



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS

FRANCISCO REGIVÂNIO NASCIMENTO ANDRADE

CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE POLISSACARÍDEOS
SULFATADOS EXTRAÍDOS DA MACROALGA MARINHA VERDE
Enteromorpha sp. CULTIVADA EM LABORATÓRIO

FORTALEZA

2017

FRANCISCO REGIVÂNIO NASCIMENTO ANDRADE

CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE POLISSACARÍDEOS
SULFATADOS EXTRAÍDOS DA MACROALGA MARINHA VERDE *Enteromorpha* sp.
CULTIVADA EM LABORATÓRIO

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A567 Andrade, Francisco Regivânio Nascimento.
Caracterização e atividade antibiofilme de polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp. cultivada em laboratório / Francisco Regivânio Nascimento Andrade. – 2017.
72 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio .
Coorientação: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias.
1. Alga. 2. Cultivo. 3. Polissacarídeo . 4. Atividade Biológica. I. Título.

CDD 660.6

FRANCISCO REGIVÂNIO NASCIMENTO ANDRADE

CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE POLISSACARÍDEOS
SULFATADOS EXTRAÍDOS DA MACROALGA MARINHA VERDE *Enteromorpha* sp.
CULTIVADA EM LABORATÓRIO

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Aprovada em: 17 / 02 / 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a Kelma Maria dos Santos Pires Cavalcante
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, por ter me concedido o dom de
realizar essa pesquisa
Ao meu eterno professor Wladimir Ronald
Lobo Farias que se dedicou com empenho e
paixão a arte de ensinar

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmãos e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Aos meus grandes amigos Átila Teixeira, Wellington Gomes, Victor Neves, Eduardo Freitas, Daniele Freitas, Daniel Oliveira, Gutho Sousa e Elder Lima pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Não importa o que aconteça sempre serei grato a vocês e levarei essa amizade pelo resto da vida.

Agradeço também a minha futura esposa Mikaelle Nobre, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades. Por sua presença amável e plena dedicação ao nosso amor. Te Amo.

Ao Vinícius Alves por seu companheirismo, pelo seu apoio em minhas decisões, pelo mútuo ensinamento de vida e por situações vividas, sejam boas ou ruins, mas que só engrandecem a figura de um irmão.

A minha grande amiga e irmã de graduação e vida Karolina Sousa pelo seu apoio e plena dedicação de amizade.

Ao Professor Wladimir Ronald, pelo exemplo, confiança, excelente orientação durante minha vida acadêmica e por despertar em mim o desejo de continuar trilhando esse caminho.

Ao Professor Alexandre Holanda Sampaio, por sua amizade, dedicação, disposição e orientação que muito contribuiu para levar a frente a realização do meu trabalho.

A professora Silvana Saker pela sua atenção, incentivo, amizade e pelo exemplo de professora que és.

Aos professores do departamento de Engenharia de Pesca, em especial Kelma Maria e Bartolomeu Warlene, pelas suas correções e considerações que muito contribuiu para realização final desse trabalho.

A todos os meus companheiros do laboratório de Plactologia e Bioquímica Marinha do departamento de Engenharia de Pesca, em especial a Ana Luzia, Pedro Henrique, Hudson Maia, Lia Reck e Eugênio Ramos.

Ao Professor Paulo Mourão da Universidade Federal do Rio de Janeiro, um excelente professor, humilde e dedicado a ciência e por toda sua equipe que muito ajudaram na realização final dessa pesquisa.

Aos amigos que muito me ajudaram nessa pesquisa e me acolheram durante o estágio na UFRJ, serei eternamente grato a você Paulo Soares, Kátia Alves, Ismael Lino, Felipe Bezzera e Ariana Vasconcelos.

Ao Laboratório Integrado de Biomoléculas do Departamento de Patologia e Medicina Legal, na pessoa do pesquisador Mayron Alves.

RESUMO

A colheita desenfreada de algas para extração de seus derivados causa um enorme problema ambiental, uma solução para diminuição desse impacto seria cultivá-las. Visto que as algas verdes se tornaram uma importante fonte de compostos bioativos, dentre eles os polissacarídeos sulfatados, objetivou-se cultivar a macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp. em laboratório, a partir do isolamento de seus esporos obtidos na natureza, e dela extrair, purificar, caracterizar essas macromoléculas e avaliar seu efeito frente a formação de biofilme bacteriano. A alga foi cultivada em meio Guillard f/2 e os polissacarídeos sulfatados totais (PST) foram extraídos por digestão enzimática com papaína e fracionados em cromatografia de troca iônica DEAE-Celulose usando um gradiente salino do tipo “stepwise” com concentrações crescentes de NaCl (0,5 - 2,0 M). A fração majoritária mais metacromática foi produzida em coluna preparativa, isolada das demais, dialisada e liofilizada. Para melhor caracterização dos polissacarídeos extraídos, realizou-se uma análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em uma coluna de troca iônica DEAE-Celulose, eluída por gradiente linear de NaCl (0 - 3,0 M). As frações de PST isoladas nas cromatografias, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e poliacrilamida. A determinação de açúcares totais, ácidos urônicos e sulfato foram pelos métodos fenol-ácido sulfúrico, carbazol-ácido sulfúrico e gelatina bário, respectivamente. A composição monossacarídica foi obtida por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). Foram analisadas as atividades dos polissacarídeos sulfatados sobre o crescimento planctônico das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, bem como a sua ação sob a formação de biofilmes. A alga cresceu 4 cm de altura após 70 dias de cultivo. O rendimento de seu PST correspondeu a 10,8% de sua biomassa. No fracionamento do PST em cromatografia de troca iônica DEAE-Celulose, do tipo “stepwise”, foram obtidas cinco frações (0,7; 0,9; 1,2; 1,6 e 1,8 M) e a maior atividade metacromática evidenciada na fração F_{1,2M}. Em sistema CLAE foram isoladas três frações a partir dos PST e um único pico a partir da fração F_{1,2M}. A análise eletroforética revelou uma mobilidade bastante semelhante, bandas homogêneas e alto peso molecular das amostras. O PST e as frações apresentaram quantidades significativas de açúcar total, variado teor de ácidos urônicos e alta sulfatação. O polissacarídeo apresentou em sua composição monômeros de ramnose (41,49%), xilose (17,35%), glicose (9,51%) e galactose (5,50%), 3-metil-ácido hexaurônico (6,91%) e 3-metil-hexose (2,81%). No ensaio bacteriano, observou-se uma diminuição significativa do crescimento planctônico e em relação a formação do biofilme os resultados mostraram

redução estatisticamente significativa para todas as concentrações de polissacarídeos testadas, em ambas as bactérias. É possível cultivar a macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp., em laboratório a partir de seus esporos e utilizando métodos colorimétricos, turbidimétricos, eletroforéticos e cromatográficos, aliado a espectrometria de massa é possível fracionar, purificar e analisar quimicamente sua estrutura, nesse trabalho concluiu-se também que essas moléculas são eficientes em diminuir a formação de biofilmes bacterianos.

Palavras-chave: Alga. Cultivo. Carboidrato. Atividade biológica

ABSTRACT

Rampant harvesting of algae for extraction of its by products causes a huge environmental problem, one solution to lessening that impact would be to grow it. As green algae became an important source of bioactive compounds, among them the sulfated polysaccharides, the objective was to cultivate the green marine macroalgae *Enteromorpha* sp. in the laboratory, from the isolation of their spores obtained in nature, and extract, purify, characterize these macromolecules and evaluate their effect against bacterial biofilm formation. The algae were grown in Guillard f / 2 medium and the total sulfated polysaccharides (PST) were extracted by enzymatic digestion with papain and fractionated by ion exchange chromatography DEAE-Cellulose using a stepwise salt gradient with increasing concentrations NaCl (0.5 - 2.0 M). The most metachromatic major fraction was produced in a preparative column, isolated from the others, dialysed and lyophilized. For a better characterization of the extracted polysaccharides, a high efficiency chromatography (HPLC) analysis was performed on a DEAE-Cellulose ion exchange column, eluted by linear NaCl gradient (0 - 3.0M). The PST fractions isolated in the chromatograms were submitted to agarose and polyacrylamide gel electrophoresis. The determination of total sugars, uronic acids and sulfate were by phenol-sulfuric acid, carbazole-sulfuric acid and barium gelatine, respectively. The monosaccharide composition was obtained by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The activities of the sulfated polysaccharides on the planktonic growth of bacteria *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, as well as their action under the formation of biofilms, were analyzed. The algae grew 4 cm high after 70 days of cultivation. The yield of its PST corresponded to 10.8% of its biomass. In the fractionation of PST in DEAE-Cellulose ion exchange chromatography, stepwise, five fractions were obtained (0.7, 0.9, 1.2, 1.6, 1.8 M) and the highest metachromatic activity evidenced in the F1.2 M fraction. In the HPLC system, three fractions were isolated from the PST and a single peak from the F1.2 M fraction. The electrophoretic analysis showed a similar mobility, homogenous bands and high molecular weight of samples. The PST and the fractions presented significant amounts of total sugar, varied uronic acid content and high sulfation. The polysaccharide presented monomers of rhamnose (41.49%), xylose (17.35%), glucose (9.51%) and galactose (5.50%), 3-methyl hexauronic acid (6.91%) and 3-methyl hexose (2.81%). In the bacterial assay, a significant decrease in planktonic growth was observed and in relation to biofilm formation the results showed a statistically significant reduction for all concentrations of polysaccharides tested in both bacteria. It is possible to cultivate the green marine macroalgae

Enteromorpha sp., in the laboratory from its spores and using colorimetric, turbidimetric, electrophoretic and chromatographic methods, together with mass spectrometry it is possible to fractionate, purify and chemically analyze its structure, in this work it was also concluded. That these molecules are efficient in decreasing the formation of bacterial biofilms.

Keywords: Algae. Culture. Carbohydrate. Biological activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Produção mundial de macroalgas marinhas.....	23
Figura 2 -	Estrutura e variação de carragenanas de algas vermelhas.....	26
Figura 3 -	Estrutura polimérica do alginato formados por série MG.....	27
Figura 4 -	Estrutura homopolimérica de alginato ligado a íons de cálcio formando o modelo “caixa de ovos”	28
Figura 5 -	Exploração de polissacarídeos sulfatados por gêneros de algas verdes.....	29
Figura 6 -	Estrutura dissacarídica de ulvanos do tipo A , B e U.....	30
Figura 7 -	Isolamento dos esporos realizado por diluição em séries e estrutura de fixação para o cultivo da alga em laboratório.....	34
Figura 8 -	Fluxograma da extração enzimática de polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha verde <i>Enteromorpha</i> sp. cultivada em meio Guillard f/2.....	37
Figura 9 -	Macroalga marinha verde <i>Enteromorpha</i> sp. produzida a partir de esporos em meio Guillard f/2 em laboratório.....	44
Figura 10 -	Fracionamento e purificação dos polissacarídeos em coluna de troca iônica DEAE-Celulose em gradiente do tipo “stepwise” extraídos da macroalga marinha verde <i>Enteromorpha</i> sp. equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0.	47
Figura 11 -	Cromatografia em coluna de troca iônica DEAE-Celulose em sistema CLAE, dos polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha verde <i>Enteromorpha</i> sp., equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 e EDTA 1mM e eluída com gradiente linear de NaCl (0- 3,0 M).....	48
Figura 12 -	Análise eletroforética em gel de agarose a 0,5%, das frações isoladas dos polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha verde <i>Enteromorpha</i> sp., comparada à mistura padrão de glicosaminoglicanos (GAG).....	49

Figura 13 - Análise eletroforética em gel de poliacrilamida a 10%, das frações isoladas dos polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha verde <i>Enteromorpha</i> sp., comparada a mistura padrão de glicosaminoglicanos (GAG).....	50
Figura 14 - Espectro do tempo de retenção das unidades monossacarídicas determinadas em CG-EM a partir dos acetatos de alditóis formados após hidrólise ácida.....	52
Figura 15 - Espectros de massas das unidades monossacarídicas que formam os polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha verde <i>Enteromorpha</i> sp.....	55
Figura 16 - Efeito do PST e de F _{1,2M} extraídos da macroalga marinha verde <i>Enteromorpha</i> sp. cultivada em laboratório sobre o crescimento planctônico de <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> . * p < 0,05 com relação ao controle.....	57
Figura 17 - Efeito do PST e de F _{1,2M} extraídos da macroalga marinha verde <i>Enteromorpha</i> sp. cultivada em laboratório sobre a formação do biofilme de <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> . * p < 0,05 com relação ao controle.....	58
Figura 18 - Efeito do PST e de F _{1,2M} extraídos da macroalga marinha verde <i>Enteromorpha</i> sp. cultivada em laboratório sobre o número de células viáveis do biofilme de <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> . * p < 0,05 com relação ao controle.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas.....	25
Tabela 2 - Concentração dos nutrientes/componentes para a preparação da solução estoque segundo Guillard (1975).....	36
Tabela 3 - Valores percentuais do teor de açúcar total, ácido urônico e sulfato nos PST e nas frações extraídos da macroalga marinha verde <i>Enteromorpha</i> sp.....	51
Tabela 4 - Tempo de retenção e proporções dos monossacarídeos obtidos a partir da hidrólise ácida e acetilação dos polissacarídeo sulfatados extraídos da macroalga marinha verde <i>Enteromorpha</i> sp.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADM	Azul-dimetil-dimetileno
ATS	Ágar triptona de soja
CCP	Cloreto de cetilpiridino
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMI	Concentração mínima inibitória
CS	Codroitin sulfato
CTS	Caldo triptona de soja
DS	Dermatan sulfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra- acético
EM	Espectrometria de massa
GAG	Glicosaminoglicanos
HS	Heparan sulfato
GAG	Glicosaminoglicanos
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PST	Polissacarídeo sulfatado total
TFA	Ácido trifluoracético

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Algas marinhas: características gerais e utilização.....	17
2.2	Classificação das algas.....	18
2.2.1	<i>Algas azuis.....</i>	19
2.2.2	<i>Algas vermelhas.....</i>	19
2.2.3	<i>Algas pardas.....</i>	19
2.2.4	<i>Algas verdes.....</i>	20
2.3	Gênero <i>Enteromorpha</i>.....	20
2.4	Cultivo de algas marinhas	22
2.5	Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas: estrutura e aplicações.....	23
2.5.1	<i>Aspectos gerais.....</i>	23
2.5.2	<i>Galactanas de algas vermelhas.....</i>	26
2.5.3	<i>Polissacarídeos sulfatados de algas pardas.....</i>	27
2.5.4	<i>Ulvanos de algas verdes.....</i>	29
2.6	Biofilme bacteriano.....	31
3	OBJETIVOS.....	33
3.1	Objetivo geral.....	33
3.2	Objetivos específicos.....	33
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1	Isolamento dos esporos e cultivo da alga em laboratório.....	34
4.2	Meio de cultivo.....	35
4.3	Extração dos polissacarídeos sulfatados totais (PST) da macroalga marinha verde <i>Enteromorpha</i> sp.....	36
4.4	Fracionamento e purificação dos polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha verde <i>Enteromorpha</i> sp	38
4.5	Análise dos polissacarídeos sulfatados em DEAE-Celulose CLAE.....	38
4.6	Eletroforese em gel de agarose.....	39
4.7	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	39
4.8	Análise química e composição monossacarídica.....	39
4.8.1	<i>Determinação do teor de açúcares totais, ácidos urônicos e sulfato.....</i>	39

4.8.2	<i>Composição monossacarídica</i>	40
4.9	Atividade antibiofilme	41
4.9.1	<i>Micro-organismos</i>	41
4.9.2	<i>Atividade dos polissacarídeos sulfatados sobre o crescimento planctônico</i>	41
4.9.3	<i>Ação dos polissacarídeos sulfatados sob a formação dos biofilmes</i>	42
4.9.3.1	<i>Quantificação da biomassa</i>	42
4.9.3.2	<i>Enumeração de células viáveis</i>	42
4.9.4	<i>Análise estatística</i>	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	Cultivo	44
5.2	Rendimento de polissacarídeos sulfatados	47
5.3	Fracionamento e purificação dos polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha verde <i>Enteromorpha sp</i>	47
5.4	Análise eletroforética	49
5.5	Análise química	51
5.6	Composição monossacarídica	52
5.7	Atividade antibiofilme	57
6	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a química de produtos naturais derivados de organismos marinhos, se tornou foco de pesquisa na área alimentícia, médica, farmacêutica e biotecnológica. Isto é devido, em grande parte, ao crescente reconhecimento desses organismos como uma fonte de compostos nutracêuticos, cosmeceuticos e de interesse biomédico (SASHIDHARA; WHITE, 2009).

Por causa das condições físicas e químicas do ambiente marinho, quase todas as classes de organismos que vivem nesse ambiente possuem a capacidade de produzir uma variedade de moléculas com características estruturais únicas (SASHIDHARA; WHITE, 2009). No entanto, a retirada desenfreada de certos organismos para extração de seus derivados, tem gerado impactos na vida marinha e causado uma diminuição do recurso em seu banco natural (SOUZA, 2011).

Nos últimos 20 anos, as algas verdes se tornaram uma importante fonte de compostos bioativos, devido sua ampla distribuição e elevada produção de biomassa. Estudos recentes têm relatado que muitas espécies de Chlorophyta são ricas em lipídios, proteínas, peptídeos, carotenoides, compostos fenólicos, alcaloides, polissacarídeos, dentre outros compostos (GANESAN *et al.*, 2014; GAMAL, 2010).

Os polissacarídeos sulfatados são macromoléculas formadas pela polimerização de unidades monossacarídicas, unidas por ligações glicosídicas e carregadas negativamente por apresentar grupos hidroxilas substituídas por radicais sulfatos (VASCONCELOS; ARAÚJO; SANTANA, 2015).

Os polissacarídeos sulfatados extraídos de macroalgas marinhas apresentam diversas atividades biológicas, incluindo anticoagulante, antiviral, imunoestimulante, antioxidante, antitumoral, imonomodulador, anti-irradiação, anti-hiperlipidêmica, antiproliferativa, antimetástica, antibacteriana etc. Essas variedades de propriedades biológicas são encontradas em diversas classes de algas, em especial no Filo Chlorophyta (RAPOSO; MORAIS; MORAIS, 2015).

Devido ao fato dessas moléculas apresentarem uma gama de atividades biológicas, elas têm sido apreciadas pelas ciências médicas e estudadas como alternativas terapêuticas para tratamento de doenças em seres humanos, causadas por diversas classes de patógeno, em especial bactérias (RAPOSO; MORAIS; MORAIS, 2015).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Algas marinhas: características gerais e utilização

As algas são organismos que possuem uma organização celular muito diversificada e apresentam grande variedade de formas e tamanhos. Podem ser encontradas em diversos sistemas aquáticos, com dimensões microscópicas, são unicelulares, coloniais, podendo viver suspensas na coluna d'água ou até mesmo por debaixo do gelo em zonas polares, outras com dimensões macroscópicas, são multicelulares, bentônicas ou flutuantes, possuindo variados tipos de talo (FRANCESCHINI *et al.*, 2010). São classificadas com base em sua morfologia e tamanho em: microalgas e macroalgas (JOHN *et al.*, 2011). Sua distribuição geográfica depende das condições físicas e químicas do ambiente, tais como: temperatura, salinidade da água, disponibilidade de luz solar e correntes oceânicas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

As algas são seres fotossintetizantes capazes de transformar energia luminosa em energia química para seu metabolismo. Possuem clorofila *a* como principal pigmento fotossintético e a maioria dispõe de uma segunda clorofila, podendo ser *b*, *c* (*c*₁ e *c*₂) ou *d*, dependendo da divisão, além de pigmentos acessórios como os carotenoides (carotenos e xantofilas) e as ficobiliproteínas (ficocianina, aloficocianina, ficoeritrina e ficoeritrocianina) (LEE, 2008; O'SULLIVAN *et al.*, 2010). Estes pigmentos potencializam a absorção de luz em diferentes comprimentos de ondas, porém não participam diretamente do processo de conversão de energia (LOURENÇO, 2006).

Por muito tempo, as algas pertenceram ao reino Protista, sugerido por Margulis e Schwartz (1998). Com o avanço da biologia molecular, por meio de técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise de DNA, tornou-se possível realizar uma nova análise filogenética baseada nas características genotípicas, as quais forneceram informações valiosas sobre as histórias evolutivas das algas e, um novo modelo sistemático foi criado, incluindo-as em três grandes reinos; Eubactéria, Plantae e Chromista (CAVALIER-SMITH, 2002; O'SULLIVAN *et al.*, 2010).

As algas apresentam uma grande importância ecológica para vida no planeta, ocupam o lugar de produtores primários formando a base da cadeia alimentar de lagos e oceanos e são responsáveis por produzir aproximadamente metade de todo oxigênio encontrado no oceano e na atmosfera (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Elas são excelentes indicadores de poluição ambiental, facilitam a identificação de

locais impactados por ação antrópica e fornecem informações sobre alterações da qualidade da água. Nesse sentido são utilizadas para avaliar o nível de eutrofização de corpos d'água (TROBAJO; COX; QUITANA, 2004) e mostram-se potentes no tratamento de águas residuais (SOARES, 2000).

Algumas espécies de algas são utilizadas como alimento humano, por serem ricas em carotenoides, fibras, proteínas, ácidos graxos essenciais, vitaminas e minerais. Sua produção e exploração é voltada em parte para a extração de compostos nutracêuticos (LORDAN; ROSS; STANTON, 2011). Outras são fontes de substâncias sem valor nutricional, os ficocolóides, que não são digeridos ou absorvidos pelo sistema digestivo humano, porém são extraídos e utilizados pela indústria alimentícia como aditivos alimentares devido suas propriedades geleficantes, estabilizantes e emulsificantes (VASCONCELOS; ARAÚJO; SANTANA, 2015).

Na agricultura, algas secas são moídas e utilizadas como fertilizantes agrícolas devido apresentarem alto teor de fibras, que atua como um condicionador do solo e aumenta a retenção de líquidos, enquanto que seus minerais são fonte de oligoelementos. No mesmo setor, o extrato de algas é utilizado como bioestimulante capaz de aumentar a produtividade vegetal, isso deve-se ao fato de possuir substâncias essenciais para o bom desenvolvimento da planta, como macro e micronutrientes, aminoácidos, vitaminas e hormônios (ABDEL-RAOUF; AL-HOMAIDAN; IBRAHEEM, 2012).

