

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS

GISELLE CRISTINA SILVA

**BIOATIVIDADE DE EXTRATOS ALGAIS FRENTE A BACTÉRIAS COM FATORES
DE VIRULÊNCIA, RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS**

FORTALEZA

2012

GISELLE CRISTINA SILVA

**BIOATIVIDADE DE EXTRATOS ALGAIS FRENTE A BACTÉRIAS COM FATORES
DE VIRULÊNCIA, RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Utilização e manejo de ecossistemas marinhos e estuarinos

Orientadora: Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira.

FORTALEZA

2012

GISELLE CRISTINA SILVA

**BIOATIVIDADE DE EXTRATOS ALGAIS FRENTE À BACTÉRIAS COM FATORES
DE VIRULÊNCIA, RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS**

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Utilização e manejo de ecossistemas marinhos e estuarinos

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Oscarina Viana Sousa

Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Jair Mafezoli

Universidade Federal do Ceará

Aos meus pais, Maria Socorro e José Edson,
por sempre acreditarem e incentivarem à
minha vida acadêmica, e por tudo que
representam na minha vida.

Ao Prof. Gustavo (*in memoriam*), certamente o
maior mestre que tive.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi fruto da contribuição de pessoas especiais que acreditaram na realização deste projeto.

A Deus pela saúde que me concedeste, persistência, força e determinação ao longo desta caminhada.

Aos meus pais, José Edson e Maria Socorro, por estarem sempre de prontidão nos bons e nos momentos difíceis da minha vida, transmitindo-me através de pequenos gestos, segurança, apoio e amor.

À minha orientadora, Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira, que com tanta presteza deu-me a oportunidade de realizar este trabalho, também pela paciência e ensinamentos direcionados nessa jornada.

Ao Prof. Dr. Gustavo Vieira (*in memoriam*) que sempre me estimulou a dar este grande passo, por sua grande contribuição, indescritível, na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Oscarina Viana pelos ensinamentos, esclarecimento de dúvidas, por ajudar-me na realização dos experimentos (coleta) e apoio ao longo deste período.

Aos meus irmãos, Michelle Cristina e Edson Neto, pelo incentivo, apoio, compreensão e amizade, e por sempre torcerem e acreditarem nesta conquista.

Ao meu namorado, Fernando, pelo amor, companheirismo, pela paciência diária ao longo desta trajetória. Amo você!

Ao professor Jair Mafezoli por ter aceitado participar da minha banca e pela ajuda nos experimentos.

Ao professor Geraldo pela ajuda nos experimentos.

À toda minha família, em especial a tia Mariinha e vó Filó pela força e amor incondicional.

Aos cunhados, Nilson e Duda, pela força, carinho e amizade.

Ao grande amigo Jackson, pela amizade verdadeira, pela confiança e por tantos momentos de aflição e descontração que compartilhamos.

À querida amiga Elisandra pela sincera amizade e incentivo.

À companheira de laboratório Renata, pelos ensinamentos e ajuda de sempre.

À Edirsana, pela confecção dos fluxogramas, apoio e amizade.

Ao Pedro, do laboratório de Macroalgas, pela prontidão na identificação dos espécimes algais.

Ao Daniel pela ajuda na obtenção das algas, a quem algumas vezes recorri e tão logo fui atendida.

À Cristiane pelo apoio e amizade, e seu esposo André pela ajuda na coleta.

Aos amigos do laboratório de Microbiologia, Gleire, Camila-CE, Camila-PI, Raíza, Ludmila e Rafael pelos momentos de conversas e descontração.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de mestrado.

RESUMO

Bactérias do gênero *Vibrio* acometem a saúde de organismos aquáticos causando sérios prejuízos econômicos a aquicultores e problemas na saúde dos consumidores. Determinadas espécies são consideradas potencialmente patogênicas por possuírem fatores de virulência. Em virtude dos problemas causados por vibrioses, o uso de antimicrobianos em cultivo aquático tornou-se constante, e determinante na seleção de cepas resistentes. Com o aparecimento cada vez maior de bactérias resistentes a antimicrobianos, surgiu o interesse pela busca de produtos naturais com potencial bioativo. As algas tornaram-se alvo de pesquisas por serem responsáveis por um amplo espectro de atividades biológicas, antioxidantes, antifúngicos, aglutinantes, além de antibacterianos. Deste modo, este trabalho objetivou investigar a atividade antibacteriana de extratos hexânicos, metanólicos, acetônicos e etanólicos de macroalgas das classes Chlorophyta, Phaeophyta e Rhodophyta frente a víbrios com fatores de virulência, resistentes a antimicrobianos. Esses víbrios foram isolados de ostras selvagens comercializadas em uma feira de pescado, e de hemolinfa de camarão, além de cepas padrões ATCC e IOC e foram testados através de antibiograma pelo método de difusão em disco. Concluiu-se que: o álcool etílico foi o solvente mais eficaz na extração do composto ativo capaz de inibir o crescimento bacteriano; a *Padina gymnospora* foi a macroalga que apresentou a maior capacidade inibitória das espécies de *Vibrio* (57%) e as maiores zonas de inibição, seguida pela *Ulva fasciata* (40%) e por último a *Hypnea musciformes* (30%); O menor valor de CIM encontrado foi com o extrato etanólico da *Padina gymnospora* com 512 µg/ mL contra *V. alginolyticus*. Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que os extratos de macroalgas marinhas poderiam servir como uma fonte potencial de produtos naturais biologicamente ativos para aplicação na indústria.

Palavras-chave: *Vibrio*, macroalgas, atividade antibacteriana

ABSTRACT

Infection of aquatic organisms by *Vibrios* can lead to serious economic losses for farmers and expose consumers to serious health risks. Some *Vibrio* species carry factors of virulence making them potentially pathogenic to humans. The consequent widespread use of antibiotics by farmers has led to the selection of resistant strains in the environment. Due to the increasing incidence of bacteria resistant to antibiotics, much effort is currently invested in identifying natural products with bioactive potential. Macroalgae have been studied for their ample spectrum of biological, antioxidant, antifungal and agglutinating activities. The purpose of this study was to evaluate the antibacterial activity of hexane, methanol, acetone and ethanol-based extracts of Chlorophyta, Phaeophyta and Rhodophyta macroalgae against virulent *Vibrio* strains resistant to antibiotics. The microorganisms used in the study included *Vibrio* strains isolated from wild oysters purchased at a fish market, strains from shrimp hemolymph and the standard strains ATCC and IOC. The strains were challenged with extracts using the disk diffusion method. Ethanol was the most efficient solvent. *Padina gymnospora* inhibited the largest number of *Vibrio* species (57%) and produced the largest inhibition halos, followed by *Ulva fasciata* (40%) and *Hypnea musciformes* (30%). The smallest minimum inhibitory concentration was observed for ethanolic extracts of *Padina gymnospora* (512 µg/mL against *Vibrio alginolyticus*). The results suggest extracts of marine macroalgae may represent a potential source of natural biologically active products for use in the industry.

Key words: *Vibrio*, seaweeds, antibacterial activity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Macroalgas marinhas verdes estudadas: A - <i>Caulerpa prolifera</i> ; B - <i>Ulva fasciata</i>	21
Figura 2	Macroalgas marinhas vermelhas estudadas: A - <i>Laurencia</i> sp; B - <i>Gracilaria dominigensis</i>	23
Figura 3	Macroalga marinha vermelha <i>Hypnea musciformis</i>	24
Figura 4	Macroalga marinha marron <i>Padina gymnospora</i>	25
Figura 5	Fluxograma da técnica de Gram	35
Figura 6	Preparação dos discos com o extrato algal	37
Figura 7	Controle negativo (disco embebido com solvente) e positivo (disco de ciprofloxacina 5 µg) em placa contendo <i>V. parahaemolyticus</i>	38
Figura 8	Fluxograma do teste de antibiograma pelo método de difusão em disco	39
Figura 9	Halos de inibição dos discos de <i>Padina gymnospora</i> frente a cepa de <i>V. xiii</i> e <i>V. cholerae</i> isolados da hemolinfa do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	43
Figura 10	Halos de inibição dos discos de <i>H. musciformis</i> frente às cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> e <i>V. neptunis</i> isolados da hemolinfa do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	46
Figura 11	Halos de inibição dos discos de <i>U. fasciata</i> frente às cepas de <i>V. parahaemolyticus</i> e <i>V. alginolyticus</i> isolados da hemolinfa do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Local e data das coletas das espécies de macroalgas utilizadas no teste da atividade antibacteriana. 36
- Tabela 2 - Tamanho médio dos halos de inibição dos extratos etanólicos da alga *Padina gymnospora* frente a 10 cepas padrões ATCC e IOC de diferentes gêneros e 20 cepas de *Vibrio* isoladas de hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* (10) e de ostras *Crassostrea rhizophorae* (10) 42
- Tabela 3 - Tamanhos médios dos halos de inibição dos extratos etanólicos da alga *Hypnea musciformis* frente a 10 cepas padrões ATCC e IOC de diferentes gêneros e 20 cepas de *Vibrio* isoladas de hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* (10) e de ostras *Crassostrea rhizophorae* (10) 44
- Tabela 4 - Tamanhos médios dos halos de inibição dos extratos etanólicos da alga *Ulva fasciata* frente a 10 cepas padrões ATCC e IOC de diferentes gêneros e 20 cepas de *Vibrio* isoladas de hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* (10) e de ostras *Crassostrea rhizophorae* (10) 47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Ampicilina
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Aztreonam
BHI	Brain Heart Infusion
BP	Baird Parker
CAS	Caseínase
CFL	Cefalotina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
CP	<i>Caulerpa prolifera</i>
CRO	Ceftriaxona
C	Cromossomal
EAM	Agar Eosina Azul de Metileno
ELAS	Elastase
EST	Estreptomicina
FOSF	Fosfolipase
GEL	Gelatinase
GEN	Gentamicina
GM	<i>Gracilaria domigensis</i>
HE	ágar Entérico Hektoen
HM	<i>Hypnea musciformes</i>
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPM	Imipenem
K	Kanagawa-positivo
LIP	Lipase
LA	<i>Laurencia sp</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NAL	Ácido nalidíxico
NIT	Nitrofurantoína
PEN	Penicilina

PG	<i>Padina gymnospora</i>
P	Plasmidial
p/v	Relação peso-volume
S	Sensível
SUT	Sulfazotrim
TCBS	Tiosulfato Citrato Bile Sacarose
TET	Tetraciclina
TSA	Agar Triptona Soja
TSB	Caldo Trypticase Soja
UR	Urease
UF	<i>Ulva fasciata</i>
V/V	Relação volume-volume
Vph	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

mL	Militro
mm	Milímetro
μg	Micrograma
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Objetivo geral	18
1.2	Objetivos específicos	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Algas	19
2.1.1	Algas verdes	20
2.1.2	Algas vermelhas	22
2.1.3	Algas pardas	25
2.2	Atividade antibacteriana de macroalgas marinhas	26
2.3	<i>Vibrio spp</i>	29
2.4	Resistência bacteriana a antimicrobianos	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	Origem das cepas	32
3.2	Pureza das cepas	32
3.3	Coleta, Identificação e Secagem das algas	34
3.4	Preparo dos extratos	36
3.5	Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos algais	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

A busca por compostos naturais utilizados como fontes alternativas ao emprego de antimicrobianos sintéticos vem sendo relatada, e alguns vegetais têm sido alvo dessa investigação (AO *et al.*, 2008; NAIR; CHANDA, 2007; PEIXOTO *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2010;). Organismos marinhos também vêm sendo estudados como potenciais promissores de agentes farmacêuticos, nesse sentido, destaca-se o relevante potencial antimicrobiano de macroalgas frente a bactérias patogênicas (CHIHEB *et al.*, 2009; KOLANJINATHAN; STELLA, 2009).

De acordo com Pádua *et al.* (2004), as macroalgas marinhas são organismos pluricelulares, eucariontes, autótrofos, sem sistema vascular e podem ser classificados em três grupos de acordo com a coloração: as clorofíceas (verdes), rodofíceas (vermelhas) e feofíceas (marrons). Estes organismos são cosmopolitas, portanto encontram-se distribuídos em ambientes marinhos, corpos de água doce, solos, rochas, sobre a neve e superfície de vegetais; desde que haja luz e umidade suficientes (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

A eficiência antibacteriana de macroalgas marinhas foi reportada por Ríos *et al.* (2009) que destacaram a atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A necessidade do desenvolvimento de novas alternativas para o uso de antimicrobianos sintéticos tem revelado o potencial de compostos bioativos oriundos de algas do nordeste brasileiro (LIMA-FILHO *et al.*, 2002; PINHEIRO-VIEIRA; CALAND-NORONHA, 1971).

Um amplo espectro de atividades biológicas diz respeito às macroalgas, além da atividade antimicrobiana, destacando-se: atividade antioxidante (RAYMUNDO *et al.*, 2004; SILVA, 2009;), antifúngica (FELÍCIO *et al.*, 2010; STEIN *et al.*, 2011), aglutinante (CHU *et al.*, 2007), capacidade de remover teores de chumbo de efluentes aquosos (CALADO *et al.*, 2003), utilização como suplemento para animais, incluindo humanos (HERNÁNDEZ-CARMONA *et al.*, 2009) e ingredientes para ração de animais aquáticos cultivados (SILVA, 2005).

A *Ulva fasciata*, por exemplo, proporcionou redução da severidade da antracnose do feijoeiro, demonstrando um efeito residual com redução de 22% contra essa doença (ABREU *et al.*, 2008). Desta forma, as macroalgas marinhas despontam com um vasto potencial biotecnológico sendo o motivo de pesquisas com a finalidade de combater

microrganismos oportunistas que atacam os cultivos aquáticos e causam perdas econômicas a nível mundial (RIVEROLL, 2009).

Bactérias do gênero *Vibrio* desempenham papéis importantes na atividade da aquicultura marinha, uma vez que representantes com potencial patogênico para os organismos aquáticos, bem como para os humanos, figuram nesses ambientes.

Ambientes aquáticos, muitas vezes, representam prováveis reservatórios para os patógenos oportunistas (AUSTIN; ZHANG, 2006; KAHLA-NAKBI *et al.*, 2007). Nesse sentido, determinadas espécies de *Vibrio* possuem fatores de virulência, o que as tornam potencialmente patogênicas, além de, muitas vezes, resistentes a antimicrobianos.

As bactérias patogênicas do gênero *Vibrio*, em particular as espécies de *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* são as principais causadoras de gastroenterite e em alguns casos, septicemia. Elas são patogênicas aos seres humanos, acarretando variadas complicações à saúde, que podem ir desde uma diarreia autolimitante a casos de óbito por septicemia (RIBEIRO, 2005). Muitas das enfermidades são ocasionadas pela ingestão de mariscos e crustáceos contaminados, sem cocção (MASINI *et al.*, 2007; OTTAVIANI *et al.*, 2005).

