

Avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de macroalgas insulares em isolado ambiental de *Enterobacteriaceae*, litoral do Paraná (Sul do Brasil)

MONIQUE TEIXEIRA DE SOUZA

Orientadora: Dra. Franciane Pellizzari (UNESPAR, campus Paranaguá)

Coorientadora: Dra. Rafaele Frassini (Universidade de Caxias do Sul - UCS)

Programa de Pós-Graduação
em Ambientes Litorâneos
e Insulares - UNESPAR

Paranaguá

2023

Avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de macroalgas insulares em isolado ambiental de *Enterobacteriaceae*, litoral do Paraná (Sul do Brasil)

PAALI



Dissertação apresentada por Monique Teixeira de Souza ao Programa de Pós-graduação em Ambientes Litorâneos e Insulares da Universidade Estadual do Paraná como requisito parcial para obtenção do Título Mestre em Ciências Ambientais, sob orientação da Dra. Franciane Pellizzari e coorientação da Dra. Rafaela Frassini.

Programa de Pós-Graduação
em Ambientes Litorâneos
e Insulares - UNESPAR

Paranaguá

2023

PALI

A stylized graphic in a light blue color. It features a lighthouse on a cliff. The lighthouse is a tall, thin tower with a lantern room at the top. The cliff is a simple, irregular shape. The graphic is positioned to the right of the word 'PALI'.

Programa de Pós-Graduação
em Ambientes Litorâneos
e Insulares - UNESPAR

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UNESPAR e Núcleo de Tecnologia de Informação da UNESPAR, com Créditos para o ICMC/USP e dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Teixeira de Souza, Monique

Avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de macroalgas insulares em isolado ambiental de Enterobacteriaceae, litoral do Paraná (sul do Brasil) / Monique Teixeira de Souza. -- Paranaguá-PR, 2023.

71 f.: il.

Orientador: Franciane Pellizzari.

Coorientador: Rafael Frassini.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação Mestrado Acadêmico em Ambientes Litorâneos e Insulares) -- Universidade Estadual do Paraná, 2023.

1. Antibacteriano. 2. Macroalgas. 3. Extratos algais. 4. Enterobacteriaceae. 5. E. coli. I - Pellizzari, Franciane (orient). II - Frassini, Rafael (coorient). III - Título.

MONIQUE TEIXEIRA DE SOUZA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS BRUTOS DE MACROALGAS INSULARES EM ISOLADO AMBIENTAL DE *ENTEROBACTERIACEAE*, LITORAL DO PARANÁ (SUL DO BRASIL)

Dissertação apresentada por Monique Teixeira de Souza ao Programa de Pós-graduação em Ambientes Litorâneos e Insulares da Universidade Estadual do Paraná como requisito parcial para obtenção do Título Mestre em Ciências Ambientais

PARANAGUÁ, 12 de maio de 2023.

Banca Examinadora:

Orientador(a) e presidente da Banca: Dra. Franciane Pellizzari (UNESPAR)

Assinatura: _____

Coorientador(a): Dra. Rafaela Frassini (UCS)

Assinatura: _____

Examinador(a): Dra. Francine Girardello, Ph.D

Instituição: UCS - Universidade de Caxias do Sul

Assinatura: _____

Examinador(a): Dra. Luciana Rolinski Gama

Instituição: UFPR - Universidade do Estado do Paraná

Assinatura: _____

Examinador(a): Dra. Danyelle Stringari

Instituição: UNESPAR - Universidade Estadual do Paraná

Assinatura: _____



MAR CALMO NUNCA FEZ BOM MARINHEIRO

DEDICO ESTE TRABALHO AOS MEUS,
ÀS PESSOAS QUE MAIS ACREDITAM EM MIM,
AS MESMAS QUE ME ENSINARAM A ANDAR COM FÉ E ACREDITAR NO IMPOSSÍVEL:
MINHA FAMÍLIA.

AGRADECIMENTOS

Dra. Franciane Pellizzari: Obrigada, com certeza hoje sou um ser humano muito melhor, depois desse processo e ensinamentos. Pela oportunidade de realizar sonhos. Sou grata por tudo!

UNESPAR, USP, UFCS. Obrigada pela Infraestrutura, pelo apoio científico e por possibilitarem o desenvolvimento dessa pesquisa. Projetos inseridos no Proantar e no Protrindade: Que disponibilizam infraestrutura, apoio técnico para a manutenção dos laboratórios e pessoal para nossas pesquisas.

Laquamar: Say, Thadeu, André, Ana: Grata pelos helps, por dividirem seus conhecimentos e me ajudarem no dia a dia desse projeto. Mi, obrigada pela paciência sempre e por dividir sua sabedoria.

Dra. Rafaela Frassini: Obrigada pelo carinho, suporte, ensinamentos e por todo tempo disponibilizado na busca do meu sonho.

Sidney Comandulli: obrigada pela ajuda a apoio com as análises estatísticas, e pelo tempo disponibilizado.

Capes/ Fundação Araucária: Pela concessão das bolsas e materiais disponíveis nos laboratórios, sem investimento em tecnologia e ciência, não há expectativa de futuro para nosso país.

Marinha do Brasil: pelo apoio logístico.

À minha turma de mestrado pela parceria e pelas trocas de conhecimento. Eder: veio pra ficar forever.

Família: Pai e Mãe, sou grata pelo amor, carinho, dedicação, apoio. Mas pela fé em mim, por me lembrarem todos os dias sobre meu norte. Cada mensagem no wpp, cada presentinho, cada “vâmo guerreira”. E muito, muito obrigada por todas as vezes que se ajoelharam e oraram por mim, gastando seus créditos com Deus em minhas causas. Eu amo muito vocês e nada me faz mais feliz do que ver os seus olhos brilhando de felicidade com as minhas conquistas (que na verdade são nossas). Mana e Bucho:

Vocês são meus pilares, meu apoio, minha torcida, aquelas que escolhi estar ao lado para enfrentar essa experiência louca que é a vida na Terra. Obrigada por tanto. Leo e Bj: Por ficarem felizes com as minhas pequenas vitórias e sempre me apoiarem. Família Linck e Teixeira: Obrigada por me apoiarem e acreditarem em mim, por apostarem nos meus sonhos. Urso, sou grata por muito, mas principalmente pela nossa amizade. Amigas: Mara, Gi, Mariana: Grata por segurarem as barras e surtos. Liu, obrigada por tantos galhos quebrados e mensagens de carinho em dias difíceis. Pri e Jessicão: De sempre, para sempre. Debs, por várias madrugadas fazendo companhia enquanto eu tava surtada lendo e tentando sobreviver nesse ‘meio de gente inteligente’, como vc diz... Best, por estar comigo desde o começo, me fazer continuar, persistir, passar por todos os desafios ao meu lado, pelos ‘pix de deizão’ trocados e nunca aceitar que eu desistisse, vibrar pelas vitórias e orar qdo as coisas estavam sem controle. Ina, sei nem o que falar... muita energia trocada, muito amor e amizade, muito universo conspirando. Tartalga Clara, Paulo e Luna: Por chegarem nesse momento final, com todos os pés na porta, entrarem no meu coração e me mostrarem que existem pessoas maravilhosas, e que tenho que voltar a ter fé.

Por serem a presença de Deus na virada de página da minha vida: Felipe, por me fazer acreditar que não existe montanha alta demais para mim. Sinval, por me ensinar a deixar a porta aberta para a felicidade. Jaisson, por olhar diferente para mim e enxergar além, meu irmão.

Por serem a presença de Deus na virada de página da minha vida: Felipe, por me fazer acreditar que não existe montanha alta demais para mim. Sinval, por me ensinar a deixar a porta aberta para a felicidade. Jaisson, por olhar diferente para mim e enxergar além, meu irmão.

RESUMO

A urbanização e o crescimento desordenado das cidades litorâneas aumentam as taxas de perturbação ambiental e fluxo de efluentes nos corpos d'água. A contaminação orgânica resulta na eutrofização e altera a distribuição de cepas bacterianas dos ambientes marinhos. Pelos efluentes há fluxo de fármacos, dando início à pressão seletiva que favorece a resistência bacteriana, novos processos infecciosos e consequente demanda por novos fármacos. Macroalgas possuem ampla distribuição e plasticidade adaptativa, atribuídas principalmente ao seu metabolismo secundário. Os bioativos algais vêm sendo amplamente estudados por suas propriedades antibacterianas: uma alternativa natural, eficaz, com baixo efeito colateral comparada aos antimicrobianos sintéticos comercializados. Esta pesquisa investigou a atividade antibacteriana de extratos metanólicos e aquosos de quatro espécies de macroalgas conspícuas de ambientes insulares do litoral do Paraná (*Ulva* sp., *P. acanthophora* e *S. cymosum* e *G. brasiliensis*) frente a enterobactérias cultivadas a partir de amostras de água marinha contaminadas, comparando com uma linhagem de referência de *E. coli*. A análise da água para cultivo foi realizada pelo teste Colilert®-18. A água positivada para *E. coli* foi filtrada e então cultivada em meio seletivo (MacConkey). Após repicagens seriadas e teste de coloração Gram, o teste bioquímico identificou a nível de família (*Bacteriaceae*). A atividade antibacteriana dos extratos foi avaliada em disco-difusão e microdiluição em caldo. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey. Os resultados obtidos permitem atribuir atividade antibacteriana aos extratos metanólicos de todas as espécies investigadas. O extrato metanólico de *Ulva* sp. reduziu a atividade bacteriana em ambas as linhagens concentrações testadas. *P. acanthophora* apresentou a maior taxa de inibição do estudo e o extrato de *S. sargassum* inibiu até 80% da cultura de linhagem referência na concentração de 1,6mg/mL. *G. brasiliensis* apresentou baixa atividade antibacteriana. Considerando a ampla distribuição e grande biomassa de *Ulva* e *Sargassum*, recomenda-se futuros isolamentos bioquímicos e uso em biorremediação.

Palavras-chave: Gram-negativa, Metabólitos Secundários, Macroalgas

ABSTRACT

Urbanization and the disorderly growth of coastal cities increase the rates of environmental disturbance and effluent flow into the aquatic environment. Organic contamination results in eutrophication and alters the distribution of bacterial strains in marine environments. Drugs flow also through the effluents, initiating the selective pressure that favors bacterial resistance, new infectious processes and consequent demand for new drugs. Macroalgae have a wide distribution and adaptive plasticity, mainly attributed to their secondary metabolism. Algal bioactives have been widely studied for their antibacterial properties: a natural, effective alternative with low side effects compared to commercially available synthetic antimicrobials. This research investigated the antibacterial activity of methanolic and aqueous extracts of four species of conspicuous macroalgae from insular environments on the coast of Paraná (*Ulva* sp., *P. acanthophora*, *S. cymosum* and *G. brasiliensis*) against *Enterobacteriaceae* cultivated from samples of contaminated marine water, compared to a reference strain of *E. coli*. The analysis of water for cultivation was performed using the Colilert®-18 test. The positive water for *E. coli* was filtered and then cultured in a selective medium (MacConkey). After serial subcultures and Gram staining, the biochemical test identified the family level (*Bacteriaceae*). The antibacterial activity of the extracts was evaluated by disk diffusion and broth microdilution. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test. The methanolic extracts of all species surveyed showed antibacterial activity. The methanolic extract of *Ulva* sp. reduced bacterial activity in both strains tested concentrations. *P. acanthophora* showed the highest inhibition rate in the study and the *S. sargassum* extract inhibited up to 80% of the reference strain culture at a concentration of 1.6mg/mL. *G. brasilienses* showed low antibacterial activity. Considering the wide distribution and large biomass of *Ulva* and *Sargassum*, future biochemical isolations and use in bioremediation are recommended.

Keywords: Gram-negative, Secondary Metabolites, Macroalgae

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Enterobactérias e sua classificação. São mais de 100 espécies de bactérias Gram negativas, distribuídas em 30 gêneros. Agrega dentre outros grupos de coliformes, costumam ser resistentes a elevadas temperaturas, patogênicas de importância para a saúde humana, uma vez que constituem a principal causa de infecção intestinal no globo..... 17

Figura 2. Mecanismos de Resistência Bacteriana. Bactérias livres no ambiente entram em contato com antimicrobianos, são selecionadas, se proliferam e possuem capacidade de compartilhar sua resistência com as demais. (fonte:<https://www.biomerieux-diagnostics.com/antimicrobial-stewardship>) 18

Figura 3. Locais de amostragem no litoral do Paraná, 1- Local de amostragem de cepas de *E.coli* ambiental: Canto das Pedras - Pontal do Sul, desembocadura de rios e trânsito de embarcações de pequeno e médio porte. Amostragem de macroalgas: 2- Ilha do Farol (Matinhos), ilha próxima a área de urbanização, com acesso turístico sazonal; 3- Ilha Rasa (Guaraqueçaba), Baía das Laranjeiras, unidade de conservação com impacto de comunidades locais e turismo não organizado. Fonte: Google Landsat/ Copernicos (Data SIO, NOAA, U.S) Data das Imagens: 14/12/2015 - Escala: 20km|Câmera: 154km. Ferramenta: Google Earth..... 27

Figura 4. Meios sólidos potenciais e seletivos para *E. coli*. A: Crescimento bacteriano em meio Ágar Sangue; B: crescimento bacteriano em meio MacConkey. (Fonte:https://www1.ibb.unesp.br/Home/Departamentos/MicrobiologiaeImunologia/5_aula_enterobacteriaceae.pdf) 29

Figura 5. Etapas para concentração e seleção de bacilos Gram-negativos: A. Filtração em bomba a vácuo. B. Diluição e homogeneização do residual do filtro para a semeadura das placas. C. Formação de colônias em meio MacConkey 30

Figura 6. Procedimento de filtração do extrato metanólico das macroalgas marinhas. Realizado no mês de setembro de 2022 32

- Figura 7.** Modelo analítico demonstrando todas as etapas da pesquisa realizada durante os anos 2021-2023, visando atestar a capacidade antibacteriana de extratos de macroalgas conspícuas de ilhas do litoral paranaense..... 33
- Figura 8.** Cartela padrão Quanti-tray usada nas análises pelo Método Colilert®, e posterior leitura de coliformes totais e *E. coli* através de contagem dos lóculos sob câmara UV. As cepas de enterobactérias são detectada pela produção de glucuronidase, que cliva em 10 umbeliferil-glucuronide (MUG), um marcador, resultando em fluorescência sob luz ultra-violeta, e consequentemente resultado positivo 36
- Figura 9.** Confirmação de cultura de bacilos Gram-negativos na água do mar coletada em Pontal do Sul (PR) em setembro de 2022, observadas em microscopia óptica após coloração de Gram. 36
- Figura 10.** Antibiograma preliminar utilizando cultivo de enterobactérias ambientais, em disco-difusão. O DMSO ao centro, não impediu o crescimento de bactérias, sendo usado como controle negativo para o antibiograma dos extratos. Os antimicrobianos comercializados com melhor resultados (azitromicina, amoxicilina e neomicina) foram escolhidos como controle positivo..... 38
- Figura 11.** Leitura de absorbância para diferentes concentrações de extratos aquosos de *Ulva* sp. (previamente *U. fasciata*) (Chlorophyta), *P. acanthophora* (Rhodophyta) e *S. cymosum* (Phaophyceae), coletadas na Ilha do Farol, município de Matinhos, litoral paranaense. Quanto menor a absorbância, maior a inibição bacteriana 41
- Figura 12.** Leitura de absorbância para distintas concentrações de extratos metanólicos de *Ulva* sp. (previamente *U. fasciata*) (Chlorophyta), *P. acanthophora* (Rhodophyta) e *S. cymosum* (Phaophyceae), coletada na Ilha do Farol, litoral paranaense. Os valores em destaque, referem-se à porcentagem de inibição observada. (Quanto menor a absorbância, maior a inibição bacteriana) 42
- Figura 13.** Análise univariada e classificação por significância. O extrato de *Ulva* sp. apresentou comportamento distinto dos demais extratos, assim como *G. brasiliensis*.

Os extratos de *P. acanthophora* e *S. cymosum* apresentaram similaridade nos resultados. A margem de erro foi expressa nas barras acima das colunas 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento de Extratos Metanólicos e Aquosos, após evaporação, subtraiu-se o peso final, do peso inicial. O resultado foi expresso em g 37

Tabela 2. Diâmetro do halo de inibição em teste antibiograma preliminar com a enterobactéria ambiental cultivada, obtida de ambiente estuarino no litoral do PR. Onde: PEN = Penicilina, gentamicina= GEN; penicilina =PEN; rifampicina = RFC; azitromicina = AZI, amoxicilina =AMC, Eritromicina = ERI, Neomicina = NEO 38

Tabela 3. Medidas dos halos de inibição resultantes do teste de suscetibilidade com antimicrobianos indicados para classificação do grau de resistência da bactéria ambiental cultivada e linhagem de referência (ATCC25922). Onde: S= Sensível, I = Intermediário, R= Resistente 39

Tabela 4. Medidas dos halos de inibição resultantes do antibiograma com os extratos de algas coletadas na Ilha do Farol – PR.) 40

Tabela 5. Resultado da análise de variâncias (ANOVA). Df: Graus de Liberdade; Sum Sq:Soma dos Quadrados; Mean Sq: Quadrado Médio; F value: Estatística F; Pr(>F): Valor p. Fonte: Vegan (2022) 43

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
Conservação Marinha	15
Aspectos Microbiológicos	16
Aspectos Ficológicos	20
OBJETIVOS	24
Objetivo Geral	24
Objetivos Específicos	24
MATERIAIS E MÉTODOS	24
Área de Estudo.....	25
Ponto amostral de coleta de água para isolamento da <i>E. coli</i> ambiental : Praia do Canto das Pedras.	26
Ponto amostral de macroalgas : Ilha do Farol.....	26
Ponto amostral de macroalgas: Ilha Rasa.....	27
Coleta de água estuarina para isolamento de <i>E. coli</i> ambiental.....	28
Análises da qualidade da água estuarina para isolamento de <i>Enterobacteriaceae</i>	29
Isolamento de cepas de Bactéria Ambiental	31
Coleta de Biomassa e Processamento das amostras de macroalgas.....	32
Preparação dos Extratos algais para os testes antibacterianos	32
Extrato Metanólico.....	32
Extrato Aquoso.....	33
Antibiogramas	34
Preparo do Inóculo Bacteriano	34
Antibiograma por Disco Difusão	34
Antibiograma pelo método de Microdiluição em Caldo Mueller Hinton	35
Análise Estatística.....	36
RESULTADOS	36
Análises da qualidade da água estuarina para isolamento de <i>Enterobacteriaceae</i> ambiental.....	36
Isolamento das Cepas de Bactéria Ambiental.....	37
Produção de Extratos	38
Antibiograma por Disco Difusão	38
Determinação do Controle Positivo	38
Teste de Suscetibilidade	40
Extratos Algais: Antibiograma de Difusão em Disco	41
Antibiograma pelo método de microdiluição em caldo Muller Hinton. .	42
Extratos Aquosos	42
Extratos Metanólicos	43
Análise Estatística.....	44

DISCUSSÃO	46
CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	56
ANEXOS.....	68
Anexo 1:	68
Anexo 2.	70

INTRODUÇÃO

Conservação Marinha

Os serviços ecossistêmicos fornecidos pelos oceanos são de suma importância para a vida humana, desde fonte de alimentos, passando por compostos para as indústrias alimentícia, têxtil, nutracêuticos e fármaco-cosmética (Pereira, 2010; Fonseca, 2016). Além da multiplicidade de atividades econômicas, aspectos culturais e recreativos dos ecossistemas marinhos, há processos regulatórios ecológicos, como ciclagem de nutrientes, liberação de oxigênio (e sequestro de carbono pelas algas, além da regulação do clima global pelas trocas oceano-atmosfera (Pellizzari *et al.* 2017, 2020a; Lomartire, Gonçalves & Shikov, 2022).

Assim como o ambiente costeiro, ecossistemas insulares com maior proximidade da faixa litorânea são diretamente impactados pelas atividades humanas, paralelamente os organismos marinhos apresentam ecologia e desenvolvimento fisiológico alterados diante de diferentes estressores e características ambientais. A interface marinha e continental apresenta amplitude climática característica (muitas vezes ampla) e geomorfologia heterogênea, a exemplo de praias arenosas, costões rochosos, recifes de corais, estuários e manguezais, os quais são habitat para uma vasta diversidade de espécies (MMA, 2012; Andrade *et al.*, 2020), incluindo diversos organismos de interesse comercial como peixes, caranguejos, siris, camarões (Beirão, 2020) e macroalgas (Jesus *et al.*, 2013).

