

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

THALITA FONSECA DE ARAUJO

**PRODUÇÃO DE EXTRATO DA ALGA ANTÁRTICA *Prasiola crista* E
ÁVALIAÇÃO DE SEUS EFEITOS ANTIMICROBIANOS**

**São Gabriel
2017**

**PRODUÇÃO DE EXTRATO DA ALGA ANTÁRTICA *Prasiola crista* E
AVALIAÇÃO DE SEUS EFEITOS ANTIMICROBIANOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biotecnologia da
Universidade Federal do Pampa, como
requisito parcial para obtenção do Título de
Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Paulo Marcos Pinto

**São Gabriel
2017**

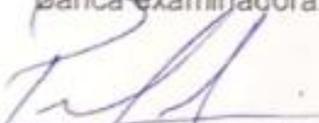
THALITA FONSECA DE ARAUJO

PRODUÇÃO DE EXTRATO DA ALGA ANTÁRTICA *Prasiola crispa* E
AVALIAÇÃO DE SEUS EFEITOS ANTIMICROBIANOS

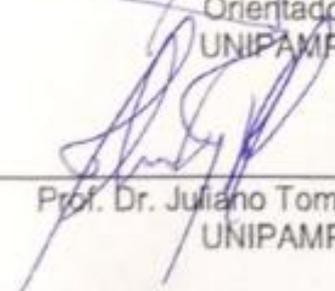
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biotecnologia da
Universidade Federal do Pampa, como
requisito parcial para obtenção do Título de
Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 17 de novembro de
2017.

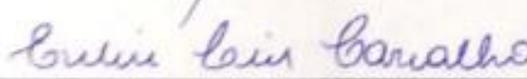
Banca examinadora:



Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto
Orientador
UNIPAMPA



Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo
UNIPAMPA



MSc. Evelise Leis Carvalho
UNIPAMPA

AGRADECIMENTO

A Deus, em primeiro lugar, por ter me dado forças para chegar até aqui e ter guiado os meus caminhos para lugares onde nunca imaginei chegar, porém onde me encontro mais feliz do que poderia imaginar.

Aos meus pais, por toda a paciência ao longo destes anos, por sempre acreditarem em mim, mesmo quando eu não acreditava, e por sempre apoiarem as minhas escolhas, por mais insanas que estas pudessem parecer.

Ao professor Paulo Marcos Pinto, por ter aceitado me orientar ao longo dessa jornada, aguentando todos os dias mau humorados e reclamações, por seus conselhos não somente sobre ciência e TCC, mas também sobre a vida.

Ao LPA, porém, em especial à Darlene, Evelise e Maria Eduarda, pelas conversas e companhia e também pelo inestimável auxílio na execução deste trabalho.

À turma 18 da Biotecnologia da Unipampa, por estes longos 4 anos juntos, mesmo com as brigas e trapalhadas, não gostaria de estar em outra turma que não esta. Em especial à minha dupla, Maria Victória, pela companhia, amizade e pelas infindáveis conversas, e por todos estes anos fazendo os slides mais bonitos que esta Unipampa já viu.

Aos professores da Unipampa pelos ensinamentos e pela paciência infindáveis, em especial aos professores Juliano Tomazzoni Boldo e Andrés Cañedo.

Aos meus irmãos, por sempre me apoiarem e mesmo quando brigamos, nunca desistirem de me animar.

À Unipampa, por ter fornecido a estrutura física e material para a realização deste trabalho, e por ter me fornecido pessoas tão especiais nestes 4 anos.

“Sempre que achamos que sabemos como será o futuro, mesmo por um segundo, ele muda. Às vezes o futuro muda de forma rápida e completa. E ficamos com a escolha do que fazer a seguir. Podemos escolher ficar com medo dele. Ficar parados, tremendo, imóveis. Pensando que o pior vai acontecer. Ou ir em frente. Rumo ao desconhecido. E acreditar que será brilhante.”