Em virtude dos prejuízos causados aos aquicultores, devido ao ataque de alguns microrganismos, muitos utilizam antimicrobianos para inibir e até mesmo para prevenir a ação de bactérias oportunistas. No entanto, o uso excessivo e inadequado dessas drogas contribui para a resistência bacteriana, através de pressão seletiva, e a permanência das substâncias nos efluentes do ambiente de cultivo e de resíduos nos tecidos dos organismos cultivados, comprometem a qualidade do alimento, podendo prejudicar a saúde do consumidor (FAO, 2010; MIRANDA; ZEMELMAN, 2002; VIEIRA *et al.*, 2008).

O isolamento de cepas multirresistentes oriundas do cultivo de animais aquáticos e de ostras comercializadas para consumo *in natura* é muito comum, e representa um risco para a saúde pública e o meio ambiente, motivo de preocupação por conta da possível transferência de bactérias resistentes para humanos que consomem esses produtos (AKINBOWALE *et al.*, 2006; BARROS *et al.*, 2005).

Considerando que a vibriose é uma das doenças que mais afeta a produção de crustáceos e mariscos em todo o mundo, e que o uso de antimicrobianos sintéticos na aquicultura pode contribuir para a seleção de bactérias resistentes, e levando-se em consideração a abundância de algas do litoral do nordeste brasileiro é que foi idealizado este projeto.

1.1 Objetivo geral

Investigar a presença de atividade antibacteriana em extratos de macroalgas das classes Chlorophyta, Phaeophyta e Rhodophyta frente a estirpes de vbrios expressando fatores de virulência e marcos de resistência a antimicrobianos comerciais, isolados de ostras selvagens, comercializadas em uma feira de pescador, e de hemolinfa de camarão.

1.2 Objetivos específicos

- Preparar extratos de macroalgas utilizando os solventes: hexano, álcool etílico, metanol e acetona;
- Testar a atividade bactericida dos extratos de macroalgas através do teste de difusão em disco;
- Determinar o melhor solvente para extrao de substâncias bioativas;
- Determinar a concentrao inibitória mínima dos extratos algais.
- Testar os solventes hexano, álcool etílico, metanol e acetona (controles negativos) frente às cepas utilizadas no experimento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Algas

A palavra alga vem do latim, significa “planta marinha”, são classificadas como vegetais inferiores, possuindo clorofila *a* como seu pigmento fotossintético primário. Algas marinhas são organismos aquáticos sem sistema vascular (MATIAS, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2005; PÁDUA *et al.*, 2004).

As macroalgas marinhas são organismos pluricelulares eucariontes e autótrofos, que podem ser classificadas em três grupos (divisão ou filo) de acordo com a coloração (PÁDUA *et al.*, 2004). As algas vermelhas pertencentes à divisão Rhodophyta, as marrons ou pardas pertencentes à divisão Phaeophyta, e as algas verdes pertencentes às Chlorophyta (LOBBAN; HARRISON, 1997). No entanto, além da pigmentação, levam-se também em consideração na classificação das algas os parâmetros bioquímicos, morfológicos e reprodutivos (PEREIRA; SOARES-GOMES, 2002).

Algumas espécies de algas são capazes de tolerar condições de seca, frio e estado de dormência do metabolismo (GRANHAM; GRANHAM; WILCOX, 2009). Podem viver individualmente ou como epífitas, em comunidades com outras algas e animais (LOBBAN; HARRISON, 1997).

As algas, por possuírem uma grande atividade fotossintetizante, são responsáveis pela maioria do oxigênio presente na terra, resultando na produção de uma enorme quantidade de carbono orgânico. Muito desse carbono orgânico é utilizado por alguns organismos como fonte de alimento (GRANHAM; GRANHAM; WILCOX, 2009).

De acordo com Barsanti *et al.* (2008), as algas marinhas podem tolerar uma ampla variação de pH, temperatura, turbidez, concentração de CO₂ e O₂ dependendo das condições do ambiente em que vivem. Thompson (1996) relata que a capacidade das algas para se adaptarem às condições ambientais se reflete em uma excepcional variedade de padrões de lipídios, bem como na sua capacidade de sintetizar uma série de compostos incomuns

O nitrogênio é o elemento que mais limita o crescimento das algas marinhas, e os mais importantes são os íons nitrato e amônia. As algas verdes, vermelhas e marrons são incapazes de usar diretamente o gás nitrogênio, apesar de ser vinte vezes mais abundante que

o nitrato. Assim, necessitam do auxílio de bactérias e cianobactérias que ajudam na fixação desses componentes (LOBBAN; HARRISON, 1997).

As macroalgas marinhas são bem diferenciadas quanto a sua estrutura morfológica e funcional quando se compara as três divisões, Rhodophyta, Chlorophyta e Phaeophyta, principalmente quando se analisa os aspectos citológicos de cada um desses grupos (BARSANTI *et al.*, 2008).

2.1.1 Algas verdes

As algas verdes, também chamadas de clorofíceas, são unicelulares e multicelulares autotróficas, que possuem clorofila *a* e *b*, e amido como reserva de alimento. Habitam ambientes de água doce, áreas marinhas costeiras e terrestres. São ricas em lipídeos, algumas espécies produzem carbonato, outras são fontes de depósito de petróleo e combustíveis renováveis (GRANHAM; GRANHAM; WILCOX, 2009).

As clorofíceas são importantes produtoras de oxigênio molecular disponível (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). Além disso, esses organismos conseguem dominar em condições adversas e até mesmo sobreviver em ambientes poluídos como é o caso da ocorrência do gênero *Ulva* e *Enteromorpha* na baía de Guanabara (PEREIRA; SOARES-GOMES, 2002).

Estudos têm utilizado algas do gênero *Ulva* para o tratamento de efluentes da maricultura liberando assim uma água de melhor qualidade, sem teores elevados de matéria orgânica (COSTA, 2006). Vale ressaltar também o emprego de certas algas verdes como fornecedoras de moléculas biologicamente ativas (BENEVIDES *et al.*, 2001).

A figura 1 representa os espécimes de algas verdes (*Caulerpa prolifera* e *Ulva fasciata*) marinhas utilizadas nesta pesquisa.

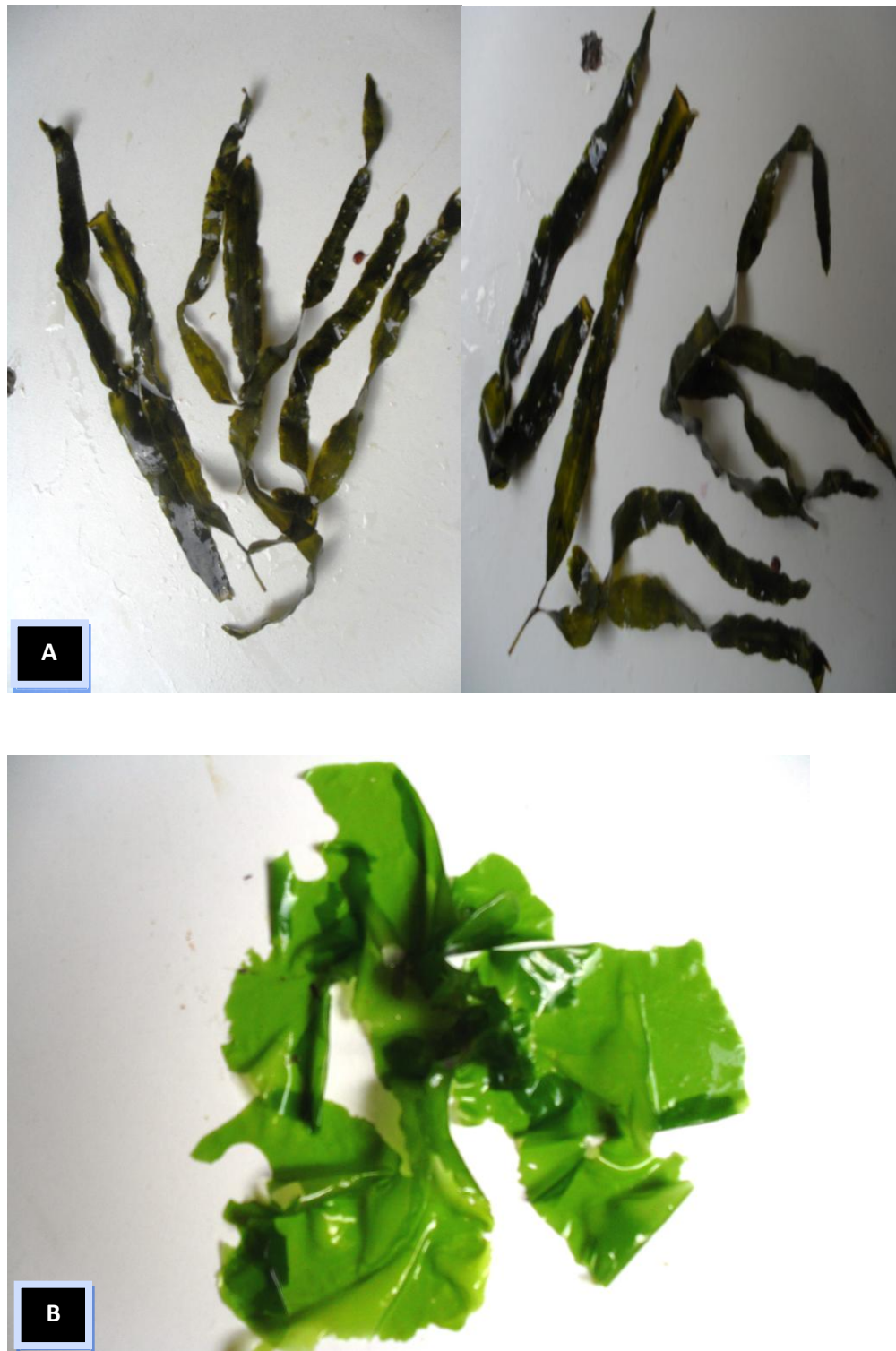


Figura 1. Macroalgas marinhas verdes estudadas: A - *Caulerpa prolifera*; B - *Ulva fasciata*

2.1.2 Algas vermelhas

Algas vermelhas são os organismos pertencentes ao filo Rhodophyta, que possuem características morfológicas peculiares, além de características bioquímicas e de história de vida bem particulares deste grupo de indivíduos, como a ausência de flagelos em suas estruturas celulares (MAGGS *et al.*, 2011). Estima-se que existam neste filo de 500-600 gêneros e o número de espécies chega a ultrapassar 5.000 (GRANHAM; GRANHAM; WILCOX, 2009).

As algas vermelhas possuem clorofila *a* e *d* como pigmentos principais e ficobilinas como pigmentos fotossintéticos secundários e armazenam amido como material de reserva. Esses organismos possuem grande importância ecológica, pois algumas espécies dessa classe ajudam na calcificação de recifes de corais e protegem a superfície das rochas contra os danos causados pelas ondas. Além da importância econômica, que está atribuída a produção de ágar e carragenana, muito utilizado na indústria cosmética (GRANHAM; GRANHAM; WILCOX, 2009; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

As algas vermelhas possuem esta coloração por causa da obtenção de um pigmento denominado de ficoeritrina, que está localizado nos cloroplastos. No entanto, outros pigmentos como a ficocianina e aloficocianina também estão presentes e são azuis. Esses pigmentos apresentam características similares (anel tetrapirrólico linear) e são conhecidos como ficobilinas. Eles ocorrem ligados a proteínas, formando uma classe de compostos chamados ficobiliproteínas (HOEK; MANN; JAHNS, 1995).

As rodofíceas possuem várias substâncias químicas que podem ser isoladas, como os metabólitos secundários, fenóis, diterpenos, sesquiterpenos e outros, com ampla atividade biológica (TEIXEIRA *et al.*, 1991).

Vale ressaltar que a maioria de espécies de algas com atividade hemaglutinante são vermelhas (SAMPAIO *et al.*, 1993). Destacam-se ainda os polissacarídeos sulfatados da *Lithothamnion calcareum*, os quais apresentaram potencial atividade antiinflamatória e os da alga *Halymenia pseudofloresia* que demonstraram ação anticoagulante (RODRIGUES *et al.*, 2009; SOARES, 2009).

Oliveira (2009) avaliou a atividade biológica de *Bostrychia radicans* coletadas em manguezal e costões rochosos, e constatou que esta possui substâncias com potencial antitumoral, tripanocida e antifúngica, contudo, observou variações nas atividades de acordo com o ecossistema em que vivem.

A figura 2 e 3 representa os espécimes de algas vermelhas marinhas utilizadas neste estudo.



Figura 2. Macroalgas marinhas vermelhas estudadas: A- *Laurencia* sp e B - *Gracilaria dominigensis*

Estudos mostraram que as rodófitas apresentam amplo potencial para a maricultura no Brasil, podendo ser utilizada como atividade pelas comunidades praianas. A alga *Gracilaria domigensis* exibiu um bom potencial de cultivo, com elevadas taxas de crescimento e alto rendimento em biomassa, podendo ser cultivada em qualquer época do ano, uma vez que não apresentou variações sazonais (BEZERRA, 2008; YOSHIMURA, 2006).

A espécie *Hypnea musciformis* é uma carragenófito de interesse para indústrias de cosmético, alimentícia, farmacêutica e para a biotecnologia. Considerando-se o cultivo para fins comerciais, estudos comprovaram que não houve diferença significativa no rendimento de carragenana da alga cultivada em relação a de bancos naturais (MASIH-NETO, 2009).



Figura 3. Macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis*

2.1.3 Algas pardas

As algas pardas (Figura 4) possuem clorofilas *a* e *c*, seus cloroplastos contêm vários carotenóides, incluindo uma grande quantidade de fucoxantina, uma xantofila presente em seus cloroplastos, que mascara a clorofila e proporciona a sua cor característica. As algas Phaeophyta dominam os costões rochosos e variam de tamanho, desde formas microscópicas até as maiores algas marinhas conhecidas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Em regiões polares e temperadas, ricas em nutrientes, as feofíceas, podem apresentar grande produção primária, resultando em estruturas que variam desde filamentos a gigantes macroalgas, os “kelps” (principalmente dos gêneros *Laminaria* e *Macrocystes*), podendo formar grandes bancos ou florestas. Em regiões tropicais e subtropicais, essa divisão é representada por algas de pequeno porte, como *Padina* e *Dictyota*. No Brasil, as maiores algas pardas encontradas em regiões costeiras são as espécies do gênero *Sargassum* e *Spatoglossum* (PEREIRA; SOARES-GOMES, 2002).

A Figura 4 representa a espécie de alga marinha parda (*Padina gymnospora*) utilizada nesta pesquisa.