A urbanização e o crescimento desordenado das cidades litorâneas aumentam as taxas de perturbação ambiental, a perda de habitat e de biodiversidade (Sganzerla *et al.*, 2021). O crescimento desordenado das populações costeiras, atividade portuária e indústrias ao longo da costa, geram pressões (Torres *et al.*, 2008) que se somam a outras de caráter natural. A exemplo disto há mudanças meteorológicas e oceanográficas que causam ampla e abrupta variação termohalina e de pH das águas marinhas, resultando no aumento de eventos naturais (ICMBio 2013, MMA 2018). Historicamente, a expansão urbana e efluente de diversas origens, incluso domésticos sem tratamento, resultam em eutrofização excessiva e contaminação orgânica do ambiente marinho (Wang *et al.*, 2021), desta forma a comunidade microbiana marinha cresce e pode funcionar como bioindicador da qualidade de água marinha para recreação, cultivos e pesca. A concentração elevada de microrganismos bacterianos

(ex. *Escherichia coli*) específicos, indica que o local está impróprio para pesca e recreação, uma vez que aumenta a exposição a contaminantes, um problema de saúde pública, que gera impacto ambiental e causa prejuízo econômico.

O próprio ecossistema marinho fornece mecanismos de recuperação e resiliência para alguns impactos, conceitos utilizados em técnicas como biorremediação (Tremblay-Gratton *et al.* 2017, Saad *et al.* 2021) e aquicultura multitrófica integrada (Brown *et al.* 2011, Elionzo-González *et al.* 2018), onde o emprego de esforço humano controla o equilíbrio de sistemas. Em contrapartida, os organismos marinhos sobrevivem e vivem em comunidades complexas e em estreita associação com outros em um ambiente competitivo e hostil. Eles produzem metabólitos secundários complexos como resposta à pressão ecológica, causada pela competição por espaço, por predação e devido às variações de maré. Alguns desses compostos são antimicrobianos que inibem ou limitam o desenvolvimento e crescimento de outros microrganismos competitivos (Perez *et al.* 2016).

Aspectos Microbiológicos

Bactérias podem ser encontradas em todos os ecossistemas e organismos existentes. No ambiente marinho, encontram-se livres na coluna d'água, aderidas a partículas de sedimentos, ou em tecidos e órgãos de animais e macroalgas (Dionisio 2000). A distribuição de cepas bacterianas no ambiente marinho, incluso patógenos, é resultado da disponibilidade de substratos e/ou hospedeiros suscetíveis, mantendo o equilíbrio ecológico de ambos (Moura *et al.* 2011). Miquelante (2007) atenta para a importância ecológica de microrganismos no ambiente marinho, uma vez que as bactérias têm capacidade de degradar compostos orgânicos e realizar a ciclagem de nutrientes, sendo o principal componente biótico dos ciclos biogeoquímicos marinhos e estuarinos juntamente com fungos e leveduras (Vieira *et al.* 2012). Desta forma, são componentes indispensáveis na teia alimentar bentônica, pois, por meio da assimilação de matéria orgânica dissolvida e transferência de carbono orgânico particulado aos níveis tróficos superiores, completa-se o ciclo biogeoquímico.

Entretanto o aumento de atividade antropogênica e estressores ambientais, tais como o descarte de resíduos líquidos e sólidos e lançamento de efluentes tanto industriais quanto domésticos, causa forte impacto nos ecossistemas, principalmente na disponibilidade de cepas bacterianas e substratos que favorecem o crescimento e

proliferação destas e amplificam a vulnerabilidade da saúde humana, provocando alterações nos processos ecológicos, meio ambiente versus biota (MMA 2017; Nicolodi *et al.* 2018). A exemplo disso, a família das enterobactérias (*Enterobacteriaceae*), bactérias Gram-negativas muito abundantes que agrega dentre outros grupos o de coliformes, costumam ser resistentes a elevadas temperaturas, patogênicas de importância para a saúde humana, uma vez que constituem a principal causa de infecção intestinal em todo o mundo (Trabulsi & Alterthum 2005). Estudos genéticos incluíram este grupo dentro das Proteobacteria, e sua ordem é Enterobacteriales (Fig.1).

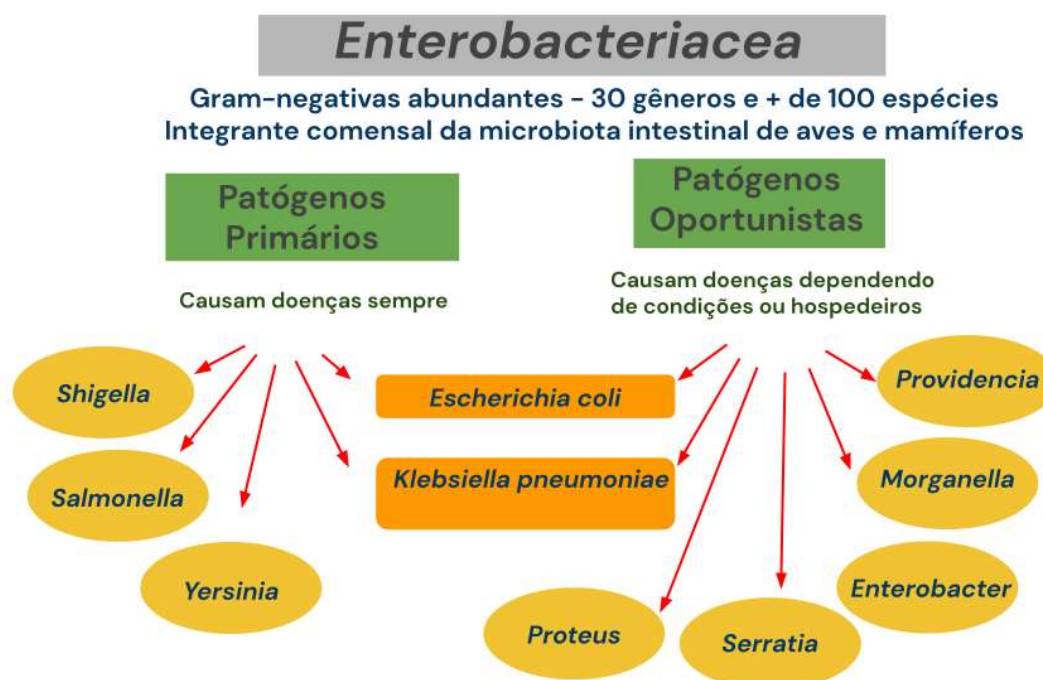


Figura 1. Enterobactérias e sua classificação. São mais de 100 espécies de bactérias Gram negativas, distribuídas em 30 gêneros. Agrega dentre outros grupos de coliformes, costumam ser resistentes a elevadas temperaturas, patogênicas de importância para a saúde humana, uma vez que constituem a principal causa de infecção intestinal no globo.

Alguns gêneros são integrantes comensais da microbiota intestinal de aves e mamíferos, inclusive humanos, como a *Escherichia coli*, outros como habitantes do solo ou da água. Os gêneros *Salmonella*, *Proteus*, *Shigella* e *Yersinia* são associados a processos patogênicos (Silva 2015). Abundantes em ambientes enriquecidos com matéria orgânica, as enterobactérias são indicadoras de qualidade da água (Silva

2015; Miquelante & Kolm 2011). E.coli é reconhecido como um microrganismo modelo, pois sua genética e bioquímica foram exaustivamente estudadas nas últimas décadas (Trabulsi & Altherthum 2005), este bacilo Gram-negativo é componente da flora intestinal normal porém causador de doenças intestinais e extra-intestinais em humanos. Embora estas bactérias sejam mais abundantes em ambiente terrestres e em sua biota natural (intestino de aves e mamíferos), diversos fatores biogeoquímicos explicam a permanência e a viabilidade das cepas destes microrganismos em água do mar. A rota de entrada de populações patogênicas são os efluentes domésticos não tratados, dada pela interface entre água doce (rio), ambiente de transição (estuário) e água salgada (mar) (Pommepuy *et al.* 2005).

A contaminação provinda de efluente antropogênico não se limita aos microrganismos: o descarte de fármacos diversificados, lixiviação de dejetos com hormônios e outros compostos químicos presentes em humanos, alimenta o fluxo de fármacos em ambientes naturais pela mesma rota dos patógenos. Desta forma iniciam uma pressão seletiva que favorece a permanência e resistência bacteriana nos ambientes naturais (Silva 2015; Pommepuy *et al.* 2005; Moura *et al.* 2011; Hoffman *et al.* 2015).

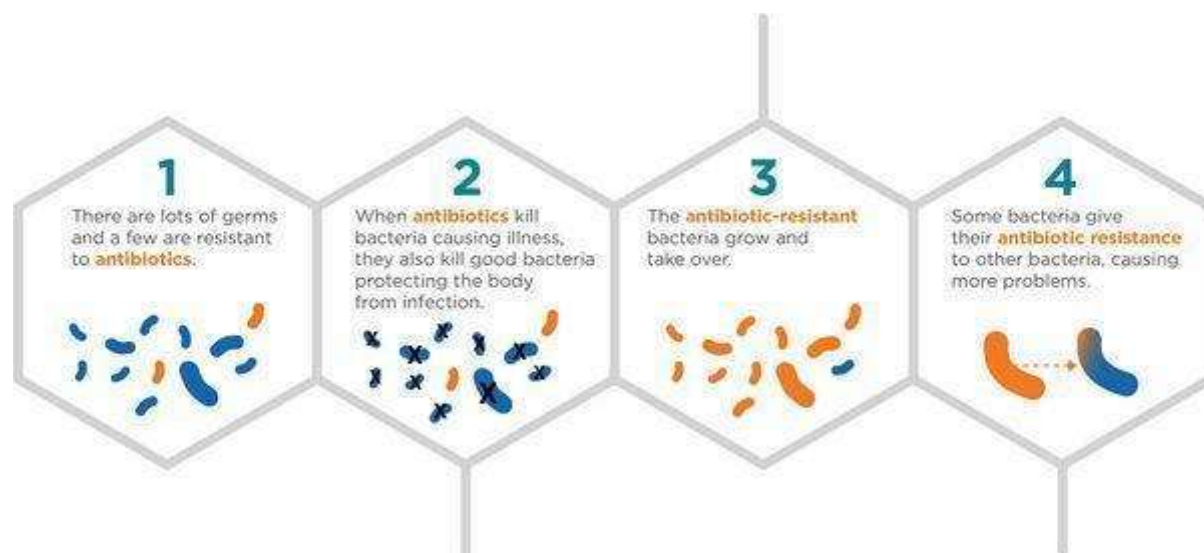


Figura 2. Mecanismos de Resistência Bacteriana. Bactérias livres no ambiente entram em contato com antimicrobianos, são selecionadas, se proliferam e possuem capacidade de compartilhar sua resistência com as demais. (fonte: <https://www.biomerieux-diagnostics.com/antimicrobial-stewardship>)

O consumo exacerbado e indiscriminado de antimicrobianos tem sido apontado como o grande facilitador da resistência bacteriana, isso acontece porque muitos dos

antimicrobianos comercializados são de origem sintética e permanecem no ambiente onde são descartados por muito tempo. Segundo Landry & Boyer (2013) (*apud* Barros 2017), aproximadamente 64% dos produtos farmacêuticos destinados ao uso humano são excretados na urina como composto original ou metabólitos. Ao entrar em contato com cepas bacterianas, os fármacos estimulam uma seleção natural, onde as mais resistentes proliferam (Calumpong *et al.* 2014).

A resistência antibiótica, multirresistência a fármacos, ou resistência antimicrobiana é a capacidade de um microrganismo, incluso bactérias, de resistir aos efeitos de medicamentos convencionais, como os antibióticos, e pode ser definida como uma alteração genética que se expressa bioquimicamente (Sun *et al.* 2013). Há diversos mecanismos químicos que tornam uma bactéria resistente: produção de enzimas, mudança na permeabilidade da membrana, expulsão do antibacteriano da célula (Trabulsi & Alterthum 2005), pode ser inerente a um grupo específico de bactérias, ocorrer na forma de uma mutação genética ou ainda pode ser transferida entre indivíduos.

A resistência antimicrobiana é uma das maiores ameaças à saúde humana em todo o mundo (Walker *et al.* 2009), já que limita muito a probabilidade de tratamento colocando em risco a eficácia de antimicrobianos disponíveis para tratamentos (Ventola 2015). Populações de áreas costeiras estão expostas à qualidade da água marinha, em virtude da dependência de recursos oriundos destes ecossistemas, tanto para alimento ou outras indústrias, quanto para fins recreacionais. Mesmo com indícios de infecções de origem marinhas em humanos, o diagnóstico e o tratamento raramente relacionam a causa dessas infecções com o ambiente onde ocorrem (Fleming *et al.* 2008; Repsold *et al.* 2020).

Algumas florações de algas (micro ou macro) estão associadas à eutrofização em ambientes aquáticos, incluindo microalgas que produzem toxinas (Moura *et al.* 2011; Fleming *et al.* 2008), o que sugere que muitos desses organismos utilizam de estratégias fisiológicas diversificadas e arsenal bioquímico para se defenderem e sobreviverem à presença de estressores ambientais oriundos de ação antrópica ou mudanças abióticas “naturais”. Incluindo uma gama de compostos químicos antioxidantes, fotoprotetores, que podem ter ação antibacteriana, fúngica ou viral, a despeito da resistência adquirida por estes microrganismos.

Além disso, estudos demonstram que macroalgas, como produtoras de diversos tipos de polissacarídeos, são excelentes substratos para a sobrevivência de

muitos microrganismos estuarinos e marinhos, sendo alguns patogênicos (Whitman *et al.* 2004, Englebert *et al.* 2008) dentre eles fungos, leveduras (Rosa *et al.* 2003) vírus e bactérias, principalmente *Escherichia coli*.

Aspectos Ficológicos

Macroalgas marinhas juntamente com o fitoplâncton, são organismos autótrofos e produtores primários responsáveis pela produção de mais de 60% do oxigênio disponível no globo (Calumpong *et al.* 2021). Ambos os grupos, micro e macroalgas, formam um importante componente dos ecossistemas marinhos, tanto de zonas costeiras quanto oceânicas, sendo base de teia alimentar, provendo nutrição e habitat para diversas espécies marinhas. Macroalgas distribuem-se ao longo do globo desde zonas polares e tropicais, de ambientes superfóticos entremarés e ou rasos, a ambientes mais profundos com baixa incidência de luz, em zonas de amplo gradiente halino, e em ambientes prístinos a eutrofizados e contaminados.

Esta ampla distribuição ocorre devido à plasticidade de alguns gêneros de se adaptar a condições abióticas muito específicas e/ou a tolerar condições ambientais com variações muito amplas ou extremas (Pellizzari *et al.* 2020). As algas são bentônicas e fixam-se em substratos consolidados tanto em costões rochosos, rochas, substratos duros naturais ou artificiais, troncos de manguezais, ou como epífitas de outras espécies (Pedrini 2010).

A fisiologia algal envolve desde a produção de pigmentos fotossintetizantes até a síntese de compostos do metabolismo secundário. Metabólitos secundários funcionam como defesa contra condições abióticas extremas (e.g. compostos antioxidantes e fotoprotetores), e quando isolados podem ter sua ação bioativa aplicada a fármaco cosmético, como é o caso dos antibacterianos ou bactericidas.

No entanto, a ecologia química das algas marinhas é compreendida em diferentes áreas do globo de forma desigual. Por exemplo, as algas antárticas estão entre os grupos menos estudados em termos de ação antibacteriana. Recentemente Martín-Martín *et al.* (2022) estudaram as evidências experimentais de atividade antimicrobiana em 22 espécies de algas marinhas antárticas, abordando papel ecológico e potencial antimicrobiano. Os autores realizaram extrações separando as frações lipofílicas e hidrofílicas, usando o método de difusão em disco contra sete bactérias antárticas e sete substitutos patogênicos humanos. Foi demonstrado que os

extratos das algas vermelhas (especialmente *Delisea pulchra*) inibiram um maior número de microrganismos em comparação com as algas pardas, e que as frações lipofílicas foram mais ativas do que as hidrofílicas. Ambos os tipos de bactérias testadas (Gram-negativas e Gram-positivas) foram inibidas, principalmente por frações butanólicas, sugerindo uma tendência de defesa química inespecífica. No entanto, bactérias Gram-negativas e um fungo patogênico apresentaram maior resistência. Isto contribuiu para a evidência de interações químicas antimicrobianas entre algas antárticas e microrganismos simpátricos (que ocorrem na mesma região geográfica), bem como o potencial de extratos de algas marinhas para aplicações farmacológicas.

No Brasil estão listadas atualmente ca. de 925 espécies de macroalgas marinhas, sendo 222 Ulvophyceae (Chlorophyta), 594 Rhodophyta, e 109 Phaeophyceae (Ochrophyta) (Guiry & Guiry, 2023). Os três grupos algais possuem uma combinação específica de pigmentos fotossintéticos, Chlorophyta (algas verdes), Rhodophyta (vermelhas) e Phaeophyceae (pardas ou marrons).

As macroalgas verdes são compostas por clorofilas a e b, podendo apresentar outros pigmentos, principalmente da classe dos carotenóides, sintetizam o polissacarídeo amido como substância de reserva (Raven *et al.* 2001), possuem parede celular composta de pectina e celulose (Sprung 2002) e estão presentes em diversos ecossistemas marinhos e estuarinos (Pellizzari & Sinclair; WOA 2021).

As algas Rhodophyta são predominantemente marinhas com alguns poucos táxons estuarinos. Possuem nuances de cor rósea, avermelhada ou vinácea, resultante da presença de clorofila a e d, pigmento acessório ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina (SILVA 2009). Estas algas ainda podem sintetizar ficobiliproteínas, carotenóides, luteína, zeaxantina (Sprung 2002). Como substância de reserva, possuem amido e caracterizam-se pela ausência de células flageladas (Pedrini 2010). Possuem ampla distribuição latitudinal, com diversidade concentradas em zonas tropicais e temperadas, mas sua biomassa pode predominar em algumas zonas mais frias, incluso polares.

Algas pardas (Phaeophyceae/Ochrophyta) são prioritariamente marinhas de ampla distribuição por todas as latitudes, de águas polares. Existem pelo menos 1500 espécies descritas, mais abundantes em águas temperadas, boreais e polares (Guiry & Guiry 2023; SILVA 2009). Estes organismos sintetizam clorofila a e c, e a coloração é proveniente dos pigmentos carotenóide e fucoxantina (Raven *et al.* 2001), não

produzem amido e armazenam energia em laminarina e manitol (Strung 2002), ainda possuem parede celular formada por celulose e protegida por camada mucilaginosa (Pedrini 2013).

Além da grande importância ecológica das algas, ressalta-se também sua relevância econômica, diretamente como alimento e ou provendo matéria prima industrial na fabricação de tintas, colas, borrachas, isolantes e lubrificantes para eletroeletrônica, impermeabilizantes e fixadores de pigmentos na indústria têxtil (Pedrini 2010), biocombustíveis, fertilizantes e degradação de petróleo (Beirão 2020). As algas são altamente nutritivas quando consumidas *in natura*, em geral têm baixo teor de lipídeos e calorias, algumas espécies possuem alta concentração de minerais (ferro, iodo, cálcio, potássio, magnésio), aminoácidos, e fibras, sendo importantes repositores nutricionais (Pereira 2010). Ainda, são ricas em vitaminas B1, B2, B6, C e E, além de niacina e oligoelementos (Fonseca 2016). Na indústria alimentícia, nutracêutica e/ou cosmética, as macroalgas são amplamente utilizadas para extração como fontes de polissacarídeos coloidais de espessantes, estabilizantes, conservantes e emulsificantes, à ex. de ágar, carragenana e alginatos (Pellizzari & Reis 2014). O alginato, extraído de alguns gêneros de Phaeophyceae, é um ficocolóide usado como excipiente para fármacos e moldes dentários. O ágar e carragenana são outros dois ficocolóides extraídos de alguns gêneros de algas vermelhas, sendo usados amplamente na indústria de rações como gelificantes, estabilizantes e emulsificantes. O ágar é a base para subproduto de importância para a fabricação de meios de cultura, separação de macromoléculas e obtenção de anticorpos (Pellizzari & Reis 2014; Pereira 2010).

A diversidade de macroalgas, seus polissacarídeos coloidais, subprodutos e metabólitos secundários extraídos, os quais são sintetizados como estratégias de sobrevivência, podem apresentar subsídios para futuras pesquisas em busca de novos fármacos, seja com base em produtos naturais e/ou sintéticos. Estudos demonstram que a zona entre marés, habitat de muitas macroalgas, funciona como um ecossistema ideal para bactérias termotolerantes, assim como para outros microrganismos patogênicos (Beverdorf *et al.* 2006; Ortiz & Galicia-Jiménez 2013). A permanência desses organismos suscita a pressão ecológica que pode induzir e/ou estimular a síntese de metabólitos secundários, incluindo compostos antibacterianos por algumas algas (Perez *et al.*, 2016).