Do ponto de vista da prospecção por compostos de interesse para ciências médicas e farmacêuticas, esses organismos vêm ganhando espaço e se destacando nos últimos anos devido a sua capacidade de sintetizar macromoléculas, tais como polifenóis, proteínas, pigmentos e polissacarídeos sulfatados com atividades biológicas e farmacológicas. (LORDAN; ROSS; STANTON, 2011).

2.2 Classificação das algas

Cada alga possui um pigmento dominante que a caracteriza, e que pode ser utilizado como instrumento de divisão em grupos, sendo elas: algas azuis, vermelhas, marrons ou pardas e verdes (BOCANEGRA *et al.*, 2009), porém esse não é o único critério de classificação, além da sua cor e seu código genético, é utilizado também características citológicas, morfológicas, natureza química da parede celular e produtos de reserva (RAVEN; EICHHORN, 2014).

2.2.1 Algas azuis

As algas azuis pertencem ao reino Eubacteria, filo Cyanobacteria totalizando 4.531 espécies (GUIRY, 2016), que são ricas em C-ficocianina (pigmento azulado), unicelulares isoladas ou filamentosas, envoltas por um envelope mucilaginoso (KILINÇ *et al.*, 2013). Possuem parede celular constituída por um peptídeoglicano (mureína), um polímero linear formado por ligações cruzadas (β 1-4) de peptídeo à polissacarídeo, alternando-se em resíduos de N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico (NELSON: COX 2011).

2.2.2 Algas vermelhas

No que concerne às algas vermelhas, elas pertencem ao reino Plantae, filo Rhodophyta, o mais diversificado dos grupos, com 7.127 espécies (GUIRY, 2016). A grande maioria das rodófitas são multicelulares e habitam ambientes marinhos bentônicos, há espécies dulcícolas e terrestres e poucos representantes unicelulares como as dos gêneros *Porphyridium* e *Rhodella* (KILINÇ *et al.*, 2013; RAPOSO; MORAIS; MORAIS, 2015).

São ricas em ficoeritrina, um pigmento avermelhado que conferem a coloração característica desse grupo, e possuem clorofila *a* e *d*, além de diversos carotenoides (KILINÇ *et al.*, 2013). Podem sofrer adaptação cromática dependendo da disponibilidade de luz e diminuição da concentração de ficoeritrina, tornando-se esverdeada. Seu carboidrato de reserva é chamado de amido das florídeas, semelhante à amilopectina e encontrado no citoplasma (LEE, 2008).

Possuem parede celular constituída por uma porção fibrosa, a celulose, e um componente amorfo, composto por galactanas, como ágar e carragenana, e algumas impregnadas com carbonato de cálcio (LEE, 2008).

2.2.3 Algas pardas

As algas pardas ou marrons pertecem ao reino Chromista, filo Ochrophyta, classe Pheophyceae, possuindo cerca de 2.048 espécies (GUIRY, 2014). São organismos multicelulares e podem chegar até 70 m de comprimento, como a espécie *Macrocystis pyrifera* e formar extensas florestas submersas. A grande maioria são marinhas e de águas frias, porém em mares tropicais é encontrado uma grande diversidade de espécie (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Vivem fixas em substrato e podem ser encontradas formando bancos

flutuantes, como a espécie *Sargassum natans* e *Sargassum fluitans* (COIMBRA, 2006).

Possuem clorofila *a* e *c*, e sua cor é resultante da dominância dos carotenoides (xantofilas e fucoxantina) sobre os outros pigmentos que variam desde verde-oliva a marrom escuro. O carboidrato de reserva é a Laminarina, um polissacarídeo formado por unidades de glicose (GUIRY 2014).

Na parede celular das feófitas é encontrado o ácido algínico, um polissacarídeo aniônico, formado por ácidos α -L-gulurônicos e β -D-manurônicos, arranjados em uma série de estrutura em blocos (VASCONCELOS, ARAÚJO, SANTANA 2015), conhecido como alginato, muito utilizado pelas indústrias de alimento, têxtil e farmacêutica (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013).

2.2.4 Algas verdes

As algas verdes, pertencem ao reino Plantae, filo Chlorophyta e com cerca de 6.408 espécies (GUIRY, 2016), sendo que 90% das espécies são dulcícolas e com distribuição cosmopolita, somente 10% são marinhas (LEE, 2008; KILINÇ *et al.*, 2013). Abrigam os mais diversos ambientes, indo desde aquáticos a terrestre, vivendo em troncos de árvores, rochas, solo ou realizando simbiose com fungos, equinodermos ou protozoários. Podem ser unicelulares, multicelulares, coloniais ou cenocíticas (sem a presença de células) (LEE, 2008).

Semelhante às plantas terrestre, as algas verdes possuem clorofila *a* e *b* e armazenam amido em seus cloroplastos como substância de reserva (GUIRY, 2014).

A parede celular das macroalgas verdes é estruturalmente a mais diversificada quando comparadas aos outros grupos de algas. Sua composição varia muito de espécie para espécie, mas são constituídas basicamente por polissacarídeos sulfatados, polímeros fibrilares e glicoproteínas. Algumas possuem como principal componente fibrilar a celulose, outras a hemicelulose, formadas por mananas ou xilanas (DOMOZYCH *et al.*, 2012).

2.3 Gênero *Enteromorpha*

Por muitos anos modificações taxonômicas nos diferentes níveis de vida tem sido alvo de debates entre cientistas, com a classificação das algas não foi diferente. Em 1952 Silva distinguia o gênero *Ulva* do gênero *Enteromorpha* com base em sua morfologia, sendo que as algas verdes com talo em forma de lâmina pertenciam ao gênero *Ulva* e as tubulares ao gênero *Enteromorpha*. Provasoli e Pintner provaram em 1980 que essa separação não seria

válida baseada somente na morfologia, pois uma mesma espécie de *Ulva* poderia produzir talos laminares e tubulares dependendo do meio em que se encontrava.

Com o avanço da biologia molecular, Hayden *et al.* (2003) mostraram as relações filogenéticas baseadas na análise dos genes de espaçadores internos transcritos (ITS) do DNA nuclear ribossomal (nrDNA), que não há distinção genética significativa entre os gêneros e que ambos deveriam ser classificados como um só. Conseqüentemente, nos dias atuais o gênero *Enteromorpha* é considerado como sinônimo de *Ulva*, que pertence ao reino Plantae, filo Chlorophyta. Atualmente são encontradas 22 espécies de *Enteromorpha* (GUIRY, 2016).

O ciclo de vida das algas do gênero *Enteromorpha* passa por uma série de estágios. O estágio gametófito produz grandes quantidades de células sexuais ou gametas móveis que se fundem para formar a fase esporófito. Esta etapa, em seguida, produz esporos que se desenvolvem para fase gametófito e o ciclo inicia-se novamente. Gametas e esporos são produzidos em grandes quantidades e é sincronizado com os ciclos das marés. (BLOMSTER *et al.*, 2002).

A reprodução assexuada ocorre através de zoósporos haploides (n) formados pela divisão meiótica de células vegetativas (2n) da fase esporófito e a reprodução sexuada ou gamética ocorre pela produção de gametas haploides, móveis e biflagelados que se unem e produzem um zigoto diploide (2n) (CASTRO, HUBER, 2012).

As algas desse gênero podem atingir de 20 a 30 cm de comprimento, são tubulares, possuem distribuição cosmopolita, vivem em regiões entre marés, são oportunistas, suportam elevadas variações de salinidade e se desenvolve em elevadas concentrações de nutrientes (SAHOO; SAHU; SAHOO, 2003; GANESAN *et al.*, 2014).

As espécies desse gênero encontradas no litoral cearense são *Enteromorpha chaetomorfoides*, *E. clathrata*, *E. compressa*, *E. linguata*, *E. linza*. e *E. flexuosa* (SANTOS *et al.*, 2012). Muitos estudos têm revelado a importância dessas algas nas áreas tecnológica e médica.

As espécies *E. compressa* e *E. linza* mostram-se como candidatas potentes na formulação de alimentos saudáveis, pois são ricas em proteínas, lipídeos e minerais, além de apresentam quantidade consideráveis de ácidos graxos poli-insaturado e aminoácidos essenciais (GANESAN *et al.*, 2014).

A literatura revela também que espécies como *E. flexuosa* e *E. linguata* são excelentes bioindicadoras de poluição orgânica (SOUSA; COCENTINO, 2004) outras como *E. prolifera* e *E. compressa* são apontadas como uma rica fonte de biocombustível (LU *et al.*, 2016; SUGANYA; KASIRAJAN; RENGANATHA, 2014).

Muitas dessas espécies se destacam por possuir moléculas com efeitos terapêuticos, tais como anticoagulante (QI *et al.*, 2012), antitumoral (JIAO *et al.*, 2009), antioxidantes (LI *et al.*, 2013), imunomoduladora (KIM *et al.*, 2011), hipolipidêmica (TENG; QIAN; ZHOU, 2013).

As algas *E. compressa*, *E. intestinalis*, *E. linza* e *E. prolifera* são as principais espécies utilizadas para extração de polissacarídeos sulfatados, moléculas que se destacam devido ao seu grande potencial biotecnológico (WANG *et al.*, 2014).

2.4 Cultivo de algas marinhas

A colheita desenfreada de algas para extração de seus derivados e a falta de uma política de manejo adequada resulta em enormes problemas ambientais e causa uma diminuição do recurso em seu banco natural. Uma solução para diminuição do impacto é cultivá-la (SOUZA, 2011; BEZERRA, 2008).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), de 2008 para 2010, a produção global de algas aumentou de menos de 4 milhões de toneladas, de biomassa úmida, para quase 20 milhões de toneladas. Segundo dados estatísticos da FAO, cada vez mais a alga marinha é cultivada em vez de ser coletada na natureza. Em 1980 a proporção de algas selvagens na produção global de algas marinhas caiu de 28% para 4,5% em 2010 (Figura 1) (VALDERRAMA, 2013).

Antes da implantação de um cultivo em larga escala fatores bióticos e abióticos devem ser analisados com atenção para melhor desenvolvimento da alga. São necessários vários estudos em ecologia, fisiologia e produtividade das espécies de interesse econômico passíveis de cultivo (BEZERRA, 2008). O ambiente adequado varia de espécie para espécie, mas deve atender aos requisitos especiais para seu desenvolvimento como: salinidade, nutrientes, movimento da água, temperatura e luminosidade (MCHUGH, 2003).

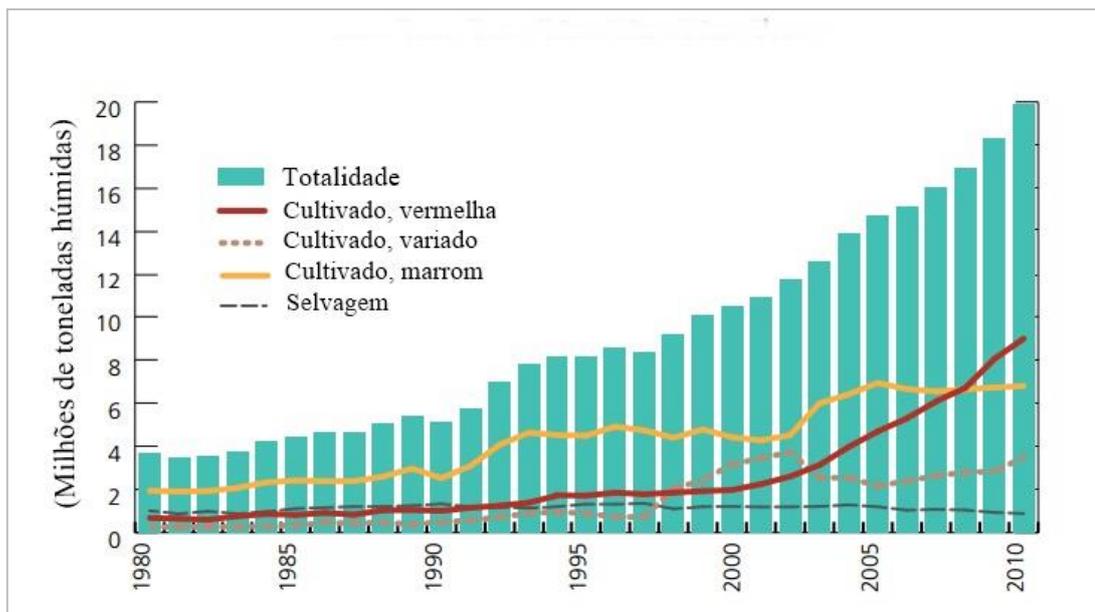
O cultivo de macroalgas marinhas em larga escala é limitado ao mar e a costa litorânea. No mar é realizado por meio da propagação de mudas, ou crescimento vegetativo, ou seja, retirando pedaços de algas e colocando em um ambiente que irá sustentar seu crescimento, quando atingem seu crescimento adequado são colhidas. Na costa litorânea, são realizados em tanques elevados ou escavados no solo (MCHUGH, 2003; SOUZA, 2011).

Os cultivos de espécies que apresentam ciclo de vida com alternância de gerações são mais complicados. A esporulação é realizada em instalações terrestres, em laboratório, sob controle cuidadoso da água, luz, temperatura e nutrientes. Os esporos são semeados sobre

um substrato e posteriormente é levado ao mar para realizar o crescimento. Essa técnica é utilizada quando a propagação por mudas não funciona. (MCHUGH, 2003; SOUZA, 2011).

Não há relatos de cultivo em larga escala de macroalgas marinhas exclusivamente para extração de compostos bioativos. O cultivo industrial é voltado principalmente para alimentação humana e extração de hidrocolóides. (MCHUGH, 2003).

Figura 1- Produção mundial de macroalgas marinhas.



Nota: As algas vermelhas incluem espécies pertencentes a Rhodophyceae; As algas marrons incluem espécies pertencentes a Phaeophyceae; Algas variadas incluem espécies pertencentes a Chlorophyceae e Cyanophyceae, bem como espécies não especificadas.

(Fonte: FAO Fishstat; VALDERRAMA, 2013)

2.5 Polissacarídeos sulfatados de algas marinhas: estrutura e aplicações

2.5.1 Aspectos gerais

Os polissacarídeos são macromoléculas formadas pela polimerização de monossacarídeos, açúcares simples, unidos por ligações glicosídicas. Se for constituído somente por uma única espécie monomérica recebe a denominação de homopolissacarídeo e, formado por duas ou mais é definido como um heteropolissacarídeo. Podem ser encontrados associados covalentemente a proteínas e a lipídeos formando glicoconjugados, tais como os proteoglicanos, glicoproteínas e glicolipídeos e, exercem algumas funções específicas celulares, como sinalizadores, pontos de adesão celular, reconhecimento e transferência de

informação inter ou entre células, além de serem componentes de estruturas citológicas (NELSON; COX, 2011; MARCIEL; STADNIK; FREITAS, 2014).

Os polímeros de carboidratos sulfatados, também chamado de polissacarídeos sulfatados, são moléculas carregadas negativamente por apresentar grupos hidroxilas substituídas por radicais sulfatos. Esses compostos são encontrados em bactérias, fungos, vegetais, algas e animais (VASCONCELOS, ARAÚJO; SANTANA, 2015).

Os invertebrados marinhos, como pepinos e ouriços, e as macroalgas marinhas, recebem atenção especial por serem uma poderosa fonte dessas moléculas que apresentam diversas atividades biológicas (MOURÃO, 2015), tais como anticoagulante, anti-inflamatória, antitumoral, anti-hiperlipidêmica, antitrombótica e imunoestimulante (FARIAS *et al.*, 2004; ROPELATTO, 2011; MELO *et al.*, 2012; COSTA, 2012). Outras atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas estão listadas na tabela 1.

As paredes celulares das algas marinhas são ricas em polissacarídeos sulfatados incluindo carragenanas e agaranas em algas vermelhas, alginato e fucanas em algas pardas e ulvanos em algas verdes (CUNHA; GRENHA, 2016).

Do ponto de vista fisiológico, essas macromoléculas promovem flexibilidade e resistências a macroalga contra forças físicas exercidas por ondas e correntes do oceano, evita seu ressecamento quando exposta a elevada radiação solar, evita o estresse quando exposta a variações de salinidades, pH e temperaturas extremas. Protege contra a contaminação de metais pesados e confere propriedades antioxidante (ANDRADE *et al.*, 2010; AQUINO *et al.*, 2005).

No campo biomédico essas moléculas se tornaram uma poderosa ferramenta, devido suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade. São utilizados na engenharia de tecidos, curativos e cicatrizador (BUENO *et al.*, 2015), biocatalizadores imobilizados (MCHUGH, 2003), excipientes de fármacos (CUNHA; GRENHA, 2016), carreador e imobilizador de micro e nanopartículas (RODRIGUES; COSTA; GRENHA 2012).

Os polissacarídeos sulfatados de algas marinhas possuem também propriedades gelificantes, espessante, estabilizantes e emulsificantes, o que os tornam bastante apreciados pela indústria de alimento, cosmético e têxtil por assegurar características físicas de emulsões, suspensões, viscosidade e adesividade no produto que o recebe como aditivo (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010; SOUSA 2011).

Tabela 1- Atividade biológica de polissacarídeos sulfatados de algas marinhas.

Divisão	Atividade	Espécie	Referência
Chlorophyta	Anticoagulante	<i>Caulerpa cupressoides</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2011
	Anti-inflamatória	<i>C. cupressoides</i>	Rodrigues <i>et al.</i> , 2012
	Antinociceptiva	<i>C. racemosa</i>	Ribeiro <i>et al.</i> , 2014
	Imunomoduladora	<i>Monostroma nitidum</i>	Karnjanapratum; You, 2011
	Antitumoral	<i>Enteromorpha intestinalis</i>	Jiao <i>et al.</i> , 2009
	Hipolipidêmica	<i>E. prolifera</i>	Teng; Qian; Zhou, 2013
	Antioxidante	<i>E. prolifera</i>	Li <i>et al.</i> , 2013
	Anti-radiação	<i>Ulva pertusa</i>	Shi <i>et al.</i> , 2013
	Anti-hiperlipidêmica	<i>U. pertusa</i>	Qi <i>et al.</i> , 2012
	Analgésico	<i>U. lactuca</i>	Araújo <i>et al.</i> 2016
	Antiviral	<i>Coccomyxa gloeobotrydiformi</i>	Komatsu <i>et al.</i> , 2013
Rhodophyta	Antivenenosa	<i>Botryocladia occidentalis</i>	Toyama <i>et al.</i> , 2010
	Anticoagulante	<i>Gelidium crinale</i>	Pereira <i>et al.</i> , 2005
	Anticoagulante	<i>Botryocladia occidentalis</i>	Farias <i>et al.</i> , 2000
	Antitrombótica	<i>B. occidentalis</i>	Farias <i>et al.</i> , 2000
	Antialérgica	<i>Porphyra haitanensis</i>	Shi <i>et al.</i> , 2015
	Antimicrobiana	<i>Gracilaria ornata</i>	Amorim <i>et al.</i> , 2012
	Antidiarréica	<i>G. caudata</i>	Costa <i>et al.</i> , 2016
	Antinociceptiva	<i>Acanthophora muscoides</i>	Quinderé <i>et al.</i> , 2013
	Antinociceptiva	<i>Bryothamnion seaforthii</i>	Viana <i>et al.</i> , 2002
	Gastroprotetora	<i>Solieria filiformis</i>	Sousa <i>et al.</i> , 2016
Anti-inflamatória	<i>Hynea musciformis</i>	Brito <i>et al.</i> , 2010	
Ochrophyta	Anticoagulante	<i>Dictyopteris delicatula</i>	Magalhães <i>et al.</i> , 2011
	Antioxidante	<i>Laminaria japonica</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2010
	Anticoagulante	<i>Padina gymnospora</i>	Silva <i>et al.</i> , 2005
	Antiangiogênica	<i>Sargassum vulgari</i>	Dore <i>et al.</i> , 2013
	Citotóxica	<i>S. vulgari</i>	Tannoury <i>et al.</i> , 2016
	Anticâncer	<i>S. plagiophyllum</i>	Suresh <i>et al.</i> , 2013
	Cardioprotetora	<i>Cladosiphon okamuranus</i>	Thomes <i>et al.</i> , 2010
	Homeostática	<i>Spatoglossum schroederi</i>	Rocha <i>et al.</i> , 2005
	Anti-inflamatória	<i>S. schroederi</i>	Júnior <i>et al.</i> , 2014
	Anti-inflamatória	<i>Lobophora variegata</i>	Siqueira <i>et al.</i> , 2011
Anticoagulante	<i>L. variegata</i>	Medeiros <i>et al.</i> , 2008	

2.5.2 Galactanas de algas vermelhas

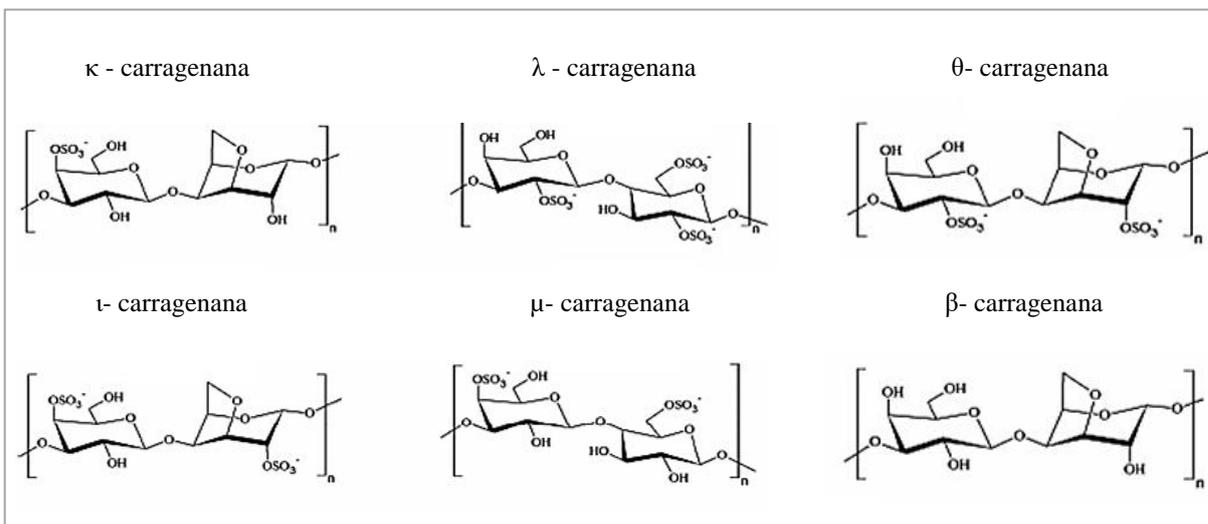
Os polissacarídeos sulfatados de macroalgas vermelhas são chamados de galactanas sulfatadas e classificados de acordo com sua estereoquímica em carragenana e agaranas (FERREIRA, 2011). Tornaram-se valiosos para as indústrias de alimentos, cosméticas e farmacêuticas, devido às suas propriedades reológicas como gelificantes, espessantes e estabilizantes (USOV, 2011).