Figura 4. Macroalga marinha marron *Padina gymnospora*

Segundo Stahl e Sies (2005), carotenóides desempenham importante papel como precursores de vitaminas antioxidantes e fotoquímicos. Nesse sentido, pesquisas mostraram que as feofíceas, coletadas no litoral cearense, são ricas em β -caroteno, e as que obtiveram maiores e menores valores foram as espécies *Dictyopteris delicatula* e *Padina gymnospora*. Delas, *Dictyota dichotoma* apresentou valores máximos de α -tocoferol (vitamina E) (SOUSA *et al.*, 2008).

2.2 Atividade antibacteriana de macroalgas marinhas

O surgimento cada vez maior de bactérias resistentes a antimicrobianos comerciais tem levado à busca por substâncias naturais eficientes na inibição do crescimento de microrganismos patogênicos, de humanos e organismos marinhos. E as algas são possíveis fontes de componentes farmacológicos (MAGALLANES *et al.*, 2003).

Segundo Lima-Filho *et al.* (2002), a atividade antimicrobiana depende de dois fatores: da espécie de alga e da eficiência na extração dos compostos ativos. Então, como uma eficiente estratégia de investigação, solventes orgânicos têm sido utilizados para a extração de possíveis princípios ativos de macroalgas marinhas.

Os extratos de algas vermelhas, pardas e verdes, obtidos com éter etílico e etanol alcançaram os maiores halos de inibição quando testados frente a bactérias e fungo (TUNEY *et al.*, 2006).

Os extratos da macroalga *Amansia multifida* (família Rhodophyceae) foram fracionados com os solventes orgânicos: hexano, clorofórmio, etanol e apresentaram atividade antibacteriana frente a espécies Gram-negativas: *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sor. Typhi, *Salmonella* sor. Choleraesuis, *Serratia marcescens*, *Vibrio cholerae* e contra bactérias Gram-positivas: *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. No entanto, extrato hexânico da alga *Caulerpa cupressoides*, pertencente à família Chlorophyceae, mostrou atividade antibacteriana somente contra *Morganella morganii*, *B. subtilis* e *S. epidermidis* (LIMA-FILHO *et al.*, 2002).

O extrato metanólico da alga verde *Cladophora prolifera* inibiu o crescimento de *S. aureus* e *V. cholerae* enquanto que, o extrato da alga marrom *Stoechospermum marginarum* inibiu o crescimento de *Klebsiella* sp. e *V. cholerae* (ELY *et al.*, 2004). Este mesmo solvente foi utilizado na extração do princípio ativo de *Gracilaria changii*, a qual testada contra *P.*

aeruginosa, mostrou uma completa inibição da bactéria na concentração de 6,25mg/mL (SASIDHARAN *et al.*, 2010). O metanol ainda foi usado nos extratos das algas *Corallina officinalis*, *Dictyota dichotoma*, *Halopteris filicina*, *Cladostephus spongiosus* f. *verticillatus*, *Cystoseira barbata*, *Ulva rígida*. Cada um desses extratos inibiu o crescimento de, pelo menos, um microrganismo (TASKIN *et al.*, 2007).

Saeidnia *et al.*(2009) encontraram moderada inibição de *S. aureus* ao testar o extrato de acetato de etila das algas vermelhas *Gracilaria salicornia* e *Hypnea flagelliformis*. No entanto, os extratos e frações de *Gracilaria domingensis* e *Gracilaria birdiae* não foram ativos contra bactérias Gram-positivas e negativas examinadas, incluindo *S. aureus* (SILVA, 2009).

O efeito inibitório dos extratos aquosos, etanólicos e diclorometano de dezesseis algas foi investigado frente a bactérias, leveduras e fungos. Foi observado que o extrato aquoso não inibiu o crescimento dos microrganismos. Porém, os extratos etanólico e diclorometano bruto inibiram o crescimento de bactérias Gram-positivas testadas, não havendo diferença significativa no efeito inibitório entre os dois solventes (HELLIO *et al.*, 2001). Já Rajasulochana *et al.* (2009) encontraram melhor extração das algas pardas da Índia utilizando como solvente clorofórmio: metano (2:1 v/v). Com esse extrato, os halos de inibição máxima do crescimento contra *S. aureus* e *E. coli* chegaram a 100 mm.

Alguns compostos ou frações algais são isolados dos extratos e testados separadamente. Os compostos oleosos halogenados elatol e iso-obtusol foram isolados de *Laurencia majuscula*. Elatol inibiu o crescimento de *S. epidermidis*, *K. pneumoniae* e *Salmonella sp.* e as CIM foram 1 mg/ml, 1 mg/ml e 2 mg/ml, respectivamente. Já, o iso-obtusol apresentou CIM de 1 mg/ml e 1,5 mg/ml para *Salmonella sp.* e *K. pneumoniae*, respectivamente (VAIRAPPAN, 2003).

O polissacarídeo ulvana, os extratos solúvel e insolúvel em metanol, o extrato etanólico foram obtidos da *Ulva fasciata* e o polissacarídeo B obtido de *Ulva sp.* foram testados, quanto a atividade antimicrobiana e o potencial desta macroalga marinha no controle da antracnose de feijoeiro comum, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. A atividade antimicrobiana da ulvana e dos extratos metanólicos foi determinada frente a bactérias potencialmente patogênicas ao homem: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, a levedura *Candida albicans* e bactérias fitopatogênicas: *Xanthomonas campestris* e *Erwinia carotovora* (PAULERT, 2005).

Mesmo que determinadas espécies de algas apresentem atividade antibiótica comprovada frente a microrganismos, alguns fatores podem interferir na ação de alguns extratos. Deste modo, algumas algas podem apresentar alguns compostos nutricionais durante o ano com maior ou menor intensidade, assim como proteínas, lipídeos, fibras, vitaminas, carboidratos e outros. E, a atividade antibacteriana não é diferente, podendo apresentar variações de acordo com a sazonalidade.

Extratos das algas *Osmundaria serrata*, *Galaxaura diessingiana* e *Codium duthieae* não apresentaram variações na atividade antibacteriana após três anos de armazenamento. Variações sazonais da atividade antibacteriana não foram encontradas em extratos de *G. diessingiana* e *C. duthieae*. Entretanto, o extrato de *O. serrata* apresentou um aumento da atividade antibacteriana no período do inverno (VLACHOS *et al.*, 2000).

Hornsey e Hide (1985) reportaram a variação, em alguns táxons, das substâncias bactericidas nas diferentes fases do ciclo de vida das algas. E, em alguns meses do ano algumas espécies apresentavam atividade antimicrobiana que em outros meses era nula, como por exemplo a espécie *Ulva lactuca*, que de março a agosto não inibiu o crescimento bacteriano, no entanto, nos outros meses do ano se mostrou com excelente eficiência (HORNSEY; HIDE, 1976). Isso justificaria os resultados contraditórios obtidos em alguns estudos.

Nesse sentido, Oliveira *et al.* (2009) observaram variações da maioria dos componentes nutricionais de algas durante o ano, exceto de proteínas. Aziza *et al.* (2008) avaliando a composição química de *Hypnea musciformis*, durante dois anos, conseguiram provar que não houve variação sazonal nos valores obtidos, no entanto, o teor dos minerais apresentaram flutuações entre 11 e 55% no período seco. Já o teor de carragenana alcançou 41% no inverno, decrescendo no outono.

Outro fator que pode intervir nos resultados inibitórios de produtos naturais contra microrganismos é a concentração dos extratos. Rocha *et al.* (2009) demonstraram halos maiores contra *P. aeruginosa* em menores concentrações do extrato da alga *Spatoglossum shroederi* o que não aconteceu com *V. cholerae* e *S. aureus*. Os maiores halos para essas bactérias foram constatados quando foi usada uma maior concentração do extrato.

2.3 *Vibrio spp.*

Algumas doenças atacam organismos aquáticos, tais como camarões e ostras, e dentre estas, destacam-se as vibrioses, provocadas por bactérias do gênero *Vibrio spp.* Na carcinicultura, notou-se que a carga vibrionácea aumentava no ambiente e no próprio organismo de acordo com o tempo de cultivo (SILVA, 2007).

No caso dos camarões marinhos cultivados, os víbrios podem atacar vários estágios de vida (larval, pós-larval, juvenil e adulta). São consideradas infecções secundárias e oportunistas que ocorrem quando há condições de estresse no sistema de cultivo tais como: diminuição de oxigênio, densidade de estocagem excessiva, lesões na cutícula dos camarões, alimentação inadequada e compostos nitrogenados excessivos no ambiente de cultivo (AGUIRRE-GUZMÁN *et al.*, 2001).

Os moluscos bivalves por serem animais filtradores, acumulam substâncias contaminantes e microrganismos, sejam patogênicos ou não. O cultivo de ostras *Crassostrea rhizophorae*, por ser feito em água salobra e em alta temperatura, favorece a multiplicação de bactérias oportunistas, tais como os vibriões. Destaca-se ainda, o fato de a manutenção de estocagem, após a colheita, ser geralmente feita em temperatura ambiente, vindo a ser perigoso o consumo sem cocção do molusco (PEREIRA *et al.*, 2007).

É possível encontrar *Vibrio parahaemolyticus* em águas estuarinas e costeiras, em sedimentos, plâncton e em uma variedade de peixes, crustáceos e moluscos em todo o mundo (SOUSA, 2004). *Vibrio vulnificus* pode ser isolado naturalmente do ambiente marinho. A ingestão de mariscos crus ou mal cozidos contaminados com *V. vulnificus* pode levar à septicemia primária ou a gastroenterite. Além disso, esse microrganismo pode causar infecção por contaminação direta de ferimentos abertos, durante a natação, a limpeza de mariscos e outras ações, envolvendo atividades marinhas (HLADY *et al.*, 1993).

A cólera é causada por *Vibrio cholerae*, uma bactéria Gram-negativa. Essa doença é veiculada principalmente pela ingestão de alimentos e água contaminados, e é associada às precárias condições higiênico-sanitárias da população (SOUSA, 2004). Além destas, muitas outras espécies de *Vibrio* estão associadas a infecções em humanos e animais.

As bactérias supracitadas são patogênicas, e algumas possuem fatores de virulência com capacidade de provocar sérias enfermidades em humanos, sobretudo pelo consumo de alimentos crus ou mal cozidos contaminados, principalmente ostras, peixes, camarões e outros frutos do mar. A presença de uma toxina, a Hemolisina Direta Termoestável (TDH),

observada através do fenômeno de Kanagawa, que é parcialmente inativada a uma temperatura de 30°C durante 30 minutos, está relacionada a gastroenterites (BAFFONE *et al.*, 2000; SOUSA, 2004).

Estirpes de *V. parahaemolyticus*, isoladas de mariscos, apresentam a maior percentagem de fatores de patogenicidade, sendo a TDH a mais freqüente (BAFFONE *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2008). Entretanto, Lee *et al.* (2008) reportaram o isolamento da Hemolisina Termolábel Relacionada (TRH) em cepas de *V. parahaemolyticus*, capazes de causar infecções. Esta espécie foi isolada de amostras de ostras, compradas em um restaurante de Fortaleza-CE, e que apresentaram além de urease-positiva, TDH e TRH-positivas, constatadas através de métodos de biologia molecular. No entanto, essas cepas não produziam halos de β -hemólise em ágar Wagatsuma, em testes fenotípicos (VIEIRA *et al.*, 2011).

A capacidade de produzir substâncias citotóxicas e enterotóxicas em cepas de *Vibrio alginolyticus* também foi observada (BAFFONE *et al.*, 2005). A água do mar é um reservatório natural deste patógeno, e mesmo na ausência de nutrientes ele consegue desenvolver algumas estratégias de sobrevivência mantendo o seu potencial para infectar peixes (KAHLA-NAKBI *et al.*, 2007).

Matté *et al.* (2007) verificaram que 100% das cepas de *Vibrio metschnikovii*, isoladas de peixe, produziram verotoxinas, e 76,9% foram positivas para testes cutâneos, resultando no aumento da permeabilidade vascular e endurecimento da zona após dez horas, porém não foi observada necrose.

2.4 Resistência bacteriana a antimicrobianos

O uso abusivo de agentes antimicrobianos nos cultivos de organismos aquáticos vem se tornando um grande problema nos últimos anos. O emprego dessas drogas no tratamento de infecções causadas por patógenos, ou mesmo como medida profilática, permite que elas permaneçam no ambiente aquático por longos períodos, gerando uma pressão seletiva que favorece a multiplicação de estirpes resistentes (CABELLO, 2006; PEREIRA-JÚNIOR *et al.*, 2006).

Nesse sentido, Costa *et al.* (2008) relataram a ocorrência de cepas de *Vibrio* isoladas de ambiente de cultivo de camarões no Ceará resistentes aos antimicrobianos sulfazotrim, ampicilina e ceftriaxona. Rebouças (2008) estudando o mesmo ambiente

encontrou grande porcentagem (80,64%) das estirpes de *Vibrio* isoladas resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos examinados, inclusive alguns usados no tratamento de infecções em humanos.

Carvalho *et al.* (2009) detectaram resistência em 100% das cepas de *Salmonella*, isoladas de água e sedimento em áreas de carcinicultura, às tetraciclinas e 21,7% às quinolonas. Assim, a utilização inadequada de antimicrobianos, além de selecionar estirpes resistentes, compromete a saúde das pessoas envolvidas diretamente na atividade. Além disso, o perfil de multirresistência apresentado por bactérias procedentes de aquicultura representa um grande risco de disseminação de resistência a várias drogas por transferência de genes, mesmo sem o uso de antimicrobianos nos sistemas de cultivos, onde esses microrganismos foram isolados (CARNEIRO, 2005; LIMA *et al.*, 2006).

O tempo de permanência de oxitetraciclina, quando servida na ração ao camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, é maior na carapaça (treze dias) que no músculo (cinco dias). Contudo, as concentrações da droga impregnadas no crustáceo são capazes de diminuir em até 80% com o cozimento (LAVORANTE *et al.*, 2009). Hirsch *et al.* (2006) atribuíram a resistência de bactérias isoladas da superfície corpórea de peixes e da água utilizada no tanque, oriunda da ração ou dos alevinos.

A resistência pode ser transmitida entre humanos, entre animais e entre os seres humanos, animais e o meio ambiente, através da transmissão e propagação de bactérias ou genes que carregam a informação de resistência (WHO, 2011). Entretanto, na aquicultura, essa resistência pode disseminar-se em todo o ambiente aquático e ser transmitida a várias espécies de bactérias, incluindo aquelas que podem infectar os humanos (ANGULO, 2000).