Os metabólitos secundários são assim chamados porque não participam das atividades relacionadas ao crescimento e desenvolvimento do organismo. Compostos como terpenóides, esteróides, compostos fenólicos, alcenos e florotaninos são sintetizados como estratégia de defesa para suportar as pressões ecológicas que as macroalgas sofrem em ambientes extremos e ou mutantes, tais como da temperatura e da salinidade da água, da incidência de luz, além dos estressores antropogênicos (Shanmughapriya *et al.*, 2008). Estes compostos atuam principalmente como potencial antibacteriano (Sridhar *et al.*, 1999; Nagayama, 2002; Shafay, 2016; Perez *et al.*, 2016; Yong Li, 2018; Shanmughapriya *et al.*, 2008; Coronel *et al.*, 2020; Hussen *et al.*, 2020; Bhruyar *et al.*, 2020; Scania & Chasani, 2021; Cmiková *et al.* 2022).

Desta forma, o uso de extratos de algas marinhas pode ser uma alternativa natural, eficaz, com menos efeitos colaterais e menor toxicidade do que os antimicrobianos sintéticos atualmente comercializados no combate às bactérias resistentes (Cmikova *et al.*, 2022; Coronel *et al.*, 2020; Hussein *et al.*, 2020)

Visto a importância das macroalgas no controle das cepas bacterianas resistentes, este estudo visou adequar um protocolo para seleção de enterobactéria ambiental marinha, avaliando sua capacidade de resistência. Ainda foi investigada a atividade antibacteriana de diferentes extratos macroalgais, com intuito de embasar um possível isolamento de composto químico com atividade contra as cepas bacterianas ambientais selecionadas.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Testar a atividade antibacteriana de extratos de macroalgas contra *Enterobacteriaceae* cultivada a partir de amostras de água do mar imprópria para balneabilidade, comparando com uma linhagem de referência de *E. coli* (ATCC 25922).

Objetivos Específicos

- Cultivar bactéria proveniente de água do mar de praias impróprias para balneabilidade do litoral do Paraná;

- Obter os extratos metanólicos das macroalgas *Ulva* sp., *P. acanthophora*, *S. cymosum* e *G. brasiliensis* por meio da técnica de maceração;
- Preparar extratos aquosos das macroalgas *Ulva* sp., *P. acanthophora* e *S. cymosum* por meio de autoclavagem;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos metanólicos e aquosos contra bactéria cultivada por método quantitativo e qualitativo;
- Analisar o perfil de suscetibilidade e resistência à antibacterianos de *Enterobacteriaceae* cultivada do ambiente por meio de antibiograma por disco difusão.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de Estudo

A costa marinha brasileira se estende por aproximadamente 10.800 km e se soma às áreas insulares oceânicas Atol das Rocas (RN), Fernando de Noronha (PE), São Pedro e São Paulo (PE), Trindade e Martim Vaz (Beirão *et al.*, 2020), totalizando 17 estados costeiros e mais de 200 municípios litorâneos (Prates *et al.*, 2012; Beirão *et al.*, 2020). Cerca de 60% das grandes metrópoles brasileiras se desenvolvem em áreas litorâneas e estuarinas, não obstante da tendência mundial, cujo crescimento de 75% ao ano inclui 65% de sua população localizada a menos de 159 km da costa marinha (Moura *et al.* 2011).

O litoral do Paraná está localizado no sul do Brasil entre a Serra do Mar e o Oceano Atlântico, limitado ao norte pelo litoral do estado de São Paulo (25° 18' 12") e ao sul pelo estado de Santa Catarina (25° 58' 35") (Angulo, Souza e Noernberg, 2020). Caracteriza-se pela diversidade de ambientes em seus 90 km (Bigarella, 2001) de faixa costeira, formada por costões rochosos, praias arenosas e longa linha de costa estuarina do Complexo Iguape-Cananéia-Paranaguá permeados por manguezais e marismas (Lana *et al.*, 2001).

O Complexo Estuarino de Paranaguá (CEP), é uma importante região econômica que abriga o maior porto graneleiro da América Latina (EMBRAPA, 2020). Essa planície costeira é entremeada por outras baías do CEP (Laranjeiras, Pinheiros e Antonina), com presença de muitas ilhas como Rasa, Peças, da Cotonga, algumas destas inseridas em Unidades de Conservação (UC). É o caso da Ilha Rasa, na Área

de Proteção Ambiental (APA) de Guaraqueçaba, Baía das Laranjeiras. Mais ao sul do litoral Paranaense, encontra-se a Baía de Guaratuba, um corpo d'água raso de 1 km de comprimento e 3 km de largura, em cuja desembocadura localiza-se a Ilha do Farol. (Angulo *et al.* 2016).

A população costeira paranaense apresenta ampla variação sazonal, uma vez que triplica nos meses de verão (Cunico, 2016). O Município de Pontal do Paraná, na desembocadura do CEP, possui uma população estimada em 28 mil habitantes, segundo o IBGE (2021), porém, durante a temporada de verão é estimado que o número da população flutuante passe dos 300 mil. Fato este que sobrecarrega o setor de prestação de serviços no município, assim como sobrecarrega, polui e contamina os seus ecossistemas adjacentes.

Ponto amostral de coleta de água para isolamento da E. coli ambiental

O Balneário de Pontal do Sul (Pontal do Paraná) (25° 33'S/ 48° 24'W) localizado no setor externo da Baía de Paranaguá (**Figura 3**), possui o terminal de embarque para Ilha do Mel, além de praias calmas com pouco hidrodinamismo de correntes e ondas nos meses de verão (quando não há influência de frente fria) (Rezende, Brandini, 1997), atraente ao turismo (Cunico, 2016). A amplitude máxima de marés no CEP é de 2,2 metros em regime semidiurno (Marone & Camargo 1994 *apud* Pellizzari 2005). O tempo de residência da água no CEP varia em torno de 3,5 dias (FUNPAR 1997 *apud* Marone 2007) havendo grande aporte água doce e a circulação residual (Camargo 1998 *apud* Pellizzari 2005). O ponto amostral foi a Praia do Canto das Pedras, região entre marés bastante antropizada, próxima também às desembocaduras do Rio Emboguaçu, Rio Maciel e principalmente Rio Perequê.

A gamboa do Perequê, possui 2.6 km de extensão e capta esgoto doméstico principalmente ao longo de seu trecho superior (Lana *et al.*, 1989), a rede de esgoto do município de Pontal do Paraná recebe, e trata cerca de 25,2% da população (CUNICO, 2016). Ao lado da Praia do Canto das Pedras (**Figura 3**), sua desembocadura serve como porto de pesca artesanal (Lana *et al.*, 1989) e único acesso às principais marinas do Balneário de Pontal do Sul e do porto de embarque para a Ilha do Mel, registrando frequente tráfego de pequenas e médias embarcações (Camargo *et al.* 1996). A observação desta estrutura foi fator primordial para a escolha do ponto de coleta de água para cultivo de bactéria ambiental, corroborado pelas

análises preliminares realizadas no ano de 2021 e nas observações sobre a balneabilidade publicadas pelo Zoneamento Ecológico Econômico (Cunico 2016).

Ponto amostral de macroalgas

Os espécimes algais foram coletados na ilha do Farol (**Figura 3**), localizada no município de Matinhos, entre duas áreas conhecidas de recreação sazonal, que recebem matéria orgânica de efluentes irregulares não tratados, um fenômeno amplificado durante a temporada turística (verão, entre os meses de dezembro a fevereiro) do Balneário de Caiobá (Cunico, 2016). O aporte de sedimento proveniente da Baía de Guaratuba mais ao sul, a urbanização e eutrofização nas proximidades influenciam as condições físico-químicas formando bancos de algas verdes (Ulvales) oportunistas em algumas épocas do ano, além dos 139 táxons (pertencentes aos três grandes grupos de macroalgas) descritos por Pellizzari *et al.* (2014). Foram coletadas espécies conspícuas no entorno da ilha, representantes dos grupos Chlorophyta, Ochrophyta (Phaeophyceae) e Rhodophyta.

A Ilha Rasa (25°15' e 25°30' S e 48°20' e 48°30' O) possui área de 10,5 Km² e altitude máxima de 40m, pertencente a APA de Guaraqueçaba (Fischer, Colley, 2005), uma planície arenosa permeada pelas baías de Paranaguá e Laranjeiras (**Figura 3**). Apresenta biodiversidade composta basicamente por espécies ameaçadas (Cunico, 2016), e cobertura vegetal caracterizada por manguezais, campos salinos e restingas (Fischer, Colley, 2005). A principal atividade econômica da Ilha é extrativista, por meio de pesca artesanal, coleta de organismos marinhos de interesse gastronômico e extração de madeira (Abbud, 2011; Cunico, 2016). Apresenta expansão de atividade turística e de recreação ainda com baixo impacto ambiental, porém com crescimento desordenado (Cunico, 2016). Foram coletadas na Ilha Rasa amostras de *G. brasilienses* (Chlorophyta), por ser uma espécie promissora, baseado em estudos com bioativos desenvolvidos (Cassolato et al. 2008; Nasatto et al, 2016; Duarte-Nosedá et al. 2021)

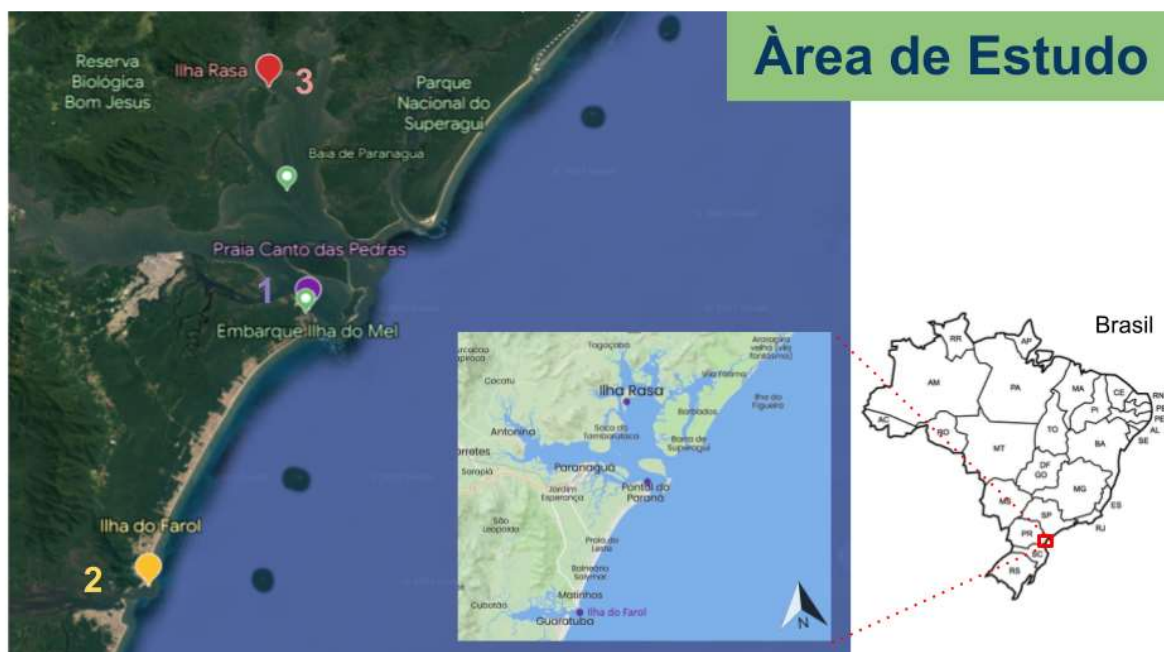


Figura 3. Locais de amostragem no litoral do Paraná, 1- Local de amostragem de cepas de *E.coli* ambiental: Canto das Pedras - Pontal do Sul, desembocadura de rios e trânsito de embarcações de pequeno e médio porte. Amostragem de macroalgas: 2- Ilha do Farol (Matinhos), ilha próxima a área de urbanização, com acesso turístico sazonal; 3- Ilha Rasa (Guaraqueçaba), Baía das Laranjeiras, unidade de conservação com impacto de comunidades locais e turismo não organizado. Fonte: Google Landsat/ Copernicus (Data SIO, NOAA, U.S) Data das Imagens: 14/12/2015 - Escala: 20km|Câmera: 154km. Ferramenta: Google Earth.

Coleta de água estuarina para isolamento de E. coli ambiental

A coleta de água para isolamento de *E. coli* aconteceu nos meses de agosto e setembro de 2022, momento em que o protocolo para isolamento foi definido. Optou-se pelo trecho de saída da gamboa do estuário, cujas amostragens piloto (3 repetições, 3 locais diferentes, 7 datas aleatórias durante os meses de março a julho) demonstraram maior presença de *E. coli* comparado às outras localidades nesta área. Foram coletadas amostras em triplicata de 300 mL acondicionadas em caixas térmicas contendo gelo em gel, e levadas imediatamente ao laboratório.

Análises da qualidade da água estuarina para isolamento de *Enterobacteriaceae*

De cada amostra, foram extraídas duas duplicatas (alíquotas) de 100mL, as quais foram analisadas pelo teste Colilert® em cartelas Quanti-tray 2000 (Idexx) para confirmar a presença de *E. coli*.

As amostras de água foram inicialmente analisadas pelo método Colilert® T-18 com substrato cromogênico específico para *E.coli* em cartelas "Quanti-tray" 2000 posteriormente seladas com *Sealer*® 2000, com Kit IDEXX. Uma característica específica dos coliformes é a enzima-galactosidase, que pode ser detectada utilizando-se o substrato ONPG (o-nitrofenol galactopiranosídeo), que confere aos coliformes uma coloração amarelada, tornando possível a contagem de coliformes totais utilizando-se a mesma amostra que foi usada para mensurar índices específicos de *E.coli*. Esta por sua vez, pode ser detectada pela produção de glucuronidase, que cliva em 10 umbeliferil-glucuronide (MUG), resultando em fluorescência sob luz ultravioleta (Pellizzari 2010).

Foi utilizada uma diluição de 100%, ou seja, 100 mL de amostra do local para uma ampola do substrato cromogênico Colilert®-18. O substrato foi adicionado, e a amostra foi delicadamente homogeneizada com movimentos circulares até a completa dissolução do substrato (meio de cultura com marcador enzimático). Posteriormente a mistura foi despejada em cartelas específicas, as quais passaram por seladora do mesmo fabricante das cartelas, para distribuição uniforme das amostras nos lóculos.

O Colilert® é um método colorimétrico e estatístico onde o índice de contaminação é calculado pela presença ou ausência das células bacterianas nos lóculos da cartela. As cartelas utilizadas possuem 97 lóculos, divididos em 49 lóculos grandes – volume de 1,3 mL - e 48 pequenos – volume de 0,3 mL - que são utilizados para conversão em tabela específica para estimativa dos valores de contaminação, expressos em número mais provável por 100 mL (NMP/100 mL). Neste estudo, procurou-se obter nas cartelas o maior índice de contaminação possível para posterior crescimento e isolamento das bactérias de uma amostra em meio sólido.

Após a selagem, as cartelas foram incubadas em câmara de germinação com temperatura controlada (BOD Marconi) a $\pm 36^{\circ}\text{C}$ durante 20 horas. Após o tempo de incubação, a reação enzimática nas amostras com presença de coliformes totais foi a coloração amarelada. As amostras com presença de *E.coli* apresentaram fluorescência azulada sob lâmpada ultravioleta.

Os lóculos que reagiram para amarelo foram marcados, e os que apresentaram luminescência sob luz UV remarcados, identificando a presença de *E.coli*. Após a

marcação das cartelas, os lóculos que apresentaram fluorescência e alteração de cor já marcados, foram contabilizados e interpretados com auxílio de Tabela do kit Idexx (nexo 2), seguindo método pré-estabelecido pelo fabricante. Os índices foram expressos em NMP/100 mL (número mais provável de *E.coli* por 100 mL de água), uma vez que o método é um teste de probabilidade de presença e ausência das cepas, que não determina a densidade celular propriamente dita, e sim estima índices em NMP.

A partir das amostras que testaram impróprias pelo teste acima descrito (segundo Resolução Conama 274/2000) foram retiradas outras réplicas de 100 mL, filtradas e então inoculadas em placas de petri (n=3) contendo meio de cultura sólido MacConkey (Kasvi) (**Figura 4**).



Figura 4. Meios sólidos potenciais e seletivos para *E. coli*. A: Crescimento bacteriano em meio Ágar Sangue; B: crescimento bacteriano em meio MacConkey. (Fonte:https://www1.ibb.unesp.br/Home/Departamentos/MicrobiologiaeImunologia/5_aula_enterobacteriaceae.pdf)

Isolamento de cepas de Bactéria Ambiental

Após confirmação pelo método Colilert®, a alíquota restante da amostra da água do mar foi filtrada em bomba a vácuo, utilizando-se filtro de membrana nitrato de celulose 11306- 47-N, de poro tamanho 0.45µm. O filtro foi retirado e depositado em

placa de Petri esterilizada, onde foi umedecido com 1mL de água destilada e homogeneizado com auxílio de alça de Drigalski. A solução resultante foi transferida para placas de Petri contendo meio MacConkey (Kasvi) e então mantida em estufa bacteriológica - BOD (SL 101- SOLAB) a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

Após o crescimento bacteriano, uma colônia com coloração rosácea e com crescimento isolado, foi retirada e adicionada a um tubo de ensaio com 1mL de solução salina (NaCl 0,85%) e submetida ao teste de coloração de Gram para confirmar presença de bacilos Gram-negativos. Posteriormente foi realizada nova semeadura em placas contendo meio MacConkey, incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e novo teste de coloração Gram (**Figura 5**). Após repicagens seriadas, as amostras cultivadas seguiram para o Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparo de DNA do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul- UCS.

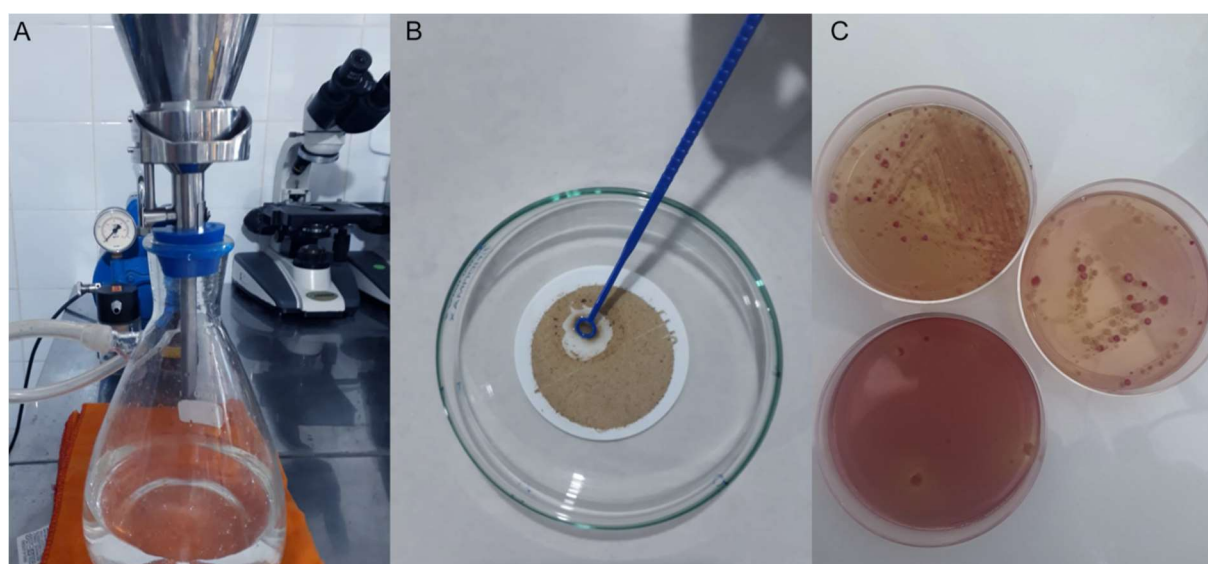


Figura 5: Etapas para concentração e seleção de bacilos Gram-negativos: A. Filtração em bomba a vácuo. B. Diluição e homogeneização do residual do filtro para a semeadura das placas. C. Formação de colônias em meio MacConkey.

Coleta de Biomassa e Processamento das amostras de macroalgas

Espécies de macroalgas representativas dos três grandes grupos foram coletadas: *S. cymosum* C. Agardh, *P. acanthophora* (E.C.Oliveira & Coll) Santiañez 2020, *Ulva* sp. *G. brasiliensis* Pellizzari, Oliveira & Yokoya 2013 foi coletada na Ilha

Rasa, APA de Guaraqueçaba, em agosto de 2022 (vide prancha de imagens do hábito geral das espécies algais em **Anexo 1** - A, B e C).

O material biológico coletado em 2017 foi triado e lavado com água do mar, visando eliminar possíveis epífitas e sedimentos. No laboratório (LAQUAMAR) as espécies algais foram enxaguadas por três vezes, consecutivamente, com água destilada e deionizada, e posteriormente congeladas. No momento que antecedeu a produção de extratos, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Algas Marinhas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de São Paulo (IB-USP), laboratório colaborador, onde a biomassa algal foi dividida, individualmente, em frações de 500g e liofilizada por 48h.