Shonda Rhimes

RESUMO

A alga Antártica *Prasiola crispera* é capaz de tolerar diversas condições consideradas extremas, como estresse salino, desidratação, frio, ventos, sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento e exposição à radiação ultravioleta. É sabido que algas são capazes de produzir compostos bioativos com diversas atividades biológicas, inclusive compostos com atividade antimicrobiana. Portanto, este trabalho teve como objetivo produzir extratos de *P. crispera* e avaliar seus efeitos contra duas bactérias Gram-positivas (*Corynebacterium glutamicum* e *Staphylococcus aureus*) e duas Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Xanthomonas campestris*). Foram produzidos dois extratos, um polar e um apolar (hidroalcoólico e hexânico, respectivamente) da seguinte maneira: 100 g de *P. crispera* já higienizada e seca foram macerados e, então, foi adicionado o solvente. Os extratos ficaram sob agitação por 48 horas. Após, os mesmos foram filtrados, os solventes evaporados e liofilizados. Os extratos restantes foram solubilizados com dimetilsulfóxido (DMSO) e foram realizados testes antimicrobianos aplicando em meio Luria-Bertani líquido, os extratos de *P. crispera* em diferentes concentrações e as bactérias em microplacas. As microplacas foram incubadas em estufa por 24 horas a 37 °C e, então, os resultados foram analisados. Após os processos de extração e filtração, foram recuperados cerca de 800 mL de cada extrato que, após passarem pelo processo de evaporação e liofilização, renderam 882 mg de extrato hidroalcoólico e 21 mg de extrato hexânico. Em relação à atividade antimicrobiana dos extratos, o extrato hexânico demonstrou maior capacidade antimicrobiana, sendo que a concentração mínima inibitória para *C. glutamicum*, *S. aureus* e *X. campestris* foi de 0,05 mg/mL. Para o extrato hidroalcoólico, não foi possível determinar uma concentração mínima inibitória para nenhuma das bactérias, devido ao fato de que houve uma inibição apenas parcial do crescimento bacteriano. *E. coli* foi a única bactéria que não foi suscetível ao efeito de nenhum dos dois extratos. *P. crispera* demonstrou ter potencial antimicrobiano contra as espécies testadas, tornando-se, portanto, mais uma possibilidade no combate aos microrganismos e seus mecanismos de resistência aos antibióticos conhecidos.

Palavras-Chave: *P. crispera*; extrato hidroalcoólico; extrato hexânico; concentração mínima inibitória; microdiluição em caldo.

ABSTRACT

The Antarctic algae *Prasiola crispa* it's able to tolerate various conditions considered extreme, like saline stress, dehydration, coldness, windiness, successive thaw-freezing cycles and exposure to ultraviolet radiation. It is known that algae are able to produce bioactive compounds with various biological activities, including compounds with antimicrobial activitie. Therefore, this work aims to produce extracts from *P. crispa* and analyze its effects against two Gram-positive bacteria (*Corynebacterium glutamicum* and *Staphylococcus aureus*) and two Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Xanthomonas campestris*). Two extracts were produced, one polar and one apolar (hydroalcolic and hexanic, respectively) in the following way: 100 g of *P. crispa*, already clean and dry, were macerated and, then, the solvent was added. The extracts were under agitation for 48 hours, and then, they were filtered, the solvents were evaporated and freeze-dried. The remaining extracts were solubilized with dimethylsulfoxide (DMSO) and were accomplished antimicrobial assays applying in liquid broth Luria-Bertani, the extracts of *P. crispa* in different concentrations and the bacteria in microplates. The microplates were incubated for 24 hours and 37 °C and, then, the results were analyzed. After the processes of extraction and filtration, about 800 mL were recovered of each extract that, after evaporation and freeze-dried, rendered 882 mg of hydroalcolic extract and 21 mg of the hexanic extract. Regarding the antimicrobial activity, the hexanic extract showed higher antimicrobial activity, and the minimum inhibitory concentration for *C. glutamicum*, *S. aureus* e *X. campestris* were 0,05 mg/mL. For the hydroalcolic extract, it was not possible to determine a minimum inhibitory concentration, due to the fact that was only a partial inhibition of bacterial growth. *E. coli* were the only bacteria that was not susceptible to the effects of both extracts. *P. crispa* demonstrated antimicrobial potential against the species tested, thus becoming one more possibility in the fight against microorganisms and their mechanisms of resistance to the known antibiotics.