Pesquisas têm revelado a variação do perfil de resistência de uma mesma espécie de bactéria em relação à área geográfica em que ela foi isolada. Todas as cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* isoladas no Japão foram resistentes a pelo menos um, dos quinze antimicrobianos testados. Na Europa apenas o florfenicol e a canamicina foram eficazes contra as estirpes desta espécie. Os resultados indicaram que as drogas se tornaram ineficazes, refletindo o efeito em longo prazo do uso dos medicamentos para o tratamento de bacterioses (THYSSEN; OLLEVIER, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem das cepas

Foram selecionadas 20 cepas de *Vibrio* portadoras de fatores de virulência e resistentes a antimicrobianos. As estirpes ambientais foram obtidas do acervo bacteriológico do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LMAP) do Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR/UFC. Além disso, foram tomadas dez cepas padrões ATCC e IOC. As cepas utilizadas encontram-se apresentadas no Quadro 1.

3.2 Pureza das cepas

Antes de serem submetidas aos testes antibacterianos com os extratos algais, foi investigada a pureza das cepas submetendo-as ao crescimento em meio de cultura seletivo, Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS) e observando-se a morfologia e coloração das colônias.

As cepas de *Vibrio* foram inoculadas em tubos de ensaio contendo caldo Tripticase Soja (TSB) a 1% de NaCl e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C/24h. Após esse período, foi retirado um inóculo e estriado sobre TCBS em placa de Petri com incubação a 37°C/18h. Logo após foi verificado o crescimento de colônias verdes e amarelas, característica de sacarose negativa e positiva, respectivamente, e a morfologia das colônias.

As estirpes pertencentes aos gêneros *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Salmonella* foram inoculadas em caldo de infusão de cérebro e coração (“Brain Heart Infusion”) (BHI) e incubadas a 37°C/24h. Depois do tempo de incubação procedeu-se o estriamento do inóculo nos respectivos meios seletivos para cada gênero.

A partir do crescimento em BHI, a cepa de *Escherichia coli* foi inoculada em placa de Agar Eosina Azul de Metileno (EAM), incubada a 35°C/24h e depois verificada a característica das colônias típicas, negras com brilho verde metálico.

Quadro 1 – Relação de cepas ambientais com seus correspondentes marcos de virulência e resistência antimicrobiana e cepas padrão de coleções utilizadas nos testes bioguiados de extratos algais.

Cepa	Espécie	Origem	Fator de virulência	Resistência a
H1	<i>V. xiii</i>	HLP	KGelCasFosfLipElas	CflPen
H2	<i>V. coralliilyticus</i>	HLP	KGelCasFosfLipElas	-
H3	<i>V. parahaemolyticus</i>	HLP	GelCasFosfLip	Pen
H4	<i>V. alginolyticus</i>	HLP	GelCasFosfLip	Pen
H5	<i>V. brasiliensis</i>	HLP	KGelCasFosf	CflPen
H6	<i>V. neptunis</i>	HLP	KCasFosfLip	-
H7	<i>V. navarrensis</i>	HLP	GelCasFosfElas	Pen
H8	<i>V. vulnificus</i>	HLP	GelCasFosf	PenTet
H9	<i>V. cholerae</i>	HLP	CasFosfLip	PenAtm
H10	<i>V. diazotrophicus</i>	HLP	CasElas	Atm
O11	<i>V. parahaemolyticus</i>	OCR	UrK	Pen
O12	<i>V. parahaemolyticus</i>	OCR	K	AtmPenAmpCfl
O13	<i>V. parahaemolyticus</i>	OCR	UrK	Pen
O14	<i>V. parahaemolyticus</i>	OCR	K	PenAmpCfl
O15	<i>V. proteolyticus</i>	OCR	K	PenCfl
O16	<i>V. litoralis</i>	OCR	Ur	AmpPen
O17	<i>V. ponticus</i>	OCR	K	PenCfl
O18	<i>V. rumoiensis</i>	OCR	K	PenCfl
O19	<i>V. parahaemolyticus</i>	OCR	GelLip	AmpPen
O20	<i>V. parahaemolyticus</i>	OCR	Gel	AmpPen
P21	<i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	-	-
P22	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 27562	-	-
P23	<i>V. alginolyticus</i>	ATCC 17749	-	-
P24	<i>V. mimicus</i>	ATCC 33653	-	-
P25	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-	-
P26	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	-	-
P27	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	-	-
P28	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	-	-
P29	<i>Samonella</i>	IOC	-	-
P30	<i>V. harveyi</i>	IOC 18450	-	-

-: Não foram feitos testes de virulência e resistência; HLP: Hemolinfa do *Litopenaeus vannamei*. OCR: Ostra *Crassostrea rhizophorae*. K: Kanagawa positivo; Gel: gelatinase; Cas: caseínase; Fosf: fosfolipase; Lip: lipase; Elas: elastase; Ur: urease; Atm: aztreonam; Pen: penicilina; Amp: ampicilina; Cfl: cefalotina

O caldo BHI contendo *Staphylococcus aureus* foi inoculado em ágar Baird Parker (BP), e dele foram isoladas colônias típicas, com coloração negra e apresentando um halo claro em torno da sua borda.

Para confirmação das colônias típicas de *Enterococcus faecalis* foi utilizado o meio m-Enterococcus em placa. No caso da *Salmonella* foram utilizados os meios de cultura

em ágar Entérico Hektoen (HE) e MacConkey em placa. No primeiro, as colônias típicas apresentam-se verde-azuladas, com ou sem centro negro, e no segundo róseas.

Para *Pseudomonas aeruginosa* foi utilizado o Agar Pseudomonas (piocianina), no qual foi detectada a produção de piocianina. Depois, prosseguiu-se com a verificação das características morfológicas das células

Para constatação de pureza das estirpes, seguiu-se a análise das características morfotintoriais das células, através da coloração de Gram (SOARES; CASIMIRO; ALBUQUERQUE, 1991) (Figura 5).

3.3 Coleta, identificação e secagem das algas

As coletas do material algal foram realizadas manualmente, no período de março de 2010 a junho de 2011, na praia do Pacheco em Caucaia-CE (a 10 Km de Fortaleza), na praia do Paracuru-CE (a 89,9 Km de Fortaleza) e na praia do Guajiru em Trairi-CE (a 143,3 Km de Fortaleza), no meso litoral, durante as marés de sizígia, com temperatura da água em torno de 30°C.

O material coletado foi transportado em sacos plásticos ao LMAP do LABOMAR e mantido sob refrigeração para posterior identificação e secagem.

A identificação dos espécimes foi feita no Laboratório de Macroalgas do LABOMAR, onde estão depositadas as exsiccatas sob o número de registro 2152 (*P. gymnospora*), 2145 (*H. musciformes*), 2151 (*Laurencia sp*), 2149 (*U. fasciata*), 2155 (*C. prolifera*) e 2146 (*Gracilaria domingensis*).

Após a identificação, os espécimes de algas foram submetidos à limpeza manual para retirada de epífitas e impurezas. Em seguida, as algas foram lavadas em água destilada, e o excesso de água retirado com o auxílio de papel absorvente. Posteriormente, foram secadas em estufa a 30°C e trituradas até a obtenção de um pó homogêneo, utilizado na preparação dos extratos.

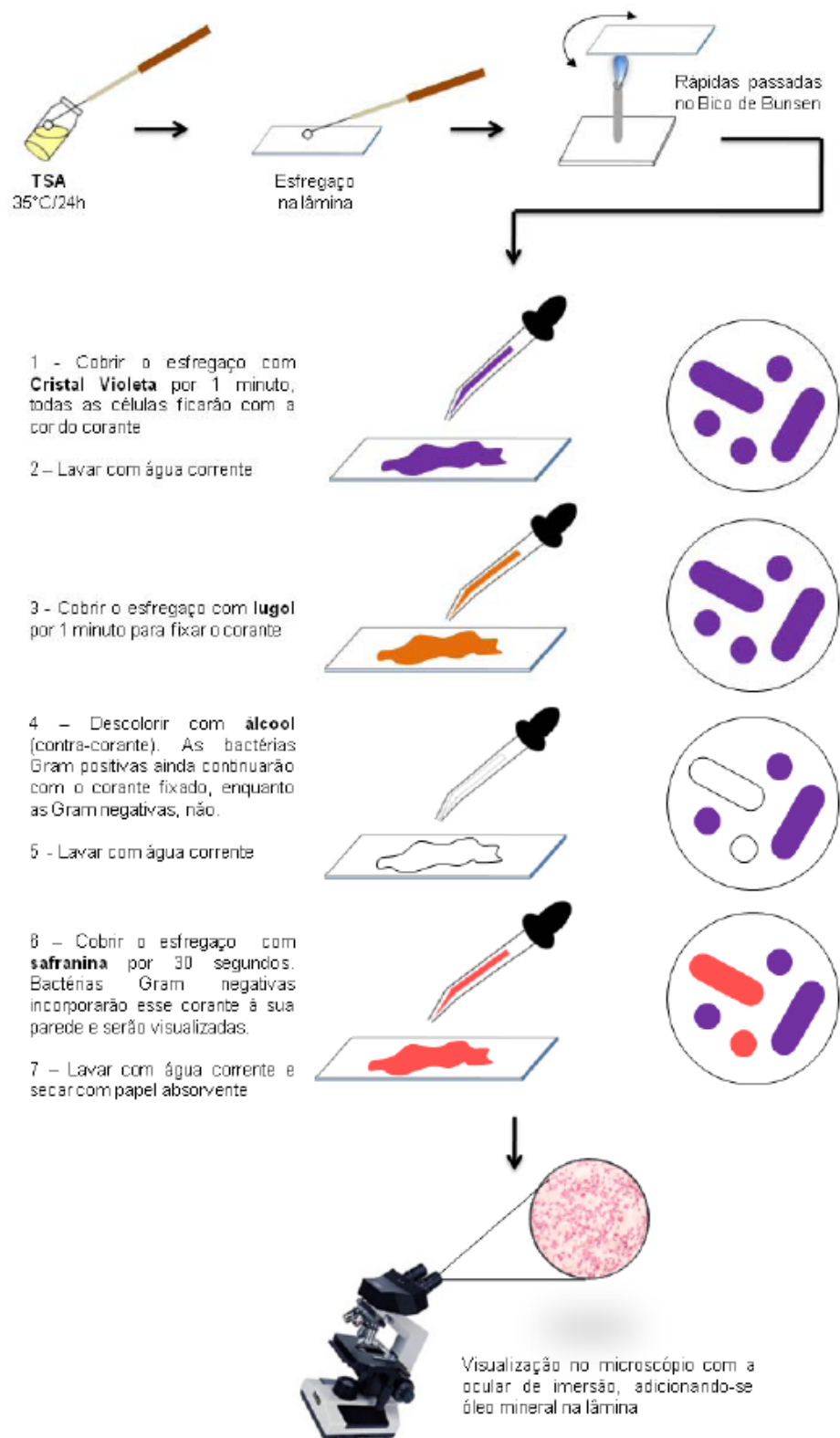


Figura 5- Fluxograma da técnica de Gram.

Tabela 1 – Local e data das coletas das espécies de macroalgas utilizadas nos testes de atividade antibacteriana.

ESPÉCIE	LOCAL	DATA
<i>Padina gymnospora</i>	Paracuru-CE	09/09/10
	Pacheco/Caucaia-CE	19/03/11
		17/06/11
<i>Hypnea musciformes</i>	Paracuru-CE	02/03/10
	Guajiru/Trairi-CE	11/08/10
	Pacheco/Caucaia-CE	19/03/11
		17/04/11
		17/06/11
<i>Ulva faciata</i>	Pacheco/Caucaia-CE	06/11/10
		17/06/11
<i>Laurencia sp</i>	Pacheco/Caucaia-CE	04/12/10
<i>Gracilaria domingensis</i>	Pacheco/Caucaia-CE	06/11/10
<i>Caulerpa prolifera</i>	Pacheco/Caucaia-CE	04/12/10

3.4 Preparo dos extratos

O pó resultante da trituração das algas foi submetido à extração com etanol, metanol, acetona e hexano 1:100 (p/v) em aparelho Soxhlet a 78,4, 64,7, 56 e 69°C, respectivamente. Todas as amostras foram mantidas sob refluxo por 16 horas e, em seguida, os extratos foram evaporados até a obtenção de uma solução a uma concentração final de 100 mg mL⁻¹. Discos brancos estéreis (Laborclin) de 6,0 mm de diâmetro foram impregnados com 100 µL dos extratos algais, o equivalente a 10 mg mL⁻¹ em cada disco (Figura 6). Como controle negativo, foram embebidos discos com 100 µL de cada solvente (etanol, metanol, acetona e hexano).

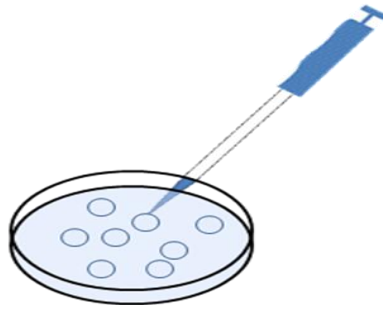


Figura 6- Preparação dos discos com o extrato algal.

3.5 Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos algais

O efeito antibacteriano dos extratos algais foi testado a partir da técnica de Difusão em Disco (DD) (Figura 8) em meio ágar Mueller-Hinton (CLSI, 2010) e da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica de macrodiluição em Caldo Mueller-Hinton (CLSI, 2010).

Para avaliação da atividade antibacteriana pelo teste de DD, as culturas puras crescidas em Ágar Trypticase Soja (TSA) contendo 1% de NaCl foram ajustadas a uma concentração de 10^8 UFC mL⁻¹, a partir de diluição em solução salina a 1% (*Vibrio*) e 0,85% de NaCl (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* e *E. faecalis*) até a obtenção de um padrão de turbidez compatível com a escala McFarland 0,5 (HINDLER; JORGENSEN, 1995). A densidade ótica foi aferida em espectrofotômetro (Micronal B542) com comprimento de onda de 625 nm.

Após o ajuste de concentração, a cultura bacteriana foi inoculada com emprego de um “swab” em placas de Petri contendo o meio de ágar Mueller-Hinton. Após a inoculação, os discos embebidos com extrato foram aplicados na superfície do meio, em triplicata, com o auxílio de uma pinça estéril. Para cada cepa, foi utilizado um disco como controle negativo (Figura 7) (embebido apenas com o solvente) e o antimicrobiano ciprofloxacina 5 µg (CIP-Laborclin) como controle positivo. Em seguida, as placas de Petri foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C/24h. Após o tempo de incubação, os halos de inibição foram medidos com paquímetro digital (Digmess), sendo considerados indicativos de atividade antibacteriana àqueles que se apresentaram ≥ 6 mm diâmetro (ENGEL *et al.*, 2006).



Figura 7 – Controle negativo (disco embebido com solvente) e positivo (disco de ciprofloxacina 5 µg) em placa contendo *V. parahaemolyticus* isolado da hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei*.