A biomassa liofilizada resultante foi enviada novamente ao LAQUAMAR para processamento, onde foi triturada e pulverizada em almofariz com auxílio de pistilo. O material resultante foi armazenado em dessecador com sílica, com a devida identificação da espécie e localidade, até o momento da extração.

Preparação dos Extratos algais para os testes antibacterianos

Extrato Metanólico

A biomassa algal liofilizada foi eluída no solvente metanol PA (SYNTH) na proporção de 80 mL de solvente para cada 5g de biomassa, em 5 repetições (n=5). A mistura foi acondicionada em um frasco tipo béquer, ao abrigo de luz, em temperatura ambiente por 24 horas. Após, realizou-se a filtração em filtro de fibra celulósica. (**Figura 6**).

O extrato resultante da filtração foi depositado em outro béquer e mantido em capela de exaustão a 25°C até evaporação total do solvente. O procedimento foi repetido 3 vezes em dias consecutivos. O extrato bruto resultante da evaporação foi armazenado em tubos tipo Falcon previamente pesados. Os frascos foram identificados e armazenados em freezer a -15°C. A biomassa resultante foi utilizada para extração aquosa.

Extrato Aquoso

À biomassa algal resultante do processo de extração metanólica, foram adicionados 160mL de água Milli-Q® (*Direct Water Purification System*) Realizou-se autoclavagem por 15 minutos em pressão igual a (1,5 kgf/cm²) e posterior filtragem em filtro de fibra celulósica comercial (Marca: Melitta, REF 103), o extrato foi mantido em estufa a 45° até a evaporação total da água. O extrato bruto resultante foi transferido para tubos tipo Falcon etiquetados e pesados previamente. O extrato resultante foi armazenado em freezer a -15°C. O modelo metodológico utilizado encontra-se esquematizado na **Figura 7**.



Figura 6: Procedimento de filtração do extrato metanólico das macroalgas marinhas. Realizado no mês de setembro de 2022.

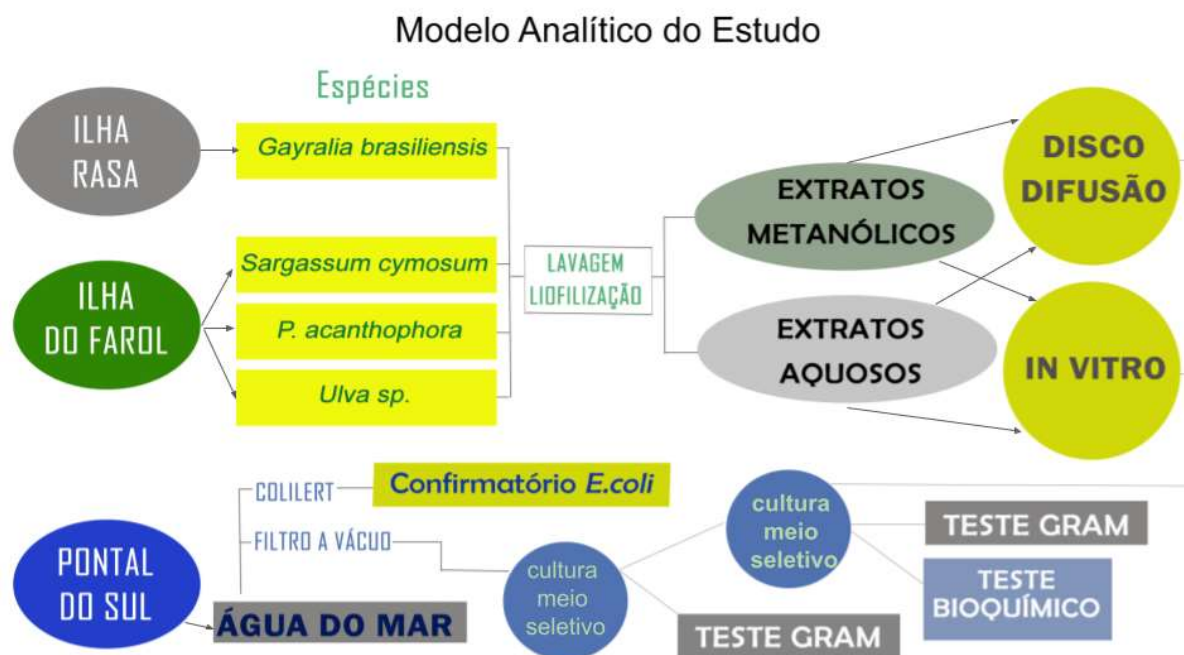


Figura 7. Modelo analítico demonstrando todas as etapas da pesquisa realizada durante os anos 2021-2023, visando atestar a capacidade antibacteriana de extratos de macroalgas conspícuas de ilhas do litoral paranaense.

Antibiogramas

Preparo do Inóculo Bacteriano

Inicialmente, uma alíquota do crescimento bacteriano de cada amostra (bactérias isoladas do ambiente e da linhagem de referência) foi transferida individualmente, para uma placa de Petri contendo meio BHI (*Brain Heart Infusion*). As placas foram incubadas a 37°C por um período de 18 a 24 horas a 35±2°C. Após, foram selecionadas três colônias e estas foram diluídas em solução salina (0,85%) até obtenção do padrão de turbidez 0,5 da escala de McFarland.

Antibiograma por Disco Difusão

Para realização do antibiograma, um *swab* foi imerso na diluição bacteriana (com padrão de turbidez 0,5 da escala de McFarland) e semeado por toda a superfície do meio de cultura da placa de Petri (150 mm) contendo o meio Ágar Mueller Hinton. Os discos, contendo o antimicrobiano foram inseridos no meio de cultura já inoculado com o auxílio de uma pinça e dispostos a uma distância de 3cm de distância um do

outro. As placas foram incubadas a 37°C por um período de 18 a 24 horas a 35±2°C em câmara tipo BOD® (Marconi). A leitura do diâmetro dos halos foi realizada com o auxílio de paquímetro digital de fibra de carbono (Nobrand). Para a interpretação dos resultados utilizou-se como referência os critérios do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2021). Inicialmente, realizou-se um antibiograma preliminar utilizando-se discos (CEFAR) contendo os seguintes antimicrobianos impregnados: penicilina (PEN 10 µg) rifampicina (RFC 3 µg), gentamicina (GEN 10 µg); azitromicina (AZI 15 µg), amoxicilina (AMC 3 µg), eritromicina (ERI 15 µg), neomicina (NEO 30 µg), além de DMSO a 10% como controle negativo contra bactéria (s) isolada (s) do ambiente. Depois, realizou-se outro antibiograma contra bactéria ambiental cultivada e uma linhagem de referência de *E. coli* (ATCC - *American Type Culture Collection* 25922), foram utilizados discos contendo antimicrobianos comercializados indicados em estudos para *E. coli*: ampicilina (AMP 10 µg), ciprofloxacina (CIP 5 µg), nitrofurantoína (NIT 300 µg), tetraciclina (TET 30 µg), cefalotina (CFL 30 µg), gentamicina (GEN 10 µg), penicilina (PEN 10µg) e ofloxacina (OFX 5 µg) (Esmerino et al., 2003; Carvalho, 2006).

Para os extratos, inicialmente preparou-se a solução mãe, onde uma alíquota de 5 mg de cada extrato bruto foi pesada e acondicionada em tubos tipo Eppendorf® e então diluídos em DMSO 10% numa concentração final de 5 mg/mL. Posteriormente aferiu-se o halo de inibição em torno dos discos, utilizando paquímetro digital de fibra de carbono (Nobrand) para determinar o diâmetro em milímetros, o que possibilitou correlacionar aos padrões estabelecidos pelo fabricante.

Antibiograma pelo método de Microdiluição em Caldo Mueller Hinton

Esta etapa dos testes foi realizada no Laboratório de Toxicologia Aplicada e Bioprodutos da Universidade de Caxias do Sul (UCS). Após o preparo do inóculo, realizou-se uma nova diluição até a obtenção da concentração 5x10⁴UFC/mL. Uma alíquota de 5µL da suspensão bacteriana (5x10⁴UFC/mL) foi adicionada ao meio de cultura (caldo Mueller Hinton) contendo diluições seriadas dos extratos metanólicos e aquosos, separadamente, em uma placa de 96 poços.

Posteriormente, as placas foram incubadas de 18 a 24 h a $35\pm 2^\circ\text{C}$. A leitura da absorbância foi realizada utilizando-se um leitor de microplacas (SpectraMax mx^e) a 600 nm. Os resultados foram comparados com controle positivo (meio de cultura contendo solvente com as mesmas diluições utilizadas nos extratos e o inóculo bacteriano). Para o controle negativo, utilizou-se apenas meio de cultura com o solvente de diluição, sem o inóculo e para o controle positivo, utilizou-se meio de cultura com o solvente de diluição e o inóculo bacteriano. Calculou-se a média e desvio padrão das triplicatas analisadas e foram construídos gráficos a partir desses resultados utilizando-se o *software* GraphPad Prisma versão 8.0.1.

Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando o *software* Microsoft Excel para calcular as médias \pm desvios padrão (DP). Após as análises exploratórias para verificação da distribuição dos dados e identificação de outliers, os dados foram compilados e analisados no *software* RStudio (2023). Foram realizadas análises estatísticas (ANOVA com Tukey como post-hoc) estabelecendo alpha de $p=0,05$, utilizando os *softwares* JAMOV (2022) e Vegan (2022). O gráfico foi gerado no *software* Sciplot (2020).

RESULTADOS

Análises da qualidade da água estuarina para isolamento de *Enterobacteriaceae* ambiental

As análises de qualidade da água pelo método Colilert® demonstraram que todas as amostras de água coletadas na praia do Canto das Pedras continham *E. coli* próximo ou maior que 1000 NMP de *E. coli* / 100 mL (tendo sido verificados na cartela 1, 48 lóculos grandes e 49 lóculos pequenos fluorescentes sob luz UV (**Figura 8**), na cartela 2, 48 e 49, e na cartela 3, 48 e 47, resultando (conforme tabela de conversão da *Idexx* vide **Anexo 2**) em 1011.2, 1011.2 e 913.9 NMP de *E.coli* / 100 mL). A amostra 2 apresentou todas as réplicas com valores superiores a 1000 NMP de *E.coli*, sendo então selecionada para crescimento em meio seletivo de *E. coli*.

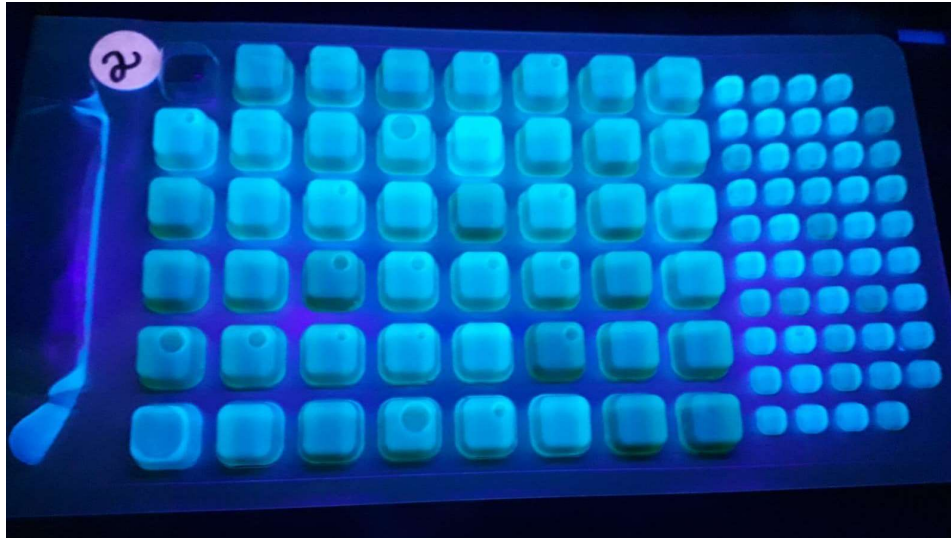


Figura 8: Cartela padrão Quanti-tray usada nas análises pelo Método Colilert®, e posterior leitura de coliformes totais e *E. coli* através de contagem dos lóculos sob câmera UV. As cepas de enterobactérias são detectada pela produção de glucuronidase, que cliva em 10 umbeliferil-glucuronide (MUG), um marcador, resultando em fluorescência sob luz ultra-violeta, e consequentemente resultado positivo.

Isolamento das Cepas de Enterobacteria Ambiental

Após três repicagens em meio McConkey e realização da coloração de Gram concomitante para cada repique (**Figura 9**), verificou-se a presença de bacilos Gram-negativos em todas as sementeiras, classificação na qual se insere *E.coli*, além de outras enterobacterias.

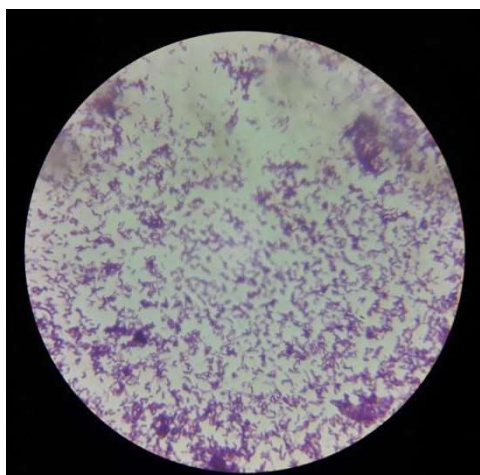


Figura 9: Confirmação de cultura de bacilos Gram-negativos na água do mar coletada em Pontal do Sul (PR) em setembro de 2022, observadas em microscopia óptica após coloração de Gram.

Produção de Extratos

Após a evaporação do solvente usado para extração foi realizada a pesagem das amostras, visando aferir o rendimento dos extratos para cada espécie de macroalga testada (**Tabela 1**). O menor rendimento observado foi na extração metanólica da rodófitica *P. acantophora* e o maior rendimento foi na extração aquosa de *Ulva* sp.

Tabela 1: Rendimento de Extratos Metanólicos e Aquosos, após evaporação, subtraiu-se o peso final, do peso inicial. O resultado foi expresso em g.

Espécie Algal	Extrato Metanólico			Extrato Aquoso		
	Peso inicial (g)	Rendimento (g)	Rendimento (%)	Peso inicial (g)	Rendimento (g)	Rendimento (%)
<i>G. brasiliensis</i>	5	0,401	8	*	*	*
<i>S. cymosum</i>	5	0,566	11,33	5	3,5	61,1
<i>P. acantophora</i>	5	0,339	6,78	5	2,446	48,92
<i>Ulva</i> sp.	5	0,408	8,16	5	2,665	53,3

*Não houve produção de extratos aquosos de *G. brasiliensis*.

Antibiograma por Disco Difusão

Determinação do Controle Positivo

Por meio do antibiograma preliminar verificou-se que os antimicrobianos que geraram maior halo de inibição foram azitromicina, neomicina e Amoxicilina, com 12, 10 e 14mm de diâmetro, respectivamente (**Figura 10 e Tabela 2**).



Figura 10: Antibiograma preliminar utilizando cultivo de enterobactérias ambientais, em disco-difusão. O DMSO ao centro, não impediu o crescimento de bactérias, sendo usado como controle negativo para o antibiograma dos extratos. Os antimicrobianos comercializados com melhor resultados (azitromicina, amoxicilina e neomicina) foram escolhidos como controle positivo.

Este teste preliminar permitiu observar a resistência da enterobactéria ambiental cultivada, frente ao antibacteriano penicilina (**Tabela 2**), onde não houve formação de halo de inibição. Este resultado corroborou a análise da água, contaminada com *E. coli*, e sugere que a enterobactéria ambiental também apresenta resistência aos antimicrobianos testados (testes de acordo com CLSI, 2021).

Tabela 2: Diâmetro do halo de inibição em teste antibiograma preliminar com a enterobactéria ambiental cultivada, obtida de ambiente estuarino no litoral do PR. Onde: PEN = Penicilina, gentamicina= GEN; penicilina =PEN; rifampicina = RFC; azitromicina = AZI, amoxicilina =AMC, Eritromicina = ERI, Neomicina = NEO

Antibiótico	Diâmetro do halo (mm)
AMC	10
AZI	12
ERI	9
NEO	14
PEN	0
RFM	9
DMSO	0

Teste de Suscetibilidade

A partir do segundo antibiograma (**Tabela 3**) infere-se que a enterobactéria ambiental cultivada, a partir das amostras de água estuarina, apresentou maior resistência aos antimicrobianos testados, quando comparada à cepa da linhagem de referência. Ambas as cepas testadas, apresentaram resistência aos antimicrobianos nitrofurantoína e penicilina. A cepa de *E. coli* referência (ATCC 25922) apresentou ainda resistência intermediária contra cefalotina, o que não foi observado nas cepas da enterobactéria ambiental isolada e cultivada.

Tabela 3: Medidas dos halos de inibição resultantes do teste de suscetibilidade com antimicrobianos indicados para classificação do grau de resistência da bactéria ambiental cultivada e linhagem de referência (ATCC25922). Onde: **S**= Sensível, **I** = Intermediário, **R**= Resistente.

	Halo (mm)		Halo (mm)	
Antibacteriano	Linhagem de Referência	Resistência	Cultivado (s) do Ambiente	Resistência
ampicilina (10µg)	18	S	18	S
ciprofloxacina (5µg)	21	S	48	S
nitrofurantoína (300µg)	Não formou halo	R	13	R
cefalotina (30µg)	17	I	33	S
gentamicina	18	S	33	S
ofloxacina (5µg)	23	S	21	S
penicilina G (10µg)	Não formou halo	R	Não formou halo	R

Extratos Algais: Antibiograma de Difusão em Disco

A partir dos dados de mensuração dos halos de inibição (**Tabela 4**), observou-se que houve atividade antibacteriana de todos os extratos testados em ao menos uma das placas (em triplicata) para *P. acanthophora*, *Ulva* sp., sendo o extrato de *S.*

cymosum, a espécie que apresentou halo de inibição em ambos os tipos de extratos, aquoso e metanólico.

Tabela 4: Medidas dos halos de inibição resultantes do antibiograma com os extratos de algas coletadas na Ilha do Farol – PR.

Antimicrobiano	Diâmetro do Halo de Inibição (mm)
Azitromicina	9,8
Neomicina	8
Amoxicilina	7,5
Extrato Metanólico <i>Ulva</i> sp.	5,1
Extrato Metanólico <i>Phycocalidia acanthophora</i>	6,9
Extrato Metanólico <i>Sargassum cymosum</i>	4,7
Extrato Aquoso de <i>Ulva</i> sp.	0
Extrato Aquoso <i>Phycocalidia acanthophora</i>	0
Extrato Aquoso <i>Sargassum cymosum</i>	5
DMSO 10%	10

Foram formados halos de inibição para o antimicrobiano comercial azitromicina de 9,8 mm, neomicina de 8 mm e 7,5 mm para o antimicrobiano amoxicilina. Na réplica 1, observou-se halo de 4,7 mm para o extrato metanólico de *S. cymosum* e no disco contendo extrato aquoso de *S. cymosum*, 5mm. Em uma das placas foi possível observar halo de inibição de diâmetro 5,1 mm para o extrato metanólico de *Ulva*, e em outra réplica po extrato metanólico de *P. acanthophora* apresentou halo de inibição de 6,9 mm.

Antibiograma pelo método de microdiluição em caldo Muller Hinton

A partir da leitura da absorbância nos testes de microdiluição em caldo, foi possível a criação de gráficos cujo padrão permite observar o perfil de atividade dos

extratos metanólicos e aquosos algais, contra as culturas de enterobactérias ambientais isoladas e cultivadas, e na cepa de referência.

Extratos Aquosos

Os extratos aquosos de *Ulva sp.*, *P. acanthophora* e *S. cymosum* (Figura 11) não apresentaram atividade antibacteriana nas concentrações testadas contra *E. coli* referência e Gram-negativos isolados do ambiente. As concentrações utilizadas em cada extrato foram diferentes, devido à diferente solubilidade de cada extrato. Utilizou-se a máxima concentração obtida para cada um.