Keywords: *P. crispa*; hydroalcolic extract; hexanic extract; minimum inhibitory concentration; microdilution in broth.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Alga antártica <i>Prasiola crispera</i>	13
Figura 2: Desenho esquemático da montagem da placa de 96 poços.....	24
Figura 3: Extratos hidroalcoólico (esquerda) e hexânico (direita) posteriormente aos processos de filtração e extração.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade antimicrobiana do Extrato Hexânico baseada na turbidez do meio.	27
Tabela 2: Atividade antimicrobiana do Extrato Hidroalcoólico baseada na turbidez do meio.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus Célsius

μl – microlitros

G+C – Conteúdo Guanina Citosina

mbar – milibar

mg – miligramas

mL – mililitros

nm – nanômetros

pb – Pares de base

P/V – Relação massa – volume

rpm – Rotações por minuto

V/V – Relação volume - volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	12
1.2	Antártica.....	12
1.2	<i>Prasiola crispa</i>	13
1.3	Atividade antimicrobiana de extratos de plantas.....	14
1.4	Microrganismos.....	16
2	JUSTIFICATIVA.....	19
3	OBJETIVOS.....	20
3.1	Objetivo geral.....	20
3.2	Objetivos Específicos.....	20
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1	Material Vegetal.....	21
4.1.1	Coleta do Material.....	21
4.1.2	Preparo do Material.....	21
4.1.3	Produção dos Extratos.....	21
4.2	Atividade Antimicrobiana.....	23
4.2.1	Bactérias utilizadas.....	23
4.2.2	Solubilização dos Extratos e microdiluição.....	23
4.2.3	Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos de <i>P. crispa</i>	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1	Extratos.....	25
5.2	Atividade antimicrobiana.....	26
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	29
7	PERSPECTIVAS.....	30
8	REFERÊNCIAS.....	31

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Antártica

A Antártica é o único continente do planeta Terra sem registro de longo prazo de convívio e habitação humana. Os primeiros contatos de humanos com o continente foram há cerca de 200 anos, na Península Antártica do Norte, e há cerca de 100 anos na Antártica Oriental. As ilhas sub-Antárticas foram, em sua maioria, descobertas e seus recursos de vida marinhos foram rapidamente super explorados nas últimas duas ou três décadas (CONVEY, 2010).

A Antártica é reconhecida como o continente mais alto, seco, ventoso e frio do mundo, possuindo o recorde de temperatura mais baixa da Terra, -89.2°C , que ocorreu na Estação Russa Vostok no Plateau Polar. A sua área ocupa cerca de 10% da superfície terrestre do planeta. A maior parte do continente, à parte do norte da Península Antártica, está situada ao sul do Círculo Antártico (latitude $66^{\circ}33'39''\text{S}$), além do qual há 24 horas de luz diurna contínua no solstício de verão em dezembro, e 24 horas de escuridão contínua no solstício de inverno em junho (CONVEY et al., 2009; TURNER et al., 2009). Apenas 0,34% da área do continente Antártico está continuamente livre de neve ou gelo na forma de ecossistemas terrestres que, em sua maioria, parecem biologicamente estéreis, com a maior parte dessas áreas localizadas em lugares de grande altitude (CONVEY, 2010).

A biota terrestre Antártica é geralmente descrita como sendo escassa em termos de números de espécies em comparação com qualquer outro ambiente da Terra, com muitos grupos de famílias completamente ausentes ou muito mal representados (CONVEY, 2006). O isolamento e a glaciação da Antártica são fortemente associados com a evolução dos organismos que lá habitam e são as principais razões pelas quais os seus ecossistemas terrestres são relativamente simples (CHWEDORZEWSKA, 2009). Os sistemas bióticos que conseguem sobreviver na Antártica compreendem organismos e cadeias alimentares que são extraordinariamente ajustados às condições extremas. Os organismos que a povoam são valiosas fontes de conhecimento em relação à fisiologia, ecologia e evolução em resposta a ambientes de estresse, especialmente frio, escuridão polar, gelo marinho, além de neve terrestre, congelamento e dessecação (BENNINGHOFF, 1987).