Para a determinação da CIM, foram selecionadas as espécies algais que exibiram bioatividade no teste de DD frente às cepas que apresentaram sensibilidade aos extratos. A partir das estirpes semeadas em TSA, o inóculo foi ajustado em solução salina a 1% de NaCl para os vibrios e 0,85% para os demais gêneros de bactérias, até a obtenção de um padrão de turbidez compatível com a concentração bacteriana de 10^5 UFC mL⁻¹. Foram tomados 50 µL da suspensão das cepas ajustadas, e semeados em tubos de caldo Mueller-Hinton contendo concentrações de extratos algais de 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 e 1024 µg mL⁻¹. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 35°C por 24h.

Após o período de incubação, o crescimento bacteriano foi caracterizado pela turvação do meio de cultura. Portanto, a CIM foi determinada pelo tubo com a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano.

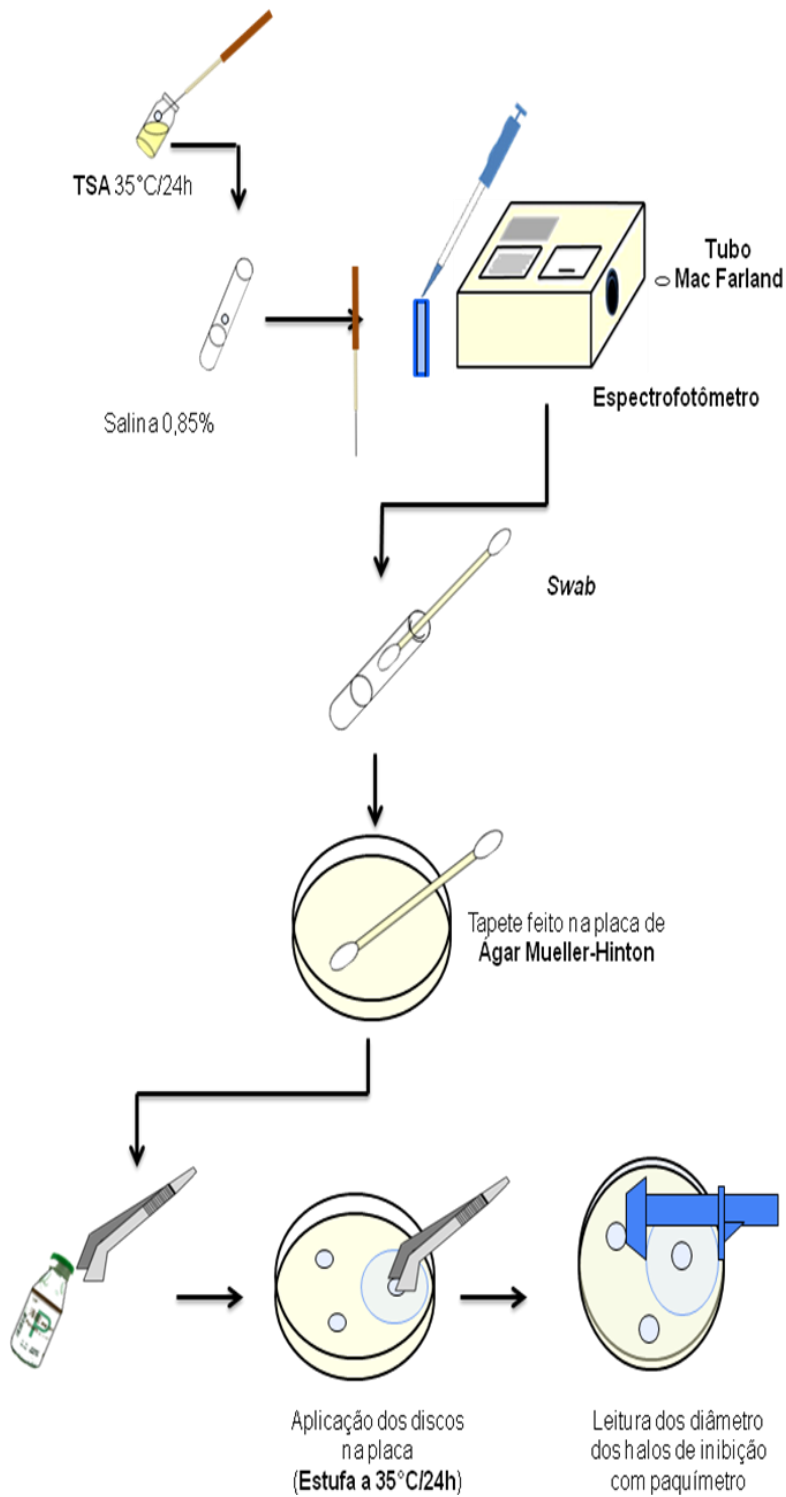


Figura 8- Fluxograma do teste de antibiograma pelo método de difusão em disco.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As macroalgas com atividade antibacteriana foram: *P. gymnospora*, *H. musciformis* e *U. fasciata*. O mesmo não foi demonstrado pelas algas *Laurencia sp*, *G. domingensis* e *C. prolifera*.

Apenas o álcool etílico, um solvente polar, quando usado na extração do potencial antibiótico das algas apresentou eficácia, portanto, pode-se sugerir que o composto bioativo seja de origem polar. Os demais solventes orgânicos empregados (acetona, hexano e metanol) não foram eficazes na extração contra qualquer uma das trinta espécies de bactérias testadas.

Alguns solventes são específicos no isolamento de substâncias bioativas de determinadas espécies de algas. Karthikaidevi *et al.* (2009) sugerem que determinados solventes são necessários para extrair substâncias antimicrobianas, deste modo a probabilidade de se constatar ação antibacteriana de produtos naturais aumenta quando se utiliza vários solventes durante a triagem.

Contrastando com os resultados alcançados no presente estudo com os solventes, Osman *et al.* (2010) obtiveram maior inibição dos microrganismos nos extratos algais usando acetona, seguido por metanol. O extrato etanólico, em seus experimentos, foi o menos eficaz na inibição bacteriana. Igualmente, Patra *et al.* (2009) consideraram de pouca eficácia, extratos etanólicos de algas oriundas da Índia. Os melhores extratos de algas obtidos por Lavanya e Veerappan (2011) foram os metanólicos.

Corroborando com os nossos resultados, Umamaheshwari *et al.* (2009) verificaram que o extrato da alga *Halodule pinifolia* obtido com álcool etílico apresentou os maiores halos de inibição contra bactérias Gram negativas e positivas.

A divergência nos resultados da literatura pesquisada sobre o solvente mais eficiente para extração torna esta questão incerta. A problemática pode estar relacionada não apenas com o solvente utilizado na extração, mas com uma série de fatores que interferem no processo, tais como, a espécie de alga examinada, o local e hora da realização da coleta, o método de extração e por fim, a metodologia utilizada para o ensaio (SALEM *et al.*, 2011).

Cepas do gênero *Vibrio* que apresentam fatores de virulência e resistência a antimicrobianos, portanto, potencialmente patogênicas, foram sensíveis a extratos etanólicos. Da mesma forma, Ravikumar *et al.* (2002) encontraram cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus* resistentes a antimicrobianos, e sensíveis a

extratos das macroalgas *Hypnea musciformis*, *Ulva lactuca*, *Padina tetrastromatica*, *Laurencia cruciata*, *Caulerpa cupressoides*, *Gracilaria edulis*, dentre outras.

Nesse sentido, Kumaran *et al.* (2010) demonstraram a capacidade de inibição no crescimento de cepas resistentes a antimicrobianos através da ação de polissacarídeos sulfatados e polifenóis de algas das classes Rhodophyceae e Phaeophyceae. Em contrapartida, Kantachumpoo e Chirapart (2010) verificaram que extratos brutos de polissacarídeos obtidos de algas marrons, alguns dos quais com alto teor de sulfato, além de não inibir o crescimento de *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* e *V. Harveyi*, promoveram o crescimento microbiano. Esse fato, segundo os autores, pode estar relacionado a elevada quantidade de carboidratos no extrato, principalmente a manose, que poderia ter sido usada como fonte de carbono incentivando o crescimento dos microrganismos testados.

Segundo Govindasamy *et al.* (2011), a capacidade antibacteriana da alga verde, vermelha e marrom está relacionada com o elevado teor de compostos fenólicos e componentes fitoquímicos. Para Kotnala *et al.* (2009) a atividade antimicrobiana das algas é uma indicadora da capacidade de síntese de metabólitos secundários bioativos. Os pesquisadores, através de uma investigação fitoquímica, revelaram a presença de fenóis, taninos, alcalóides, antraquinonas, flavonóides, glicosídeos cardíacos, saponinas, esteróides e terpenóides em dezesseis espécies de algas.

Os extratos da macroalga *P. gymnospora* exibiram atividade contra um amplo espectro de microrganismos Gram-negativos, inibindo o crescimento de 57% das espécies de *Vibrio* analisadas. Dentre elas, bactérias de grande interesse para a aqüicultura como *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*, apresentando zonas de inibição de 9,0 e 7,6 mm, respectivamente. Os halos observados variaram de 6,0 a 11,0 mm de diâmetro (Tabela 2).

Dentre as algas investigadas, os extratos obtidos com a alga marrom *P. gymnospora* apresentaram uma maior capacidade de inibição das bactérias testadas, resultado também demonstrado por Rizvi; Shameel (2004).

O desempenho vibriocida dessa espécie algal alcançado neste trabalho (Figura 9) está de acordo com os achados de Vallinayagam *et al.* (2009) que obtiveram resultados satisfatórios na inibição de seis espécies de bactérias, e dentre elas, *V. cholerae*. Os autores descobriram a presença de alcoóis poli-insaturados em seus extratos relacionados com essa atividade. Da mesma forma, Manivannan *et al.* (2011) revelaram halos de inibição consideráveis dos extratos da *P. gymnospora* frente às cepas de *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus*.

Tabela 2 – Tamanho médio dos halos de inibição (mm) dos extratos etanólicos da alga *Padina gymnospora* frente a dez cepas padrões ATCC e IOC de diferentes gêneros, dez cepas de *Vibrio* isoladas de hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* e dez cepas de *Vibrio* isoladas de ostras *Crassostrea rhizophorae*

Origem	Cepa	Código	Coletas			Controle Positivo
			09/09/10	19/03/11	17/06/11	
Camarão	<i>V. xuii</i>	H1	8,90 ± 0,3	6,9 ± 0,8	-	34,73
	<i>V. coralliilyticus</i>	H2	6,8 ± 1,4	6,4 ± 0,3	-	50,57
	<i>V. parahaemolyticus</i>	H3	-	-	-	31,55
	<i>V. alginolyticus</i>	H4	8,3 ± 0,6	7,5 ± 0,3	6,0 ± 0,1	46,90
	<i>V. brasiliensis</i>	H5	-	-	-	32,49
	<i>V. neptunis</i>	H6	-	6,9 ± 0,4	-	41,98
	<i>V. navarrensis</i>	H7	-	7,8 ± 0,2	-	50,05
	<i>V. vulnificus</i>	H8	-	-	7,3 ± 0,4	35,48
	<i>V. cholerae</i>	H9	10,2 ± 1,4	10,1 ± 0,5	-	39,00
	<i>V. diazotrophicus</i>	H10	11,0 ± 0,3	-	-	32,62
Ostra	<i>V. parahaemolyticus</i>	O11	9,0 ± 0,9	-	6,7 ± 1,1	30,45
	<i>V. parahaemolyticus</i>	O12	-	-	6,1 ± 0,2	27,89
	<i>V. parahaemolyticus</i>	O13	-	-	-	30,52
	<i>V. parahaemolyticus</i>	O14	-	-	-	33,07
	<i>V. proteolyticus</i>	O15	-	7,4 ± 0,3	-	28,39
	<i>V. littoralis</i>	O16	-	-	-	28,72
	<i>V. ponticus</i>	O17	-	-	-	29,01
	<i>V. rumoiensis</i>	O18	8,6 ± 0,5	-	-	37,14
	<i>V. parahaemolyticus</i>	O19	6,2 ± 0,5	-	-	25,34
	<i>V. parahaemolyticus</i>	O20	7,9 ± 0,3	-	6,2 ± 0,6	24,65
Padrão	<i>V. parahaemolyticus</i>	P21	7,5 ± 0,3	-	6,0 ± 0,6	NT
	<i>V. vulnificus</i>	P22	7,6 ± 0,5	-	-	NT
	<i>V. alginolyticus</i>	P23	7,1 ± 0,6	8,2 ± 0,9	6,0 ± 0,4	NT
	<i>V. mimicus</i>	P24	-	-	-	NT
	<i>Escherichia coli</i>	P25	-	-	-	NT
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P26	-	-	-	NT
	<i>Staphylococcus aureus</i>	P27	-	-	-	NT
	<i>Enterococcus faecalis</i>	P28	-	-	-	NT
	<i>Samonella</i>	P29	-	-	-	NT
<i>V. harveyi</i>	P30	-	-	-	NT	

-: Sem atividade; NT: Não foi testado o controle positivo

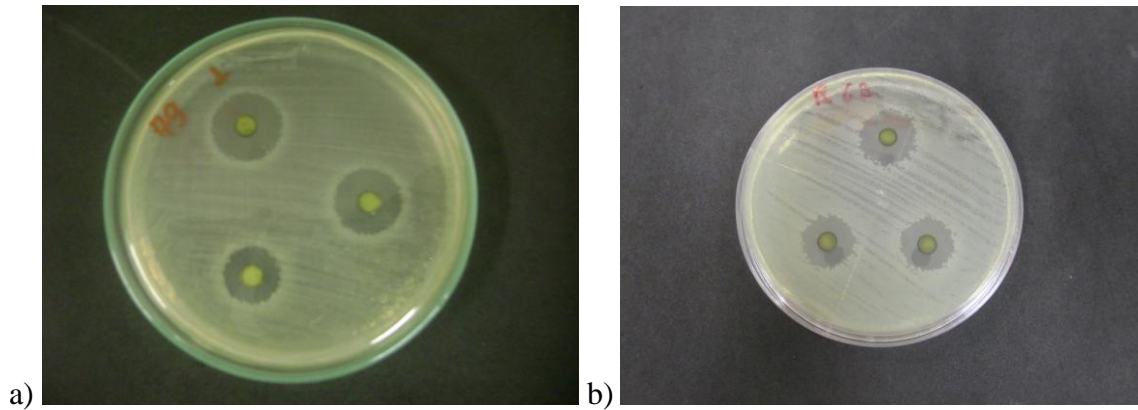


Figura 9 – Halos de inibição dos discos com extrato da alga *Padina gymnospora* frente a cepa de *V. xuii* (a) e *V. cholerae* (b) isolados da hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei*.

A bioatividade de extratos da alga *P. gymnospora* se estende a bactérias como *E. coli*, *S. aureus*, *Enterococcus sp.*, *P. aeruginosa* e *Salmonella*, resultados que não foram alcançados neste trabalho (MANIVANNAN *et al.* 2011).

Shanmughapriya *et al.* (2008) atribuíram a bioatividade de macroalgas das classes Phaeophyta, Rhodophyta e Chlorophyta a compostos de origem lipofílica.