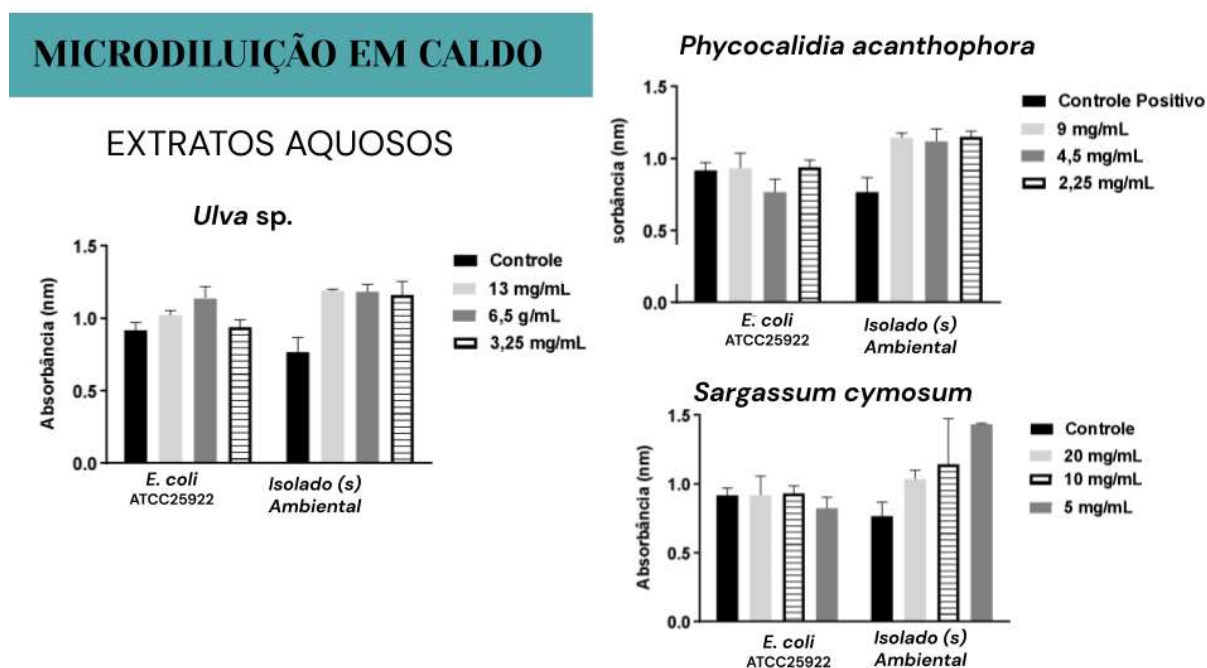


Figura 11: Leitura de absorbância para diferentes concentrações de extratos aquosos de *Ulva sp.* (previamente *U. fasciata*) (Chlorophyta), *P. acanthophora* (Rhodophyta) e *S. cymosum* (Phaophyceae), coletada na Ilha do Farol, município de Matinhos, litoral paranaense. Quanto menor a absorbância, maior a inibição bacteriana.

Extratos Metanólicos

O extrato metanólico de *Ulva sp.* apresentou, em média, a melhor atividade antibacteriana, sendo que reduziu a atividade bacteriana de ambas as linhagens, e em todas as concentrações testadas. Este dados foi interpretado pelas menores leituras de absorbâncias, nas maiores concentrações de extrato testadas, reduziu a

viabilidade celular da cultura de enterobactéria ambiental em até 70,4%, e em 68,2% contra a linhagem de referência (**Figura 12**).

MICRODILUIÇÃO EM CALDO

EXTRATOS METANÓLICOS

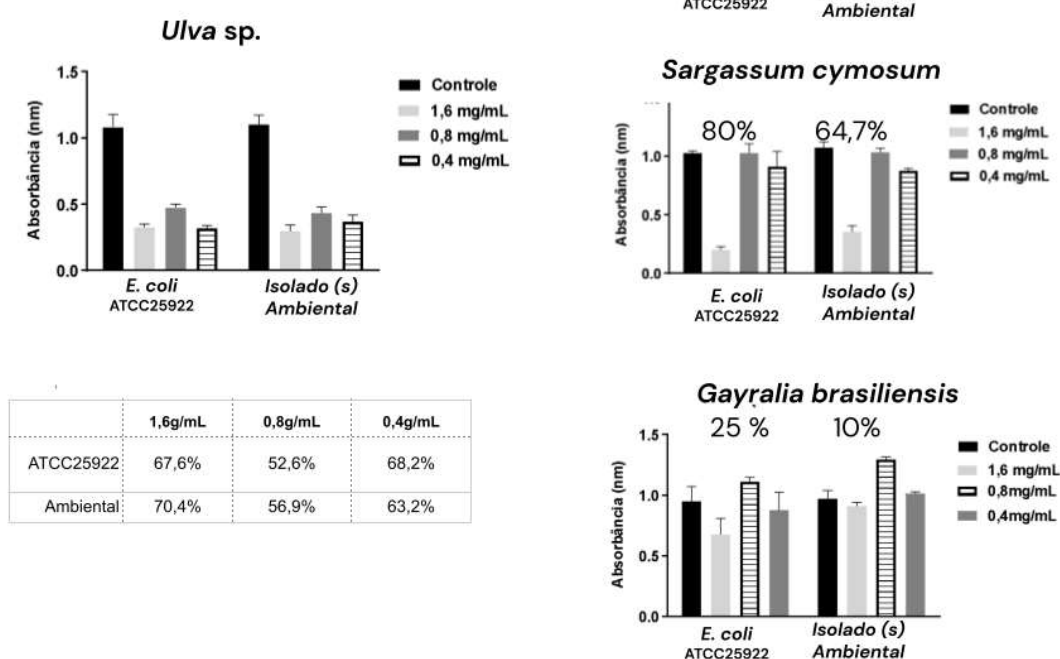


Figura 12: Leitura de absorbância para distintas concentrações de extratos metanólicos de *Ulva sp.* (previamente *U. fasciata*) (Chlorophyta), *P. acanthophora* (Rhodophyta) e *S. cymosum* (Phaophyceae), coletada na Ilha do Farol, litoral paranaense. Os valores em destaque, referem-se à porcentagem de inibição observada. (Quanto menor a absorbância, maior a inibição bacteriana).

Todos os extratos algais apresentaram atividade antibacteriana na maior concentração testada. *Ulva sp.* apresentou atividade antibacteriana em todas as concentrações testadas, e para ambas as culturas bacterianas utilizadas. *P. acanthophora* causou redução na viabilidade celular apenas na maior concentração (1,6 mg/mL) do extrato metanólico, mas apresentou as maiores taxas de inibição do estudo, inibindo 90,8% do isolado de enterobactéria ambiental e 74,2% da cepa de

referência. A taxa média de inibição na concentração 1,6mg/mL do extrato metanólico de *S. cymosum*, foi de 80% para a cepa de *E. coli* de referência, e de 64,7% para o (s) isolado (s) de enterobactéria ambiental. (**Figura 12**).

Já o extrato metanólico da macroalga *G. brasiliensis* apresentou baixa atividade antimicrobiana comparado aos outros extratos. Comparando os dados de absorvâncias em relação ao controle positivo, na maior concentração testada (1,6mg/mL), a espécie apresentou uma taxa média de 25% de controle inibitório frente à cepa de referência, e de apenas 10% contra o(s) isolado (s) de enterobactéria ambiental.

Análise Estatística

A análise de variância (ANOVA) estão expressos na **Tabela 5**, onde demonstra-se que o nível de significância ($\alpha = 0,05$) foi de $p = >0,01$, indicando, portanto, a distinção entre as amostras avaliadas.

Tabela 5: Resultado da análise de variâncias (ANOVA). Df: Graus de Liberdade; Sum Sq: Soma dos Quadrados; Mean Sq: Quadrado Médio; F value: Estatística F; Pr(>F): Valor p. Fonte: Vegan (2022).

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
conc\$'Espécie Algal'	3	3.573	1.1911	155.16	<2e-16
conc\$'Concentração (mg.mL)'	2	3.347	1.6737	218.02	<2e-16
conc\$'Espécie Algal': :conc\$'Concentração (mg.mL)'	6	1.958	3.264	42.52	<2e-16
Residuals	58	445	77		

conc\$'Espécie Algal' ***

conc\$'Concentração (mg.mL)' ***

conc\$'Espécie Algal':
conc\$'Concentração (mg.mL)' ***

Residuals

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

2 observations deleted due to missingness

A análise estatística univariada permitiu a classificação por significância expressa no gráfico (**Figura 13**). A margem de erro calculada através da relação entre desvios-padrão das médias, demonstra que as amostras apresentam comportamento de inibição diferente. *Ulva* sp. se distingue das demais amostras uma vez que apresenta baixos valores de absorbância (maior atividade antibacteriana), assim como *G. brasiliensis*, que apresenta os maiores valores de absorbância e, portanto, menor atividade antibacteriana. Os extratos de *P. acanthophora* e *S. cymosum* apresentam similaridade nos resultados das médias de absorbância, nesses extratos a atividade antibacteriana ocorre apenas na maior concentração utilizada (1.6mg/mL).

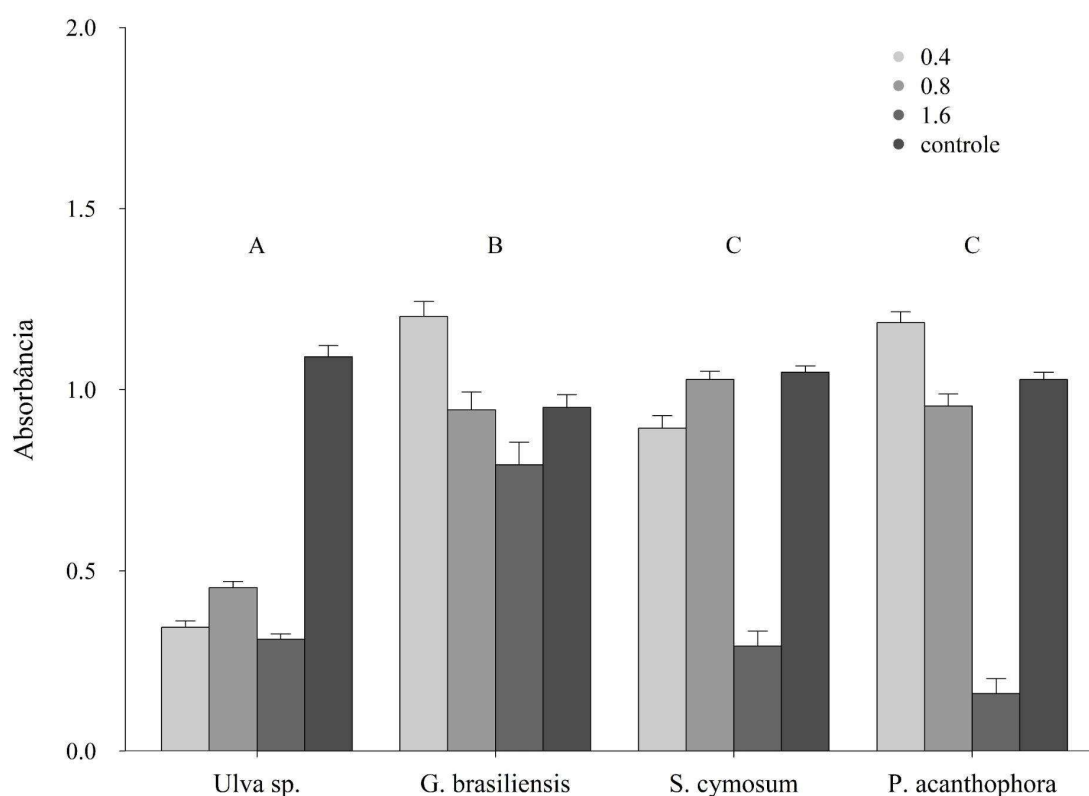


Figura 13: Análise univariada e classificação por significância. O extrato de *Ulva* sp. apresentou comportamento distinto dos demais extratos, assim como *G. brasiliensis*. Os extratos de *P. acanthophora* e *S. cymosum* apresentaram similaridade nos resultados. A margem de erro foi expressa nas barras acima das colunas.

DISCUSSÃO

As macroalgas marinhas alvo deste estudo são resistentes e bem adaptadas a variações amplas ambientais, e a diversos estressores abióticos, resistência associada ao metabolismo secundário, pela síntese de uma gama de compostos bioquímicos defensivos; e por isso muitas espécies destes gêneros, estão sendo sugeridas como promissoras fontes de compostos bioativos, incluso de ação antibacteriana (Choi, 2010; Bhuyar *et al.*, 2020; Schania e Chasani, 2021). Um possível nicho de compostos bioativos de origem natural como de macroalgas, abre novos panoramas para uso terapêutico de infecções e outras necessidades farmacológicas, podendo simplificar processos, baratear o custo de medicamentos e oferecer alternativas sustentáveis de baixo impacto residual.

Ulva, um gênero conspícuo, oportunista, de alto crescimento e cosmopolita, apresentou as melhores atividades antibacterianas médias nas concentrações testadas, sendo, portanto, nosso melhor candidato para estudos futuros, mais detalhados, de bioprospecção e ou biorremediação. Dentre todos os extratos de macroalgas testados aqui por microdiluição, somente os extratos metanólicos causaram redução significativa nas absorbâncias, ou seja, apresentaram potencial inibitório contra a cepa bacteriana da linhagem de referência (*E. coli* ATCC 25922) e contra o (s) isolado (s) de enterobactéria ambiental, sugerindo que compostos antimicrobianos podem ser encontrados nas quatro espécies de algas marinhas testadas.

O extrato de *Ulva* sp. apresentou baixas absorbâncias, e conseqüentemente alta inibição, em todas as concentrações testadas, tanto para o (s) isolado (s) do ambiente, quanto para a cepa laboratorial usada como controle (ATCC 25922), sendo, portanto, a melhor candidata para estudos futuros contra *E. coli*, como já reportado por Alves *et al.* (2016). A análise das variâncias da amostra (**Figura 13**), demonstra que os desvios e a homogeneidade dos resultados, fazem deste extrato o resultado mais robusto com relação à atividade antibacteriana. Sob a maior concentração de extrato testada (1.6 mg/mL), o extrato de *P. acanthophora* apresentou as menores absorbâncias registradas no estudo para o(s) isolado(s) de enterobactéria ambiental, e para a cepa de *E. coli* referência (ATCC 25922), 0.1 (Dp 0,005) e 0.25 nm (Dp 0,014), respectivamente. Similarmente, *Sargassum*, na maior concentração de extrato

apresentou baixas absorvâncias (entre 0.17 (Dp 0,03) e 0.25 nm (Dp 0,05)), ou seja, maior potencial inibitório para ambas as bactérias. O desvio padrão para estes extratos são maiores, indicando que a repetição dos testes na mesma concentração poderia fornecer um resultado mais robusto. Assim como os extratos de *Sargassum cymosum*, *Gayralia brasiliensis* apresentou maior atividade antibacteriana frente às cepas de referência (ATCC 25922), diferente dos extratos de *Phycocladia acanthophora* que apresentou maior inibição contra o (s) isolado (s) ambiental cultivado. O extrato de *Ulva sp.* apresentou maior constância, mantendo médias similares para ambas as bactérias testadas: 0,365 nm para cepas ambientais e 0,372 (Dp 0,04) para cepas de referência (Dp 0,03).

Ulva é uma espécie oportunista e que ocorre em alta biomassa em muitos locais, se desenvolvem amplamente em ambientes eutrofizados (Pellizzari *et al.*, 2014). É comumente associada a interações com compostos nitrogenados, o que sugere uma relação com microrganismos. Alves *et al.* (2016) testou cinco macroalgas marinhas dos três grupos do litoral de pernambuco, os extratos metanólicos de *Ulva lactuca* e *Caulerpa racemosa* apresentaram-se como os mais ativos contra todas as bactérias testadas (Gram-positivas e Gram-negativas), incluso *E. coli*. Tremblay (2017) criou ambientes controlados em laboratório, simulando as condições de regiões estuarinas no Canadá, e analisou a capacidade de biorremediação de *Ulva lactuca* para remover nutrientes dissolvidos assim como acompanhou o crescimento da alga em um ambiente considerado eutrofizado. A macroalga não apresentou dificuldades de desenvolvimento e ainda absorveu maior quantidade de nitrato, sendo apontada como promissora para a Biorremediação. Da mesma forma Elizondo-González (2018) em Baja Califórnia, fez experimentos com farinhas de *Ulva lactuca* em cultivos de camarão, apresentando eficiência na remoção de compostos de nitrogênio e fósforo, além de melhorar o crescimento dos indivíduos cultivados, apresentou aumento de propriedades nutracêuticas, como carotenóides.

Algas do gênero *Sargassum* parecem ser amplamente estudadas quanto aos seus metabólitos secundários, talvez por sua distribuição abundante em diversas condições ambientais. Assim como nossa pesquisa, outros estudos atribuem a esse gênero, bioatividade frente à bactérias. Elizondo-González (2018) cita estudos com *Sargassum sp.* com resultados positivos para implantação de aquacultura multitrófica integrada em cultivos de camarão. Scania e Chasani (2021) reportaram que extratos

de *Sargassum polycystum* foi o extrato mais eficiente na inibição de crescimento de *E. coli*. Na Índia, Sutharshan (2021) testou diferentes concentrações de extratos etanólicos e metanólicos de *Sargassum* sp. e obteve resultados positivos para ação antibacteriana contra *Escherichia coli* resistente a medicamentos, *E. coli* uropatogênica e *E. coli* produtora de verotoxina. Shanmughapriya em 2008 reportou que a família Sargassaceae apresentava atividade microbiana prevalente em relação às outras famílias de macroalgas. O extrato de *Sargassum dentifolium* com o solvente diclorometano, testado por Shanab (2007) pelo método de disco-difusão, apresentou halos de 11mm para *E. coli*. Não foi possível observar atividade antibacteriana em todas as réplicas do antibiograma por disco difusão, mas os extratos aquosos e metanólico apresentaram halos de inibição em pelo menos uma das placas do antibiograma. Adicionalmente à ação inibitória sobre o crescimento bacteriano reportada, o ácido algínico, polissacarídeo presente na parede celular de algas pardas com amplo uso comercial, e no caso de estudos com *Sargassum* (Chen 2013, Parsaeimehr, 2013) foi reportada potente ação antiinflamatória e antioxidante. Sobre as concentrações testadas, obtivemos resultados positivos para ação antibacteriana em concentrações muito inferiores aos estudos observados, a exemplo disso, Coronel *et al.* (2020) apontou atividade antimicrobiana do extrato de *Sargassum filipendula* do Brasil a partir da concentração de 156,25 mg/mL, obtendo atividade antimicrobiana contra 100% das cepas testadas sendo mais eficiente contra a cepa de *E. coli*.

Devido a sua limitada distribuição, poucos estudos reportam atividades antibacterianas de Rhodophytas, não sendo encontrados dados que corroborem o excelente resultado obtido na maior concentração de *P. acanthophora*, que diferente de *S. cymosum* e *Ulva* sp. apresentou taxas de inibição maiores para a bactéria ambiental cultivada.

Considerando *Gayralia brasiliensis* este resultado surpreende, pois é amplamente reportado em literatura que a espécie detém vários estudos promissores de bioatividade. Análises bioquímicas preliminares suportam os usos nutracêuticos e cosméticos de *G. brasiliensis* (Pellizzari & Reis 2011), bem como bioatividade contra o vírus herpes simplex (Cassolato *et al.* 2008), características reológicas (Nasatto 2013) e propriedades antioxidantes (Bernardi *et al.* 2016). Além disso, polissacarídeos obtidos de *G. brasiliensis* (metilcelulose e heterorhamnana sulfatada) são sugeridos para diversas aplicações industriais resultando em patente depositada por Nasatto *et*

al. (2013) e Nasatto (2016). Recentemente, foi obtida a patente de invenção referente à propriedade de modular a neovascularização baseada em polissacarídeos sulfatados de *G. brasiliensis* (Duarte-Nosedá *et al.* 2021). Todas essas aplicações e os diversos usos dessa espécie favorecem cultivos em maior escala (Pellizzari *et al.* 2007 e 2008).

Sendo assim, futuramente sugere-se realizar novas extrações utilizando maior biomassa de *G. brasiliensis* a fim de obter distintas concentrações, dentre as já obtidas. Pois acredita-se, com base nos estudos pretéritos citados acima, que *Gayralia* apresente bons resultados de potencial antibacteriano contra as duas cepas estudadas. Independente destes resultados futuros, podemos inferir no sentido de aplicabilidades das espécies que: como *Ulva* é uma espécie oportunista e que ocorre em alta biomassa em muitos locais, seu uso como antibacteriano poderia ser centrado em biorremediação. Já *G. brasiliensis*, cuja biomassa é sazonal, não tão abundante e onde sua biomassa dependeria de cultivos extensivos, o uso dos seus extratos naturais poderia ser focado em biotividades e processos biotecnológicos mais nobres, como os já mencionados. Considerando a presente contribuição, sugere-se também que princípios ativos de *Ulva* e *Phycocalidia* poderiam ser aplicados igualmente à biorremediação ambiental (Tremblay-Gratton *et al.* 2017, Saad *et al.* 2021), assim como em empreendimentos baseados em aquacultura multitrófica integrada (Brown *et al.* 2011, Elionzo-González *et al.* 2018).