1.2 *Prasiola crispera*

A ordem Prasiolales é composta por três famílias, sendo que a família Prasiolaceae é constituída por algas verdes marinhas, dulcícolas e terrestres distribuídas em regiões polares e de baixa temperatura, tendo como características possuir um único cloroplasto axial de forma estrelada com um pirenoide central, células flageladas com quatro raízes em um arranjo cruzado e um corpo basal com rotação anti-horária (RINDI et al., 2007). As algas do gênero *Prasiola* são extremamente nitrófilas e preferem habitats ricos em excretas e fezes de aves, lidando muito bem, por conseguinte, com condições eutróficas (GUIRY, 2017; HOLZINGER et al., 2006).

A espécie mais comumente reportada dentro o gênero *Prasiola* é a alga verde *Prasiola crispera* (Lightfoot) Kützing (Figura 1). *P. crispera* foi descrita primeiramente por Lightfoot em 1977 como *Ulva crispera* baseado no material obtido da Ilha Skye, Escócia (MONIZ et al. 2012).

Figura 1: Alga antártica *Prasiola crispera*.



Fonte: <http://www.algaebase.org>

P. crispera é uma espécie genuinamente cosmopolita, sendo encontrada em regiões polares e de baixa temperatura dos hemisférios sul e norte, sendo provável que a mesma exista em quaisquer ambientes com condições favoráveis à sua

conservação e reprodução (HEESCH et al., 2016). A alga cresce abundantemente em áreas supra litorâneas, sendo comumente encontrada na forma de conjuntos de algas predominantemente foliares, com formações enroladas semelhantes a talos, principalmente em solo úmido e com seu habitat associado a colônias de pinguins (KOVACIK; PEREIRA, 2001).

P. crispera é capaz de suportar diversas condições climáticas consideradas extremas, como estresse salino, desidratação, exposição à radiação ultravioleta, ciclos de congelamento e dessecação (JACOB et al., 1991; BACIOR et al., 2017; JACOB et al., 1992; LUD et al., 2001), além de ter tido os seus genomas acessórios (plastidial e mitocondrial) sequenciados, revelando um tamanho de 196,502 pb para seu genoma plastidial e 89,819 pb para seu genoma mitocondrial (CARVALHO et al., 2015). Todos estes fatores tornam *P. crispera* um excelente foco de estudos biotecnológicos.

1.3 Atividade antimicrobiana de extratos de plantas

Apesar de haver uma grande ênfase em pesquisa por novas drogas sintéticas, o interesse em plantas medicinais vem crescendo ultimamente, em parte devido ao fato de que diversas drogas sintéticas são potencialmente tóxicas e podem causar variados efeitos colaterais. Esse fato tem levado microbiologistas a formularem novos agentes antimicrobianos e a avaliarem a eficácia de produtos naturais de plantas como substitutos para os agentes microbianos químicos (MAREGESI et al., 2008).

A procura por capacidades terapêuticas de plantas já ocorre há bastante tempo na humanidade. Indivíduos de todos os tempos têm aplicado cataplasmas e infusões de centenas, senão de milhares de plantas indígenas, com registros que datam à pré-história (COWAN, 1999). Muitas descobertas relacionando plantas a propriedades fitoterapêuticas foram realizadas de maneira empírica, fundamentadas em vivências e experimentações que ocorriam aleatoriamente. Tais descobertas serviram como base para áreas de extrema importância, como a Botânica, a Química e a Medicina (MENDES et al., 2011).