São utilizados em eletroforese, cromatografia de exclusão por tamanho, cromatografia de grânulos em gel e meios de cultura para crescimento bacteriano (VASCONCELOS; ARAÚJO; SANTANA, 2015).

A estrutura base das carragenanas é formada por repetições de unidades β -D-galactopirranose (Unidade G) ligadas a α -D-galactopirranose (Unidade D) unidas por ligações glicosídicas $\alpha(1-3)$ e $\beta(1-4)$. O resíduo D pode ser convertido em 3,6-anidro- α -galactopirranose (AnGal) através da eliminação do grupo sulfato (SO_3) a partir da posição C6. As unidades estão dispostas em uma sequência alternada $(\text{GD})_n$ (RINAUDO, 2008; JIAO *et al.*, 2011).

Os padrões de sulfatação (quantidade e posição) e a presença ou ausência de AnGal na unidade D, são utilizadas como caracteres de classificação do polímero (RINAUDO, 2008; JIAO *et al.*, 2011). A literatura relata cerca de 15 tipos de carragenanas com base nessa modificação estrutural. As mais relevantes industrialmente são as carragenanas encontradas nas formas κ (kappa), ι (iota) e λ -carragenana (lambda) (Figura 2) (CUNHA; GREHA, 2016).

Figura 2- Estrutura e variação de carragenanas de algas vermelhas.



Fonte: CUNHA; GREHA, 2016.

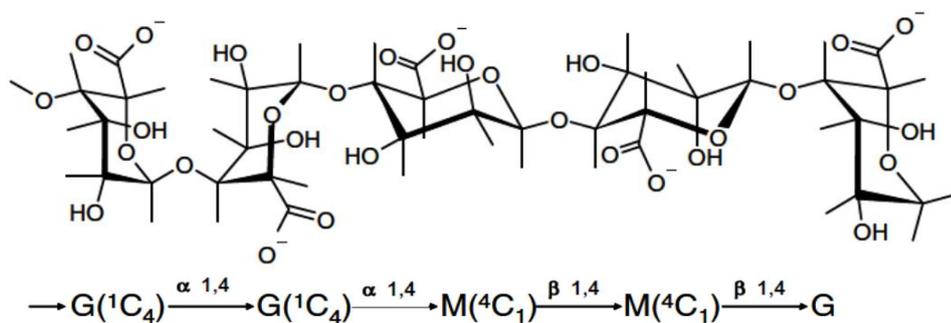
A estrutura das galactanas do tipo agaranas é formada por cadeia linear, tendo como resíduo da unidade G a β -D-galactopiranosose. A principal diferença está na sua estereoquímica da outra unidade, sendo esta formada por resíduos de α -L-galactopiranosose, denominada de unidade L (USOV, 2011; JIAO *et al.*, 2011), que podem estar também ciclizada na forma de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose. A estrutura básica dessas unidades também pode variar de acordo com o grau de sulfatação, metilação, glicosilação e apresentar acetal de ácido pirúvico ligado ao C4 e C6 de G (FERREIRA, 2011).

2.5.3 Polissacarídeos sulfatados de algas pardas

Alginatos e fucanas são os polissacarídeos sulfatados encontrados na parede e na matriz extracelular celular de algas pardas e correspondem aproximadamente a 40% e 10% de biomassa seca respectivamente. Essas porcentagens variam entre uma espécie e outra, região do talo e época de coleta (FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2013; USOV; ZELINSKI, 2013).

O alginato, conhecido também como ácido algínico, é um polímero aniônico formado pelos açúcares ácido α -L-gulurônico (G) e β -D-manurônico (M) com ligações (1-4), arranjados em uma série de estrutura em blocos, constituído de dois ou mais resíduo MG. São denominados de heteropoliméricos se possuir resíduos alternados e homopolimérico se constituído por apenas um tipo de resíduo (Figura 3) (DONG *et al.*, 2012).

Figura 3- Estrutura polimérica do alginato formados por séries MG.



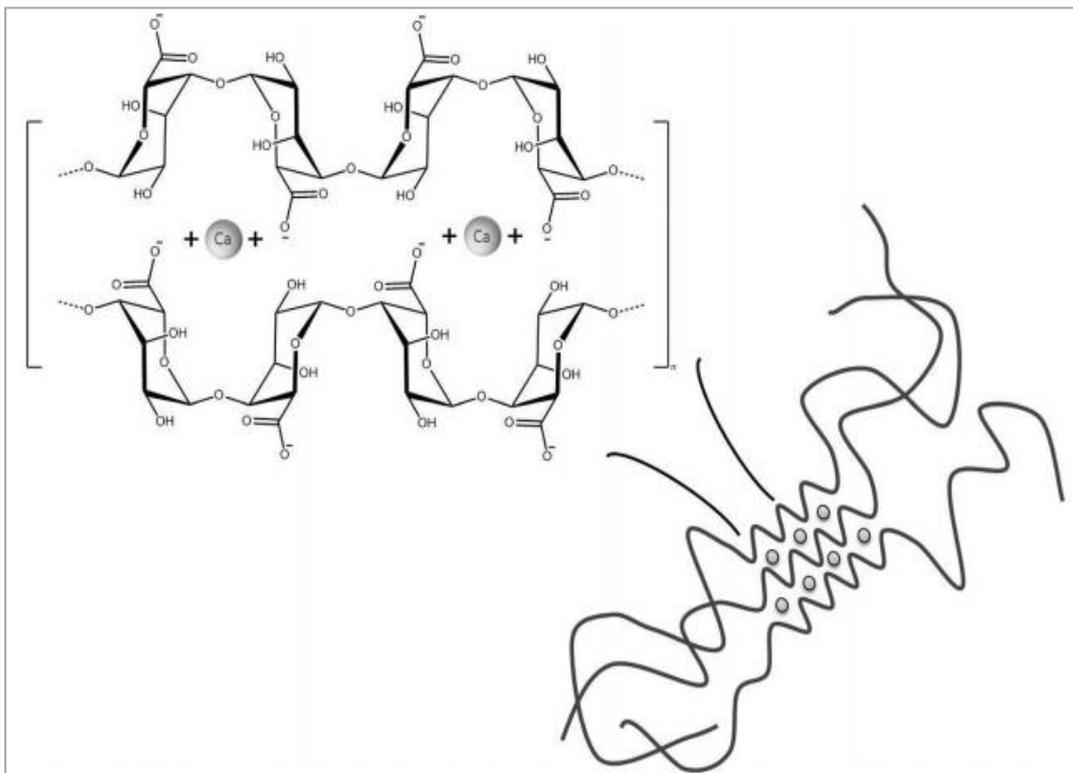
Fonte: SANTOS, 2014

Esses polímeros são capazes de formar géis ou filmes, quando em contato com alguns cátions di- ou multivalentes, em especial íons de Ca^{2+} ou Mg^{2+} . (TONNESEN;

KARLSEN, 2002). Os íons de cátion neutralizam as cargas negativas de blocos glucurônicos (seguimento homopolimérico) e forma uma estrutura em blocos conhecida como “modelo caixa de ovos” (Figura 4). A característica desse gel dependerá da proporção M por G, e do número de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas (TONNESEN; KARLSEN, 2002; CORONA-HERNANDEZ *et al.*, 2013).

Os alginatos possuem várias aplicações em diferentes setores industriais. Na indústria de alimentos e bebidas são utilizados como agentes estabilizantes e espessantes para melhorar as características sensoriais, no setor têxtil são utilizados em tintas para sua melhor aderência e deposição no tecido, na área médica farmacêutica atuam como excipientes de liberação de fármacos e formulação de curativos inteligentes, e na engenharia tecidual são utilizados como suporte tridimensional para células (*scaffolds*) (FOOD INGREDIENTES BRASIL, 2013).

Figura 4- Estrutura homopolimérica de alginato ligado a íons de cálcio formando o modelo “caixa de ovos”.



Fonte: CORONA-HERNANDEZ *et al.*, 2013.

As fucanas ou “fucoidan” são outra classe de polissacarídeos sulfatados presentes nas feófitas. São formadas basicamente por unidades de α -L-fucopiranosose em que a sulfatação ocorre no C2, C3 e/ou C4. Nessas posições também podem ocorrer à substituição de grupos sulfatos por grupos acetatos. Em algumas espécies de algas marrons, como *Sargassum sp.*,

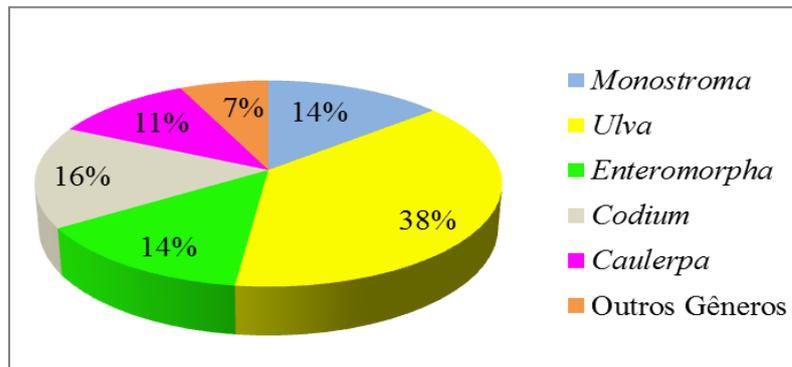
Fucus serratus, *Punctaria plantaginea*, *Ascophyllum nodosum*, a fucose apresenta-se ligada a outros açúcares, tais como manose, galactose, glucose, xilose ou ácido urônico, formando assim um heteropolímero ou heterofucana (JIAO *et al.*, 2011; BLEAN-FICKO; HERVÉ; MICHEL, 2015; CUNHA; GRENHA, 2016).

Assim como o alginato, as fucanas apresentam potenciais aplicações nas indústrias nutracêutica, cosmeceutica e farmacêutica (CUNHA; GRENHA, 2016).

2.5.4 Ulvanos de algas verdes

A ordem Ulvales é a ordem das algas verdes cujos polissacarídeos são estruturalmente mais diversos e complexos. Segundo Wang *et al.* (2014) os polissacarídeos mais explorados dessa ordem são os das algas pertencentes ao gênero *Ulva* com 38%, seguido de *Codium* com 16%, *Enteromorpha* e *Monostroma* com 14%, *Caulerpa* com 11% e 7% de outros gêneros incluindo *Capsosiphon*, *Chaetomorpha*, *Bryopsis* e *Halimeda* (Figura 5).

Figura 5- Exploração de polissacarídeos sulfatados por gêneros de algas verdes.



Fonte: WANG *et al.*, 2014

A celulose junto com os polissacarídeos sulfatados hidrossolúveis são os polímeros mais abundantes encontrados na ordem Ulvales, e esses últimos recebem a denominação de ulvanos. São classificados como um heteropolissacarídeos, encontrados na forma de proteoglicanos com resíduos de ramnose, xilose, ácido idurônico e ácido glicurônico, fortemente ligados a uma proteína presente na parede celular e que correspondem aproximadamente de 8 a 29% do peso seco do extrato (RIBEIRO, 2012).

Apesar dos ulvanos serem a classe de polissacarídeos menos estudados, em comparação com os outros grupos, eles recebem atenção especial devido sua potente

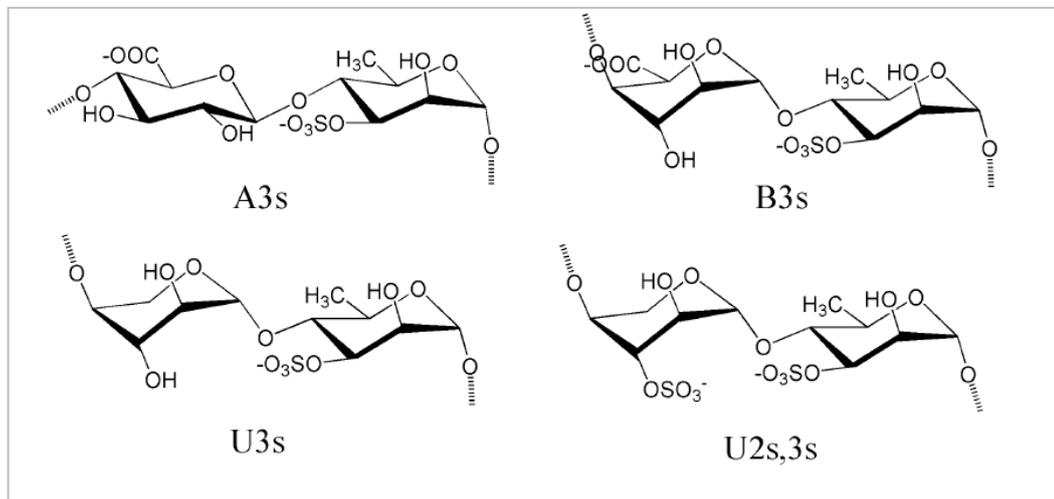
aplicação farmacêutica. Essas propriedades estão intimamente relacionadas à sua composição química, densidade de carga e peso molecular (HERNÁNDEZ-GARIBAY, ZERTUCHE-GONZÁLEZ; PACHECO-RUÍZ, 2011).

Estudos revelaram que os géis formados por ulvano são termo-reversível e que a concentração de íons (mono ou bivalentes), bem como as variações de pH, podem influenciar em sua conformação, e, assim, na formação de gel (ROBIC; SASSI; LAHAYE, 2008).

A principal unidade dissacarídica repetitiva de ulvanos é o ácido ulvanobiurônico 3-sulfato, composto por ramnose-O-3-sulfato e ácido glucorônico $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap3S}\text{-}(1\rightarrow)_n$, classificados como tipo A ou A3s. Se a ramnose estiver ligada a um ácido idurônico $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Idop}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap3S}\text{-}(1\rightarrow)_n$, essas unidades passam a ser classificadas como tipo B ou B3s. (WANG *et al.*, 2014).

Pequenas unidades repetidas de xilose, sem ou com radical sulfato ligado ao oxigênio do C2 ou C3, podem aparecer também ligadas a ramnose e recebem a denominação de ulvanobiose 3-sulfato $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Xyl}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rha 3S}\text{-}(1\rightarrow)$, classificados como tipo U ou U3s, e ulvanobiose 2',3-sulfato do tipo U2s3s $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Xyl 2S}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rha 3S}\text{-}(1\rightarrow)$ como apresentados na figura 6. (JIAO *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2014).

Figura 6- Estrutura dissacarídica de ulvanos do tipo A, B e U.



Fonte: WANG *et al.*, 2014

A produção de ulvanos pelas algas é influenciada por fatores ambientais e a extração desses polímeros tem como base a sua solubilidade em água. A eficiência de sua obtenção, tal como rendimento e pureza, dependerá da espécie da alga escolhida, sazonalidade e da metodologia empregada na extração podendo apresentar variações em sua composição,

propriedades biológica e físico-química (WANG *et al.*, 2014; CUNHA; GRENHA, 2016).

Processos físico-químicos são empregados para sua obtenção e embora a metodologia siga uma base comum em eliminar resíduos celulares, precipitar polissacarídeos solúveis, secar e armazenar, a mesma terá variações dependendo do foco da sua aplicação, como por exemplo, se aplicados para fins terapêuticos seu grau de purificação deve-se apresentar maior, já para fixação de metais pesados e utilização na agricultura a pureza torna-se menos importante (RIBEIRO, 2012).

A múltipla potencialidade de ulvanos, tais como, propriedades biológicas (atividade antioxidante, antiproliferativa e anticarcinogênica, antiviral, anticoagulante, antihiperlipidêmica e antihipercolesterolêmica, antihipertensora, imunomoduladora), aplicações biomédicas devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e biodisponibilidade, potencial tecnológico (bioadsorção de metais pesados e utilização em técnicas de melhoramento de culturas vegetais), devido a todas essas propriedades funcionais e aplicações, diversas pesquisas tem voltado atenção especial para extração, purificação e caracterização dessas macromoléculas (RIBEIRO, 2012).

2.6 Biofilme bacteriano

As bactérias são encontradas em dois estados de vida, na forma sésil, quando as células se encontram aderidas ao biofilme, e na forma planctônica, quando as células estão livres e dispersas. As células bacterianas de vida sésil, oferecem maiores riscos à saúde humana e são mais resistentes a antibióticos do que em sua forma planctônica (MULCAHY; CHARRON-MAZENOD; LEWENZA, 2008).

Um biofilme é uma comunidade de células aderidas a um substrato biótico ou abiótico, envolta por uma matriz polimérica extracelular produzidas pelas próprias células. Suas etapas de formação envolvem adesão da bactéria ao substrato, crescimento e produção da matriz extracelular e maturação (LACERDA, 2013).

No meio aos mecanismos de resistências das bactérias, os biofilmes agem como uma barreira física, diminuindo a penetração de agentes químicos, sejam antibióticos ou compostos reativos produzidos pelos fagócitos, dificultando sua penetração e difusão através da matriz exopolissacarídica (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

Essa estrutura proporciona as bactérias um crescimento heterogêneo, as mais próximas a superfície possuem crescimento mais acelerado, já as bactérias presentes na base do biofilme crescem menos e possuem uma menor atividade metabólica (baixa síntese

proteica, de ácidos nucléicos e de parede celular), o que garante uma maior resistência a antibióticos, visto que essas substâncias atuam no metabolismo para destruí-las. O biofilme facilita também a transferências de genes de resistência devido aumentar a proximidade entre as células (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

Dentre os principais patógenos responsáveis por infecções associadas a formação de biofilmes em seres humanos estão *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, causadores de infecções hospitalares (ROMLING; BALSALOBRE, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Cultivar a macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp., em meio Guillard f/2, a partir do isolamento de seus esporos, e dela extrair e isolar seus polissacarídeos sulfatados, afim de avaliar sua atividade antibiofilme.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar os esporos da macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp. utilizando o método de diluição seriada.
- Cultivar a macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp. a partir de seus esporos em meio Guillard f/2 sob condições controladas.
- Extrair os polissacarídeos sulfatados totais (PST) da macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp. por digestão enzimática.
- Quantificar, fracionar e purificar o PST em cromatografia de troca iônica utilizando um gradiente do tipo “stepwise” e linear de NaCl.
- Analisar os polissacarídeos sulfatados por cromatografia de troca iônica DEAE-Celulose CLAE.
- Quantificar o teor de carboidratos totais, ácidos urônicos e sulfato e determinar a composição monossacarídica através dos derivados acetilados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM).
- Avaliar a atividade dos polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp., nas bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

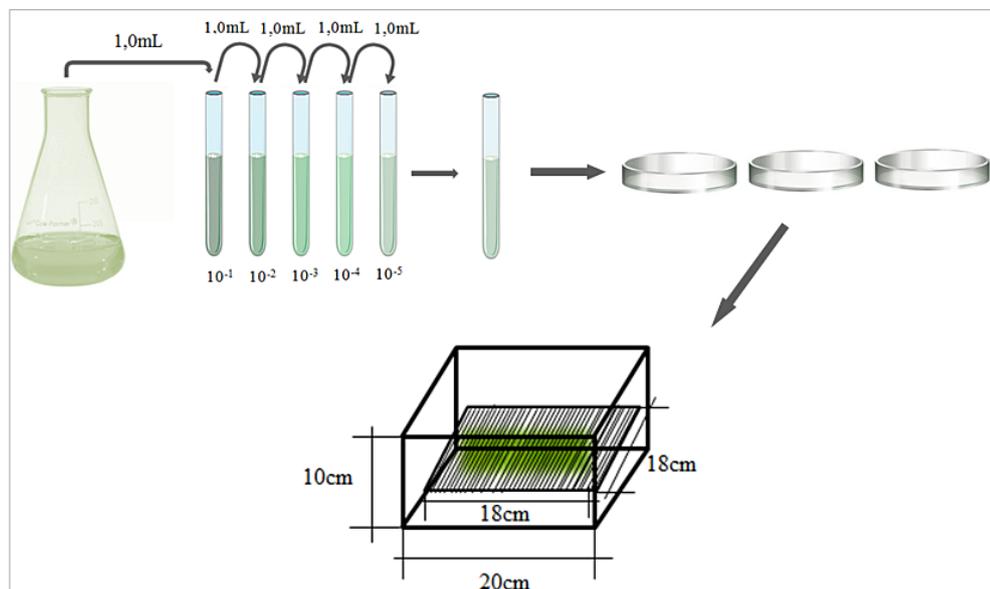
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolamento dos esporos e cultivo da alga em laboratório

O cultivo foi realizado no Laboratório de Planctologia do Departamento de Engenharia de Pesca da UFC, localizado no Centro de Biotecnologia Aplicada a Aquicultura (CEBIAQUA). Os esporos da alga foram obtidos de forma eventual durante uma coleta de água na Praia do Futuro localizada em Fortaleza-Ce. As amostras coletadas foram filtradas em uma rede de plâncton com abertura de malha de 60 μm , afim de diminuir a herbívoros causada pelo zooplâncton.

O isolamento dos esporos foi realizado pelo método de diluição em série, onde foi colhido 1 mL da amostra filtrada e adicionou-se em um tubo de ensaio contendo 9 mL de meio Guillard f/2 (GUILLARD, 1975). Foram realizadas diluições de 10^{-1} a 10^{-5} e o inóculo final foi mantido a temperatura de 25 ± 1 °C. Após seu isolamento e desenvolvimento inicial no tubo de ensaio, as cepas foram transferidas e mantidas em placa de Petri por cerca de 10 dias, para seu desenvolvimento e adaptação em um volume maior de meio, e em seguida levadas para cima de uma estrutura de fixação com 18 cm² confeccionada com canos de policloreto de polivinila (PVC) e fio de polipropileno, disposta dentro de um aquário de 20 cm² com altura de 10 cm e volume de 3,5 L (Figura 7).

Figura 7- Isolamento dos esporos realizado por diluição em séries e estrutura de fixação dos esporos para o cultivo da alga em laboratório.