Os compostos bioativos presentes nas diferentes espécies macroalgais, distribuídas dentre os três grandes grupos, conferem a estes organismos uma grande diversidade bioquímica e metabólica, o que possibilita diferentes atividades biológicas, e ainda dependente de distintas extrações de acordo com sua polaridade (Mattos, 2013). Este estudo indica que o rendimento dos extratos não está diretamente ligado ao potencial antibacteriano, porém os metabólitos extraídos podem funcionar como diferentes princípios ativos. Lu *et al.* (2018) testou atividade antibacteriana de extratos etanólicos das algas: *Laminaria japonica*, *Sargassum horneri*, *Gracilária sp.* e *Porphyra dentata* contra culturas de *E.coli* resistente, e não obteve resultados satisfatórios, porém, os mesmos extratos potencializaram a atividade de eritromicina contra as mesmas cepas, demonstrando que os bioativos extraídos podem apresentar diferentes mecanismos de amplificação, interação e ou potencialização de outros fármacos.

Perez *et al.* (2016) em uma compilação sugerem que as substâncias isoladas de algas verdes, marrons e vermelhas que apresentam potente atividade antimicrobiana pertencem às classes químicas dos polissacarídeos, ácidos graxos, florotaninos, pigmentos, lectinas, alcaloides, terpenoides e compostos halogenados. Em um estudo mais específico, Amorin *et al.* (2012) estudaram os efeitos antimicrobianos de polissacarídeo sulfatado bruto extraídos da rodófito *Gracilaria ornata* no Ceará, NE do Brasil, frente ao crescimento de várias cepas de bactérias (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogens*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis* e *Salmonella typhi*), apenas o crescimento de *E. coli* foi inibido. Lima-Filho *et al.* (2002) sugeriram que a atividade antimicrobiana depende de dois fatores básicos: a espécie algal e o sucesso no método de extração.

A depender dos compostos bioativos disponíveis nas espécies e de selecionar o extrator e a concentração ideal em busca de resultados satisfatórios. Corroborando essa hipótese, Shanmughapriya (2008) testou extratos metanólicos e obteve resultados positivos para atividade antimicrobiana, diferente do observado nos extratos etanólicos do mesmo estudo, sugerindo que o método de extração tem efeito definitivo no isolamento de bioativos. A extração realizada por Sutharshan (2021), metanólica, exibiu maior atividade antibacteriana contra as bactérias patogênicas humanas testadas. Em contraposição, Shima (2015) testou extratos metanólicos de *Sargassum vulgare* coletadas no Mar Vermelho (Egito) e não obteve resultados positivos frente a diversas bactérias multirresistentes, incluso *E. coli*, diferente dos resultados para extratos etanólicos da mesma espécie e outros extratos metanólicos das demais espécies algais apresentadas no estudo. Ainda em Lima-filho (2002) que analisou extratos de hexano, clorofórmio e etanol de seis macroalgas marinhas dos grupos vermelhas e verdes na costa norte do Ceará (Brasil) contra cepas patogênicas Gram-negativas, dentre elas *E. coli*. Nenhum dos extratos testados apresentou atividade antibacteriana para *E. coli*, os autores evidenciam a importância do método e substância de extração, principalmente quando extratos lipossolúveis têm apresentado propriedades farmacológicas. Da mesma forma, Shanmughapriya (2008) sugere que solventes orgânicos têm maior eficiência do que métodos à base de água em atividade antimicrobiana de macroalgas, o que pode explicar porque os extratos aquosos não apresentaram atividade bacteriana. Coronel *et al.* (2020) sugeriu que as

atividades antimicrobianas de algas são atribuídas aos compostos fenólicos e a algumas proteínas. Uma vez que o método de extração por metanol pode precipitar e degradar proteínas, indica que os compostos bioativos responsáveis pela atividade antibacteriana, são os fenólicos. Solventes aquosos costumam extrair proteínas e carboidratos. Possivelmente a presença da classe dos compostos fenólicos nos extratos metanólicos das espécies de algas testadas é que proporciona o seu potencial antimicrobiano *in vitro* contra as bactérias, e pretende-se realizar testes futuros de compostos fenólicos nos extratos promissores, uma vez que a polaridade do metanol possibilita extração de compostos fenólicos (Barbi, 2016). Nagayama *et al.* (2002) extraíram florotaninos de feófitas, e obtiveram sucesso na ação bactericida *in vitro* contra bactérias resistentes. Dentre os distintos solventes utilizados em estudos desta natureza, o metanol 80% é a solução mais indicada para a extração de compostos fenólicos, compostos reportados em literatura como um dos principais compostos bioativos responsáveis pela inibição do crescimento bacteriano (Vieira *et al.*, 2010). Metabólitos secundários da classe dos terpenóides, florotaninas e fenol são compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana de algas marinhas na presença de microrganismos patogênicos.

Nos antibiogramas por disco difusão, não foi possível observar atividade inibitória para todos os extratos algais que apresentaram resultado positivo para atividade antibiótica nos testes *in vitro*. Os extratos metanólicos de *Phycocladia acanthophora*, *Ulva sp.* e *Sargassum cymosum* apresentaram halo de inibição em pelo menos uma das triplicatas testadas contra a bactéria ambiental cultivada. Divergindo dos demais extratos aquosos que não formaram halos de inibição, o extrato macroalgal de *Sargassum cymosum* exibiu atividade inibitória, porém em apenas uma das triplicatas. Esse resultado pode ser atribuído às concentrações em que foram produzidos e sugere mais testes com diferentes discos, uma vez que não se conhece a polaridade e perfil químico dos extratos produzidos, consequentemente podendo interferir na propagação pelo meio. Bhuyar (2020) e Coronel (2020) apontam efeito antimicrobiano com concentrações muito superiores às usadas no presente estudo (a partir de 50mg/mL e 19mg/mL respectivamente). Bhuyar descreveu que a concentração mínima para bactérias Gram-negativas foi 25µg/mL, e que para inibir *E. coli* em disco difusão, o halo de inibição variou conforme a concentração, 3mm na concentração 50mg/mL até 10mm na concentração 100mg/mL. Sutharshan (2021) listou resultados a partir da concentração de 50 µg/mL de extratos metanólicos de

Sargassum sp. frente à cepas de *E. coli* resistentes. Fayzi *et al.* 2020, investigou a atividade antibacteriana de extratos metanólicos de quatro macroalgas abundantes na costa norte do Marrocos, *Bifurcaria bifurcata*, *Corallina elongata*, *Corallina officinalis* e *Ulva fasciata* contra quatro bactérias patogênicas humanas, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. *B. bifurcata* (Phaeophyceae) apresentou os melhores resultados, *U. fasciata* (Chlorophyceae) contra todos os microrganismos testados, exceto *P. aeruginosa*, e os demais extratos não apresentaram atividade antibacteriana em disco difusão. Quando testados *in vitro*, os mesmos extratos apresentaram atividades nas maiores concentrações testadas (0,11 mg/mL a 7,5 mg/mL), da mesma forma que foi observado em nossos resultados. A concentração mínima inibitória comum para os extratos de macroalgas testados neste estudo, para ambas as bactérias submetidas ao antibiograma, foi de 1.6 mg/mL, ou seja, foi necessária uma maior concentração de extratos para exercer ação antimicrobiana, comparado com as concentrações de estudos semelhantes realizados, fica implícita a necessidade de extratos mais concentrados.

A descoberta de antibióticos nas décadas de 30-40 possibilitou um declínio considerável das taxas de mortalidade relacionadas a infecções bacterianas (Butler & Buss 2005), porém, o uso exacerbado e indiscriminado destes compostos, aumentou o surgimento de novas infecções (Coronel *et al.*, 2020), e de microrganismos resistentes aos antimicrobianos disponíveis comercializados, que são muitas vezes de origem sintética (Scania & Chasani, 2021). Desta forma, é crescente a demanda por novas drogas, principalmente de origem natural (Shanmughapriya *et al.*, 2008).

O contato do ser humano com bactérias livres e resistentes no ambiente, aumenta os riscos de infecções. Rima *et al.* 2022 reporta que biofilmes bacterianos participam de 65% das doenças microbianas e 80% das infecções crônicas e busca alternativas para efetivamente prevenir ou tratar infecções associadas ao biofilme. Flemming (2008) atenta para a contaminação microbiana que afeta a segurança do abastecimento de frutos do mar, bem como o uso comercial e recreativo das águas marinhas costeiras. Pommepuy *et al.* (2005) demonstra que a contaminação das áreas costeiras pode ser por escoamento de água, rio ou emissário de esgoto e que a oferta de nutrientes, luz e temperatura facultam a permanência de enterobactérias como *E.coli*. A contaminação por *E.coli* costuma desaparecer proporcionalmente ao fluxo dos rios, quando em ambiente estuarino, quando as cargas fecais diminuem

(Fiandrino *et al.* 2003 *apud* Pommepuy *et al.* 2005). A permanência dos resultados positivos para *E. coli* durante os meses observados na praia do Canto das Pedras, pode demonstrar a frequência de efluentes sendo despejados no Rio, que afetará diversos balneários ao longo do município de Pontal do Paraná. Ainda que a cepa Gram-negativa cultivada do meio ambiente estuarino tenha apresentado resistência pelo menos um antimicrobiano no teste de suscetibilidade, Youn *et al.* (2011) atribui resistência aos microrganismos que apresentem crescimento mediante três ou mais antimicrobianos de diferentes classes. Considerando as discussões acerca da coexistência de microrganismos e antibacterianos no ambiente, a permanência de níveis consideráveis de bactérias na praia analisada, pode viabilizar o surgimento de bactérias resistentes (Pommepuy, 2005; Guardabassi *et al.*, 2010).

O crescimento exponencial da aquicultura (FAO, 2022) acaba por gerar uma demanda por técnicas e modelos de fazendas sustentáveis e com qualidade e segurança para os consumidores. Não obstante, com o desenvolvimento das regiões costeiras, a qualidade da água passa a ser uma preocupação de nível público. Devido à natureza sintética de fármacos e inibidores do crescimento de patógenos, tendo em vista a ameaça constante da resistência bacteriana, procura-se soluções de baixa toxicidade, biodegradáveis, ecológicas (Fayzi *et al.* 2020) e de custo favorável para biorremediação ou como alternativa para princípios ativos no tratamento de doenças bacterianas. As algas possuem um ciclo de geração considerado curto, e portanto facilmente cultivadas, além de apresentarem grande diversidade, disponibilidade e produtividade, o que possibilita seu uso como fonte de metabólitos (Lu *et al.*, 2018). Uma vantagem no uso de macroalgas em ambientes de cultivo, é a implantação da aquicultura multitrófica integrada (introdução de organismos que alterem os níveis tróficos, ao passo que degradam compostos resultantes de eutrofização), onde a alga serve como alimento e ainda participa dos processos de ciclagem e renovação da qualidade da água. Os resultados deste estudo levantam informações relevantes para possíveis experimentos envolvendo as quatro espécies de macroalgas investigadas em processos de biorremediação de ambientes contaminados por *E. coli*. Novas pesquisas devem focar na análise da composição química dos extratos e isolamento dos componentes ativos como moléculas puras, e por fim, usar estes bioativos isoladamente ou em combinação com outros antimicrobianos para, além das funções biomédicas, melhorar a qualidade de áreas agrícolas cultiváveis, ou de pequenos

corpos d'água costeiras contaminadas, como forma de biorremediação. Este estudo fornece uma linha de base para esta nova abordagem.

CONCLUSÕES

- O protocolo estabelecido para cultivo de bactérias ambientais foi eficiente e deve continuar até a identificação a nível de espécie;
- Os solventes utilizados para extração podem influenciar na atividade antibacteriana devido aos diferentes bioativos extraídos de acordo com sua polaridade, desta forma os extratos metanólicos foram os mais promissores para a abordagem utilizada;
- Analisar o perfil de suscetibilidade e resistência à antibacterianos de *Enterobacteriaceae* cultivada do ambiente por meio de antibiograma por disco difusão;
- Este estudo corrobora evidências de que as macroalgas marinhas possuem compostos de ação antimicrobiana eficazes, promissores na busca por novos princípios bioativos, incluso antibacterianos, além de excelentes bioindicadores de qualidade ambiental;
- Os resultados gerados poderão ser base para novas linhas de pesquisa potenciais: uso de extratos antibacterianos algais com potencial de biorremediação em fazendas de aquicultura; biorremediação em agricultura vegetal; e biorremediação de pequenos corpos d'água costeiros.

REFERÊNCIAS

ABBUD, MC. (2011) Projeto de Participação Comunitária na Conservação da ilha Rasa, APA de Guaraqueçaba, Paraná. Trabalho de Conclusão de Curso. MBA em Gestão Ambiental. Departamento de Economia Rural e Extensão, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

ALVES RCC, FIGUEIREDO DAS MERCÊS PF, ARRUDA DE SOUZA IR, ALVES DE ALMEIDA CM, SANT'ANNA DA SILVA AP, DE MENEZES LIMA VL, CORREIA MTS, VANUSA DA SILVA M & GOMES DA SILVA A. (2016). Antimicrobial activity of seaweeds of Pernambuco, northeastern coast of Brazil. *African Journal of Microbiology Research*. Vol. 10(10), pp. 312-318, DOI: 10.5897/AJMR2015.7616

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. (2012). 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.

ANDRADE, H.M.Q; ROSA, L.P; SOUZA, F.E.S; SILVA, N.F; CABRAL, M.C; TEIXEIRA, D.I.A; (2020) Seaweed Production Potential in the Brazilian Northeast: A Study on the Eastern Coast of the State of Rio Grande do Norte, RN, Brazil. *Sustainability* 2020, 12(3), 780; <https://doi.org/10.3390/su12030780>

ANGULO, J.R; SOARES, C.R; MARONE, E; SOUZA, M.C; ODRESKI, L.L.R; NOENBERG, M.A. (2016). Erosão e Progradação do Litoral Brasileiro. PARANÁ. Página 297. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Dieter Muehe, organizador. – Brasília: MMA. ISBN 85-7738-028-9

ANGULO, RODOLFO JOSÉ; SUZA, MARIA CRISTINA DE; NOERNBERG, MAURÍCIO ALMEIDA. (2020) Anthropic impacts on the morphological and sedimentary processes in the coast of State of Paraná, in Southern Brazil: past and future perspectives. *Journal of Integrated Coastal Zone Management / Revista de Gestão Costeira Integrada* 20(1):5-25. DOI:10.5894/rgci-n197

BARBI, R. C. T. (2016) Extração e quantificação de compostos fenólicos e antioxidantes da chia (*Salvia hispânica* L) usando diferentes concentrações de solventes. 37 f. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso. (Engenharia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão.

BARROS, JA. (2017). Estudo Toxicológico do Efeitos de um Fármaco de Uso Humano (Diclofenac), ao Longo de Uma Cadeia Trófica Simulada em Ambiente Marinho. Dissertação. Mestrado em Toxicologia e Contaminação de Ambientes. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Faculdade de Ciências. Universidade do Porto.

BEIRÃO, A.P.; MARQUES, M.; RUSCHEL, R.R. (2020). O valor do Mar.Uma visão integrada do oceano do Brasil. 2. ed. São Paulo : Essencial Idea Editora. Vários autores. Pag. 177.

BEVERSDORF L.J., BORNSTEIN-FORST S.M. Y MCLELLAN S.L. (2006). The potential for beach sand to serve as a reservoir for *Escherichia coli* and the physical influences on cell die-off. *Appl. Environ. Microbiol.* 102, 1372-1381.

BHUYAR,P; RAHIM,M.H.A; MANIAM, G.P; RAMARAJ, R. (2020) Exploration of bioactive compounds and antibacterial activity of marine blue-green microalgae (*Oscillatoria* sp.) isolated from coastal region of west Malaysia. *SN Applied Sciences* 2:1906 <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03698-8>

BICUDO, CEM., & MENEZES, M. (2010) Introdução: As algas do Brasil. In: FORZZA, RC., org., *et al.* INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTANICO DO RIO DE JANEIRO. Catálogo de plantas e fungos do Brasil [online]. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro. p. 49-60. Vol. 1. ISBN 978-85-8874-242-0.

BIGARELLA, JJ. (2001). Contribuição ao Estudo da Planície Litorânea do Estado do Paraná. *Brazilian Archives of Biology and Technology: An International Journal. Jubilee Volume (1946-2001):* pp65-110, 2001.ISSN 1516-8913. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 1, pp. 75-111.<https://doi.org/10.1590/S1516-89132001000500005>

BROWN, N.; PLAUD, S., & E. STEPHEN (2011). Utilization of waste from a marine recirculating fish culture system as a feed source for the polychaete worm, *Nereis virens*. *Journal Articles.* 5.
DOI:10.1016/j.aquaculture.2011.09.017

BUTLER, M. S; BUSS, A. D; (2006) Natural products — The future scaffolds for novel antibiotics? *Biochemical Pharmacology*, 71pag.919–929.
DOI:10.1016/j.bcp.2005.10.012

CAMARGO, R; MARONE, E & SILVA DIAS, P.L.; (1996) Detecção do sinal de brisa no registro de vento de Pontal do Sul (PR); IX Congresso Brasileiro de Meteorologia; p. 1036-1040.

CARVALHO, EMR (2006). Susceptibilidade de cepas de *E. coli* isoladas de água, camarão e sedimento de viveiros de três fazendas do estado do Ceará a diferentes antimicrobianos. (Dissertação).

CASSOLATO J, NOSEDA M, PUJOL C, PELLIZZARI FM, DAMONTE EB, DUARTE MER (2008) Chemical structure and antiviral activity of the sulfated heterorhamnan isolated from the green seaweed *Gayralia oxysperma*. Carbohydr Res 343:3085-3095

CAVALCANTI, MARIA IRISVALDA LEAL GONDIM. (2021). Macroalgas arribadas da costa brasileira: biodiversidade e potencial de aproveitamento. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente. 183 p. il. São Paulo - SP.

CHOI TS, KANG EJ, KIM JH, KIM KY. 2010.(2010). Effect of salinity on growth and nutrient uptake of *Ulva pertusa* (Chlorophyta) from an eelgrass bed. Algae. Volume 25(1): 17-26.; Article.

DOI: <https://doi.org/10.4490/algae.2010.25.1.017>

CLSI. (2021). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100, 31st ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA

CONAMA (2000). Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000

CORONEL, LINCOLN G et al. (2020). Antimicrobial activity of seaweeds extracts against pathogenic bacteria in aquaculture. Braz. Ap. Sci. Rev, Curitiba, v. 4, n. 3, p. 1192-1205 mai./jun. 2020 ISSN 2595-3621. DOI:10.34115/basrv4n3-036

CMIKOVA, N.; GALOVICOVA, L.; MISKEJE, M.; BOROTOVÁ, P.; KLUZ, M.; KACANIOVÁ, M. (2022) Determination of Antioxidant, Antimicrobial Activity, Heavy Metals and Elements Content of Seaweed Extracts. Plants 2022, 11, 1493. <https://doi.org/10.3390/plants11111493>

CUNICO, CAMILA (Org). (2016) Zoneamento Ecológico Econômico do Estado do Paraná. Curitiba: ITCG, 2016. 352p.: 42cm. ISBN: 978-85-64176-02-7

DIONISIO, L. P. C.; RHEINHEIMER, G.; BORREGO, J. J.; Microbiological pollution of Ria Formosa (South of Portugal). Marine Pollution Bulletin, v.40, n.2, p.186-93, 2000.

DUARTE-NOSEDA ME, BERTÉ SD, NOSEDA MD NASATTO MPL, PELLIZZARI FM, CASSOLATO JEF (2021) Invention Patent: Polissacarídeos sulfatados obtidos de uma macroalga verde marinha com capacidade de modular a neovascularização. BR 102013010819-7 (Deposit 13/05/2013; Issue 03/2021)

ELIONZO-GONZÁLEZ, R; QUIROZ-GUZMÁN, E; ESCOBEDO-FREGOSO,C; MAGALLÓN-SERVIN,P; PEÑA-RODRÍGUEZ,A. (2018). Use of Seaweed *Ulva lactuca* for Water Bioremediation ad as Feed Additive for White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. PeerJ 6:e4459; DOI: 10.7717/peerj.4459

EMBRAPA TERRITORIAL. (2020) Sistema de Inteligência Territorial Estratégica da Macrologística Agropecuária brasileira (SITE-MLog). Campinas, 2020. Disponível em: < www.embrapa.br/macrologistica >.

ENGLEBERT, E.T.; MCDERMOTT, C. KLEINHEINZ,G.T. (2008). Effects of the nuisance algae, *Cladophora*, on *Escherichia coli* at Recreational Beaches in Wisconsin. Departement of Biology and Microbiology, University of Wisconsin Oshkosh. USA.

ESMERINO LA, GONÇALVES, LG, SCHELESKY ME. (2003). Perfil de Sensibilidade antimicrobiana de cepas de *E. coli* isoladas de infecções urinárias comunitárias (2003). Ci. Biol. Saúde 9(1): 3 – 39.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. (2021) Censo Brasileiro de 2021. Rio de Janeiro.

FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>

FAYZI, LAHBIB; ASKARNE, LATIFA; CHERIFI,OUAFA; BOUFOUS, EL HOUSSINE; CHERIFI, KHALIL. (2020). Comparative Antibacterial Activity of Some Selected Seaweed Extracts from Agadir Coastal Regions in Morocco. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2020,9,pp.390-399. DOI: 10.20546/ijc-mas.2020.906.051

FIANDRINO, A., MARTIN Y., GOT, P., BONNEFONT, J.L. & TROUSSELLIER,M. (2003). Bacterial contamination of Mediterranean coastal seawater as affected by riverine inputs: Simulation approach applied to a shellfish breeding area “Thau lagoon”, France. Water Res 37, 1711–1722.

FISCHER, M. L. & COLLEY, E. (2005). Espécie invasora em reservas naturais: caracterização da população de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca - Achatinidae) na Ilha Rasa, Guaraqueçaba, Paraná, Brasil. Biota Neotropica, 5(1), 127–144. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032005000100014>

FLEMING, L.E.; BROAD, K.; CLEMENT, A.; DEWAILLY, E.; ELMIR,S. KNAP, A.;POMPONI, S.A.; SMITH, S.; GABRIELE, H.S.; WALSH, P. (2008). Oceans and Human Health: Emerging Public Health Risks in The Marine Environment. Marine Pollution Bulletin, Volume 53, Issues 10–12, 2006, Pages 545-560. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2006.08.012

FONSECA, J. A. (2016) Aplicação de Algas na Indústria Alimentar e Farmacêutica. Dissertação de Mestrado. Universidade de Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde. Porto.

GASTALHO S, SILVA GJ, RAMOS F. (2014). Antibiotics in aquaculture and bacterial resistance: health care impact. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, v. 3, p. 28-44.

GUARDABASSI L, KRUSE H. (2010). Princípios da utilização prudente e racional de antimicrobianos em animais. In: Guardabassi L, Jensen L, Kruse H (ed) *Guia de Antimicrobianos em Veterinária*, 1st edn. Artmed, Porto Alegre, pp 17-30.

GUIRY M.D. & GUIRY, G.M. (2023) *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>; searched on 30 de abril de 2023.

HOFFMAN S.J.; OOUTERSON K.; ROTIINGEN J-A.; CARS O.; CLIFT C.; RIZVI Z.; ROTBERG F.; TOMSON G.; ZORZET A. (2015). An International Legal Framework to Address Antimicrobial Resistance. *Bulletin of the World Health Organization*. 93 (2): 66.

HOOD JR, WILKINSON JM, CAVANAGH HMA. (2013) Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. *Journal of Essential Oil Research*, v. 15, p. 428-433.

HUSSEIN, H.A.; SYAMSUMIR, D.F; RADZI, S.A.M.; SIONG, J.Y.F.; ZIN, N.A.M.; ABDULLAH, M.A. (2020). Phytochemical Screening, Metabolite Profiling and Enhanced Antimicrobial Activities of Microalgal Crude Extracts in Co-Application with Silver Nanoparticle. *Bioresources and Bioprocessing*. 7:39 DOI: 10.1186/s40643-020-00322-w

ICMBio (2013). *Monitoramento in situ da biodiversidade: Proposta para um Sistema Brasileiro de Monitoramento da Biodiversidade*/Raul Costa Pereira, Fabio de Oliveira Roque, Pedro de Araujo Lima Constantino, José Sabino, Marcio Uehara-Prado. - Brasília/DF: ICMBio, 2013, 61p. 22,5cm - ISBN 978-85-65872-04-1

JESUS, PB; MACHADO, GEM; MUNIZ, RA. (2013). Marine Macroalgae as Indicators of Environmental Impacts in Itacoatiara, Niterói, RJ: subsidies for future environmental monitoring programs. *Caderno de Estudos Geoambientais*. v.04, n.01, p.67-80.

LANA, P.; ALMEIDA, M.; FREITAS, C.A.F.; GUERREIRO-COUTO, E.; CONTI, L.M.P.; GONZALEZ-PERONTI, A.L.; GILES, A.G.; LOPES, M.J.S.; SILVA, M.H.C.; PEDROSO, L.A. (1989). Estrutura espacial de associações macrobênticas sublitorais da gamboa Perequê (Pontal do Sul, Paraná) .*Nerítica*, Pontal do Sul, PR, 4(1/2):119-36.

LANA, P.C.; MARONE, E.; LOPES, R.M; MACHADO, E.C. (2001). The Subtropical Estuarine Complex of Paranaguá Bay, Brazil. *Ecological Studies*, Vol. 144 - U. Seeliger

and B. Kjerfve (eds.) Coastal Marine Ecosystems of Latin America ©Springer· Verlag Berlin Heidelberg 2001.

LIMA-FILHO, J. V. M. *et al.* (2002). Antibacterial Activity Of Extracts Of Six Macroalgae From The Northeastern Brazilian Coast. *Brazilian Journal of Microbiology*. 33:311-313.

LOMARTIRE, S.; GONÇALVES, AMM.; SHIKOV, ALEXANDER N. (2022). An Overview of Potential Seaweed-Derived Bioactive Compounds for Pharmaceutical Applications. *Mar Drugs*. 2022 Feb 15;20(2):141. doi: 10.3390/md20020141. PMID: 35200670; PMCID: PMC8875101.

LU, WEN-JUNG; LIN, HSUAN-JU; HSU, PANG-HUNG; LAI, MARGARET; CHIU, JEN-YU; LIN, HONG-TING VICTOR. (2018). Brown and Red Seaweeds Serve as Potential Efflux Pump Inhibitors for Drug-Resistant *Escherichia coli*. *Hindawi - Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Vol 2019. Article ID 1836982, 12 pages. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/1836982>

MARONE, E. & CAMARGO, R. (1994) Marés Meteorológicas no Litoral do Estado do Paraná. *Nerítica*, Curitiba, v.8(l-2),p.73-85-1994-Editora da UFPR

MARONE, E.; NOENBERG, M.; LAUTERT L.F.; SANTOS, I.; FILL, H.D.; BUBA, H.; MAREDA, M. (2007) Medições de Correntes e Curva Vazão Maré na Baía de Paranaguá, PR. *Boletim Paranaense de Geociências*, n. 60-61, p. 55-64, 2007. Editora UFPR.

MARTÍN-MARTÍN, A., COSTAS, R., VAN LEEUWEN, T., & LÓPEZ-CÓZAR, E. D. (2018, March 18). Evidence of Open Access of scientific publications in Google Scholar: a large-scale analysis. <https://doi.org/10.17605/osf.io/k54uv>

MATTOS, G. (2013) Extração e quantificação de ácidos fenólicos e flavonóides de eugenia pyriformiscambess usando diferentes solventes. Trabalho de conclusão de curso. Campo Mourão.

MIQUELANTE, FA & KOLM, HE. (2011). Microbiological Indicators of Fecal Pollution in The Mouth of Olho D'água Tidal Creek, Paraná: A Subsidy for Monitoring Balneability in Brazil. *Publ. UEPG Biol. Health Sci.*, Ponta Grossa, v.17, n.1, p. 21-35, jan./jun.2011 DOI: 10.5212/Publ.Biologicas.v.17i1.000

MMA (2012) Ministério do Meio Ambiente. Panorama da Conservação dos Ecossistemas Costeiros e Marinhos no Brasil. Brasília. pág. 14 ISBN 978-85-7338-167-8

MMA (2017). Avaliação dos Zoneamentos Ecológico-Econômico Costeiro Elaborados no Brasil. Relatório Final.

MMA (2018). Avaliação dos Zoneamentos Ecológico-econômicos Costeiros elaborados no Brasil - 2018. Relatório Técnico Final .Ministério do Meio Ambiente - MMA, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Universidade do Vale do Itajaí - Univali, Universidade de São Paulo – USP

MORALES M, Team wcdbtRDC, community wgaftRI, Murdoch. eD (2020). *sciplot: Scientific Graphing Functions for Factorial Designs*. R package version 1.2-0, <<https://CRAN.R-project.org/package=sciplot>>.

MOURA, J.F.; CARDOZO, M.; BELO, M.S.S.P.; HACON, S.; SICILIANO, S. (2011). The interface of Public Healthcare With the Health of the Oceans: Proliferation of Disease, Socioeconomic Impacts and Beneficial Relationships. *Ciênc. saúde coletiva* 16 (8) • Ago 2011 • <https://doi.org/10.1590/S1413-81232011000900015>

NAGAYAMA, K.; IWAMURA, Y; SHIBATA, T. HIRAYAMA, I.; NAKAMURA, T. (2002) Bactericidal Activity of Phlorotannins from the Brown Alga *Ecklonia kurome*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* - 50, 889–893
DOI: 10.1093/jac/dkf222

NASATTO PL. (2016) Análises físico-químicas de polissacarídeos: metilcelulose e heteroramnanas sulfatadas de *Gayralia brasiliensis*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, 224p

NASATTO PL, NOSEDA MD, Silveira JLM PELLIZZARI, F. & DUARTE ME (2013) Innovation Patent: Gel de polissacarídeos de *Gayralia brasiliensis* e gel termoestável de polissacarídeos de *Gayralia brasiliensis* complexados com íons, Brasil. BR1020130108170 (Deposit 02/05/2013)

NICOLODI, J.L.; ASMUS, M.; TURRA, A.; POLETTE, M. (2018). Evaluation of Coastal Ecological-Economic Zoning (ZEEC) in Brazil: Methodological Proposal. *Desenvolv. Meio Ambiente*, v. 44, Edição especial: X Encontro Nacional de Gerenciamento Costeiro, p. 378-404, fevereiro 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/dma.v44i0.54865>

OKSANEN J. et al (2022). *Vegan: Community Ecology Package*. R package /version 2.6-4, <<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>>.

OLIVEIRA FILHO, E.C.; HORTA, P.A.; AMANCIO, C.E. & SANT'ANNA, C.L. (2002). Algas e angiospermas marinhas bênticas do litoral brasileiro: diversidade, exploração e conservação. In: Workshop sobre avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da zona costeira e marinha. Relatório Técnico. Brasília: MMA/FNMA/GEF. Campinas, BDT, Fundação André Tosello.

ORTIZ, IC. & GALICIA-JIMÉNEZ, M. (2013). PCTI 129. Calidad Bacteriológica De La Arena De Mar: Caso Puerto Escondido, Oaxaca. Ciencia, Tecnología e Innovación para Desarrollo de México. Categoría Medicina y Ciencias de la Salud. Último acesso em 03 de dezembro de 2022. Disponível em:

<https://pcti.mx/articulos/pcti-129-calidad-bacteriologica-de-la-arena-de-mar-caso-puerto-escondido-oaxaca/>

PEDRINI, AG. (2010). Macroalgas: Uma Introdução à Taxonomia. 1. ed. - Rio de Janeiro: Techical Books, 2010. 153p. /; il. color. ; 23cm. - (Série Flora Marinha do Brasil; v. 1)

PEDRINI, AG. (2013). Macroalgas (Ocrófitas Multicelulares) Marinhas do Brasil. Série Flora Marinha do Brasil - Volume 3 - 1ª Edição. Technical Books Editora, 2013. 180p. / il.color. Rio de Janeiro - RJ. ISBN-13978-8561368289

PELLIZZARI, F.M. (2005) Desenvolvimento das Bases Biológicas e de Técnicas para o Cultivo de Algas Verdes de Talo Monostromático (Chlorophyta) no litoral do Paraná, Sul do Brasil. São Paulo.

PELLIZZARI FM, ABSHER T, YOKOYA NS, OLIVEIRA-FILHO EC (2007) Cultivation of the edible green seaweed *Gayralia* (Chlorophyta) in Southern Brazil. J Appl Phycol 19: 63-69

PELLIZZARI FM, OLIVEIRA EC, YOKOYA NS (2008) Life-history, thallus ontogeny and the effects of temperature, irradiance and salinity on the growth of the edible green seaweed *Gayralia* spp. (Chlorophyta) from southern Brazil. Journal Appl Phycol 20:75-82

PELLIZZARI, F.M. (2010) Relatório Operação Verão, Atividades Anuais Desenvolvidas no Laquamar. Paranaguá, Paraná, Brasil. 131 pp.

PELLIZZARI F & REIS RP (2011) Seaweed cultivation on the Southern and Southeastern Brazilian Coast. Braz J Pharmacogn 21:305-312

PELLIZZARI, F.; BERNARDI, J.; SILVA, E.M.; SILVA, M.C.; YOKOYA, N.S. (2014). Benthic Marine Algae From the Insular Areas of Paraná, Brasil: New Database to Support the Conservation of Marine Ecosystems. Biota Neotropica. 14(2): e20130011. <http://dx.doi.org/10.1590/1676-060320140615183049>

PELLIZZARI, F.; SILVA, M.C.; SILVA, E.M.; MEDEIROS, A.; OLIVEIRA, M.C.; YOKOYA, N.S.; PUPO, D.; ROSA, L.H.; COLEPICOLO, P. (2017). Diversity and spatial distribution of seaweeds in the South Shetland Islands, Antarctica: an updated database for environmental monitoring under climate change scenarios. Polar Biology, 40(8), 1671-1685. DOI 10.1007/s00300-017-2092-5

PELLIZZARI, F.; SINCLAIR, E.. (2020). The Second World Ocean Assessment. Cap.6G Marine plants and macroalgae (Vol. 1, pp. 225-249). United Nations. <https://www.un.org/regularprocess/sites/www.un.org.regularprocess/files/2011859-e-woa-ii-vol-i.pdf>

PELLIZZARI, F., ROSA L.H., AND N. S. YOKOYA (2020) Biogeography of Antarctic Seaweeds Facing Climate Changes. In: Antarctic Seaweeds: Diversity, Adaptation and Ecosystem Services. Iván Gómez • Pirjo Huovinen Editors. Springer Nature. ISBN 978-3-030-39448-6 (eBook). <https://doi.org/10.1007/978-3-030-39448-6>

PEREIRA, L. (2010). As Algas Marinhas e Respectivas Utilidades. Departamento de Botânica- Universidade de Coimbra. Texto baseado na palestra com o mesmo título, integrada na iniciativa “Contam as Plantas”, organizada pelo Departamento de Botânica (FCTUC) e pela Sociedade Broteriana. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/341056597_As_Algas_Marinhas_e_Respectivas_Utilidades

PÉREZ, M.J; FALQUÉ, E; DOMINGUEZ, H. (2016) Antimicrobial Action of Compounds from Marine Seaweed. *Marine Drugs*, 2016, 14, 52; Doi:10.3390/md14030052

POMMEPUY, M.; HERVIO-HEATH, D. CAPRAIS; M.P.; GURMELOUN, M; LeSAUX, J.C.; Le GUYADER, F. (2005) Fecal Contamination in Coastal Areas: An engineering approach. *Oceans and Health*, p.331-359, 2005. DOI: 10.1007/0-387-23709-7_14

PRATES, A. P. L.; GONÇALVES, M. A.; ROSA, M. R. Panorama de conservação dos ecossistemas costeiros e marinhos no Brasil. Brasília: MMA, 2012. 152 p.

RAVEN, PH; EVERT, RF; CURTS. (2001) *Biologia Vegetal* 6 ed. Rio do Janeiro: Guanabara Koogan. 2001. 906p.

R Core Team (2023). *_R: A Language and Environment for Statistical. Computing_*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <<https://www.R-project.org/>>.

REPSOLD, T.A.R.; DALLA, M.D.B.; MARIANO, J.S. (2020). Infecção Marinha: Abordagem na Atenção Primária. *Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade*. Rio de Janeiro, 2020 Jan-Dez; 15(42):1939. DOI: [https://doi.org/10.5712/rbmfc15\(42\)1939](https://doi.org/10.5712/rbmfc15(42)1939)

REZENDE, KÁTIA REGINA VIEIRA DE; BRANDINI, FREDERICO PEREIRA. (1997). Variação Sazonal do Fitoplâncton na Zona de Arrebentação da Praia de Pontal do Sul (Paranaguá - Paraná). *Nerítica*, Curitiba, v. 11, p. 49-62, 1997. Editora da UFPR

RIMA, M.; TROGNON, J.; LATAPIE, L.; CHBANI, A.; ROQUES, C.; EL GARAH, F. Seaweed Extracts: (2022). A Promising Source of Antibiofilm Agents with Distinct Mechanisms of Action against *Pseudomonas aeruginosa*. *Mar. Drugs* 2022, 20, 92. <https://doi.org/10.3390/md20020092>

ROSA, L.H; MACHADO, K.M.G; JACOB, C.C; CAPELARI, M; ROSA, C.A; ZANI, C.L. (2003). Screening of Brazilian Basidiomycetes for Antimicrobial Activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 98(7): 967-974, October.

SAAD, E.M; ELSHAARAWY, R.F; MAHMOUD, S.A ; EL-MOSELHY, K.M. (2021). New *Ulva lactuca* Algae Based Chitosan Bio-composites for Bioremediation of Cd(II) Ions. *Journal of Bioresources and Bioproducts* . *Journal of Bioresources and Bioproducts*, Volume 6, Issue 3,2021. pages 223-242. ISSN 2369-9698. DOI: 10.1016/j.jobab.2021.04.002.

SCANIA, ALIFAH EVI; CHASANI, ABDUL RAZAQ. (June 2021) The Antibacterial Effect of Phenolic Compounds from Three Species of Marine Macroalgae. *Biodiversitas*. Volume 22, Number 6, Pages: 3412-3417..

SGANZERLA, CLÉBER; DALZUCHIO, MARINA SCHMIDT; PRASS, GABRIEL DOS SANTOS; PÉRICO, EDUARDO. (2021). Effects of Urbanization on the Fauna of Odonata on the Coast of Southern Brazil. *Biota Neotropica* 21(1): e20201122, 2021. ISSN 1676-0611. DOI: <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2020-1122>

SHAFAY, SHIMAA M; ALI, AMH S.; EL-SHEEKH, MOSTAFAM. (2016) Antimicrobial activity of some seaweeds species from Red sea, against multidrug resistant bacteria. *Egyptian Journal of Aquatic Research* 42, 65–74. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejar.2015.11.006>

SHANMUGHAPRIYA, S; MANILAL, A; SUJITH, S; SELVIN, J; KIRAN, G.S; NATARAJASEENIVASAN, K. (2008) Antimicrobial Activity of Seaweeds Extracts Against Multiresistant Pathogens. *Annals of Microbiology*, 58 (3) 535-541

SHANNON, EMER; ABU-GHANNAM, NISSREEN. (2016). Antibacterial Derivatives of Marine Algae: An Overview of Pharmacological Mechanism and Applications. *Mar. Drugs* 2016, 14, 81; doi:10.3390/md14040081

SHANAB SMM. (2007). Antioxidant and antibiotic activities of some seaweeds (egyptian isolates). *International Journal Of Agriculture and Biology*, v. 9, p.

SILVA, PATRÍCIA MIRANDA. (2009) Atividades Biológicas de Extratos de Algas Marinhas Brasileiras. Dissertação. Universidade de São Paulo. Instituto de Química. São Paulo.

SILVA, VANESSA FEITOSA VIANA DA. (2015) Caracterização Fenotípica e molecular de *Escherichia coli* Isoladas de Amostras de Água do Mar da REgião Costeira do Estado de São Paulo, Brasil. Dissertação. Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. USP. São Paulo.

SPRUNG, JULIAN. (2002) Algae: A Problem Solver Guide. Oceanographic Series - Two Little Fishies, Inc. DBA Ricordea Publishing. Miami, Florida - USA. Pág.43.

SRIDHAR, K.R. & VIDYAVATHI, N. (1991) Antimicrobial Activity of Seaweed. Acta Hydrochim. Hydrobiol. 19 (1991) 5, 455-496.

SUN, DONGCHANG; WANG, BING; ZHU, LIHONG. (2013). Advances in molecular mechanisms of bacterial resistance caused by stress-induced transfer of resistance genes--a review. Wei Sheng Wu Xue Bao. 2013 Jul 4;53(7):641-7. PMID: 24195370

SUTHARSHAN, G. S.; ROY, ANITHA; SIVAPERUMAL, PITCHIAH; LAKSHMI, T. (2021). Antibacterial Activity of *Sargassum* Species Seaweed Extracts against *E. coli*. Sutharshan et al.; JPRI, 33(62A): 534-541. JPRI.77719. DOI: 10.9734/JPRI/2021/v33i62A35699

JAMOVI. The jamovi project (2022). (Version 2.3) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>.

TORRES, M.; BARROS, MP.; CAMPOS, SARA C.G.; PINTO, E.; RAJAMANI, S.; SAYRE, RICHARD T. (2008). Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. Ecotoxicology and Environmental Safety. Volume 71, Issue 1. Pages 1-15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.05.009>

TRABULSI, LR; ALTERTHUM, F.. (2005). Microbiologia. 4.Ed.- São Paulo: Editora Atheneu.

