la mia guida, collega e amico. Ringraziamento speciale va anche ai miei genitori e alla mia famiglia per il loro sostegno costante. Sono la mia fonte di ispirazione e di forza, e non avrei potuto raggiungere questo traguardo senza di loro. Vorrei dedicare un ringraziamento speciale alla mia amata Stefania. La tua presenza costante e il tuo sostegno durante questo percorso di ricerca sono stati fondamentali per il mio successo. Infine, desidero ringraziare tutte le persone che hanno partecipato alla mia ricerca e coloro che hanno contribuito in qualsiasi modo alla realizzazione di questa tesi: il Prof. L. Settanni, la Prof.ssa M.G. Zizzo, il Prof. C. Luparello, Prof. A. Attanzio, Dott. R. Chiarelli, Dott.ssa M. Frinchi, Dott.ssa C. Rizzo, Dott. I. Restivo.

Grazie di cuore a tutti coloro che hanno reso possibile questo traguardo.

*ROSARIO*

*“Lo scienziato non è l'uomo che fornisce le vere risposte; è quello che pone le vere domande”*

*Claude Lévi-Strauss*