Fonte: Arquivo pessoal

Os frascos com os esporos foram mantidos em uma câmara de germinação com iluminação constante (fotoperíodo de 24 h) (ZHANG; NOORI; ANGELIDAK, 2011), promovida por duas lâmpadas fluorescentes do tipo “luz do dia” com 20 watts de potência cada, o que corresponde a uma intensidade luminosa igual a $56 \mu\text{mol de fótons. m}^{-2}\text{s}^{-1}$, medidos pelo equipamento luxímetro (precisão de $\pm 4\%$) e temperatura controlada.

O meio de cultivo foi renovado a cada 20 dias. O aquário foi mantido em câmara de germinação com iluminação constante, mantendo os mesmos parâmetros de iluminância como citado anteriormente, e temperatura de $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. A densidade algal foi analisada macroscopicamente e as estruturas celulares em microscópio óptico. A alga foi identificada somente após seu crescimento, através da análise de suas características taxonômicas.

4.2 Meio de Cultivo

Neste trabalho, utilizou-se o meio Guillard f/2 (1975) modificado para o isolamento dos esporos, manutenção e desenvolvimento algal, cujos componentes são: água do mar 30 ppm, enriquecida com nitrato, fosfato, metais traço e vitaminas.

O meio foi preparado adicionando 1 mL de solução estoque de fosfato de sódio, nitrato de sódio, metais traço e 0,5 mL de solução estoque de vitamina a 1 L de água do mar esterilizada. Essas soluções foram preparadas de acordo com a tabela 2. A salinidade final do meio foi ajustada para 30 ppm e pH 8,0.

Foi utilizado ferro quelado para o preparo da solução final de metais traço. Para isso, foi dissolvido em 900 mL de água destilada, 4,36 g de Na_2EDTA (sal dissódico do ácido etilenodiaminotetra-acético) e 3,15 g de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (cloreto férrico hexahidratado) e em seguida adicionado 1 mL de cada solução estoque de metais traço. Água destilada foi adicionada para aferir a 1 L o volume final.

A solução estoque de vitaminas foi preparada diluindo-se 100 mg de cloridrato de timina, 100 mg de cloridrato de piridoxina e 5 mg de cianocobalamina em 50 mL de água destilada.

Todas as soluções preparadas foram armazenadas a uma temperatura de $4 \text{ }^\circ\text{C}$, e o material utilizado para isolamento e cultivo, tais como, vidrarias, utensílios e meio de cultivo, foram esterilizados por calor úmido, em autoclave, a uma temperatura de $120 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos.

Tabela 2- Concentração dos nutrientes/componentes para a preparação da solução estoque segundo Guillard (1975).

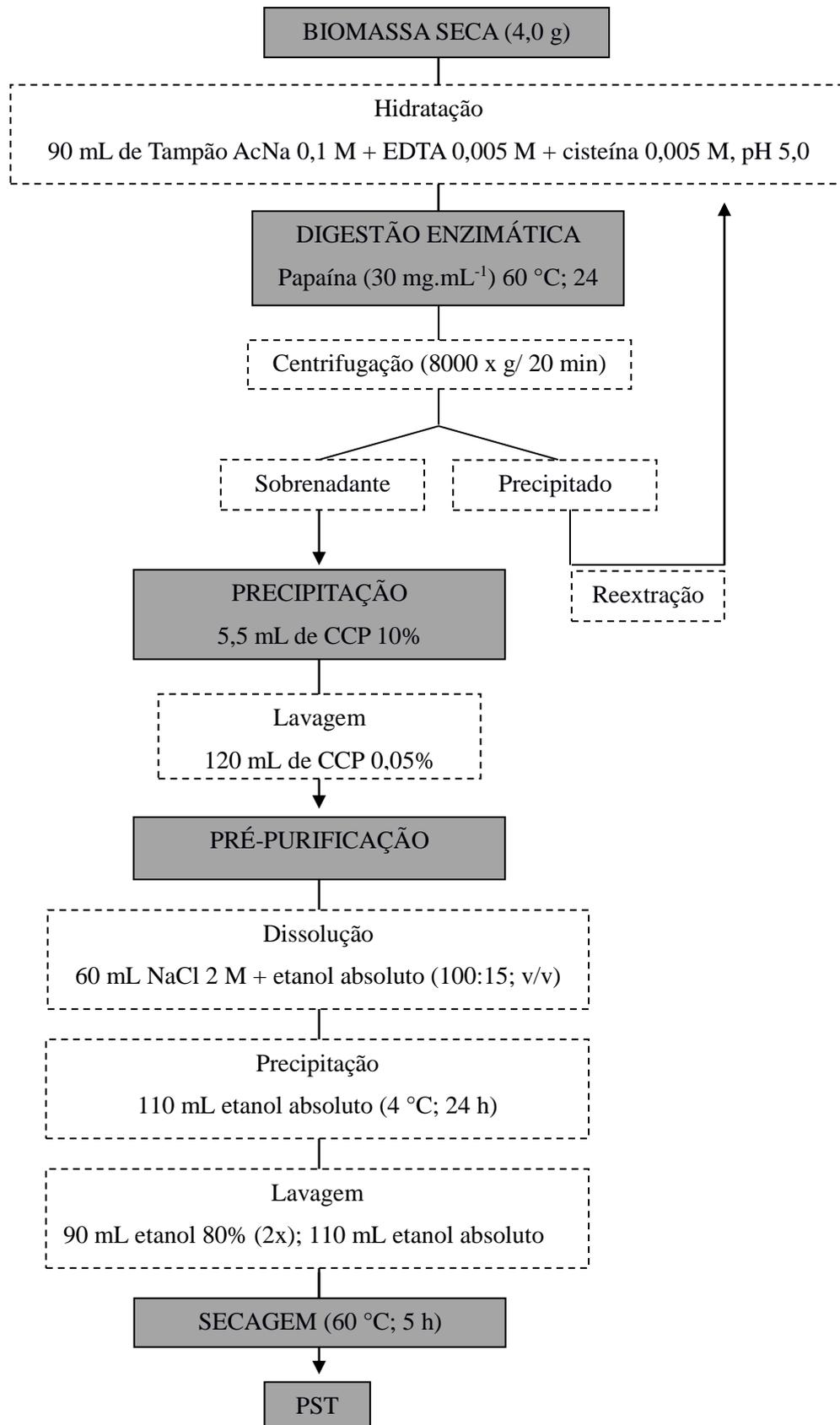
Nutrientes/ Componentes		Sais utilizados	Concentração (g/ 100 mL)
Fósforo	P	NaHPO ₄ H ₂ O	0,5
Nitrogênio	N	NaNO ₃	7,5
	Cu	CuSO ₂ 5.H ₂ O	0,98
Metais traço	Zn	ZnSO ₄ 7.H ₂ O	2,2
	Co	CoCl ₂ 6.H ₂ O	1,0
	Mn	MnCl ₂ 4.H ₂ O	18,0
	Mo	Na ₂ MoO ₄ 2.H ₂ O	0,63
	Tiamina	*	0,2
Vitaminas	Piridoxina	*	0,2
	Cianocobalamina	*	0,01

4.3 Extração dos polissacarídeos sulfatados totais (PST) da macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp.

A figura 8 apresenta o fluxograma de extração enzimática de PST da macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp., proposta por Farias *et al.*, (2000), como descrito abaixo.

A extração dos PST partiu de 4 g de biomassa seca, obtida do cultivo, e hidratada em 90 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, contendo 0,005 M de cisteína e 0,005 M de EDTA. Em seguida, a mistura foi incubada com papaína bruta (30 mg.mL⁻¹) em banho-maria a 60 °C por 24 h e, após a digestão enzimática o material foi filtrado em membrana de nylon, centrifugado (8000 x g/ 20 min), e ao sobrenadante, adicionado 5,5 mL de cloreto de cetilpiridínio (CCP 10%) para precipitação dos polissacarídeos presentes na mistura por 24 h a 25 °C. Após a precipitação do PST, a amostra foi centrifugada (8000 x g/ 20 min), o *pellet* foi lavado com 120 mL CCP 0,05%, centrifugado (8000 x g/ 20 min) e dissolvido em 60 mL de NaCl 2 M + etanol absoluto (100:15; v/v) e novamente precipitado por meio da adição de 110 mL de etanol absoluto gelado, deixado em repouso a 4 °C por 24 h. Em seguida o material foi centrifugado (8000 x g/ 20 min), lavado duas vezes com 90 mL de etanol 80% e uma vez com 110 mL de etanol absoluto gelado. Por fim, o PST foram secos em estufa com circulação de ar a 60 °C por 5 h.

Figura 8- Fluxograma da extração enzimática de polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp. cultivada em meio Guillard f/2.



Fonte: Arquivo pessoal, adaptado de Farias *et al.*, 2000.

4.4 Fracionamento e purificação dos polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp.

Os PST foram fracionados em uma coluna de troca iônica DEAE-Celulose equilibrada com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Aplicou-se na coluna 1 mL de solução de PST (1 mg.mL⁻¹) e, em seguida, eluídos em gradiente do tipo “stepwise” com concentrações crescentes de NaCl (0,5; 0,7; 0,9; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 e 2,0 M) preparadas em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. O fluxo da coluna foi ajustado em 1 mL.min⁻¹ e coletadas frações de 1 mL. A presença dos PST nas frações foi evidenciada através de reação metacromática, utilizando 200µL de cada fração adicionados a 1 mL de azul-dimetil-dimetileno (ADM). A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 525 nm.

A fração majoritária mais metacromática foi produzida em uma cromatografia preparativa, utilizando uma maior quantidade do mesmo gel de DEAE-Celulose empregado no fracionamento. Para isso, cerca de 200 mg dos PST foram dissolvidos em 50 mL do tampão de extração (acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0) e aplicados no topo do gel. O fluxo da coluna foi ajustado para 10 mL.min⁻¹. Evidenciou-se a presença da fração isolada através da reação metacromática com ADM e, após a completa percolação com o tampão de extração, contendo o sal correspondente, a fração mais metacromática foi isolada das demais, dialisada exaustivamente contra água destilada e liofilizada.

4.5 Análise dos polissacarídeos sulfatados em DEAE-Celulose CLAE

Para melhor caracterização dos polissacarídeos extraídos, cerca de 4 mg da amostra do PST e da fração majoritária isolada, foram analisadas por cromatografia de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu) em uma coluna de troca iônica DEAE-Celulose (GE Healthcare Fast Flow, 5 mL) equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, mais EDTA 1 mM. A coluna foi eluída por gradiente linear de NaCl de 0 a 3 M preparada com o mesmo tampão de equilíbrio. O fluxo da coluna foi ajustado em 1 mL.min⁻¹ e coletadas frações de 1 mL, em seguida, a presença dos polissacarídeos sulfatados foram verificadas nas frações por meio da reação metacromática com ADM. A leitura da absorvância foi realizada em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 525 nm. As frações contendo polissacarídeos sulfatados foram reunidas, dialisadas contra água destilada e liofilizadas.

4.6 Eletroforese em gel de agarose

As frações de PST (F₁, F₂, F₃) isoladas por CLAE, a fração majoritária (F_{1,2M}), obtida por cromatografia de troca iônica em gradiente salino do tipo “stepwise” e uma mistura padrão de glicosaminoglicanos dermatan sulfato (DS), heparan sulfato (HS) e condroitin sulfato (CS) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,5% em tampão 1,3-acetato diaminopropano 0,05 M (pH 9,0). A corrida foi realizada em voltagem constante (110 V) durante 60 min. Após a corrida, os polissacarídeos presentes no gel foram fixados com uma solução de N-cetil-N,N,N-brometo de trimetilamônio 0,1% por 24 h. Após esse período, o gel foi seco e corado com azul de toluidina a 0,1% em ácido acético/etanol/água (0,1: 5: 5, v/v) e descorado com uma solução de etanol absoluto, água destilada e ácido acético concentrado (4,95: 4,95: 0,1; v/v/v) (DIETRICH; DIETRICH, 1976).

4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

As massas moleculares das frações foram também analisadas por PAGE em comparação com a mobilidade eletroforética de composto padrão (POMIN *et al.*, 2005). O marcador de massa molecular foi uma mistura padrão de glicosaminoglicanos (dermatan sulfato, heparan sulfato e sulfato de condroitina) de baixo peso molecular (< 400 kDa).

Aproximadamente 10 µg dos polissacarídeos purificados (F₁; F₂; F₃; F_{1,2M}) foram aplicados em gel de poliacrilamida 10% com 1 mm de espessura em 0,06 M de Tris-HCl (pH 8,6). Após a eletroforese, em 100 V durante 60 min, as amostras foram coradas com azul de toluidina a 0,1% em ácido acético e descoradas com uma solução de ácido acético 1%.

4.8 Análise química e composição monossacarídica

4.8.1 Determinação do teor de açúcares totais, ácidos urônicos e sulfato

O conteúdo de carboidrato total foi determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Foi construída uma curva padrão, a partir de uma solução 1mg.mL⁻¹ de PST e das frações isoladas, em seguida adicionou-se nas soluções 20 µL de fenol redestilado e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após 30 minutos a leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm, e a quantificação foi feita com base na curva padrão de D-fucose.

O teor de ácidos urônicos nos PST e nas frações foram determinados pelo método carbazol-ácido sulfúrico (DISCHE, 1962). Para isso, construiu-se uma curva padrão a partir de uma solução 1 mg.mL^{-1} de PST e das frações isoladas. Em seguida adicionou-se $1,0 \text{ mL}$ de ácido sulfúrico com borato. As amostras foram aquecidas por 10 min a $100 \text{ }^\circ\text{C}$, resfriadas a temperatura ambiente e adicionado $40 \text{ }\mu\text{L}$ de carbazol. Logo após, foi aquecida novamente por 10 min a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ e resfriada à temperatura ambiente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 525 nm , utilizando uma curva padrão de ácido glicurônico.

Para determinar o teor de sulfato nos PST e na fração mais metacromática realizou-se o método da gelatina bário (DODGSON, 1961). Para isso pegou-se cerca de $3,0 \text{ mg}$ das amostras e foram hidrolisadas em $\text{HCl } 1 \text{ M}$, por 4 h , à $105 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida foi adicionado o reativo gelatina-bário que gera uma solução turva. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 360 nm e como referência foi utilizado uma curva padrão de sulfato de sódio anidro (1 mg.mL^{-1}).

4.8.2 Composição monossacarídica

Aproximadamente 5 mg de PST e da fração purificada foram hidrolisadas com $300 \text{ }\mu\text{L}$ de TFA (ácido trifluoroacético 5 mol.L^{-1}) e $300 \text{ }\mu\text{L}$ de água durante 4 h a $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Após hidrólise, o ácido foi removido por evaporação, e o material resultante foi solubilizado, liofilizado e submetido à redução com borohidreto de sódio (NaBH_4) e NaOH . O material foi neutralizado com ácido acético, liofilizado e lavado exaustivamente com metanol e novamente seco.

Os derivados de alditóis obtidos foram acetilados com uma mistura de anidrido acético: piridina ($1:1, \text{ v/v}$) por 1 h a $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Os acetatos de alditóis obtidos foram extraídos com clorofórmio e a fase clorofórmica foi lavada sucessivas vezes com água destilada para remoção da piridina residual. Para promover a total desidratação da fase clorofórmica o material foi submetido a uma coluna de sulfato de sódio anidro. Os acetatos de alditóis foram então analisados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS, QP2010 Shimadzu, Japão) em uma coluna Restek RTX-5MS. Utilizou-se gás hélio como gás de arraste com um fluxo de 1 mL.min^{-1} e um gradiente de temperatura de $110 \text{ }^\circ\text{C}$ a $250 \text{ }^\circ\text{C}$, com variação de $2 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. A temperatura do injetor, da fonte de íons e da interface foram $260 \text{ }^\circ\text{C}$, $200 \text{ }^\circ\text{C}$ e $230 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Os componentes individuais foram identificados por comparação com os espectros de massa padrão dos monossacarídeos ramnose, fucose,

arabinose, xilose, manose, glicose, galactose e com os espectros constantes da biblioteca computacional NIST (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia).

4.9 Atividade antibiofilme

4.9.1 *Micro-organismos*

Os micro-organismos utilizados nos ensaios de crescimento planctônico e formação de biofilme foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), uma bactéria Gram-positiva, e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), uma bactéria Gram-negativa, ambas provenientes da American Type Culture Collection (ATCC).

Os meios de cultura utilizados foram: Ágar Triptona de Soja (ATS) e Caldo de Triptona de Soja (CTS).

O cultivo das bactérias ocorreu em ATS a 37 °C por 24 h. Após o crescimento os micro-organismos foram inoculados em 5 mL de CTS e incubados sob agitação constante por um período de 18 horas a 37 °C. Logo após o crescimento, a suspensão bacteriana foi ajustada para 2×10^6 células/mL, através de turbidimetria, utilizando espectrofotômetro em comprimento de onda de 620 nm, e curvas de calibração previamente determinada para cada bactéria.

4.9.2 *Atividade dos polissacarídeos sulfatados sobre o crescimento planctônico*

A determinação da concentração mínima inibitória (CMI) dos PST e da fração isolada mais metacromática, sobre o crescimento planctônico, foi realizado pela técnica padrão de microdiluição em placas de poliestireno de 96 poços. Os PST e fração foram diluídos em água em concentrações variando de 1.000 a 15,6 µg/mL, e em seguida, colocou-se em cada poço 100 µL dessas soluções e 100 µL de células (previamente ajustadas a 2×10^6 células/mL) obtendo um volume final de 200 µL em cada poço. Como controle foi utilizado somente água sem a presença dos polissacarídeos. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas em agitação constante. Para avaliar o crescimento bacteriano após a incubação, foi realizada a medida da turbidez por meio da densidade óptica de cada poço com o auxílio de um leitor de microplacas automático (SpectraMax® I3) em comprimento de onda de 620 nm.

4.9.3 Ação dos polissacarídeos sulfatados sob a formação dos biofilmes

Para o ensaio de formação de biofilmes, seguiu-se a metodologia proposta por Stepanovic *et al.* (2000), com modificações. Realizou-se esse procedimento tanto para a avaliação da biomassa total, como para enumeração de células viáveis, para isso foram preparadas duas placas de microtitulação distintas como descrito abaixo.

Para determinar o CMI foram utilizadas placas estéreis de polipropileno de 96 poços, com concentração inicial de células de 2×10^6 células/mL e de PST e fração de 1.000 a 15,6 µg/mL, preparadas de forma semelhante ao ensaio de crescimento planctônico. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h em agitação constante e, após a incubação, o conteúdo de cada poço foi removido. Os biofilmes aderidos na placa foram então lavados duas vezes com 200 µL/poço de água estéril com o objetivo de remover células fracamente aderidas.

4.9.3.1 Quantificação da biomassa

Após as duas lavagens descrita anteriormente, a quantificação da biomassa do biofilme foi determinada por coloração utilizando cristal de violeta e leitura da densidade óptica a 590 nm. O biofilme formado foi fixado com 200 µL de metanol a 99% por 15 minutos, após esse período o metanol foi removido e as placas secas à 25 °C. Em seguida, foram adicionados aos poços 200 µL de cristal de violeta a 1% durante 5 min, o excesso do corante foi removido e as placas lavadas com água estéril. Para determinar a quantificação indireta da formação do biofilme por meio da absorbância, o corante preso ao biofilme foi dissolvido com 200 µL de ácido acético (33%, v/v) e realizado sua leitura em espectrofotômetro.

4.9.3.2 Enumeração de células viáveis

Após as duas lavagens descrita anteriormente, adicionou-se aos biofilmes bacterianos, 200 µL de água estéril em cada poço e as placas foram colocadas em banho ultrassônico operando a 50 kHz por 8 minutos, para liberação das células bacterianas do biofilme. As suspensões dos poços foram retiradas e então realizadas diluições seriadas para posterior plaqueamento em meio ATS durante 24 h a temperatura de 37 °C. O número de unidades formadoras de colônias por unidades de área dos poços foi então enumerado (log UFC/mL).

4.9.4 Análise estatística

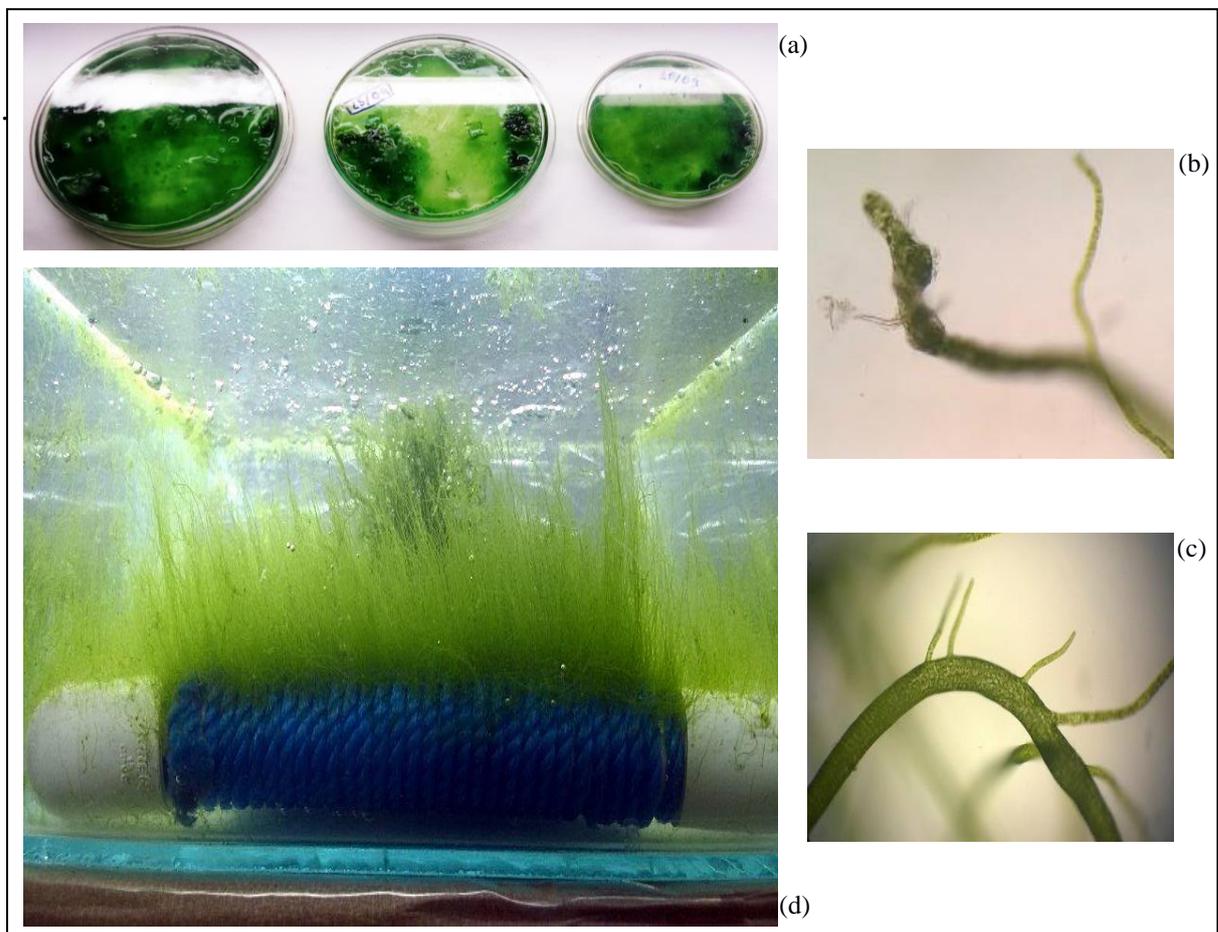
Os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do software GraphPad Prism® versão 5.0 para Microsoft Windows®. E os dados de todos os ensaios comparados utilizando análise de variância (ANOVA), com o teste Bonferroni. Foi considerado um nível de significância de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cultivo

A estrutura de fixação foi totalmente colonizada por talos com aproximadamente 4 cm de altura após 70 dias de cultivo e a macroalga foi identificada como sendo a espécie *Enteromorpha* sp. (Figura 9), que pertencente ao filo Chlorophyta, ordem Ulvales e família Ulvaceae, segundo o banco de dados AlgaeBase (2016). Os esporos dessa alga se ligaram a estrutura de fixação através de um mecanismo que envolve a secreção de uma substância adesiva de natureza glicoproteica, que a fixou, e partir daí desenvolveram uma parede celular, germinaram e produziram uma nova alga (STANLEY, CALLOW, CALLOW, 1999; CALLOW *et al.*, 2003).