TREMBLAY-GRATTON, A; BOUSSIN, J-C; TAMIGNEAUX, É; VANDENBERG, G.W; LE FRANÇOIS, N.R. (2017). Bioremediation efficiency of *Palmaria palmata* and *Ulva lactuca* for use in a fully recirculated cold-seawater naturalistic exhibit: effect of high NO₃ and PO₄ concentrations and temperature on growth and nutrient uptake. J Appl Phycol. DOI: 10.1007/s10811-017-1333-x

VENTOLA, CL. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. P T. 2015 Apr;40(4):277-83. PMID: 25859123; PMCID: PMC4378521.

VICENTE, T.F.L.; FÉLIX, C.; FÉLIX, R.; VALENTÃO, P.; LEMOS, M.F.L. (2023). Seaweed as a Natural Source against Phytopathogenic Bacteria. Mar. Drugs 2023, 21, 23. <https://doi.org/10.3390/md21010023>

VIEIRA, M.; HUGHES, A.F.S; GIL, V.; VAZ, A.B.M.; ALVES, T.M.A.; ZANI, C.L.; ROSA, C.A. ROSA, L.H. (2012). Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae) *Can J Microbiol.* 58(1):54-66. doi: 10.1139/w11-105.

WALKER, B., BARRETT, S., POLASKY, S., GALAZ, V., FOLKE, C., EENGSTROM, G., et al. 2009. Environment. Looming global-scale failures and missing institutions. *Science* 325, 1345–1346. DOI: 10.1126/science.1175325

WANG, GANG; SINGH, MINERVA; WANG, JIAQIU; XIAO, LING; GUAN, DONGSHENG. 2021. Effects of marine pollution, climate, and tidal range on biomass and sediment organic carbon in Chinese mangrove forests. *CATENA*, Volume 202. ISSN 0341-8162. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.catena.2021.105270>.

WATSON S.B. & CRUZ-RIVERA, E. (2003). Ecologia química de algas: uma introdução à edição especial. *Phycologia*, 42: 319-323.

WHITMAN, L. R.; SHIVELY, D.A.; PAWLINK, H.; NEVERS, M. B.; BYAPPANAHALLI, M.N; 2003. Occurrence *Escherichia coli* and *Enterococci* in *Cladophora* (Chlorophyta) in Nearshore Water and Beach Sand of Lake Michigan. Lake Michigan Ecological Research Station, United States Geological Survey, Porter, Indiana.

Calumpong H., Kirkman H., Yokoya NS. Hall-Spencer JM., Osman NAR, Park C, Pellizzari F. & E. Sinclair. Cap.6G Marine plants and macroalgae (Vol. 1, pp. 225-249). IN: WOA (2021). The Second World Ocean Assessment. United Nations. <https://www.un.org/regularprocess/sites/www.un.org.regularprocess/files/2011859-e-woa-ii-vol-i.pdf>

YONG, L; SUN, S; PU, X; YANG, Y; ZHU, F; ZHANG, S; XU, N. (2018) Evaluation of Antimicrobial Activities of Seaweed Resources from Zhejiang Coast, China. *Sustainability* 10, 2158.

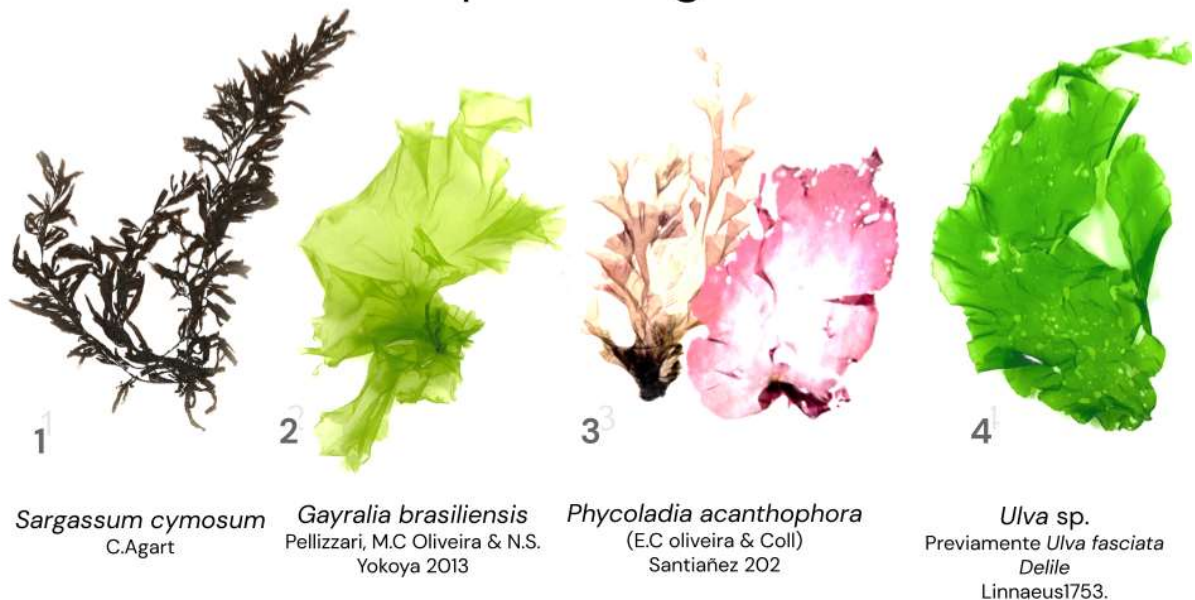
YOUN J., YOON J.W., KOO H.C., LIM S.K. & PARK Y.H. (2011). Prevalence and antimicrogram of *Staphylococcus intermedius* group isolates from veterinary staff, companion animals, and the environment in veterinary hospitals in Korea. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23:268-274

ANEXOS

Anexo 1:

1A) Espécies de Macroalgas utilizadas no presente estudo. 1. *Sargassum cymosum* C. Agardh (Phaeophyceae); 2. *Gayralia brasiliensis* Pellizzari, M.C.Oliveira & N.S.Yokoya 2013 (Chlorophyta); 3. *Phycocalidia acanthophora* (E.C.Oliveira & Coll) Santiañez 2020 (Rhodophyta); 4. *Ulva* sp. previamente (*Ulva fasciata* Delile) Linnaeus 1753 (Chlorophyta).

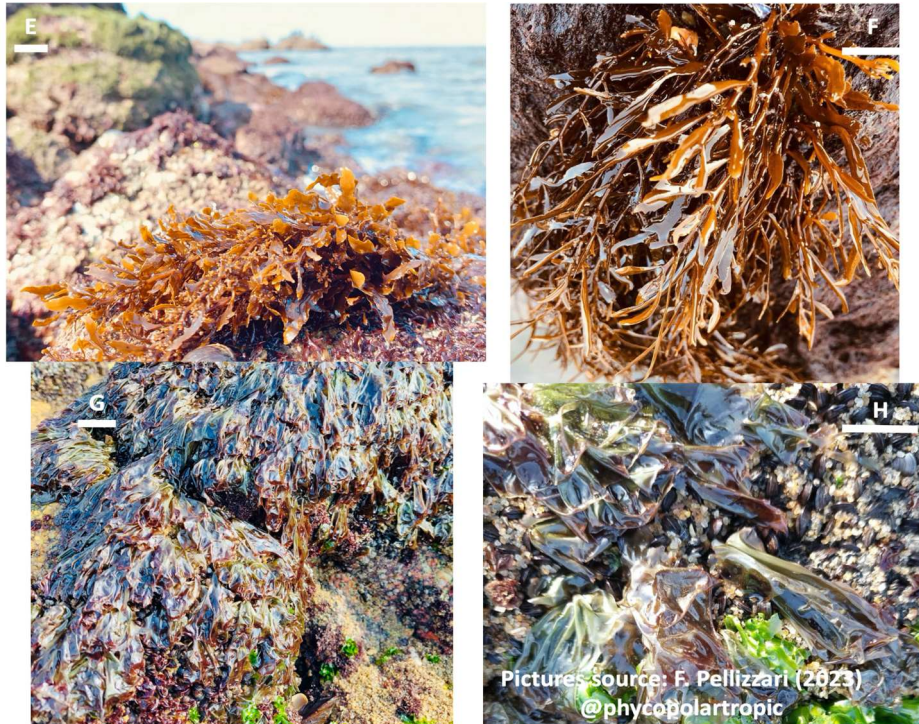
Espécies Algais



1B) Imagens das clorófitas utilizadas no estudo, sendo: A, B - *Ulva sp.* hábito geral no habitat natural e exemplar herborizado em exsicata; C, D - *Gayralia brasiliensis* hábito geral. Escala = 1cm.



1C) E, F - *Sargassum cymosum* (hábito geral e detalhe do espécime no costão); G,H - *Phycocalidia* (*Pyropia*) *acantophora*, espécimes na zona entre marés do costão rochoso, seu habitat natural. Escala = 1cm.



Anexo 2.

Tabela fornecida pelo fabricante Indexx para leitura e interpretação de resultados do método Quanti-Tray para análise de água, usando Colilert®-18

# Large Wells Positive	IDEXX Quanti-Tray®/2000 MPN Table (per 100ml)																								
	# Small Wells Positive																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0	<1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	13.0	14.1	15.1	16.1	17.1	18.1	19.1	20.2	21.2	22.2	23.3	24.3
1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.1	8.1	9.1	10.1	11.1	12.1	13.2	14.2	15.2	16.2	17.3	18.3	19.3	20.4	21.4	22.4	23.5	24.5	25.6
2	2.0	3.0	4.1	5.1	6.1	7.1	8.1	9.2	10.2	11.2	12.2	13.3	14.3	15.4	16.4	17.4	18.5	19.5	20.6	21.6	22.7	23.7	24.8	25.8	26.9
3	3.1	4.1	5.1	6.1	7.2	8.2	9.2	10.3	11.3	12.3	13.4	14.4	15.4	16.5	17.5	18.6	19.6	20.7	21.8	22.8	23.8	24.9	25.9	26.9	28.0
4	4.1	5.2	6.2	7.2	8.3	9.3	10.4	11.4	12.5	13.5	14.6	15.6	16.7	17.8	18.8	19.9	21.0	22.0	23.1	24.2	25.3	26.4	27.5	28.5	29.6
5	5.2	6.3	7.3	8.4	9.4	10.5	11.5	12.6	13.7	14.7	15.8	16.9	17.9	19.0	20.1	21.2	22.2	23.3	24.4	25.5	26.6	27.7	28.8	29.9	31.0
6	6.3	7.4	8.4	9.5	10.6	11.6	12.7	13.8	14.9	16.0	17.0	18.1	19.2	20.3	21.4	22.5	23.6	24.7	25.8	26.9	28.0	29.1	30.2	31.3	32.4
7	7.5	8.5	9.6	10.7	11.8	12.9	13.9	15.0	16.1	17.2	18.3	19.4	20.5	21.6	22.7	23.8	24.9	26.0	27.1	28.3	29.4	30.5	31.6	32.8	34.0
8	8.6	9.7	10.8	11.9	13.0	14.1	15.2	16.3	17.4	18.5	19.6	20.7	21.8	22.9	24.1	25.2	26.3	27.4	28.6	29.7	30.8	32.0	33.1	34.3	35.4
9	9.8	10.9	12.0	13.1	14.2	15.3	16.4	17.6	18.7	19.8	20.9	22.0	23.2	24.3	25.4	26.6	27.7	28.9	30.0	31.2	32.3	33.5	34.6	35.8	37.0
10	11.0	12.1	13.2	14.4	15.5	16.6	17.7	18.9	20.0	21.1	22.3	23.4	24.6	25.7	26.9	28.0	29.2	30.3	31.5	32.7	33.8	35.0	36.2	37.4	38.6
11	12.2	13.4	14.5	15.6	16.8	17.9	19.1	20.2	21.4	22.5	23.7	24.8	26.0	27.2	28.3	29.5	30.7	31.9	33.0	34.2	35.4	36.6	37.8	39.0	40.2
12	13.5	14.6	15.8	16.9	18.1	19.3	20.4	21.6	22.8	23.9	25.1	26.3	27.5	28.6	29.8	31.0	32.2	33.4	34.6	35.8	37.0	38.2	39.5	40.7	41.9
13	14.8	16.0	17.1	18.3	19.5	20.6	21.8	23.0	24.2	25.4	26.6	27.8	29.0	30.2	31.4	32.6	33.8	35.0	36.2	37.5	38.7	39.9	41.2	42.4	43.6
14	16.1	17.3	18.5	19.7	20.9	22.1	23.3	24.5	25.7	26.9	28.1	29.3	30.5	31.7	33.0	34.2	35.4	36.7	37.9	39.1	40.4	41.6	42.9	44.2	45.4
15	17.5	18.7	19.9	21.1	22.3	23.5	24.7	25.9	27.2	28.4	29.6	30.9	32.1	33.3	34.6	35.8	37.1	38.4	39.6	40.9	42.2	43.4	44.7	46.0	47.3
16	18.9	20.1	21.3	22.6	23.8	25.0	26.2	27.5	28.7	30.0	31.2	32.5	33.7	35.0	36.3	37.5	38.8	40.1	41.4	42.7	44.0	45.3	46.6	47.9	49.2
17	20.3	21.6	22.8	24.1	25.3	26.6	27.8	29.1	30.3	31.6	32.9	34.1	35.4	36.7	38.0	39.3	40.6	41.9	43.2	44.5	45.9	47.2	48.5	49.8	51.2
18	21.8	23.1	24.3	25.6	26.9	28.1	29.4	30.7	32.0	33.3	34.6	35.9	37.2	38.5	39.8	41.1	42.4	43.8	45.1	46.5	47.8	49.2	50.5	51.9	53.2
19	23.3	24.6	25.9	27.2	28.5	29.8	31.1	32.4	33.7	35.0	36.3	37.6	39.0	40.3	41.6	43.0	44.3	45.7	47.1	48.4	49.8	51.2	52.6	54.0	55.4
20	24.9	26.2	27.5	28.8	30.1	31.5	32.8	34.1	35.4	36.8	38.1	39.5	40.8	42.2	43.5	44.9	46.3	47.7	49.1	50.5	51.9	53.3	54.7	56.1	57.5
21	26.5	27.9	29.2	30.5	31.8	33.2	34.5	35.9	37.3	38.6	40.0	41.4	42.8	44.1	45.5	46.9	48.4	49.8	51.2	52.6	54.1	55.5	56.9	58.4	59.9
22	28.2	29.5	30.9	32.3	33.6	35.0	36.4	37.7	39.1	40.5	41.9	43.3	44.8	46.2	47.6	49.0	50.5	51.9	53.4	54.8	56.3	57.8	59.3	60.8	62.3
23	29.9	31.3	32.7	34.1	35.5	36.8	38.3	39.7	41.1	42.5	43.9	45.4	46.8	48.3	49.7	51.2	52.7	54.2	55.6	57.1	58.6	60.2	61.7	63.2	64.7
24	31.7	33.1	34.5	35.9	37.3	38.8	40.2	41.7	43.1	44.6	46.0	47.5	49.0	50.5	52.0	53.5	55.0	56.5	58.0	59.5	61.1	62.6	64.2	65.8	67.3
25	33.6	35.0	36.4	37.9	39.3	40.8	42.2	43.7	45.2	46.7	48.2	49.7	51.2	52.7	54.3	55.8	57.3	58.9	60.5	62.0	63.6	65.2	66.8	68.4	70.0
26	35.5	36.9	38.4	39.9	41.4	42.8	44.3	45.8	47.3	48.8	50.3	51.8	53.3	54.8	56.3	57.8	59.3	60.8	62.4	63.9	65.4	66.9	68.4	70.0	71.6
27	37.4	38.9	40.4	42.0	43.5	45.0	46.5	48.1	49.6	51.2	52.7	54.2	55.7	57.2	58.7	60.2	61.7	63.2	64.7	66.2	67.7	69.2	70.7	72.2	73.7
28	39.5	41.0	42.5	44.1	45.6	47.1	48.6	50.1	51.6	53.1	54.6	56.1	57.6	59.1	60.6	62.1	63.6	65.1	66.6	68.1	69.6	71.1	72.6	74.1	75.6
29	41.7	43.2	44.7	46.2	47.7	49.2	50.7	52.2	53.7	55.2	56.7	58.2	59.7	61.2	62.7	64.2	65.7	67.2	68.7	70.2	71.7	73.2	74.7	76.2	77.7
30	43.9	45.5	47.1	48.6	50.1	51.6	53.1	54.6	56.1	57.6	59.1	60.6	62.1	63.6	65.1	66.6	68.1	69.6	71.1	72.6	74.1	75.6	77.1	78.6	80.1
31	46.2	47.9	49.5	51.2	52.9	54.6	56.3	58.1	59.8	61.6	63.3	65.1	66.9	68.7	70.5	72.4	74.2	76.1	78.0	79.9	81.8	83.7	85.7	87.6	89.6
32	48.7	50.4	52.1	53.8	55.6	57.3	59.1	60.9	62.7	64.5	66.3	68.2	70.0	71.9	73.8	75.7	77.6	79.5	81.4	83.3	85.2	87.1	89.0	91.0	93.0
33	51.2	53.0	54.8	56.5	58.3	60.2	62.0	63.8	65.7	67.6	69.5	71.4	73.3	75.2	77.2	79.2	81.2	83.2	85.2	87.3	89.3	91.4	93.5	95.6	97.7
34	53.9	55.7	57.6	59.4	61.3	63.1	65.0	66.9	68.8	70.8	72.8	74.8	76.8	78.8	80.8	82.9	85.0	87.1	89.2	91.3	93.5	95.7	97.9	100.2	102.4
35	56.8	58.6	60.5	62.4	64.3	66.3	68.3	70.3	72.3	74.3	76.3	78.4	80.5	82.6	84.7	86.9	89.1	91.3	93.5	95.7	98.0	100.3	102.6	105.0	107.3
36	59.8	61.7	63.7	65.7	67.7	69.7	71.7	73.8	75.9	78.0	80.1	82.3	84.5	86.7	88.9	91.2	93.5	95.8	98.1	100.5	102.9	105.3	107.7	110.2	112.7
37	62.9	65.0	67.0	69.1	71.2	73.3	75.4	77.6	79.8	82.0	84.2	86.5	88.8	91.1	93.4	95.8	98.2	100.6	103.1	105.6	108.1	110.7	113.3	115.9	118.6
38	66.3	68.4	70.6	72.7	74.9	77.1	79.4	81.6	83.9	86.2	88.6	91.0	93.4	95.8	98.3	100.8	103.4	105.9	108.6	111.2	113.9	116.6	119.4	122.2	125.0
39	70.0	72.2	74.4	76.7	79.1	81.3	83.6	86.0	88.4	90.9	93.4	95.9	98.4	101.0	103.6	106.3	109.0	111.8	114.6	117.4	120.3	123.2	126.2	129.2	132.2
40	73.8	76.2	78.5	80.9	83.3	85.7	88.2	90.8	93.3	95.9	98.5	101.2	103.9	106.7	109.5	112.4	115.3	118.2	121.2	124.3	127.4	130.5	133.7	137.0	140.3
41	78.0	80.5	83.0	85.5	88.0	90.6	93.3	95.9	98.7	101.4	104.3	107.1	110.0	113.0	116.0	119.1	122.2	125.4	128.7	132.0	135.4	138.9	142.3	145.9	149.5
42	82.6	85.2	87.8	90.5	93.2	96.0	98.8	101.7	104.6	107.6	110.6	113.7	116.9	120.1	123.4	126.7	130.1	133.6	137.2	140.8	144.5	148.3	152.2	156.1	160.2
43	87.6	90.4	93.2	96.0	98.9	101.8	104.8	107.8	110.8	113.9	117.0	120.1	123.2	126.4	129.7	133.1	136.6	140.2	143.9	147.7	151.5	155.4	159.3	163.3	167.3
44	93.1	96.1	99.1	102.2	105.4	108.6	111.9	115.3	118.7	122.1	125.6	129.1	132.6	136.1	140.0	143.5	147.1	150.8	154.6	158.5	162.5	166.5	170.5	174.6	178.7
45	99.3	102.5	105.9	109.2	112.6	116.2	119.8	123.6	127.4	131.4	135.4	139.6	143.9	148.3	152.9	157.6	162.4	167.2	172.1	177.0	182.0	187.0	192.1	197.2	202.3
46	106.3	109.8	113.4	117.2	121.0	125.0	129.1	133.3	137.6	142.1	146.7	151.5	156.5	161.6	167.0	172.5	178.2	184.2	190.4	196.8	203.5	210.5	217.8	225.4	233.3
47	114.3	118.3	122.4	126.6	130.9	135.4	140.1	145.0	150.0	155.3	160.7	166.4	172.3	178.5	185.0	191.8	198.9	206.4	214.2	222.4	231.0	240.0	249.5	259.5	270.0
48	123.3	128.4	133.7	139.0	144.3	149.8	155.9	162.8	170.0	177.6	185.6	194.0	202.9	212.3	222.2	232.5	243.2	254.4	266.1	278.3	291.0	304.2	318.0	332.4	347.3
49	135.5	140.8	146.4	152.3	158.5	165.0	172.0	179.3	187.2	195.6	204.6	214.3	224.7	235.9	248.1	261.3	27								