Não foi encontrada eficácia dos extratos algais frente a bactérias Gram-positivas, contrastando com os resultados obtidos por Dubber e Harder (2008), que verificaram maior sensibilidade das bactérias Gram-positivas que das negativas (Vibrionaceae). Esses autores observaram, através do método utilizado de fluorescência do DNA bacteriano, que o microrganismo havia sido lisado durante a exposição ao extrato algal. Portanto, presumiram que os extratos além da ação bacteriostática teriam também ação bacteriolítica.

Tabela 3 - Tamanho médio dos halos de inibição (mm) dos extratos etanólicos da alga *Hypnea musciformis* frente a dez cepas padrões ATCC e IOC de diferentes gêneros, dez cepas de *Vibrio* isoladas de hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* e dez cepas de *Vibrio* isoladas de ostras *Crassostrea rhizophorae*.

Origem	Cepa	Código	Coletas		Controle Positivo
			02/03/10	17/04/11	
Camarão	<i>V. xuii</i>	H1	-	-	34,73
	<i>V. corallilyticus</i>	H2	9,0 ± 1,5	-	50,57
	<i>V. parahaemolyticus</i>	H3	7,8 ± 0,9	-	31,55
	<i>V. alginolyticus</i>	H4	7,3 ± 0,3	-	46,90
	<i>V. brasiliensis</i>	H5	7,2 ± 0,4	-	32,49
	<i>V. neptunis</i>	H6	9,7 ± 1,1	-	41,98
	<i>V. navarrensis</i>	H7	9,0 ± 0,8	-	50,05
	<i>V. vulnificus</i>	H8	-	-	35,48
	<i>V. cholerae</i>	H9	-	-	39,00
	<i>V. diazotrophicus</i>	H10	-	-	32,62
Ostra	<i>V. parahaemolyticus</i>	O11	-	-	30,45
	<i>V. parahaemolyticus</i>	O12	-	-	27,89
	<i>V. parahaemolyticus</i>	O13	8,4 ± 1,1	-	30,52
	<i>V. parahaemolyticus</i>	O14	8,2 ± 0,5	-	33,07
	<i>V. proteolyticus</i>	O15	-	-	28,39
	<i>V. litoralis</i>	O16	-	-	28,72
	<i>V. ponticus</i>	O17	-	-	29,01
	<i>V. rumoiensis</i>	O18	-	-	37,14
	<i>V. parahaemolyticus</i>	O19	-	-	25,34
	<i>V. parahaemolyticus</i>	O20	-	-	24,65
Padrão	<i>V. parahaemolyticus</i>	P21	9,8 ± 1,9	6,9 ± 0,5	NT
	<i>V. vulnificus</i>	P22	-	-	NT
	<i>V. alginolyticus</i>	P23	-	-	NT
	<i>V. mimicus</i>	P24	-	-	NT
	<i>Escherichia coli</i>	P25	-	-	NT
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P26	-	-	NT
	<i>Staphylococcus aureus</i>	P27	-	-	NT
	<i>Enterococcus faecalis</i>	P28	-	-	NT
	<i>Samonella</i>	P29	-	-	NT
	<i>V. harveyi</i>	P30	-	-	NT

-: Sem atividade; NT: Não foi testado o controle positivo

Diversos trabalhos consultados (BOUHLAL *et al.*, 2010; KOLANJINATHAN; STELLA, 2011; MANILAL *et al.*, 2008) revelaram que bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis aos extratos de macroalgas. Chiheb *et al.* (2009) constataram a susceptibilidade de *S. aureus* a 28 espécies de macroalgas testadas. Do mesmo modo, Manilal *et al.* (2011) investigando a bioatividade de *Laurencia brandenii*, comprovaram que a máxima atividade foi contra as Gram-positivas, contrastando com uma moderada sensibilidade do extrato da alga apresentado frente as Gram-negativas. Salem *et al.* (2011) também registraram uma maior susceptibilidade de bactérias Gram-positivas (zona de inibição 19 mm) do que Gram-negativas (zona de inibição 14 mm) quando usaram extratos de oito algas vermelhas tendo como solvente acetato de etila e metanol.

Nesse sentido, Christobel *et al.* (2011) revelaram que macroalgas das classes Chlorophyceae, Phaeophyceae e Rhodophyceae, inclusive *H. musciformis* foram mais ativas contra as bactérias Gram-negativas, sugerindo que os compostos bioativos poderiam ser de origem fenólica, o que facilitaria a solubilização da camada lipopolissacarídica da parede celular desse grupo de microrganismos, induzindo a entrada das moléculas inibidoras.

Os resultados dos testes realizados com os extratos da macroalga *H. musciformis* estão apresentados na tabela 3. Os extratos exibiram atividade contra microrganismos Gram-negativos (*V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. coralliilyticus*, *V. neptunis*, *V. navarrensis* e *V. brasiliensis*).

A bioatividade de *H. musciformis* foi observada contra 30% das cepas, com halos de inibição variando de 6,9 a 9,8 mm de diâmetro, todas do gênero *Vibrio* (Figura 10).

Bouhlal *et al.* (2010) reportaram halos de inibição que variaram de 15,0 a 35,0 mm de diâmetro. O maior halo encontrado foi contra *S. aureus*. Da mesma forma, o poder dos extratos de *H. musciformis* foi notado por Kolanjinatha e Stella (2009) frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*.

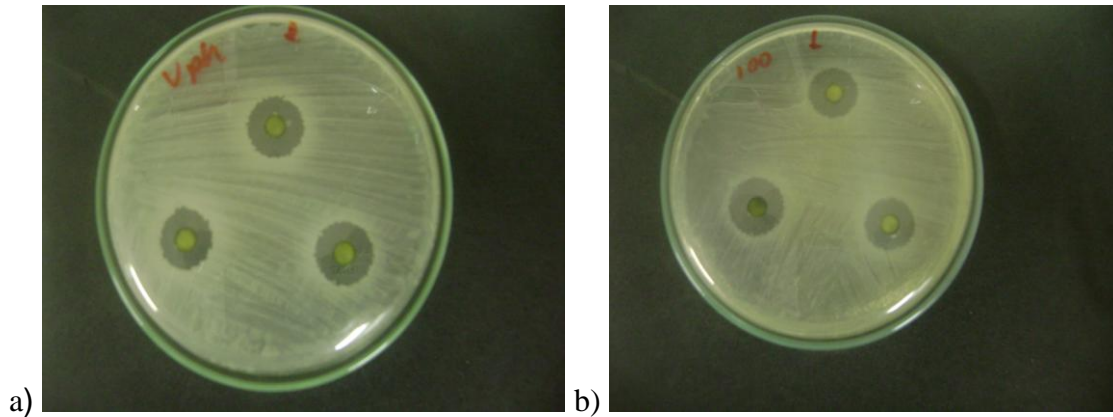


Figura 10 – Halos de inibição dos discos com extrato da alga *H. musciformes* frente às cepas de *V. parahaemolyticus* (a) e *V. neptunis* (b) isolados da hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei*.

Lipton *et al.* (2009) comprovaram a capacidade vibriostática dos metabólitos secundários extraídos de *H. musciformis* através da diminuição da carga bacteriana nos camarões. Os metabólitos eram adicionados à ração dos camarões durante dez dias, depois vibrios patogênicos eram injetados nesses crustáceos. Desta forma, os metabólitos contribuíam para a remoção bacteriana e, conseqüentemente aumentava a resistência dos crustáceos a doenças. Experimento semelhante foi realizado com outra espécie de alga vermelha, *Gracilaria fisheri*. Foi constatado que seu extrato etanólico numa concentração de $90 \mu\text{g/ml}^{-1}$, injetado no alimento do camarão *Penaeus monodon*, produzia atividade antimicrobiana contra cepa virulenta de *Vibrio harveyi* (KANJANA *et al.*, 2011).

Extratos de *H. musciformis* preparados com clorofórmio-metanol foram analisados por cromatografia gasosa-espectrometria de massa e os resultados comprovaram, que os ácidos graxos, especialmente o ácido hexadecanóico foi o principal componente encontrado neles (ABD-ELNABY, 2010).

Os resultados dos experimentos com os extratos da macroalga *U. fasciata* estão apresentados na Tabela 4 e Figura 11. Foi evidenciada atividade bactericida frente a 40% dos microrganismos testados. O maior tamanho de zona de inibição medido na placa foi de 8,4 mm contra *V. alginolyticus* e o menor contra *V. vulnificus*, 6,0 mm de diâmetro.

Tabela 4 – Tamanho médio dos halos de inibição (mm) dos extratos etanólicos da alga *Ulva fasciata* frente a dez cepas padrões ATCC e IOC de diferentes gêneros, dez cepas de *Vibrio* isoladas de hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* e dez cepas de *Vibrio* isoladas de ostras *Crassostrea rhizophorae*.

Origem	Espécie	Código	Coletas		Controle Positivo
			06/11/10	17/06/11	
Camarão	<i>V. xuii</i>	H1	-	-	34,73
	<i>V. coralliilyticus</i>	H2	7,5 ± 1,4	-	50,57
	<i>V. parahaemolyticus</i>	H3	-	-	31,55
	<i>V. alginolyticus</i>	H4	-	6,7 ± 0,2	46,90
	<i>V. brasiliensis</i>	H5	7,4 ± 0,6	-	32,49
	<i>V. neptunis</i>	H6	-	-	41,98
	<i>V. navarrensis</i>	H7	-	6,6 ± 0,4	50,05
	<i>V. vulnificus</i>	H8	-	-	35,48
	<i>V. cholerae</i>	H9	6,5 ± 0,1	-	39,00
	<i>V. diazotrophicus</i>	H10	8,35 ± 0,4	-	32,62
Ostra	<i>V. parahaemolyticus</i>	O11	-	-	30,45
	<i>V. parahaemolyticus</i>	O12	-	-	27,89
	<i>V. parahaemolyticus</i>	O13	-	-	30,52
	<i>V. parahaemolyticus</i>	O14	-	-	33,07
	<i>V. proteolyticus</i>	O15	7,3 ± 1,3	-	28,39
	<i>V. littoralis</i>	O16	-	-	28,72
	<i>V. ponticus</i>	O17	-	-	29,01
	<i>V. rumoiensis</i>	O18	-	-	37,14
	<i>V. parahaemolyticus</i>	O19	6,4 ± 0,3	6,8 ± 0,4	25,34
	<i>V. parahaemolyticus</i>	O20	7,5 ± 1,1	-	24,65
Padrão	<i>V. parahaemolyticus</i>	P21	-	7,0 ± 0,4	NT
	<i>V. vulnificus</i>	P22	6,0 ± 0,4	-	NT
	<i>V. alginolyticus</i>	P23	8,4 ± 0,5	6,6 ± 0,5	NT
	<i>V. mimicus</i>	P24	-	-	NT
	<i>Escherichia coli</i>	P25	-	-	NT
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P26	-	-	NT
	<i>Staphylococcus aureus</i>	P27	-	-	NT
	<i>Enterococcus faecalis</i>	P28	-	-	NT
	<i>Samonella</i>	P29	-	-	NT
	<i>V. harveyi</i>	P30	-	-	NT

-: Sem atividade; NT: Não foi testado o controle positivo

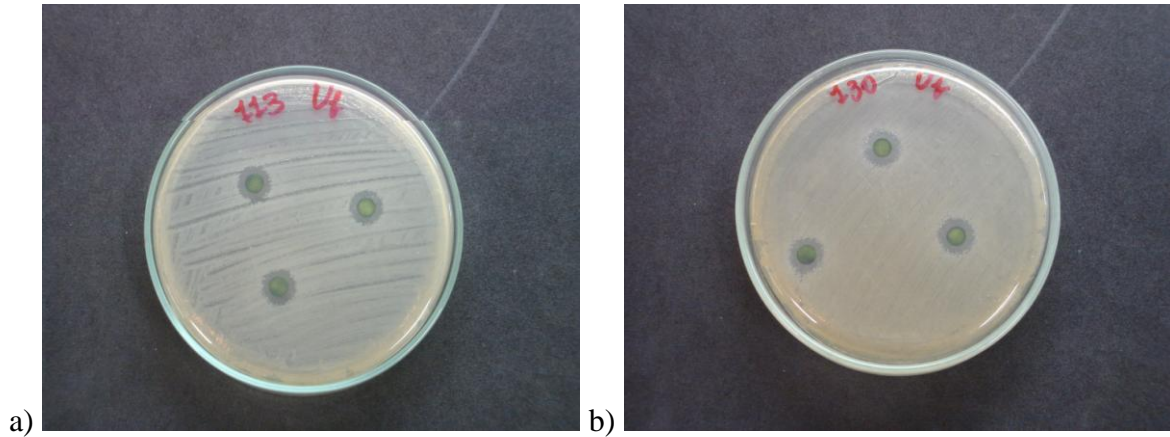


Figura 11 – Halos de inibição dos discos com extrato da alga *U. fasciata* frente as cepas de *V. parahaemolyticus* (a) e *V. alginolyticus* (b) isolados da hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei*.

Estudos anteriores demonstraram que o extrato aquoso de *Ulva fasciata* apresentou concentrações inibitórias mínima (CIM) de 16,2; 5,4; 7,1 e 15 mg/ml, para *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* respectivamente (PRIYA; ALI, 2011).

De acordo com Osman *et al.* (2010), os extratos de algas verdes preparados com etanol, metanol e acetona foram os mais ativos para as bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus aureus*, e para as Gram-negativas *Escherichia coli*, *Salmonella* sor Typhi e *Klebsiella pneumoniae*. Quando a alga *U. fasciata* foi testada contra *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Streptococcus aureus*, *E. coli*, *Salmonella* sor Typhi e *K. pneumoniae* foram evidenciadas zonas de inibição de até 24,66 mm de diâmetro. Estudos mostram a capacidade dessa alga em inibir também patógenos de peixes tais como: *V. alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila* e *Enterobacter sp* (PRIYADHARSHINI *et al.*, 2012).

Recentemente, metabólitos secundários de *U. fasciata* foram testados frente a víbrios patogênicos isolados de peixe, sendo detectados diterpenóides com atividade antibacteriana contra *V. parahaemolyticus* e *V. harveyi* (CHAKRABORTY *et al.*, 2010).

De acordo com Selvin *et al.* (2004) houve um aumento significativo nos fatores de defesa do camarão cultivado, evidenciados por testes de hemograma, índice de aglutinação, taxa fagocítica, depuração bacteriana e atividade bactericida do soro de camarões tratados comparado ao grupo controle (camarão sem tratamento), quando alimentado com metabólitos secundários de *U. fasciata* incorporados na dieta, através da pulverização no alimento. Baseado na análise da carga bacteriana do intestino dos camarões foi constatado que os

metabólitos secundários dessa macroalga poderiam ser usados como agente profilático na carcinicultura.