Figura 9- Macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp. produzida a partir de esporos em meio Guillard f/2 em laboratório. (a) aclimatação dos esporos em volumes maiores de meio. (b) presença do esporo na extremidade distal do talo. (c) identificação de um talo ramificado. (d) crescimento da macroalga na estrutura de fixação.



Fonte: Arquivo pessoal

Callow *et al.* (2003) avaliaram a natureza dos esporos de *Enteromorpha*, por meio da microscopia de força atômica, e concluiu que a substância adesiva é de natureza fibrilar e está presente em vesículas pré-formadas na região anterior do esporo. Esse material é então liberado e sofre um endurecimento rápido para formar uma substância gelatinosa, se espalhando e fixando no substrato.

A alga desse trabalho, pertence ao gênero *Enteromorpha*, essas algas criam mecanismo para suportarem longos períodos em condições adversas, os esporos, que permanecem dormentes durante certos períodos até que as condições ambientais se tornem favoráveis para seu desenvolvimento (ERIKSSON; JOHANSSON, 2005).

Elas também crescem a partir de células somáticas. Zhang *et al.* (2010) realizou experimento com a macroalga marinha verde *Enteromorpha prolifera*, por meio de estudo de campo e culturas laboratoriais, tendo as células somáticas como foco do estudo para desenvolvimento da macroalga. Essas células foram submetidas a variações de temperatura e luminosidade durante o cultivo, resistiram as mudanças e voltaram a crescer quando a temperatura (20 °C) e a irradiância (20 $\mu\text{mol de fótons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) foram ajustadas a níveis normais.

O controle das variáveis limnológicas (temperatura, luminosidade, pH e salinidade), bem como o fornecimento de nutrientes adequados, são fatores primordiais para obter sucesso em um cultivo (LOURENÇO, 2006).

Xu *et al.* (2016) avaliaram os efeitos da salinidade, pH e nutrientes no cultivo em laboratório da macroalga *Enteromorpha prolifera* em meio Guillard f/2 e concluiu que a faixa ótima de salinidade para essa alga varia entre 15 e 25 psu e que as concentrações de 0,06 mg.L^{-1} de $\text{PO}_4\text{-P}$ e 0,42 mg.L^{-1} de $\text{NO}_3\text{-N}$ em pH 9, são máximas para a produção de esporos e gametas. Essas condições podem variar de espécie para espécie, para *Enteromorpha* sp. Sousa *et al.* (2007) obteve um crescimento máximo dos esporos em salinidade 35 psu.

A partir das condições fornecidas nesse trabalho, de temperatura de 25 ± 1 °C, luminosidade de 56 $\text{mmol de fótons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, salinidade de 30 ppm, pH 8,0 e água do mar enriquecida com nutrientes essenciais (fósforo, nitrogênio, metais traços e vitaminas), foi possível obter uma boa produção da macroalga. A água do mar natural por si só já é adequada para a germinação de esporos, porém muitos elementos estão em quantidades limitadas, o que dificulta a crescimento da alga, daí se fez necessário o enriquecimento do meio com certos elementos químicos em concentrações mais elevadas (LOURENÇO, 2006).

A retirada desenfreada de várias espécies de algas para extração de seus derivados, tem causado um declínio em seus bancos naturais (BARROS; DAVIM; MARINHO-

SORIANO, 2010). Nem todas as espécies que produzem compostos biológicos são passíveis de cultivo, nesse contexto, a produção em laboratório se torna uma ferramenta importante para obter informações sobre o comportamento fisiológico da espécie frente as condições de cultivo e para avaliar sua viabilidade de ampliação para produzir biomassa em escala maior.

Apesar de que a literatura relate inúmeras algas com potencial para produzir substâncias com atividades biológicas, não existe registro de cultivo em larga escala de macroalgas do gênero *Enteromorpha* voltado para a extração de polissacarídeos sulfatados e os trabalhos encontrados na literatura que envolvem o cultivo de algas desse gênero são voltados para entender e resolver o fenômeno de maré verde que ocorre em várias costas, em várias partes do mundo, como América do Norte, Europa, Ásia e Austrália (MARTINS; MARQUES, 2002; MARTINS *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2016).

5.2 Rendimento de polissacarídeos sulfatados

A extração de polissacarídeos de macroalgas vem sendo realizada por meio de várias técnicas que utilizam de solventes tradicionais (álcool e água), soluções ácidas ou tecnologias inovadoras como extrações assistida por enzimas, ultrassom e micro-ondas (GARCIA-VAQUERO *et al.*, 2016). Após a extração inicial, a solução contendo polissacarídeos sulfatados é tratada com agentes precipitantes, geralmente álcool, acetona ou detergentes, como brometo de cetiltrimetilamônio ou cloreto de cetilpiridino (GARCIA-VAQUERO *et al.*, 2016; Farias *et al.*, 2000).

Nesse trabalho, empregando a metodologia que utiliza uma enzima proteolítica para extrair os PST, e utilizando CPP como agente precipitante, foi possível obter um rendimento de 0,432 g de PST partindo de 4 g de biomassa seca da macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp. cultivada em laboratório, o que corresponde a um rendimento total de 10,8% de sua biomassa.

Esse rendimento é considerado alto quando comparado aos PST obtidos de outras espécies de macroalgas verdes. Rodrigues *et al.* (2010) obtiveram 4,10 e 3,17% de PST extraídos das macroalgas marinhas verdes *Caulerpa racemosa* e *Caulerpa cupressoides*, respectivamente, utilizando uma enzima proteolítica, a papaína, e CPP como agente precipitante. Essa mesma metodologia foi aplicada por Bezerra-Neto *et al.* (2008) e Araújo *et al.* (2016) e resultou em rendimentos de 3,30% da *Caulerpa sertularioides* e 2,21% de *Ulva lactuca*, respectivamente. Costa (2012), realizando uma extração proteolítica, utilizando como enzima a maxatase e metanol como agente precipitante, obteve um rendimento de

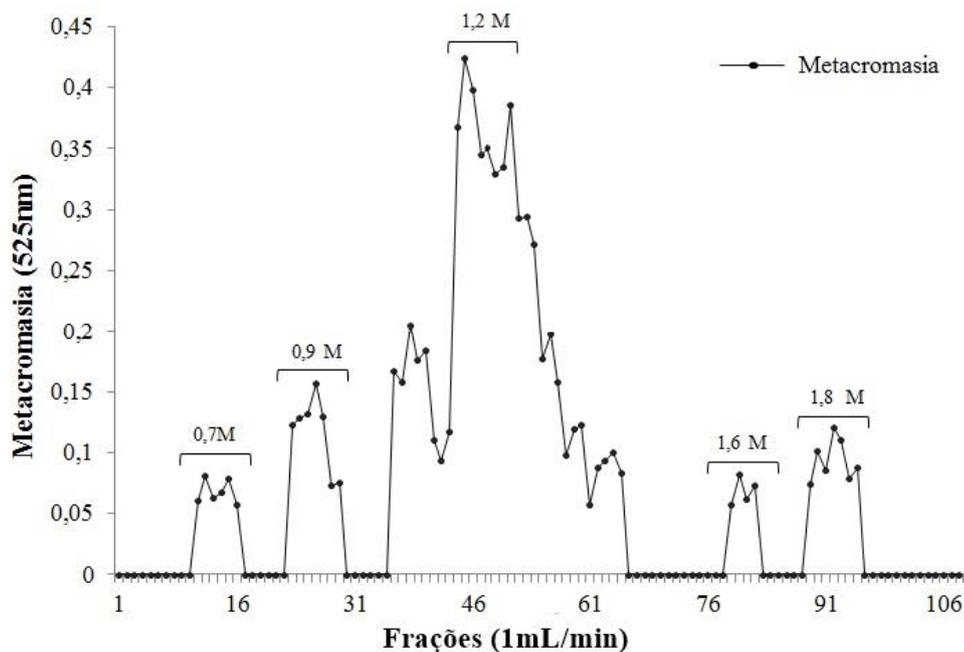
aproximadamente 2,4% em *Caulerpa sertularioides*, 3,5% em *C. prolifera*, 6,0% em *C. cupressoides* e 11,0% em *Codium isthmocladum*.

O rendimento e a estrutura dessas macromoléculas podem variar de acordo com a espécie utilizada, metodologia de extração (RODRIGUES *et al.*, 2010), estágio do ciclo de vida e sazonalidade (RIOUX; TURGEON; BEAULIEU, 2009). As algas vermelhas e pardas geralmente apresentam os rendimentos mais elevados quando comparado com macroalgas verdes que apresentam rendimentos menores (COSTA, 2012).

5.3 Fracionamento e purificação dos polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp.

Após o fracionamento dos PST em cromatografia de troca iônica DEAE-Celulose, por gradiente salino do tipo “stepwise”, foram obtidos cinco frações com atividade metacromática eluídas com 0,7; 0,9; 1,2; 1,6; 1,8 M de NaCl sendo a maior atividade metacromática evidenciada na fração 1,2 M (Figura 10).

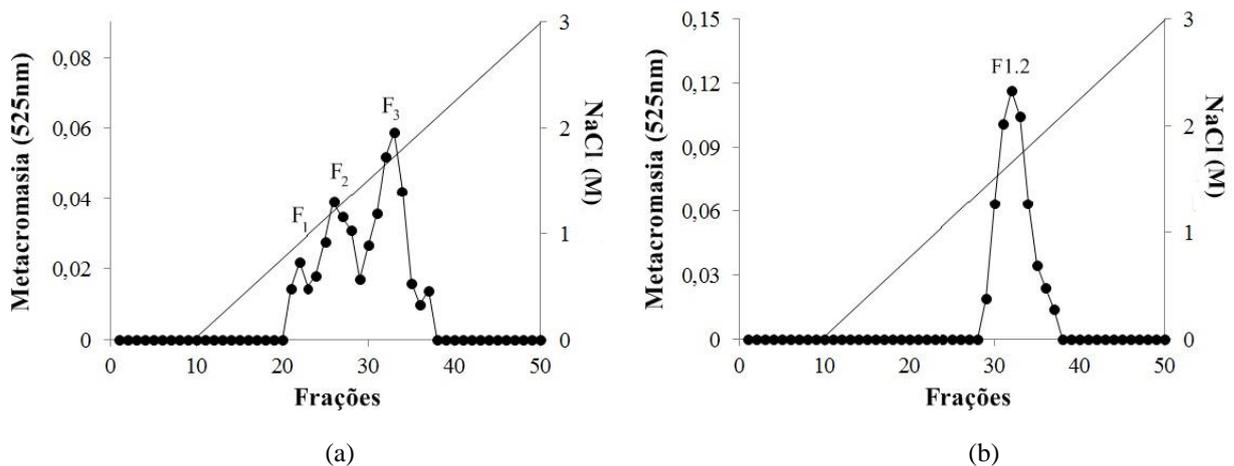
Figura 10- Fracionamento e purificação dos polissacarídeos sulfatados totais, em coluna de troca-iônica DEAE-Celulose em gradiente do tipo “stepwise” extraídos da macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp. equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0.



Fonte: Arquivo pessoal

Os PST extraídos e a fração majoritária mais metacromática ($F_{1,2M}$), obtida da cromatografia de troca iônica e isolada em coluna preparativa de DEAE-Celulose, foram submetidos a cromatografia de troca iônica DEAE-Celulose em sistema CLAE eluída por gradiente linear de NaCl de 0 a 3 M, e isolou-se três frações de polissacarídeos sulfatados a partir da preparação dos PST, denominadas de F_1 , F_2 e F_3 (Figura 11a) e um único pico a partir da fração $F_{1,2M}$, comprovando assim a eficiência da coluna preparativa no isolamento da fração majoritária (Figura 11b).

Figura 11- Cromatografia em coluna de troca iônica DEAE-Celulose em sistema CLAE, dos polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp., equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 e EDTA 1 mM e eluída com gradiente linear de NaCl (0 - 3 M). (a) Análise e isolamento dos PST. (b) Análise da purificação da fração $F_{1,2M}$.



Fonte: Arquivo pessoal

O fracionamento de polissacarídeos sulfatados, seja para purificar ou determinar o peso molecular, vem sendo realizado por meio de cromatografia de troca iônica, exclusão por tamanho ou afinidade (CHEN *et al.*, 2016). A CLAE é considerada uma das técnicas mais eficientes para separar, quantificar e detectar compostos ativos e tem sido amplamente utilizada como uma ferramenta na análise de polissacarídeos sulfatados (HAYES *et al.*, 2014).

O emprego da técnica cromatográfica, utilizando a matriz trocadora aniônica DEAE-Celulose eluída com gradiente salino do tipo “stepwise”, é eficiente no fracionamento e purificação de PST de macroalgas marinhas. Rodrigues, Coura e Benevides (2016) utilizaram essa técnica para fracionar e purificar os PST da macroalga marinha vermelha *Gracilaria cornea* e isolaram três frações polissacarídicas, eluídas em 0,50; 0,75 e 1,00 M de

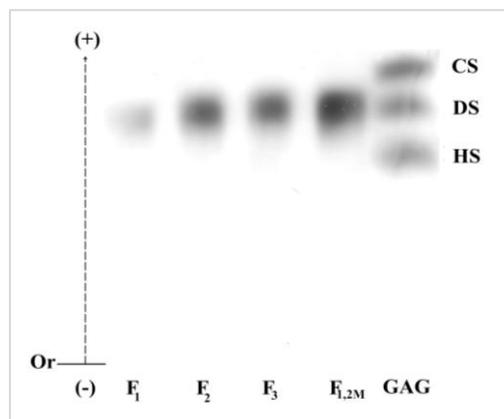
NaCl. Araújo *et al.* (2016) utilizando a mesma técnica cromatográfica nos PST extraídos da macroalga marinha verde *Ulva lactuca*, isolaram duas frações eluídas com 0,5 e 0,75 de NaCl. Xu *et al.* (2015) isolaram três frações eluídas por 0,1; 0,3 e 0,5 M de NaCl de PST da macroalga marinha verde *Enteromorpha prolifera*.

O isolamento de PST pode ser realizado utilizando outras matrizes que compõem a fase estacionária do processo cromatográfico e com outros tipos de soluções para realizar a troca iônica e/ou a exclusão molecular entre a matriz e a amostra. Qi *et al.* (2012) fracionaram os PST da macroalga marinha verde *Enteromorpha clathrata* e Li *et al.* (2016) os PST da macroalga marinha verde *Monostroma angicava*, ambos utilizando uma coluna Q-Sepharose Fast Flow eluída com um gradiente salino de NaCl (0 - 4 M) do tipo “stepwise” e purificou as frações obtidas em coluna Sephacryl S-400/ HR eluída com 0,2 mol/ L de NH_4HCO_3 .

5.4 Análise eletroforética

As frações de PST (F_1 , F_2 e F_3) obtidas por CLAE e $F_{1,2M}$ purificada e isolada em coluna preparativa de troca iônica do tipo “stepwise”, quando submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,5% a 110 V, durante 60 min em tampão acetato diaminopropano (pH 9,0), revelaram uma mobilidade eletroforética bastante semelhante e bandas homogenias, porém a fração $F_{1,2M}$ apresentou uma maior densidade de cargas, o que reforça o fato de uma maior metacromasia dessa fração em reação com o ADM, observada nos processos cromatográficos (Figura 12).

Figura 12- Análise eletroforética em gel de agarose a 0,5%, das frações isoladas dos polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp., comparada à mistura de glicosaminoglicanos (GAG).



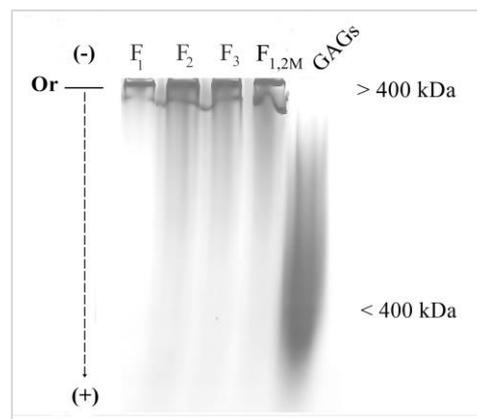
Legenda: Or- Origem; (-) pólo negativo; (+) pólo positivo; CS-condroitin sulfato; DS-dermatan sulfato; HS- heparan sulfato

Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com Melo *et al.* (2012) os polissacarídeos sulfatados que possuem estruturas e cargas semelhantes têm mobilidade eletroforética semelhante, porém não se pode afirmar com certeza que se trata de um mesmo componente. Essa técnica foi utilizada nesse trabalho como finalidade de confirmar a presença de moléculas carregadas e caracterizá-las quanto aos padrões de densidade de cargas negativas.

Quanto ao procedimento PAGE, a fim de avaliar a massa molecular de ulvanos sulfatados, não houve migração eletroforética das frações durante o processo, que ocorreu a 100 V durante 60 min em tampão Tris-HCl (pH 6) (Figura 13). Os resultados mostraram que tais frações são de elevado peso molecular quando comparada com o padrão GAG de baixo peso (< 400 kDa), pois não foram capazes de entrarem no gel a 10%.

Figura 13- Análise eletroforética em gel de poliacrilamida a 10%, das frações isoladas dos polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp, comparada à mistura padrão de glicosaminoglicanos (GAG).



Legenda: Or- Origem; (-) pólo negativo; (+) pólo positivo; GAGs-glicosaminoglicanos

Fonte: Arquivo pessoal

A PAGE se trata de um método analítico que tem sido útil para estimar a massa molecular aproximada de polissacarídeos sulfatados, quando comparado com um padrão de peso conhecido (FARIAS *et al.*, 2008). Para determinar o peso dessas moléculas com maior exatidão, tem-se aplicado a cromatografia de exclusão por tamanho, molecular ou gel filtração (FARIAS *et al.*, 2008; QI *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2015).

Os polissacarídeos sulfatados de algas verdes apresentam geralmente um elevado peso molecular médio que varia de 189 a 8.200 kDa (PÉREZ; FALQUÉ; DOMÍNGUEZ, 2016). QI *et al.* (2012) determinou um peso de 511 kDa nos polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha verde *Enteromorpha clathrata* por meio da cromatografia gel filtração.

5.5 Análise química

De modo geral o PST e as frações apresentaram quantidades significativas de açúcar total, cujos teores ficaram compreendidos entre 16,46 a 97,98% e de ácido urônico, cujos valores oscilaram entre 4,35 a 61,82%. Quanto ao teor de sulfato, determinado por turbidimetria, obteve-se valores elevados de 34,40% nos PST e 25,87% na F_{1,2M}. Os resultados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3- Valores percentuais do teor de açúcar total, ácido urônico e sulfato nos PST e nas frações extraídos da macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp.

Amostras	Açúcar total	Ácidos Urônicos	Sulfato
PST	70,36	15,74	34,40
F ₁	16,46	61,82	N.D.
F ₂	61,62	14,52	N.D.
F ₃	48,28	25,91	N.D.
F _{1,2M}	97,98	4,35	25,87

Legenda: N.D.; Não determinado

Os teores de açúcares totais e sulfato para PST e F_{1,2M}, são considerados muito altos quando comparado a outras espécies de macroalgas marinhas verdes. Em *Caulerpa racemosa*, foram encontrados teores de açúcares totais de 55% em PST e em suas frações isoladas variando de 30,0 a 49,0%, já para seu grau de sulfatação foram de 15,17% em PST e em suas frações de 5,91 a 28,39% (RIBEIRO, 2012).

Zhang *et al.* (2013) extraiu os PST de macroalga marinha verde *Enteromorpha linza* por dois métodos, aquoso e alcalino, e apresentaram diferenças entre os conteúdos de açúcares totais, ácidos urônicos e sulfato. No método aquoso foi obtido 53,8% de açúcar total 14,4% de ácidos urônicos e 21,3% de sulfato, já para PST extraídos pelo método alcalino, apresentou um teor de açúcar menor, de 48,1%, maior para ácidos urônicos, de 20,5%, e menor para sulfato, de 17,4%. Para essa mesma espécie, utilizando um outro método de extração Zhang *et al.* (2014) obteve teores de 58,72% de açúcares totais, 11,96% de ácidos urônicos e 20,08% de sulfato.