Proteínas, tais como as lectinas de algas marinhas vermelhas, foram relacionadas com a inibição do crescimento de *V. vulnificus* isolado de ambiente marinho (LIAO *et al.*, 2003). A atividade antibacteriana dos extratos aquosos de *U. fasciata* e *H. musciformis* frente a cepas Gram-positivas também poderiam indicar a ação de lectinas agindo sobre açúcares específicos da membrana celular das bactérias, causando aglutinação (CHARZEDDINE; FARIÑAS, 2001). Na verdade, as algas possuem diversos compostos bactericidas tais como: aminoácidos, terpenóides, florotaninos, ácido acrílico, compostos fenólicos, esteróides, derivados halogenados, cetonas, alcanos, polissulfuretos cíclicos e ácidos graxos (WATSON; CRUZ-RIVERA, 2003).

Os resultados variaram nas diferentes épocas do ano para *P. gymnospora*. O maior desempenho antibacteriano dos extratos etanólicos dessa alga aconteceu quando a coleta foi realizada em setembro de 2010, diminuindo, de maneira gradativa, em março e junho de 2011.

Para os extratos etanólicos de *H. musciformis*, bons resultados foram obtidos em março de 2010, sendo apenas uma cepa, sensível ao extrato da alga coletada em abril de 2011. Nenhuma inibição foi constatada no uso de extratos de algas coletadas em agosto de 2010 e em março e junho de 2011. Já para os extratos etanólicos de *U. fasciata* o melhor efeito contra as cepas testadas aconteceu em novembro de 2010, diminuindo em junho de 2011. Essa queda da ação antimicrobiana foi constatada pela diminuição do número das cepas sensíveis, visualizada através da diminuição dos halos, confirmado através do teste de DD.

A divergência nos resultados dos extratos da mesma espécie de alga, coletada em meses diferentes, sugere que os extratos mais eficientes foram preparados com algas coletadas no verão (ausência do período chuvoso). Diferente dos achados, Abd-Elnaby (2010) revelou que os extratos preparados com a alga *Ulva lactuca* mostraram forte atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas no inverno, enquanto que no verão exibiram a maior atividade contra bactérias Gram-positivas.

Além da época da coleta, a presença de bactérias patogênicas associadas à superfície de algas pode induzir à produção de compostos antibacterianos, fato constatado por Abd-Elnaby (2010).

Quando as cepas anteriormente sensíveis aos extratos etanólicos de *U. fasciata*, *P. gymnospora* e *H. musciformis* foram submetidas ao teste de CIM as concentrações variaram

de 4 a 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. Contudo, mesmo nos extratos mais concentrados não foi possível encontrar a CIM de todas as cepas sensíveis no teste de DD.

A CIM do extrato de *P. gymnospora* para *V. alginolyticus* e *V. diazotrophicus* foi de 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. A CIM do extrato de *U. fasciata* para as cepas *V. alginolyticus* e *V. diazotrophicus* foi de 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$. E a do extrato de *H. musciformis* para *V. coralliilyticus*, *V. parahaemolyticus* e *V. navarrensis* foi de 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Deste modo, a CIM mais baixa registrada quando foi usado o extrato etanólico de *P. gymnospora* contra *V. alginolyticus* foi de 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Corroborando com a presente pesquisa em relação à alta concentração das CIM detectadas para os extratos algais, Kolanjinathan e Stella (2011) encontraram que a CIM dos extratos metanólicos da alga *Gracilaria corticata* frente a bactérias Gram-negativas e positivas variaram entre 1, 25 e 5 mg/mL , já os extratos hexânicos da mesma alga variaram de 5 a 80 mg/mL . O extrato aquoso bruto de *U. fasciata* apresentou os valores de MIC de 16.2, 5.4, 7.1 e 15 mg/mL contra *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, respectivamente (PRIYA; ALI, 2011). Concentrações mais baixas foram alcançadas na presente pesquisa.

As frações cromatográficas do extrato metanólico da alga verde *Pithophora oedogonia* apresentaram baixos valores de MIC para *Streptococcus pyogenes* ($31.2 \pm 0.07 \mu\text{g}/\text{mL}$) e *Streptococcus faecalis* ($31.25 \pm 0.072 \mu\text{g}/\text{mL}$) quando comparados com antimicrobianos, como a ampicilina, que foram de 250 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (SUKUMARAN; THEVANATHAN, 2010).

Normalmente, estudos que envolvem ação de extratos de produtos naturais e/ou testes da CIM relatam que são usadas quantidades maiores do que aquelas utilizadas para o mesmo fim, quando se testa antimicrobianos comerciais (AL-HAJ *et al.*, 2010). Isto se deve ao fato de que, extratos são misturas complexas de vários compostos, sendo as porções do princípio bioativo muito baixas, necessitando assim de uma maior concentração e/ou volume para inibir o crescimento do microrganismo (BANSEMIR *et al.*, 2006). Ratificando essas observações a CIM dos extratos algais avaliados na presente pesquisa apresentaram-se muito acima do controle positivo (ciprofloxacina 5 μg).

5 CONCLUSÃO

Os resultados da triagem com macroalgas das famílias Phaeophyceae, Rhodophyceae e Chlorophyceae da costa cearense estudadas indicaram que a *Padina gymnospora*, *Hypnea musciformes* e *Ulva fasciata* apresentaram atividade antibacteriana contra víbrios resistentes a antimicrobianos, com fatores de virulência isolados de ostra e da hemolinfa de camarão, além de cepas padrões ATCC de víbrios.

O álcool etílico foi o solvente mais eficaz na obtenção do extrato capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Padina gymnospora foi a macroalga que apresentou a maior capacidade inibitória das espécies de *Vibrio* (57%) e as maiores zonas de inibição, seguida pela *Ulva fasciata* (40%) e por último a *Hypnea musciformes* (30%).

O menor valor da CIM encontrada foi com o extrato etanólico da *Padina gymnospora* com 512 µg/ mL contra *V. alginolyticus*.

A atividade bactericida dos extratos algais variou de acordo com as diferentes coletas realizadas.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que os extratos de macroalgas marinhas poderiam servir como uma fonte potencial de produtos naturais biologicamente ativos para aplicação na indústria.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELNABY, H. Bacteria–Algae Interactions in Abu-Qir Marine Ecosystem and Some Applied Aspects of Algal Extracts. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 6, n. 4, p. 345-357, 2010.
- ABREU, G. F.; TALAMINI, V.; STADNIK, M. J. Bioprospecção de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para o controle da antracnose do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 1, p. 78-82, 2008
- AGUIRRE-GUZMÁN, G.; VÁSQUEZ-JUÁREZ, R.; ASCENCIO, F. Differences in the susceptibility of american white Shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, p. 215-219, nov. 2001.
- AKINBOWALE, O. L.; PENG, H.; BARTON, M. D. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1103–1113, 2006.
- AL-HAJ N. A. *et al.* Antibacterial activity of marine source extracts against multidrug resistance organisms. **American Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 5, p. 95-102, 2010.
- ANGULO, F. Agentes antimicrobianos en acuicultura: impacto potencial em la salud pública. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología**, v. 20, n. 6, p. 217-219, nov/dez. 2000.
- AUSTIN, B.; ZHANG, X-H. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 119-124, 2006.
- AO, C. *et al.* Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa* L. fil. extract. **Food Control**, v. 19, p. 940-948, 2008.
- AZIZA, M. *et al.* Seasonal variation of the growth, chemical composition and carrageenan extracted from *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux harvested along the Atlantic coast of Morocco. **Scientific Research and Essay**, v. 2, n. 10, p. 509-514, oct. 2008.
- BAFFONE, W. *et al.* Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 54, p. 9-18, 2000.
- BAFFONE, W. *et al.* Occurrence and expression of virulence-related properties by environmental halophilic *Vibrio* spp. in in vitro and in vivo systems. **Food Control**, v. 16, p. 451-457, June 2005.
- BANSEMIR, A. *et al.* Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. **Aquaculture**, v. 252, p. 79–84, 2006.

BARROS, L. M. O. *et al.* Contaminante fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* comercializada na Praia do Futuro, Fortaleza-Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, v. 36, n. 3, p. 285-289, 2005.

BARSANTI, P. *et al.* **The World of Algae**. Springer Science. Business Media B.V. 2008

BENEVIDES, N. M. B. *et al.* Purification and partial characterization of the lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh. **Botanica Marina**, v. 44, p. 17-22, 2001.

BEZERRA, A. F. **Cultivo de algas marinhas como desenvolvimento de comunidades costeiras**. 2008. 75f. Dissertação (Mestre em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Programa Regional de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

BOUHLAL, R. *et al.* The antibacterial potential of the seaweeds (Rhodophyceae) of the Strait of Gibraltar and the Mediterranean Coast of Morocco. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 38, p. 6365-6372, setp. 2010.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1137-1144, 2006.

CALADO, S. C. S. *et al.* Cinética e equilíbrio de bio sorção de chumbo por macroalgas. **Tropical Oceanography**, Recife, v. 31, n. 1, p. 53–62, 2003.

CARNEIRO, D. O. **Avaliação e caracterização de populações bacterianas resistentes a antibióticos isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2005. 69 f. Dissertação (Mestre em Ciências de alimentos) – Programa de Pós-Graduação “stricto sensu” em Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

CARVALHO, F. C. T. *et al.* Susceptibilidade antimicrobiana de *Salmonella* spp. isoladas de fazendas de carciniculturas no Estado do Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, n. 4, p. 549-556, 2009.

CHAKRABORTY, K. *et al.* Antibacterial labdane diterpenoids of *Ulva fasciata* Delile from southwestern coast of the Indian Peninsula. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1399-1408, 2010.

CHARZEDDINE, L.; FARIÑAS, M. Propiedades bioactivas de algas marinas del nororiente de Venezuela. **Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad Oriente**, v. 40, p. 49-54, 2001.

CHIHEB, I. *et al.* Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 7, p. 1258-1262, Apr. 2009.

CHRISTOBEL, G. J. *et al.* Antibacterial activity of aqueous extract from selected macroalgae of southwest coast of India. **Seaweed Research Utilization.**, v. 33, p. 67-75, 2011.

CHU, C.Y., HUANG, R., LIN, L. P. Analysis of the agglutinating activity from unicellular algae. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, p. 401-408, 2007.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Twentieth Informational Supplement: Supplement M100-S20, Wayne, PA, USA, 2010.

COSTA, R.A. *et al.* Susceptibilidade “in vitro” a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp isoladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceará. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 6, p. 458-462, 2008.

COSTA, V. M. F. **Utilização da macroalga *Ulva lactuca* Linnaeus na redução de nutrientes (NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{2-}) provenientes da carcinicultura**. 2006. 52p. Dissertação (Mestrado em Bioecologia aquática) – Departamento de Oceanografia e Limnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 2006

DUBBER, D.; HARDER, T. Extracts of *Ceramium rubrum*, *Mastocarpus stellatus* and *Laminaria digitata* inhibit growth of marine and fish pathogenic bacteria at ecologically realistic concentrations. **Aquaculture**, v. 274, p. 196-200, 2008.

ELY, R.; SUPRIYA, T.; NAIK, C. G. Antimicrobial activity of marine organisms collected off the coast of South East India. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 309, p. 121-127, 2004.

ENGEL, S. *et al.* Antimicrobial activities of extracts from tropical Atlantic marine plants against marine pathogens and saprophytes. **Marine Biology**, v. 149, p.991–1002, 2006.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state fisheries and aquaculture 2010. Roma: **FAO**, 2010. 219 p.

FELÍCIO, R. *et al.* Trypanocidal, leishmanicidal and antifungal potential from marine red alga *Bostrychia tenella* J. Agardh (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, p. 763-769, 2010.

GOVINDASAMY, C. *et al.* In vitro antimicrobial activities of seaweed extracts against human pathogens. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 7, p. 2076-2077, 2011.

GRANHAM, L. E.; GRANHAM, J. M.; WILCOX, L. W. **Algae**. 2. ed. São Francisco: Pearson Education, 2009. 616 p.

HELLIO, C. *et al.* Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. **Marine Environmental Research**, v. 52, p. 231-247, 2001.

HERNÁNDEZ-CARMONA, G. *et al.* Monthly variation in the chemical composition of *Eisenia arborea* J.E. Areschoug. **Journal of Applied Phycology**, v.21, p. 607-616, 2009.

HINDLER, J. A.; JORGENSEN, J. H. Concepts in antimicrobial therapy. Procedures in antimicrobial susceptibility testing. In: MAHON, C. R.; MANUSELIS, JR, G. **Textbook of Diagnostic Microbiology**. W. B. Saunders Company, 1995. p. 58-89.

HIRSCH, D. *et al.* Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e ambientes aquáticos. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1211-1217, Nov/dez. 2006.

HLADY, W. G.; MULLEN, R. C.; HOPKINS, R. S. *Vibrio vulnificus* from raw oysters: leading cause of reported deaths from foodborne illness in Florida. **Journal of the Florida Medical Association**, Jacksonville, v. 172, p. 795-806, 1993.

HOEK, V. C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae**: an introduction to Phycology. Cambridge: University Press, 1995. 623 p,

HORNSEY; HIDE. The production of antimicrobial compounds by British marine algae III. Distribution of antimicrobial activity within the algal thallus. **British Phycological Journal**, v. 11, p. 175-181, 1976.

HORNSEY; HIDE. The production of antimicrobial compounds by British marine algae. IV. Variation of antimicrobial activity with algal generation. **British Phycological Journal**, v. 20, p. 21-25, Mar, 1985.

KAHLA-NAKBI, A. B. *et al.* Survival of *Vibrio alginolyticus* in seawater and retention of virulence of its starved cells. **Marine Environmental Research**, v. 64, p. 469-478, 2007.

KANJANA, K. *et al.* Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 30, p. 389-396, 2011.

KANTACHUMPOO, A.; CHIRAPART, A. Components and antimicrobial activity of polysaccharides extracted from Thai brown seaweeds. **Kasetsart Journal (Natural Science)**, v. 44, p. 220-233, 2010.

KARTHIKAIDEVI, G. *et al.* Antibacterial properties of selected green seaweeds from Vedalai coastal waters; Gulf of Mannar marine biosphere reserve. **Global Journal of Pharmacology**, v. 3, n. 2, p. 107-112, 2009.

KOLANJINATHAN, K.; STELLA, D. Antibacterial activity of marine macro algae against human pathogens. **Recent Research in Science and Technology**, v. 1, p. 020-022, 2009.

KOLANJINATHAN, K.; STELLA, D. Pharmacological effect of *Gracilaria corticata* solvent extracts against human pathogenic bacteria and fungi. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, v. 2, n. 6, p. 1722-1728, 2011.

KOTNALA, S.; GARG. A.; CHATTERJI, A. Screening for the presence of antimicrobial activity in few Indian seaweeds. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 32, n. 1, p. 69-75, 2009.