O teor de carboidrato total, ácidos urônicos e sulfato podem variar de acordo com a metodologia empregada na extração dos PST e classe das algas marinhas (RODRIGUES *et*

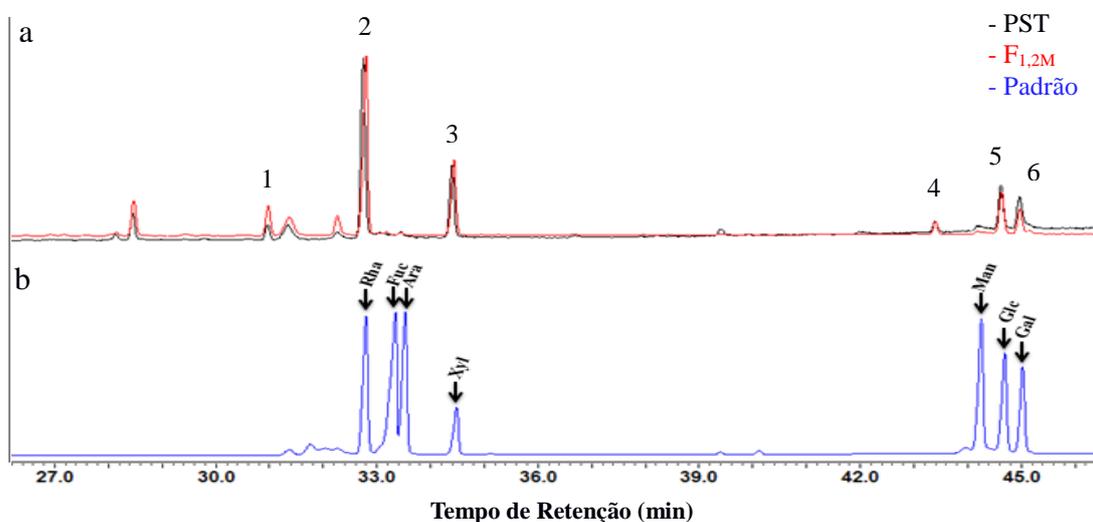
al., 2011). Em carragenanas de algas vermelhas o teor de sulfato varia de 15,0% - 40,0% e em fucanas de algas pardas varia de 4,0% - 8,0%, dependendo do local e época de coleta das algas (CUNHA; GRENHA, 2016). E em ulvanos de algas verdes esses valores encontram-se entre 16,0% - 23,2% (WANG *et al.*, 2014), menores do que o encontrado nesse trabalho.

Os grupos urônicos apresentam uma carga negativa, isso os tornam capazes de gerar metacromasia em reação com o ADM e migrar no campo eletroforético (RIBEIRO, 2012), desse modo se torna importante determiná-lo para evitar uma falsa conclusão quanto a sulfatação da molécula e comprovar a presença de monômeros de açúcares ácidos nos polissacarídeos sulfatados. O baixo teor de ácidos urônicos na fração F_{1,2M} indica a forte presença de grupos sulfatos na molécula, onde esses foram responsáveis por uma elevada metacromasia nessa fração observada durante a cromatografia e alta densidade na eletroforese

5.6 Composição monossacarídica

A análise comparativa em CG-EM do PST e da fração F_{1,2M}, não apresentou diferença no espectro do tempo de retenção das unidades monossacarídicas (Figura 14), ou seja, o PST e a fração purificada são homogêneos, não fracionados, formados pelos mesmos componentes e possuem a mesma estrutura geral, fato que pode ser reforçado pela análise do perfil eletroforético. As frações obtidas nas cromatografias, possivelmente são fragmentos da molécula formados por uma eventual quebra dos polissacarídeos durante sua extração.

Figura 14- Espectro do tempo de retenção das unidades monossacarídicas determinadas em CG-EM a partir dos acetatos de alditóis formados após hidrólise ácida. (a) Espectro do PST e F_{1,2M}. (b) Espectro da referência.



Legenda: Rha-ramnose; Fuc-fucose; Ara-arabnose; Xyl-xilose; Man- manose; Glc-glicose; Gal-galactose.

A composição de monossacarídeos dos polissacarídeos sulfatados purificados (F_{1,2M}) foi determinada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). A análise dos acetatos de alditóis formados após hidrólise ácida produziu (em % p/p): ramnose (41,49%), xilose (17,35%), glicose (9,51%) e galactose (5,50%), 3-metil-ácido hexaurônico (6,91%) e 3-metil-hexose (2,81%) como apresentado na tabela 4, e seus espectros de massas estão apresentados na figura 14.

Tabela 4- Tempo de retenção e proporções dos monossacarídeos obtidos a partir da hidrólise ácida e acetilação dos polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp.

Número do Pico	Tempo de Retenção (t _R - min)	Proporção (% do total)	Monossacarídeos
1	30.97	6,91	3-Metil- Ácido hexaurônico
2	32.80	41,49	Ramnose
3	34.44	17,35	Xilose
4	43.40	2,81	3-metil-hexose
5	44.63	9,51	Glicose
6	44.97	5,50	Galactose

Zhang *et al.* (2013) também encontrou ramnose e xilose como sendo os principais açúcares constituintes em suas amostras, quando extraiu os PST de macroalga marinha verde *Enteromorpha linza* utilizando dois métodos, aquoso e alcalino. O PST obtido por extração aquosa foi composto por ramnose, xilose, manose, glicose e galactose em uma razão molar de 3,4: 1: 0,35: 0,29: 0,15, respectivamente, e na extração alcalina em uma razão molar de 2,4: 1: 0,23: 0,21: 0,18, respectivamente.

A CG realizada por Jiao *et al.* (2009) mostrou que os polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga marinha verde *Enteromorpha intestinalis* eram compostos por ramnose, xilose, galactose e glicose em uma razão molar de 5,36: 1,00: 0,57: 0,64, porém nenhum ácido urônico foi estimado pelo CG, mas encontrado no método colorimétrico, daí a importância de realizar técnicas analíticas em conjunto para melhor análise da estrutura.

Shi *et al.* (2016) determinou a composição monossacarídica de polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha verde *Enteromorpha prolifera* antes e após degradação com peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico e analisou em CG-EM, os acetatos de alditóis que produziram (% p/p): ramnose (67,8%), glicose (18,6%), xilose (7,7%), galactose (4,0%),

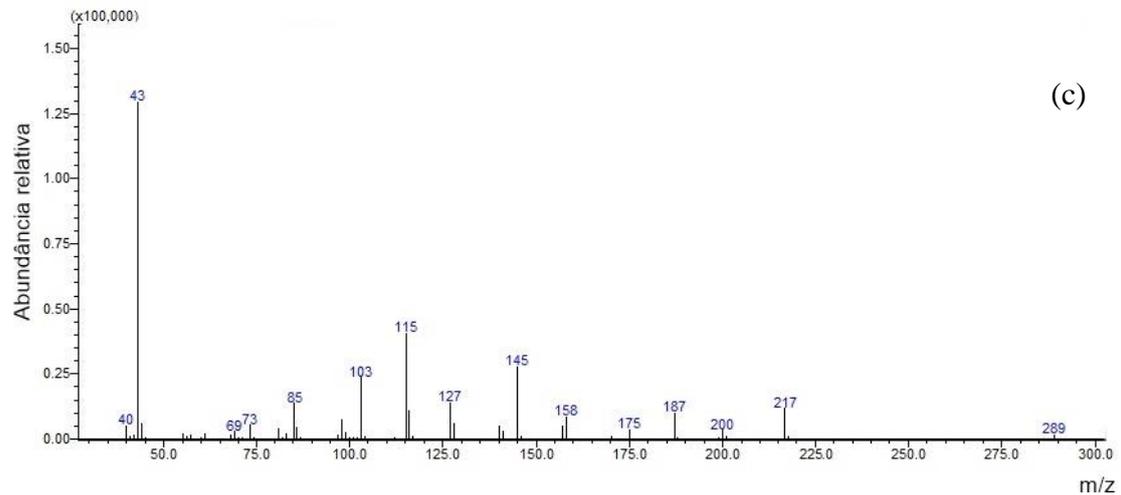
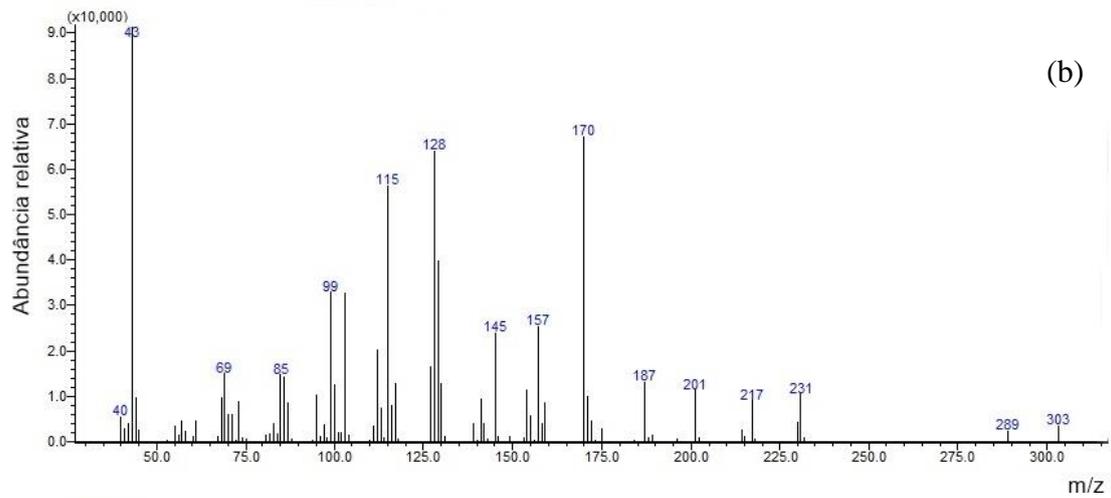
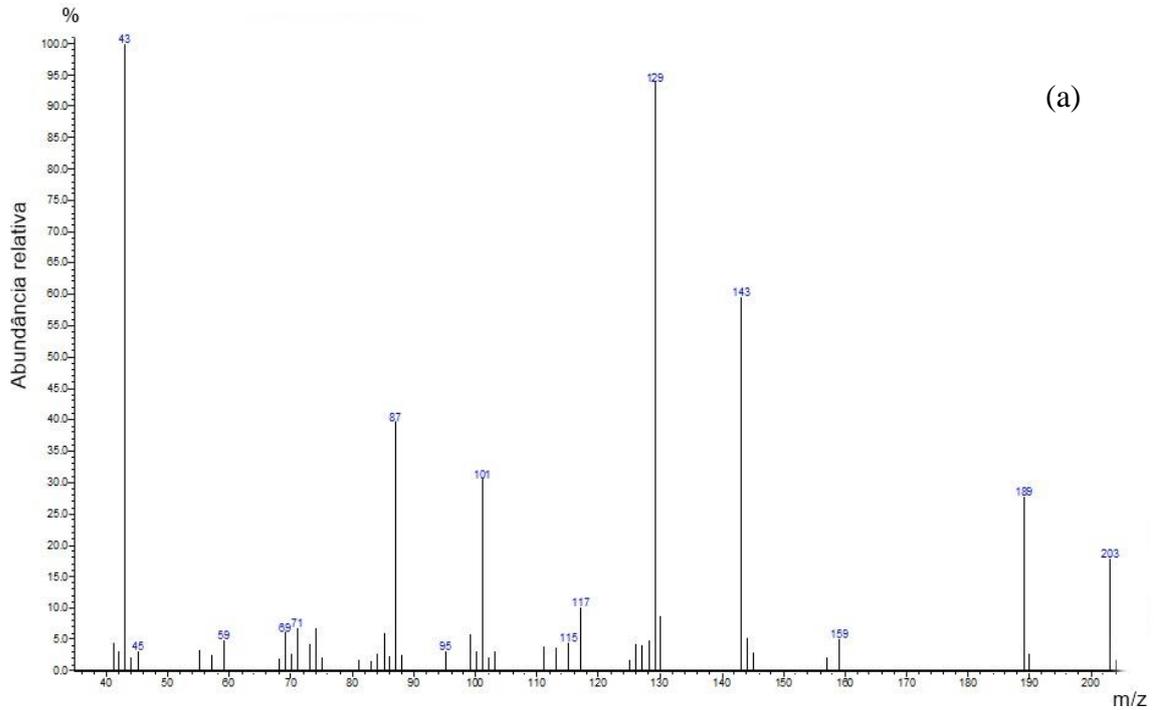
manose (1,4%) e quando submetido a degradação e analisados em CG-EM mudou em proporção sua composição para ramnose (56,9%), glicose (31,8%), xilose (6,4%), galactose (2,5%) e manose (2,5%).

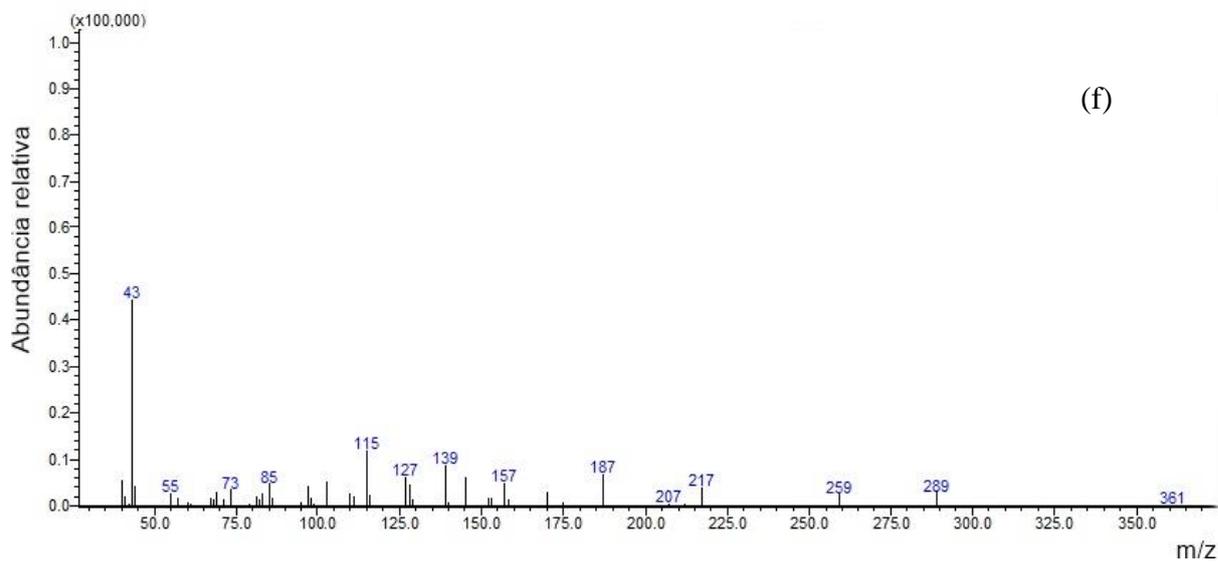
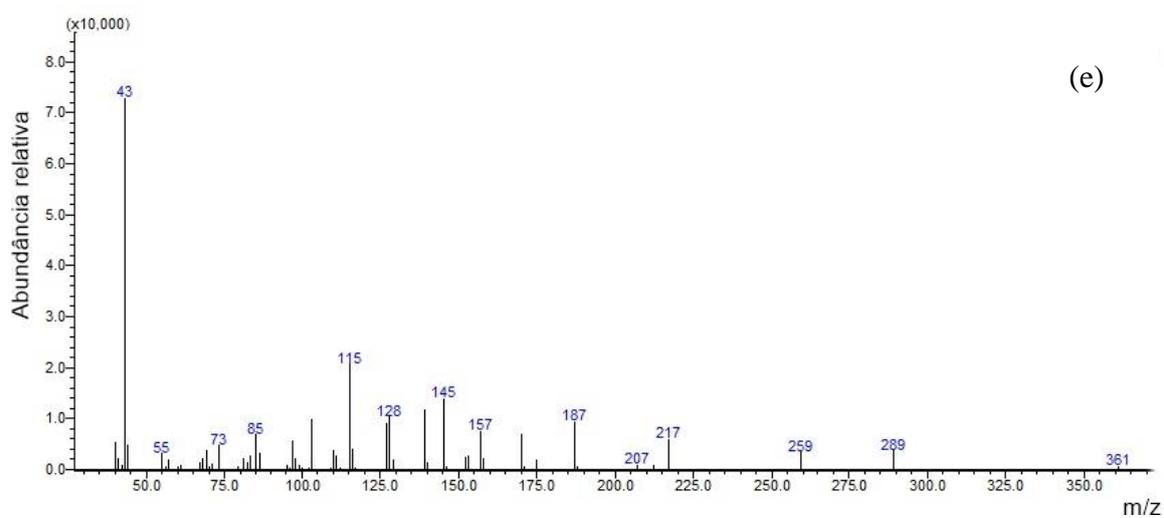
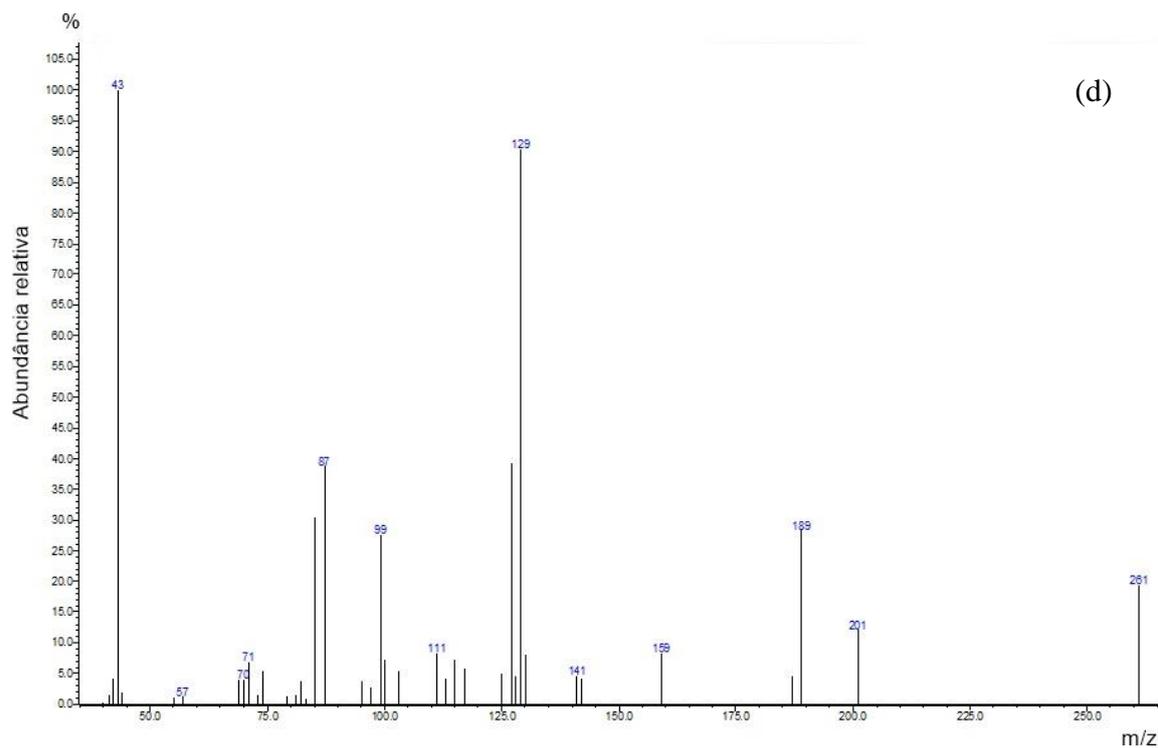
Outras técnicas como CLAE de fase reversa são utilizadas para determinar as unidades monoméricas de polissacarídeos sulfatados. Qi *et al.* (2012) determinou a composição monossacarídica da macroalga marinha verde *Enteromorpha clathrata* e obteve como componentes arabinose (80,5%), ramnose (10,7%), galactose (4,8%) e ácido glucurônico (4,0%).

Os polissacarídeos sulfatados das algas verdes possuem uma grande diversidade de monômeros de açúcares em sua estrutura, podendo apresentar unidades de ramnose, xilose, glicose, arabinose, galactose, manose e ácidos hexaurônicos, o caracterizando como heteropolissacarídeos, variando em proporção de acordo com a espécie e metodologia de extração.

A análise comparativa em CG-EM do PST e da fração F_{1,2M}, não apresentou diferença no espectro do tempo de retenção das unidades monossacarídicas (Figura 15), ou seja, o PST e a fração purificada são homogêneos, não fracionados, formados pelos mesmos componentes e possuem a mesma estrutura geral, fato que pode ser reforçado pela análise do perfil eletroforético. As frações obtidas nas cromatografias, possivelmente são fragmentos da molécula formados por uma eventual quebra dos polissacarídeos durante sua extração.

Figura 15- Espectros de massas das unidades monossacarídicas que formam os polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp. (a) 3-Metil-Ácido hexaurônico; (b) Ramnose; (c) Xilose; (d) 3-metil-hexose; (e) Glicose; (f) Galactose.



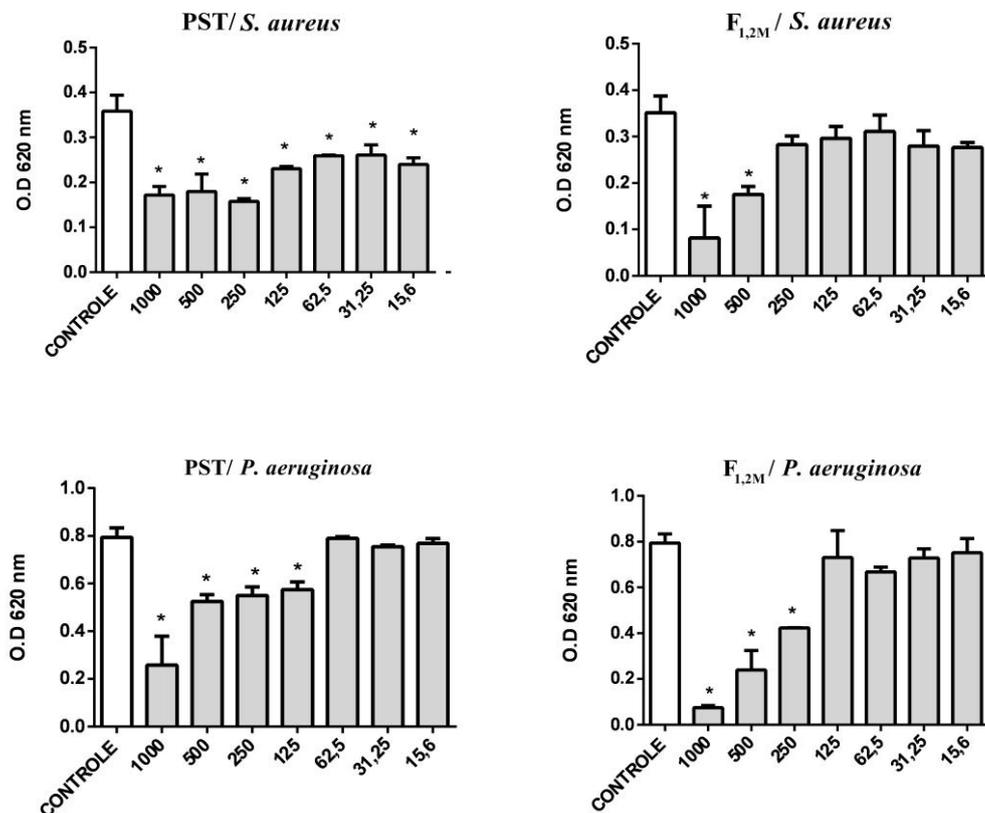


5.7 Atividade antibiofilme

A razão da escolha de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* deve-se ao fato destes micro-organismos apresentarem uma grande capacidade para formação de biofilme, serem espécies responsáveis por altos índices de infecções adquiridas em hospitais e estarem associadas a altas taxas de mortalidade (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; SAGINUR; SUTH, 2008).