- KUMARAN, S. *et al.* Antibiotic resistant *Escherichia coli* strains from seafood and its susceptibility to seaweed extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, p. 977-981, Dec. 2010.
- LAVANYA, R., VEERAPPAN, N. Antibacterial potential of six seaweeds collected from Gulf of Mannar of southeast coast of India. **Advances in Biological Research**, v. 5, p. 1, p. 38-44, 2011.
- LAVORANTE, B. R. B. O. *et al.* Método de determinação e avaliação da depleção de oxitetraciclina em camarão marinho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 44, n. 7, p. 738-745, jul. 2009.
- LEE, J-K. *et al.* Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters from Korean retail outlets. **Food Control**, v. 19, p. 990-994, 2008.
- LIAO, W. R. *et al.* Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine v́brios. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** , v. 30, p. 433-439, 2003.
- LIMA, R. M. S. *et al.* Resistência a antimicrobianos de bactérias oriundas de ambiente de criação e filés de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 126-132, jan./fev. 2006
- LIMA-FILHO, J. V. *et al.* Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern Brazilian coast. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 311-313, 2002.
- LIPTON, A.P.; PRAMITHA, V.S.; JEAN JOSE, J. Marine secondary metabolites (MSM) from macro algae enhance bacterial clearance in hemolymph of *Penaeus monodon*. **The Israeli Journal of Aquaculture**, Bamidgeh, v. 61, n. 1, p. 42-47, 2009.
- LOBBAN, C. S.; HARRISON, P. J. Seaweed ecology and physiology. **Cambridge University Press, UK**, 1997. 366 p.
- MAGALLANES, C.; CÓRDOVA, C.; OROZCO, R. Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. **Revista peruana de biología**, v. 10, n. 2, p. 125- 132, 2003.
- MAGGS, C. A. *et al.* Speciation in red algae: Members of the ceramiales as model organisms. Oxford University. **Integrative and Comparative Biology**, Cary, v. 51, n. 3, p. 492-504, sept. 2011
- MANIVANNAN, K. *et al.* Antimicrobial potential of selected brown seaweeds from Vedalai coastal waters, Gulf of Mannar. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 114-120, apr. 2011.
- MANILAL, A. *et al.* Biological activity of the red alga *Laurencia brandenii*. **Acta Botanica Croatica**, v. 70, n. 1, p. 81-90, 2011.
- MASIH-NETO, T. **Cultivo da carragenófito *Hypnea musciformis* (wulfen) j.v. lamour. (gigartinales - rhodophyta) em estruturas long-line.** 2009. Dissertação (Mestre em engenharia de pesca), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

- MASINI, L., *et al.* Research and characterization of pathogenic vibrios from bathing water along the Conero Riviera (Central Italy). **Water Research**, v. 41, p. 4031- 4040, 2007.
- MATIAS, W. G. Algas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, n. 8, p. 16-17, 1999.
- MATTÉ, M. H. *et al.* Virulence factors of *Vibrio metschnikovii* strains isolated from fish in Brazil. **Food Control**, v. 18, p. 747-751, 2007.
- MIRANDA, C. D.; ZEMELMAN, R. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. **The Science of the Total Environment**, v. 293, p. 207-218, 2002.
- NAIR R.; CHANDA S. In-vitro antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaf extracts against clinically important pathogenic microbial strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 452-458, 2007.
- OLIVEIRA, E. C. *et al.* **Algas e angiospemas marinhas bêmicas do litoral brasileiro**. Disponível em: <<http://www.bdt.fat.org.br/workshop/costa/algas>>. Acesso em: junho de 2005.
- OLIVEIRA, A. L. L. **Avaliação química e biológica de espécimes de *Bostrychia radicans* (Rhodomelaceae)**. 2009. 101f. Dissertação (Mestre em Ciências farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- OLIVEIRA, M. N. *et al.* Nutritive and non-nutritive attributes of washed-up seaweeds from the coast of Ceará, **Brazil. Food Chemistry**, v. 115, p. 254-259, 2009.
- OSMAN, M. E. H.; ABUSHADY, A. M.; ELSHOBARY, M. E. In vitro screening of antimicrobial activity of extracts of some macroalgae collected from Abu-Qir bay Alexandria, Egypt. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 12, p. 7203-7208, mar. 2010.
- OTTAVIANI, D. *et al.* Presence of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* strains in mussels from the Adriatic Sea, Italy. **Food Microbiology**, v. 22, p. 585–590, 2005.
- PÁDUA, M.; FONTOURA, P. S. G.; MATHIAS, A. L. Chemical composition of *Ulvaria oxysperma* (Kützinger) Bliding, *Ulva lactuca* (Linnaeus) and *Ulva fasciata* (Delile). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 1, p. 49-55, 2004.
- PATRA, J. K. *et al.* Antimicrobial activity of organic solvent extracts of three marine macroalgae from Chilika Lake, Orissa, India. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 128-131, 2009.
- PAULERT, R. **Atividade antimicrobiana e controle da antracnose do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando polissacarídeo e extratos da macroalga marinha *Ulva fasciata***. 2005. 107f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) – Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

- PEIXOTO J.R.O., et al. *In vitro* antibacterial effect of aqueous and ethanolic *Moringa* leaf extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, p. 201-204, 2011.
- PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. **Biologia Marinha**. In. Cap. Produção primária marinha. Editora Interciência, 2002.
- PEREIRA, C. S.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D. P. Vibrios patogênicos em ostras (*Crassostrea rhizophorae*) servidas em restaurantes no Rio de Janeiro: um alerta para a Saúde Pública. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 300-303, mai./jun. 2007.
- PEREIRA-JÚNIOR, D. J. *et al.* Concentração inibitória mínima de oxitetraciclina para isolados de *Aeromonas hydrophila* obtidos de diferentes fontes. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1190-1195, nov./dez., 2006
- PINHEIRO-VIEIRA, F., CALAND-NORONHA, M. C. Atividade antibiótica de algumas algas marinhas do estado do Ceará. **Arquivo Ciências do Mar**, v. 11, n. 2, p. 91-93, 1971.
- PINTO, A. *et al.* Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in southern Italian shellfish. **Food Control**, v. 19, p. 1037-1041, 2008.
- PRIYA, K. M.; ALI, S. K. Antibacterial activity of aqueous extract of seaweed *Ulva fasciata*: an *in vitro* study. **International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research**, v. 2, n. 2, p. 101-105, may/july 2011.
- PRIYADHARSHINI, S. *et al.* Antimicrobial and hemolytic activity of seaweed extracts *Ulva fasciata* (Delile 1813) from Mandapam, Southeast coast of India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, supl. 1, p. S38-S39, 2012.
- RAJASULOCHANA, P. *et al.* Antibacterial activity of the extracts of marine red and brown algae. **Journal of American Science**, v. 5, n. 3, p. 20-25, 2009.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 234 p.
- RAVIKUMAR, S. *et al.* Screening of seaweed extracts against antibiotic resistant post operative infectious pathogens. **Seaweed Research and Utilisation**, v. 24, n. 1, p. 95-99, 2002.
- RAYMUNDO, M. S., HORTA, P., FETT, R. Atividade antioxidante in vitro de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 4, out./dez. 2004
- REBOUÇAS, R. H. **Perfil de resistência a antimicrobianos de *Vibrio* isolado de água de viveiro e de camarão (*litopenaeus vannamei*) cultivado em fazendas no estado do ceará**. 2008. 83p. Dissertação (Mestre em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

RIBEIRO, C. M. F. **Aspectos gerais da vibriose em camarão-marinho**. 2005. 40f. Especialização (Especialista em Microbiologia) – Faculdade Frassinetti do Recife, Recife, 2005.

RÍOS, N. *et al.* Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas marinas venezolanas. **Revista peruana de biología**, v. 16, n. 1, p. 97- 100, ago. 2009.

RIVEROLL, L, M, D. Estudio de la actividad frente a bacterias patógenas de cinco especies algales: Pros y contras del protocolo de aislamiento guiado por bioensayo. 2009. 116f. Dissertação (Mestre em Ciências e Manejo de Recursos Marinhos) – Instituto Politécnico nacional, La Paz, 2009.

RIZVI, M. A.; SHAMEEL, M. Studies on the Bioactivity and Elementology of Marine Algae From the Coast of Karachi, Pakistan. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 865–872, 2004.

ROCHA, R. S.; *et al.*. Avaliação da Atividade antimicrobiana da alga marinha *Spatoglossum schroederi* obtida por extração etanólica e metanólica. In: *I Encontro Regional de Microbiologia Aplicada*, 2009, Salvador. **Anais do I Encontro Regional de Microbiologia Aplicada**, 2009.

RODRIGUES, J. A. G. *et al.* Extração e atividade anticoagulante dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Halymenia pseudofloresia*. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 40, n. 2, p. 224-231, abr./jun. 2009.

SAEIDNIA, S. *et al.* Biological activity of two red algae, *Gracilaria salicornia* and *Hypnea flagelliformis* from Persian Gulf. **Pharmacognosy Research**, v. 1, n. 6, p. 428-430, nov./dez. 2009.

SALEM, W. M.; GALAL, H.; NASR EL-DEEN, F. Screening for antibacterial activities in some marine algae from the red sea (Hurghada, Egypt). **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 15, p. 2160-2167, aug. 2011.

SASIDHARAN S.; DARAH, I.; NOORDIN, M. K. M. J. In vitro antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* and acute oral toxicity of marine algae *Gracilaria changii*. **New Biotechnology**, v. 27, n. 4, sept. 2010.

SAMPAIO, A. H. *et al.* Hemaglutininas de algas marinhas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, n. 2, p. 171-177, 1993.

SELVIN, J.; HUXLEY, A. J.; LIPTON, A. P. Immunomodulatory potential of marine secondary metabolites against bacterial diseases of shrimp. **Aquaculture**, v. 230, p. 241-248, 2004.

SHANMUGHAPRIYA, S. *et al.* Antimicrobial activity of seaweeds extracts against multiresistant pathogens. **Annals of Microbiology**, v. 58, p. 535-541, 2008.

SILVA, R. L. **Utilização de macroalgas marinhas arribadas em dietas para o camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)**. 2005. 59f. Dissertação (Mestre em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) - Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005.

- SILVA P. M. **Atividades biológicas de extratos de algas marinhas brasileiras**. 2009. 74f. Dissertação (Mestre em Ciências (Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- SILVA, R. P. P. **Fatores interferentes na frequência da vibriose em camarão marinho cultivado (*Litopenaeus vannamei*, boone 1931) no litoral sul de Pernambuco**. 2007. 51f. Dissertação (Mestre em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) - Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.
- SOARES, C. M. **Estudo químico da alga *Lithothamnion calcareum* e avaliação da atividade inibitória do rolamento de leucócitos**. 2009. 102f. Dissertação (Mestre em Ciências farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.
- SOARES, J. B.; CASIMIRO, A. R. S.; ALBUQUERQUE, L. M. B. **Métodos de coloração**. Microbiologia Básica. Fortaleza: UFC, v. 2, 1991, p. 33-35.
- SOUSA, M. B. *et al.* α -, β -caroteno e α -tocoferol em algas marinhas in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 953-958, out./dez. 2008.
- SOUSA, O. V. *Vibrio parahaemolyticus*. In: VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: Teoria e pratica**. 1ª ed. São Paulo: Varela, 2004. p. 141-149.
- SOUSA, O. V. *Vibrio cholerae*. In: VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: Teoria e pratica**. 1ª ed. São Paulo: Varela, 2004. p. 187-198.
- STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1740, p. 101-107, 2005.
- STEIN, E. M., *et al.* Screening for antifungal activities of extracts of the Brazilian seaweed genus *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 2, p. 290-295, mar./apr. 2011.
- SUKUMARAN, P.; THEVANATHAN, R. Antibacterial Properties of the green alga *Pithophora Oedogonia* (Mont.) Wittrock. **Report and Opinion**, v. 2, n. 12, p. 112-120, 2010.
- TASKIN, E. *et al.* Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 2746-2751, 2007.
- TEXEIRA, V. L.; KELECOM, A.; GOTTLIEB, O. R. Produtos naturais de algas marinhas. **Química nova**, v. 14, n. 2, 1991.
- THOMPSON, G. A. Lipids and membrane function in green algae. **Biochimica et Biophysica Acta – Lipids and Lipid Metabolism**, Amsterdam, v. 1302, n. 1, p. 17-45, July 1996.
- THYSSEN, A.; OLLEVIER, F. *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* to 15 different antimicrobial agents. **Aquaculture**, v. 200, p. 259-269, 2001.

TUNEY, U. *et al.* Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (Üzmir, Turkey). **Turkish Journal of Biology**, v. 30, p. 171-175, 2006.

UMAMAHESHWARI, R.; THIRUMARAN, G.; ANANTHARAMAN, P. Potential Antibacterial Activities of Seagrasses from Vellar Estuary; Southeast Coast of India. **Advances in Biological Research**, v. 3, n. 3-4, p. 140-143, 2009.

VAIRAPPAN, C. S. Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae, *Laurencia majuscula* (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 255-259, 2003.

VALLINAYAGAM, K. *et al.* Antibacterial activity of some selected seaweeds from Pudumadam Coastal Regions. **Global Journal of Pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 50-52, 2009.

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

VIEIRA, G. H. F. *et al.* Antibacterial effect (*in vitro*) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against gram positive and gram negative bacteria. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, p. 129-132, 2010.

VIEIRA, R. H. S. F. *et al.* Kanagawa-negative, *tdh* and *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fresh oysters marketed in Fortaleza, Brazil. **Current Microbiology**, v. 63, n. 2, p.126-130, may, 2011.

VIEIRA, R. H. S. F. *et al.* Contaminação fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* e da água de cultivo do estuário do Rio Pacoti (Eusébio, Estado do Ceará): Isolamento e identificação de *Escherichia coli* e sua susceptibilidade a diferentes antimicrobianos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 180-189, 2008

VLACHOS, V.; CRITCHLEY, A. T.; HOLY, V. Effect of post-collection storage time and season on the antibacterial activity of selected southern african marine macroalgae. In: Chen, F.; Jiang, Y. **Algae and their Biotechnological Potential**. Kluwer Academic Publishers, Hong Kong, 2000.

WATSON, S. B.; CRUZ-RIVERA, E. Algal chemical ecology: an introduction to the special issue. **Phycologia**, v. 42, p. 319-323, 2003.

WHO - World Health Organisation. **Overcoming antimicrobial resistance world health report on infectious diseases** 2011. Geneva, 2011

YOSHIMURA, C. Y. **Avaliação do potencial de cultivo e produção de Agar de *Gracilaria domingensis* e de *Gracilaria caudata* (Rhodophyta, Gracilariales) na enseada de armação de Itapocoroy (Penha, Santa Catarina)**. 2006, 163f. Tese (Doutor em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.