As células planctônicas dessas bactérias foram cultivadas em meio CTS e tratadas com concentrações de 1.000 a 15,6 $\mu\text{g/mL}$ de PST e $F_{1,2M}$. Observou-se uma diminuição do crescimento em todas as concentrações de PST e em duas concentrações mais elevadas de $F_{1,2M}$ para *S. aureus*, com uma redução de mais de 50% de seu crescimento na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Para *P. aeruginosa* somente as elevadas concentrações das amostras foram capazes de diminuir o seu crescimento, a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de $F_{1,2M}$ o diminuiu quase que por completo, sendo esta concentração a mais eficiente contra o crescimento planctônico dessa bactéria (Figura 16).

Figura 16- Efeito do PST e de $F_{1,2M}$ extraídos da macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp., cultivada em laboratório, sobre o crescimento planctônico de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. * $p < 0,05$ com relação ao controle.



Em relação a formação do biofilme os resultados mostraram redução estatisticamente significativa para todas as concentrações testadas em ambas as bactérias (Figura 17). Todas as concentrações de PST diminuem abruptamente a formação de biofilme de *P. aeruginosa*, resultados semelhantes foram observados em concentrações da fração F_{1,2M}. Por outro lado as concentrações das amostras de PST testadas, mostraram um baixo efeito sobre o número de células viáveis. Somente a fração F_{1,2M} mostrou-se relativamente eficiente, na redução do número de células viáveis de *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Figura 18).

Outras substâncias de algas marinhas, como as lectinas, apresentam efeitos semelhantes. A lectina extraída da macroalga vermelha *Bryothamnion seaforthii* é capaz de diminuir a formação de biofilme de *S. aureus* em concentrações que varia de 31,25 a 250 µg/mL, já a lectina extraída da macroalga vermelha *Hypnea musciformis* diminui significativamente a formação de biofilme de *P. aeruginosa* na concentração de 250 µg/mL. Quanto ao número de células viáveis, as lectinas de ambas as algas apresentam uma pequena redução nas células de *S. aureus*, porém não inibem as de *P. aeruginosa*. (VASCONCELOS, 2013).

Figura 17- Efeito do PST e de F_{1,2M} extraídos da macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp., cultivada em laboratório, sob a formação do biofilme de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. * $p < 0,05$ com relação ao controle.

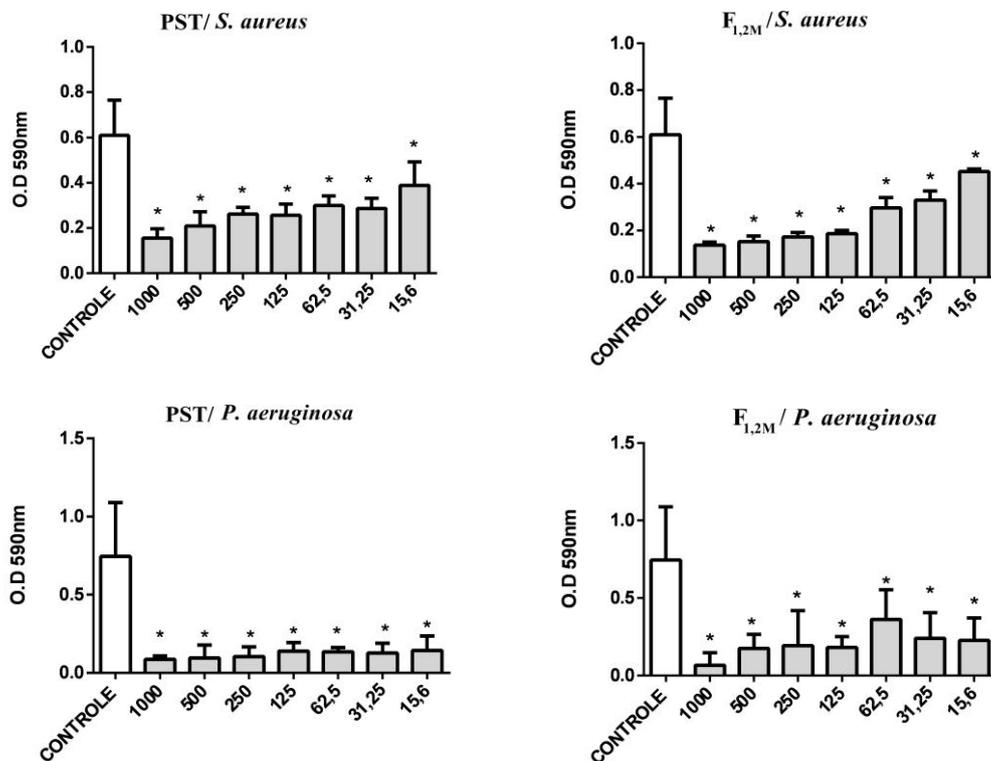
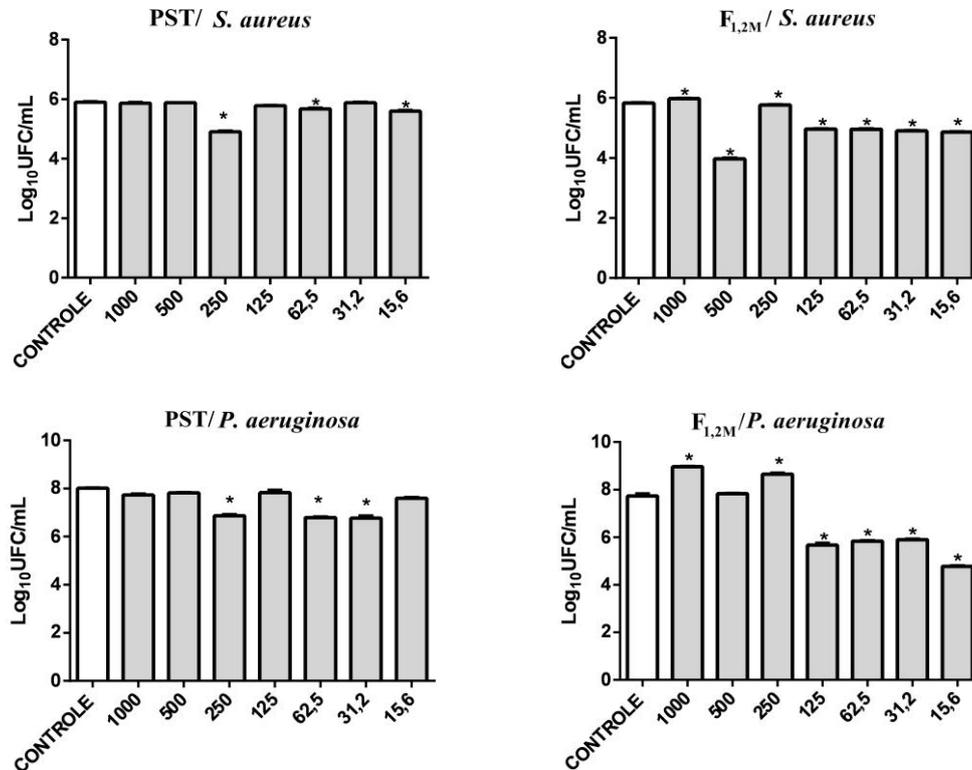


Figura 18- Efeito do PST e de F_{1,2M} extraídos da macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp., cultivada em laboratório, sob o número de células viáveis do biofilme de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. * $p < 0,05$ com relação ao controle.



A primeira etapa de formação de biofilmes consiste na adesão bacteriana em superfície biótica ou abiótica. Alguns polissacarídeos sulfatados de algas verdes diminuem em até 90% o processo de adesão. Gadenne *et al.* (2013) imobilizou covalentemente polissacarídeos sulfatados, extraídos da macroalga marinha verde *Ulva rotundata* e *Ulva compressa*, em superfície de titânio e observou que essas moléculas imobilizadas diminuiu cerca de 90% a adesão de *Pseudomonas aeruginosa* na superfície, inibiu o espalhamento bacteriano, mas não a interação célula-célula.

Os biofilmes aumentam a capacidade bacteriana em resistir a tratamentos antimicrobianos. De acordo com Mulcahy, Charron-Mazenod e Lewenza (2008) os biofilmes de *P. aeruginosa* conferem uma resistência de ordem de até mil vezes mais tolerantes aos antibióticos do que em sua forma planctônica e uma das saídas para eliminar essas bactérias seria diminuir ou destruir o biofilme, para que essas se tornassem mais expostas ao tratamento.

6 CONCLUSÃO

É possível cultivar a macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp., em laboratório, a partir dos seus esporos, utilizando meio Guillard f/2. A produção da macroalga partindo do laboratório se torna uma ferramenta importante para obter informações sobre o comportamento dessa espécie frente as condições de cultivo, e avaliar sua viabilidade de ampliação para produzir biomassa em escala maior.

A macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp. produz quantidades significativas de polissacarídeos sulfatados que foram eficientemente extraídos por digestão enzimática.

Através de métodos colorimétricos, eletroforéticos e cromatográficos, aliados a espectrometrias de massas foi possível fracionar e purificar os polissacarídeos sulfatados e concluir que sua molécula é de alto peso molecular, altamente sulfatada e constituída majoritariamente por unidades de ramnose e xilose.

Os polissacarídeos sulfatados da macroalga marinha verde *Enteromorpha* sp. diminuem o crescimento planctônico das bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* porém não é capaz de inibi-lo completamente. Por outro lado, essas moléculas diminuem abruptamente a formação de biofilme bacteriano, nesse sentido utilizar os polissacarídeos sulfatados extraídos, combinados a antimicrobianos, seria uma estratégia terapêutica eficiente no combate a essas bactérias.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A.; IBRAHEEM I. B. M. Agricultural importance of algae. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 54, p. 11648- 11658, 2012.
- ALGAEBASE. [Homepage]. 2016. Disponível em: <www.algaebase.org>. Acesso em: 10 set. 2016.
- AMORIM, R. D. N. D. S.; RODRIGUES, J. A. G.; HOLANDA, M. L.; QUINDERÉ, A. L. G.; PAULA, R. C. M. D.; MELO, V. M. M.; BENEVIDES, N. M. B. Antimicrobial effect of a crude sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria ornata*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 2, p. 171-181, 2012.
- ANDRADE, L.R.; LEALA, R. N.; NOSEDAC, M.; DUARTEC, M. E. R.; PEREIRAD, M. S.; MOURÃO, P. A. S.; MARCOS, F.; FILHO, G. M. A. Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 9, p. 1482-1488, 2010.
- AQUINO, R. S.; LANDEIRA-FERNANDEZ. A. M.; VALENTE, A. P.; ANDRADE, L. R.; MOURÃO, P. A. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms. evolutionary implications. **Glycobiology**, v. 15, n. 1, p. 11-20, 2005.
- ARAÚJO, I. W. F.; RODRIGUES, J. A. G.; QUINDERÉ, A. L. G.; SILVA, J. F. T.; MACIEL, G. F.; RIBEIRO, N. A.; SOUSA, O. V. E.; RIBEIRO, K. A.; CHAVES, H. V.; PEREIRA, K. M. A.; BEZERRA, M. M.; BENEVIDES, N. M. B. Analgesic and anti-inflammatory actions on bradykinin route of a polysulfated fraction from alga *Ulva lactuca*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 820-830, 2016.
- BARROS, G. L. G. P.; DAVIM, M. A. A. C.; MARINHO-SORIANO, E. Cultivo in vitro da macroalga *Gracilaria birdiae* (Rhodophyta, Gracilariales), comparação do crescimento de diferentes estádios reprodutivos. **Anais/ resumos 62ª Reunião Anual da SBPC**, 2010.
- BEZERRA, A. F. **Estudo experimental para maricultura de *Gracilaria birdiae* (Rhodophyta) no litoral do Rio Grande do Norte**. 2008. 75f . Dissertação (Mestre em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - PRODEMA. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.
- BEZERRA-NETO, J. T. B.; RODRIGUES, J. A. G.; PONTES, G. C.; FARIAS, W. R. L. Polissacarídeos sulfatados da alga *Caulerpa sertularioides* (GMEL.) HOWE: análise de metodologias de precipitação. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 3, n. 2, p. 50-62, 2008.
- BLEAN-FICKO, E.; HERVÉ, C.; MICHEL, G. Sweet and sour sugars from the sea: the biosynthesis and remodeling of sulfated cell wall polysaccharides from the macroalgae. **Perspective in Phycology**, v. 2, p. 51-54, 2015.
- BLOMSTER, J.; BACK, S.; FEWER, D. P.; KIIRIKKI, M.; LEHVO, A.; MAGGS, C. A.; STANHOPE, M. J. Novel morphology in *Enteromorpha* (Ulvophyceae) forming green tides. **American Journal of Botany**, v. 89, n.11, p. 1756-1763, 2002.

BOCANEGRA, A.; BASTIDA, S.; BENEDÍ, J.; RODENAS, S.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 12, n. 2, p. 236-258, 2009.

BUENO, C. Z.; VEIGA, I. G.; SACCHETIN, P. S. C.; BELLINI, M. Z.; MORAES, A. M. Aplicação de polissacarídeos para a produção de curativos e outros biomateriais. SOUSA, H. C.; BRAGA, M. E. M.; SOSNIK, A. (Eds). **Biomateriais aplicados ao desenvolvimento de sistemas terapêuticos avançados**. Coimbra, Imprensa da Universidade de Coimbra, p. 67-110, 2015.

BRITO, T. V.; PRUDÊNCIO, R. S.; SALES, A. B.; MEDEIROS, J. V. R.; BARBOSA, A. L. R. avaliação do potencial antiinflamatório de um polissacarídeo (pls) extraído da alga vermelha *Hynea musciformis*, mediante análise do edema de pata induzido por carragenina ou dextran e dosagem de mieloperoxidase (mpo). **Anais/ resumos 62ª Reunião Anual da SBPC**, 2010.

CASTRO, P., HUBER, M. E. **Biologia marinha**. 8. ed. Porto Alegre: AMGH Ed. p. 107-109, 2012.

CAVALIER-SMITH, T. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa . **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52 p. 297-354, 2002.

CALLOW, J. A.; OSBORNE, M. P.; CALLOW, M. E. BAKER, F.; DONALD, A. M. Use of environmental scanning electron microscopy to image the spore adhesive of the marine alga *Enteromorpha* in its natural hydrated state. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 27, p. 315-321, 2003.

CHEN, G.; YUAN, Q.; SAEEDUDDINA, M.; OU, S.; ZENG, X.; YEA, H. Recent advances in tea polysaccharides: Extraction, purification, physicochemical characterization and bioactivities. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 663-678, 2016.

COIMBRA, C. S. **Interferências filogenéticas na ordem Fucales (Phaeophyceae), com ênfase no gênero *Sargassum* C. Agardh do Atlântico Sul**. 2006. 75 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CORONA-HERNANDEZ, R. I.; PARRILLA, E. A.; LIZARDIMENDOZA, J.; ISLAS-RUBIO, A. R.; ROSA, L. A.; WALL-MEDRANO, A. Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, p. 614-628, 2013.

COSTA, L. S. **Bioprospecção de polissacarídeos sulfatados de macroalgas marinhas do litoral do Rio Grande do Norte: Caracterização de uma heterofucana extraída da alga marron *Sargassum filipendula* que induz apoptose em células HeLa**. 2012. 140 f. Tese (Doutorado em química)- Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

COSTA, D. S.; ARAÚJO, T. S.; SOUSA, N. A.; SOUZA, L. K.; PACÍFICO, D. M.; SOUSA, F. B. M.; MEDEIROS, J. V. R. Sulphated polysaccharide isolated from the seaweed

Gracilaria caudata exerts an antidiarrhoeal effect in rodents. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 118, n. 6, p. 440-448, 2016.

CUNHA, L.; GRENHA, A. Sulfated seaweed polysaccharides as multifunctional materials in drug delivery applications. **Marine Drugs**, v. 14, p. 1-42, 2016.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, v. 70, n. 02, p. 645-647, 1976.

DISCHE, Z. General color reactions. In: Whistler, R.L.; Wolfram, M.L. ed. **Carbohydrate chemistry**. Academic Press, New York, p. 475-514, 1962.

DODGSON, K.S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and nonenzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. **Biochemical Journal**, v. 78, p. 312-319, 1961.

DONG, S.; YANG, J.; ZHANG, X. Y.; SHI, M.; SONG, X. Y.; CHEN, X. L.; ZHANG, Y. Z. Cultivable alginate lyase-excreting bacteria associated with the arctic brown alga *Laminaria*. **Marine Drugs**, v. 10, p. 2481-2491, 2012.

DOMOZYCH, D. S.; CIANCIA, M.; FANGEL, J. U.; MIKKELSEN, M. D.; ULVSKOV, P.; WILLIAM, G. T. W. The cell walls of green algae: A journey through evolution and diversity. **Frontiers Plant Science**, v. 3, p. 1-7, 2012.

DORE, G. C. M.; ALVES, F. M. G.; SANTOS, N. D.; CRUZ, A. K.; CÂMARA, R. B.; CASTRO, A. J.; GUIMARÃES, A. L.; NADER, H. B.; LEITE, E. L. Antiangiogenic activity and direct antitumor effect from a sulfated polysaccharide isolated from seaweed. **Microvascular Research**, v. 88, p. 12-18, 2013.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 03, p. 350-356, 1956.

ERIKSSON, B. K.; JOHANSSON, G. Effects of sedimentation on macroalgae: species-specific responses are related to reproductive traits. **Oecologia**, v. 143, p. 438-448, 2005.

FARIAS, E. H. C.; POMIN, V. H.; VALENTE, A. P.; NADER, H. B.; ROCHA, H. A. O.; MOURAO, P. A. S. A preponderantly 4-sulfated, 3-linked galactan from the green alga *Codium isthmocladum*. **Glycobiology**, v. 18, n. 3, p. 250-259, 2008.

FARIAS, W. R. L. VALENTE, A. P.; PEREIRA, M. S.; MOURÃO, P. A. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red alga *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29299-29307, 2000.

FARIAS, W. R. L.; REBOUÇAS, H. J.; TORRES, V. M.; RODRIGUES, J. A. G.; PONTES, G. C.; SILVA, F. H. O. S.; SAMPAIO, A. H. Enhancement of growth in tilápia larvae (*Oreochromis niloticus*) by sulfated D-galactanas extracted from the red marine alga

Botryocladia occidentalis. **Revista Ciência Agronômica**, v. 35, p. 189-195, 2004.

FERREIRA, L. G. **Estrutura química e atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados obtidos de algas do complexo Laurencia (Ceramiales, Rhodophyta)**. 2011. 217 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Os alginatos e suas múltiplas aplicações. **Revista FIB**, n. 26, p. 34-38, 2013. Disponível em <<http://www.revista-fi.com/materias/340.pdf>> Acesso em: 01 de setembro de 2013.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Estabilizantes. **Revista FIB**, n. 14, p. 42-48, 2010. Disponível em <<http://www.revista-fi.com/materias/145.pdf>> Acesso em: 01 de setembro de 2013.

FRANCESCHINI, I. M.; BURLIGA, A. L.; REVIERS, B.; PRADO, J. F.; RÉZIG, S. H. **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Porto Alegre: Artmed, 2010, 331 p.

GADENNE, V.; LEBRUN, L.; JOUENNE, T.; THEBAULT, P. Antiadhesive activity of ulvan polysaccharides covalently immobilized onto titanium surface. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 112, p. 229-236, 2013.

GAMAL, A. A. E. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharm Journal**, v.18, n. 1, p.1-25, 2010.

GANESAN, K.; KUMAR, K.S.; RAO, P. V. S.; TSUKUI, Y.; BHASKAR, N.; HOSOKAWA, M.; MIYASHITA, K. Studies on chemical composition of three species of *Enteromorpha*. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 4, p. 365-369, 2014.

GARCIA-VAQUERO, M.; RAJAURIA, G.; O'DOHERTY, J. V.; SWEENEY, T. Polysaccharides from macroalgae: Recent advances, innovative technologies and challenges in extraction and purification. **Food Research International**, p. 10, 2016.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Culture of Marine Invertebrates Animals (Smith, W. L. e Chanley, M.H., eds.) Plenum Publishing, New York, p. 29-60, 1975.

GUIRY, M. D., 2014. The Seaweed Site: Information on Marine Algae. **Seaweed.ie**.

GUIRY, M. D. 2016. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <<http://www.algaebase.org>> Acesso em: 26 de setembro de 2016.

HAYDEN, H. S.; BLOMSTER, J.; MAGGS, C. A.; SILVA, P. C.; STANHOPE, M. J.; WAALAND, J. R. Linnaeus was right all along: *Ulva* and *Enteromorpha* are not distinct genera. **European Journal of Phycology**, v. 38, p. 277-294, 2003.

HAYES, R.; AHMED, A.; EDGE, T.; ZHANG, H. Coreshell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1357, p. 36-52, 2014.

- HERNÁNDEZ-GARIBAY, E.; ZERTUCHE-GONZÁLEZ, J.A.; PACHECO-RUÍZ, I. Isolation and chemical characterization of algal polysaccharides from the green seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 537-542. 2011.
- JIAO, L.; XIA, L.; LI, T.; PENG, J.; ZHANG, L.; WU, M.; ZHANG, L. Characterization and anti-tumor activity of alkali-extracted polysaccharide from *Enteromorpha intestinalis*. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 324-329, 2009.
- JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H.S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine Drugs**, v.9, p.196-223, 2011.
- JOHN, R. P.; ANISHA, G. S.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 102, n.1, p. 186-193, Jan. 2011.
- JÚNIOR, S. Q.; CARNEIRO, V. H. A.; FONTENELLE, T. P. C.; CHAVES, L. S.; MESQUITA, J. X.; BRITO, T. V.; PRUDÊNCIO, R.; OLIVEIRA, J. S.; MEDEIROS, J. V. R.; ARAGÃO, K. S.; RIBEIRO, R. A.; BARBOSA, A. L. R.; FREITAS, A. L. P. Antioxidant and anti-inflammatory activities of methanol extract and its fractions from the brown seaweed *Spatoglossum schroederi*. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, p. 2367-2376, 2014.
- KARNJANAPRATUM, S.; YOU, S.; Molecular characteristics of sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their in vitro anticancer and immunomodulatory activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, p. 311-318, 2011.
- KILINÇ, B.; CIRIK, S.; TURAN, G.; TEKOGUL, H.; KORU, E. Seaweeds for Food and Industrial Applications. **Intech Open Access Publisher**, 2013.
- KIM, J. K.; CHO, M. L.; KARNJANAPRATUM, S.; SHIN, I. S.; YOU, S. G. In vitro and in vivo immunomodulatory activity of sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*. **International journal of biological macromolecules**, v. 49, p. 1051-1058. 2011.
- KOMATSU, T.; KIDO, N.; SUGIYAMA, T.; YOKOCHI, T. Antiviral activity of acidic polysaccharides from *Coccomyxa gloeobotrydiformis*, a green alga, against an in vitro human influenza A virus infection. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v, 35, p. 1-7, 2013.
- LEE, R. E. **Phycology**. 4. ed. New York, NY: Cambridge University Press, 2008. 547 p.
- LACERDA, G. L. **Biofilmes microbianos e resistência a antibióticos**. 2013. 49 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em farmácia)- Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, RJ, 2013.
- LI, B.; LIU, S.; XING, R.; LI, K.; LI, R.; QIN, Y.; WANG, X.; WEI, Z.; LI, P. Degradation of sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* and their antioxidant activities. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1991-1996. 2013.
- LI, N.; LIU, X.; HE, X.; WANG, S.; CAO, S.; XIA, Z.; XIAN, H.; QIN, L.; MAO, W. Structure and anticoagulant property of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Monostroma angicava*. **Carbohydrate Polymers**, v. 159, p. 195-206, 2016.
- LISTER, P. D.; WOLTER, D. J.; HANSON, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas*

aeruginosa: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clinical Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 582-610, 2009.

LORDAN, S.; ROSS, R. P.; STANTON, C. Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. **Marine Drugs**, v. 9, n. 6, p. 1056-1100, 2011.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006, 588 p.

LU, J.; LIU, Z.; ZHANG, Y.; LI, B.; LU, Q.; MA, Y.; SHEN, R.; ZHU, Z. Improved production and quality of biocrude oil from low-lipid high-ash macroalgae *Enteromorpha prolifera* via addition of crude glycerol. **Journal of Cleaner Production**, 2016.

MAGALHÃES, K. D.; COSTA L, S.; FIDELIS, G. P.; OLIVEIRA, R. M.; NOBRE, L. T.; DANTAS, S. N.; CAMARA, R. B.; ALBUQUERQUE, I. R.; CORDEIRO, S. L.; COSTA, M. S.; ALVES, L. G.; ROCHA, H. A. Anticoagulant, antioxidant and antitumor activities of heterofucans from the seaweed *Dictyopteris delicatula*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 5, p. 3352-3365, 2011.

MARCIEL, J. STADNIK, M. J.; FREITAS, M. B. Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 2, p. 111-118, 2014.

MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K. V. **Five Kingdoms. An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth**. 3. Ed. New York, NY: W.H. Freeman e Company, 1998. 448p.

MARTINS, I.; MARQUES, J. C. A Model for the growth of opportunistic macroalgae (*Enteromorpha* sp.) in Tidal estuaries. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 55, p. 247-257, 2002.

MARTINS, IRENE.; LOPES, R. J.; LILLEBO, A. I.; NETO, J. M., PARDAL, M. A.; FERREIRA, J. G.; MARQUES, J. C. Significant variations in the productivity of green macroalgae in a mesotidal estuary: Implications to the nutrient loading of the system and the adjacent coastal area. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, p. 678-690, 2007.

MCHUGH, D. J. A guide to seaweed industry. FAO Fisheries technical paper n°441. Rome, 105p. 2003.

MOURÃO, P. A.; Perspective on the use of sulfated polysaccharides from marine organisms as a source of new antithrombotic drugs. **Marine Drugs**, v. 13, p. 2770-2784, 2015.

MEDEIROS, V. P.; QUEIROZ, K. C.; CARDOSO, M. L.; MONTEIRO, G. R.; OLIVEIRA, F. W.; CHAVANTE S. F.; GUIMARÃES, L. A.; ROCHA, H. A.; LEITE, E. L. Sulfated galactofucan from *Lobophora variegata*: anticoagulant and anti-inflammatory properties. **Biochemistry**, v. 3, n. 9, p. 1018-1024, 2008.

MELO, K. R. T.; LIMA, J. A.; GOMES, D. L.; SANTOS, N. D.; CAMARA, R. B. G.; OLIVEIRA, H. A. O. Caracterização e atividade anticoagulante de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marrom *Dictyopteris justii*. **Holos**, v. 1, p. 29-40, 2012.

MULCAHY, H.; CHARRON-MAZENOD, L.; LEWENZA, S. Extracellular DNA chelates

cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 11, 2008. < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000213>> Acesso em 10 de Janeiro de 2017.

NELSON, D.L; COX, M. M. Lehninger's Principles of Biochemistry. New York, NY, USA. Freeman and Company. 2011.

O'SULLIVAN, L.; MURPHY, B.; McLOUGHLIN, P.; DUGGAN, P.; LAWLOR, P. G.; HUGHES, H.; GARDINER, G. E. Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. **Marine Drugs**, v.8, n. 7, p. 2038-2064, 2010.

PROVASOLI, L.; PINTNER, I. J. Bacteria induced polymorphisms in an axenic laboratory strain of *Ulva lactuca* (Chlorophyceae). **Journal Phycology**, v. 16, p. 196-201, 1980.

POMIN, V. H.; VALENTE, A. P.; PEREIRA, M.S; MOURÃO, P. A. Mild acid hydrolysis of sulfated fucans: A selective 2-desulfation reaction and an alternative approach for preparing tailored sulfated oligosaccharides. **Glycobiology**, v. 15, p. 1376-1385, 2005.

PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B.; MELO, M. R. S.; VALENTE, A. P.; MELO, F. R.; MOURÃO, P. A. S. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga *Gelidium crinale*. Is there specific structural requirement for the anticoagulant action?. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 2015-2023, 2005.

PÉREZ, M. J.; FALQUÉ, E.; DOMÍNGUEZ, H. Antimicrobial action of compounds from Marine Seaweed. **Marine Drugs**, v. 14, n. 3, p. 2-38, 2016.

QI, H.; HUANG, L.; LIU, X.; LIU, D.; ZHANG, Q.; LIU, S. Antihyperlipidemic activity of high sulfate content derivative of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1637-1640, 2012.

QI, X.; MAO, W.; GAO, Y.; CHEN, Y.; CHEN, Y.; ZHAO, C.; LI, N.; WANG, C.; YAN, M.; LIN, C.; SHA, J. Chemical characteristic of an anticoagulant-active sulfated polysaccharide from *Enteromorpha clathrata*. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 1804 - 1810, 2012.

QUINDERÉ, A. L.; FONTES, B. P.; VANDERLEI, E. S.; QUEIROZ, I. N.; RODRIGUES, J. A.; ARAÚJO, I. W.; JORGE, R. J.; MENEZES, D. B.; SILVA, A. A.; CHAVES, H. V.; EVANGELISTA, J. S.; BEZERRA, M. M.; BENEVIDES, N. M. Peripheral antinociception and anti-edematogenic effect of a sulfated polysaccharide from *Acanthophora muscoides*. **Pharmacological Reports**, v.65, p. 600-613, 2013.

RAPOSO, M. F. J.; MORAIS, A. M. B.; MORAIS, R. M. S. M. Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. **Marine drugs**, v. 13, p. 2967-3028, 2015.

RAVEN, P. H.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 8. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2014.

RIBEIRO, G. A. M.; **Propriedades funcionais do ulvano e seus derivados**. 2012. 78f. Tese (Mestre em Microbiologia Aplicada). Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Portugal, 2012.

RIBEIRO, N. A. **Efeitos de uma fração polissacarídica sulfatada da alga marinha verde *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh na nocicepção e inflamação.** 2012. 105 f. Dissertação (Mestre em Bioquímica). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

RIBEIRO, N. A.; ABREU, T. M.; CHAVES, H. V.; BEZERRA, M. M.; MONTEIRO, H. S. A.; JORGE, R. J. B.; BENEVIDES, N. M. B. Sulfated polysaccharides isolated from the green seaweed *Caulerpa racemosa* plays antinociceptive and anti-inflammatory activities in a way dependent on HO-1 pathway activation. **Inflammation Research (Printed ed.)**, v. 63, p. 569-580, 2014.

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer International**, v. 57, p. 397-430, 2008.

RIOUX, L. E.; TURGEON, S. L.; BEAULIEU, M. Effect of season on the composition of bioactive polysaccharides from the brown seaweed *Saccharina longicuris*. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1069-1075, 2009.

ROBIC, A.; SASSI, J. F.; LAHAYE, M. Impact of stabilization treatments of the green seaweed *Ulva rotundata* (Chlorophyta) on the extraction yield, the physico-chemical and rheological properties of ulvan. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 344-352. 2008.

ROCHA, H. A.; MORAES, F. A.; TRINDADE, E. S.; FRANCO, C. R.; TORQUATO, R. J.; VEIGA, S. S.; VALENTE, A. P.; MOURÃO, P. A.; LEITE, E. L.; NADER, H. B.; DIETRICH C. P. Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schroederi*. An ideal antithrombotic agent? **Journal of Biological Chemistry**, v. 16, p. 1278-1288, 2005.

RODRIGUES, S.; COSTA, A. M. R.; GRENHA, A. Chitosan/carrageenan nanoparticles: Effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 1, p. 282-289, 2012.

RODRIGUES, J. A. G.; COURA, C. O.; BENEVIDES, N. M. B. Extração e caracterização físico-química dos polissacarídeos sulfatados da rodofíceia *Gracilaria cornea* J. Agardh e avaliação de seus efeitos sobre coagulação in vitro. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**, v. 4, n. 2, p. 91-100, 2016.

RODRIGUES, J. A. G.; OLIVEIRA, V. E. D. S.; BESSA, E. F.; MAGALHÃES, F. D. A.; MONTEIRO DE PAULA, R. C.; LIMA, V.; BENEVIDES, B. N. M. Anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Caulerpa cupressoides*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.54, p. 691-700, 2011.

RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI ES, S. L. M.; ARAÚJO, I. W.; QUEIROZ, I. N.; PAULA, G. A.; ABREU, T. M.; RIBEIRO, N. A.; BEZERRA, M. M.; CHAVES, H. V.; LIMA, V.; JORGE, R. J.; MONTEIRO, H. S.; LEITE, E. L.; BENEVIDES, N. M. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Caulerpa cupressoides*. **Pharmacol Reports**, v. 64, n. 2, p. 282- 92, 2012.

RODRIGUES, J. G.; VANDERLEI, E. S. O.; QUINDERÉ, A. L.; BENEVIDES, N. M. B. Polissacarídeos sulfatados isolados das clorofíceas *Caulerpa racemosa* e *Caulerpa*

cupressoides – extração, fracionamento e atividade anticoagulante. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 32, n. 2, p. 113-120, 2010.

ROMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **Journal of Internal Medicine**, v. 272, n. 6, p. 551-561, 2012.

ROPELATTO, J. **Estrutura química e atividade antitumoral de heteroramnanas sulfatadas e seus produtos de degradação parcial obtidos da macroalga verde *Gayralia oxysperma***. 2011. 133 f. Dissertação (Mestre em Ciências- Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

SAGINUR, R.; SUTH, K. N. *Staphylococcus aureus* bacteraemia of unknown primary source: Were do stand. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. 1, p. 21-25, 2008.

SAHOO, D.; SAHU, N.; SAHOO, D. A critical survey of seaweed diversity of Chilika Lake, India. **Algae**, v. 18, n.1, p. 1-12, 2003.

SANTOS, C. H. A.; LOURENÇO, J. A.; WIEGAND, M. C.; PENAFORT, J. M.; IGARASHI, M. A. (2012) Aspectos do cultivo de algas marinhas com vistas a sustentabilidade da atividade. Educadores dia a dia. <<http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br>> Acesso em: 20 de setembro, 2016.

SANTOS, K. M. **Encapsulação de proteína em cápsulas de alginato, alginato-quitosana e estudos de estabilidade e liberação controlada em função do pH**. 2014. 25 f. Monografia (Bacharel em Química) - Centro de Ciências Naturais Humanas, Universidade Federal do ABC, 2014.

SASHIDHARA, K. V.; WHITE, K. N. A selective account of effective paradigms and significant outcomes in the discovery of inspirational marine natural products. v. 27, pg. 588-603, 2009

SHI, C.; PAN, T.; CAO, M.J.; LIU, Q. M.; ZHANG, L. J.; LIU, G. M.; Suppression of Th2 immune responses by the sulfated polysaccharide from *Porphyra haitanensis* in Tropomyosin-Sensitized Mice. **International Immunopharmacology**, v. 24, p. 211-218, 2015.

SHI, M. J.; WEI, X.; XU, JIE.; CHEN, B. J.; ZHAO, D. Y.; CUI, S.; ZHOU, T. Carboxymethylated degraded polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*: Preparation and in vitro antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 215, p. 76-83, 2016.

SHI, J.; CHENG, C.; ZHAO, H.; JING, J.; GONG, N.; LU, W. In vivo anti-radiation activities of the *Ulva pertusa* polysaccharides and polysaccharide-iron (III) complex. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 341-346, 2013.

SILVA, P. C. A review of nomenclatural conservation in the algae from the point of view of the type method. **University of California publications in botany.**, v. 25, p. 241- 324, 1952.

SILVA, T. M. A.; ALVES, L. G.; QUEIROZ, K. C. S.; SANTOS, M.G. L.; MARQUES, C. T.; CHAVANTE, S. F.; ROCHA, H. A. O.; LEITE, E. L. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 523-533, 2005.

- SIQUEIRA, R. C.; SILVA, M. S.; ALENCAR, D. B.; PIRES, A. F.; ALENCAR, N. M.; PEREIRA, M. G.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R.; ASSREUY, A. M. In vivo anti-inflammatory effect of a sulfated polysaccharide isolated from the marine brown algae *Lobophora variegata*. **Pharmaceutical biology**, v. 49, n. 2, p. 167-174, 2011.
- SOARES, R. J. B.; **Avaliação das possibilidades de tratamento de um efluente piscícola marinho por microalgas**. 2000. 152f. Dissertação (Mestrado em Hidrobiologia) – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto. 2000.
- SOUSA, A. I.; MARTINS, I.; LILLEBO, A. I.; FLINDT, M. R.; PARDAL, M. Influence of salinity, nutrients and light on the germination and growth of *Enteromorpha* sp. spores. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 341, p. 142-150, 2007.
- SOUSA, G. S.; COCENTINO, A. L. M. Macroalgas como indicadoras da qualidade ambiental da praia de piedade-Pe. **Tropical Oceanography, Recife**, v. 32, n. 1, p. 1-22, 2004.
- SOUSA, W. M.; SILVA, R. N. O.; BEZERRA, F. F.; BINGANA, R. D.; BARROS, F. C. N.; COSTA, L. E.; SOMBRA, V. G.; SOARES, P. M. G.; FEITOSA, J. P. A.; PAULA, R. C. M.; SOUZA, M. H. L. P.; BARBOSA, A. L. R.; FREITAS, A. L. P. Sulfated polysaccharide fraction from marine algae *Solieria filiformis*: Structural characterization, gastroprotective and antioxidant effects. **Carbohydrate Polymers**, v.152, p. 140-148, 2016.
- SOUZA, G. C. C. F. Algas marinhas, Dossiê Técnico. Instituto de Tecnologia do Paraná TECPAR. 27 p. 2011.
- SOUZA R. M. C.; MARQUES, C. T.; DORE, G. C.M.; SILVA, F. F. R.; ROCHA, O. H. A.; LEITE, E. L. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, n. 2, p. 153-160, 2007.
- STANLEY, M. S.; CALLOW, M. E.; CALLOW, J. A. Monoclonal antibodies to adhesive cell coat glycoproteins secreted by zoospores of the green alga *Enteromorpha*. **Planta**, v. 210, n. 1, p. 61-71, 1999.
- STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.
- SUGANYA, T.; KASIRAJAN, R.; RENGANATHAN, S. Ultrasound-enhanced rapid in situ transesterification of marine macroalgae *Enteromorpha compressa* for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 283-290. 2014.
- SURESH, V.; SENTHILKUMAR, N.; THANGAM, R.; RAJKUMAR, M.; ANBAZHAGAN, C.; RENGASAMY, R.; GUNASEKARAN, P.; KANNAN, S.; PALANI, P.; Separation, purification and preliminary characterization of sulfated polysaccharides from *Sargassum plagiophyllum* and its in vitro Anticancer and Antioxidant Activity. **Process Biochemistry**. v. 48, p. 364-373, 2013.
- TANNOURY, M. Y.; ELIA, J. M.; SAAB, A. M.; MAKHLOU, H. Y.; ABOUD, J. S.; DAOUCHABO, R. J.; DIAB-ASSAF, D. Evaluation of cytotoxic activity of *Sargassum*

vulgare from the Lebanese coast against jurkat cancer cell line. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, p. 108-112, 2016.

TENG, Z.; QIAN, L.; ZHOU, Y. Hypolipidemic activity of the polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 254-256, 2013.

THOMES, P.; RAJENDRAN, M.; PASANBAN, B.; RENGASAMY, R. Cardioprotective activity of *Cladosiphon okamuranus* against isoproterenol induced myocardial infraction in rats. **Phytomedicine**, v. 18, p. 52-57, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TONNESEN, H. H.; KARLSEN, J. Alginate in drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28, n. 6, p. 621-630, 2002.

TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; TORRES, V. M.; PONTES, G. C.; FARIAS, W. R. L.; MELO, F. R.; OLIVEIRA, S. C. B.; FAGUNDES, F. H. R.; DIZ FILHO, E. B. S.; CAVADA, B. S. Effects of Low Molecular Weight Sulfated Galactan Fragments From *Botryocladia occidentalis* on the Pharmacological and Enzymatic Activity of Spla2 From *Crotalus Durissus* Cascavella. **Protein Journal**, v. 29, p. 567-571, 2010.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

TROBAJO, R.; COX, E. J.; QUITANA, X. D.; The effects of environmental variables on the morphology of *Nitzschia frustulum* (Bacillariophyta), in relation it's use as a bioindicator. **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v. 79, p. 433-445, 2004.

USOV, A. I. Polysaccharides of the red algae. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 65, p. 115-217, 2011.

USOV, A. I.; ZELINSKI, N. D. Chemical structures of algal polysaccharides. In *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. **Elsevier Science**, p. 45-49, 2013.

VASCONCELOS, M. A. **Atividade de lectinas e metabólitos bioativos de plantas sobre biofilmes microbianos de interesse clínico**. 2013. 265 f. Tese (Doutorado em Bioquímica), Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

VASCONCELOS, A. G.; ARAÚJO, K. V.; SANTANA, L. A. Polissacarídeos extraídos de algas marinhas e suas aplicações biotecnológicas: uma revisão. **Revista brasileira de inovação tecnológica em saúde**, v. 5, n.3. pg 27-51, 2015.

VALDERRAMA, D.; CAI, J.; HISHAMUNDA, N.; RIDLER, N. Social and economic dimensions of carrageenan seaweed farming. **FAO fisheries and aquaculture technical paper**, n. 580, p. 204, 2013.

VIANA, G. S. B. ; FREITAS, A. L. P. ; LIMA, M. M. L. ; VIEIRA, L. A. P. ; ANDRADE, M.

C. H. ; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kutz and *B. triquetrum* (S.G.Gmel) M.Howe. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 6, p. 713-722, 2002.

XU, Z.; LIU, Q.; ZHAN, X.; HUANG, X.; HE, P.; LIU, S.; SUI, G. A microfluidic chip for studying the reproduction of *Enteromorpha prolifera*. **Talanta**, v. 160, p. 577-585, 2016

XU, J.; XU, LI.; ZHOU, Q. W.; HAO, S. X.; ZHOU, T.; XIE, H. J. Isolation, purification, and antioxidant activities of degraded polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 1026-1030, 2015.

WANG, L.; WANG, X.; WU, H; LIU, R. Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years. **Marine Drugs**, v. 12, p. 4984-5020, 2014.

ZHANG, X.; XU, D.; MAO, Y.; LI, Y.; XUE, S.; ZOU, J.; LIAN, W.; LIANG, C.; ZHUANG, Z.; WANG, Q.; YE, N. Settlement of vegetative fragments of *Ulva prolifera* confirmed as an important seed source for succession of a large-scale green tide bloom. **Limnology Oceanography**, v. 56, n. 1, p. 233-242, 2011.

ZHANG, Z.; WANG, F.; WANG, X.; LIU, X.; HOU, Y.; ZHANG, Q.; Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 118-121, 2010.

ZHANG, Y.; NOORI, J. F.; ANGELIDAK, I. Simultaneous organic carbon, nutrients removal and energy production in a photomicrobial fuel cell (PFC). **Energy Environment Science**, v. 4, p. 4340-4346, 2011.

ZHANG, X.; WANG, H.; MAO, Y.; LIANG, C.; ZHUANG, Z.; WANG, Q.; YE, N. Somatic cells serve as a potential propagule bank of *Enteromorpha prolifera* forming a green tide in the Yellow Sea, China. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 2, p. 173-180, 2010.

ZHANG, Z.; WANG, X.; ZHAO, M.; QI. O-acetylation of low-molecular-weight polysaccharide from *Enteromorpha linza* with antioxidant activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 39-45, 2014.

ZHANG, Z.; WANG, X.; ZHAO, M.; YUA, S.; QIC. H. The immunological and antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Enteromorpha linza*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 57, p. 45-49, 2013.