As plantas produzem uma grande variedade de compostos orgânicos que, em sua grande maioria, não parecem participar diretamente em seu crescimento e desenvolvimento. Estas substâncias, tradicionalmente conhecidas como metabólitos secundários, muitas vezes são diferencialmente distribuídos entre grupos

taxonômicos limitados dentro do Reino Plantae. Suas funções, muitas das quais permanecem desconhecidas, têm sido elucidadas com uma frequência cada vez maior. Os metabólitos primários, dessemelhantemente aos secundários, são moléculas como fitoesteróis, ácidos lipídicos, nucleotídeos, aminoácidos e ácidos orgânicos, e são encontrados em todas as plantas, executando papéis metabólicos que são essenciais à planta e usualmente evidentes (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000). O desenvolvimento programado das atividades metabólicas em plantas é profundamente perturbado por danos mecânicos, ataques relacionados a patógenos ou tratamentos com eliciadores bióticos ou abióticos (SCHAAF; WALTER; HESS, 1995). As plantas são reconhecidas pela capacidade de alguns de seus metabólitos secundários de atuarem como agentes antimicrobianos (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008).

Algas também são abundantes fontes de diversos compostos bioativos com várias atividades biológicas. A importância de algas marinhas como fontes de novas substâncias biotativas vem crescendo rapidamente, sendo que as mesmas têm originado compostos variados que exercem diferentes funções (KAUSALYA; RAO, 2015; WIJESEKARA; KIM, 2010). O primeiro estudo de atividade antimicrobiana de algas foi realizado por Pratt e colaboradores (1944). As algas têm sido utilizadas na medicina tradicional há algum tempo, sendo que algumas apresentam atividades bacteriostáticas, bactericidas, antifúngicas, antivirais e antitumorais (UMA; SIVASUBRAMANIAN; DEVARAJ, 2011).

A medicina tem enfrentado diversos problemas com relação ao aparecimento de cepas de microrganismos resistentes a antibióticos ou com o aumento de sua resistência às drogas tradicionais. Essa resistência tem sido um importante fator para o aumento da morbidade, mortalidade e para o custo dos tratamentos relacionados a infecções bacterianas. O uso excessivo de antibióticos não é a solução para resolver este problema, sendo que existe uma constante busca por novas classes de antibióticos com novas estruturas que sejam efetivas contra patógenos (CHINGIZOVA et al., 2017).

A atividade antimicrobiana das algas tem sido reconhecida com base na existência de compostos que pertencem a algumas classes químicas, incluindo fenóis, ácidos graxos, indóis, acetogeninas, terpenos e hidrocarbonetos voláteis halogenados (PARSAEIMEHR; CHEN, 2013). Os compostos químicos que as algas apresentam podem apresentar novas perspectivas na quimioterapia de doenças

infeciosas, principalmente em terapias primárias (CHINGIZOVA et al., 2017).

Há uma vasta literatura de estudos comprovando os efeitos antimicrobianos de algas em diversos países: Brasil (LIMA-FILHO et al., 2002; PAULERT, 2005), Rússia (CHINGIZOVA, 2017), Turquia (TÜNEY et al., 2006), Itália (PANE et al., 2015), Egito (SHAFAY; ALI; EL-SHEEKH, 2016), Peru (MAGALLANES; CORDOVA; OROZCO, 2003), África do Sul (VLACHOS; CRITCHLEY; HOLY, 1997), dentre muitos outros.

1.4 Microrganismos

Na década de 50, um grupo de pesquisadores do Japão isolou uma bactéria com a capacidade de excretar ácido L-glutâmico abundantemente, a *Corynebacterium glutamicum* (SAHM; EGGELING; GRAAF, 2000; KINOHITA; UDAKA; SHIMONO, 1957). *C. glutamicum* é um microrganismo de rápido crescimento, aeróbica, não esporulante, sem motilidade, saprófita e Gram-positiva (YUKAWA et al., 2007). Ademais, essa bactéria em forma de bastão é capaz de crescer numa variedade de açúcares e ácidos orgânicos (SAHM; EGGELING; GRAAF, 2000). *Corynebacterium* pertence à ordem das eubactérias *Actinomycetales* que tem como característica possuir um alto conteúdo G+C (STACKEBRANDT; RAINEY; WARD-RAINEY, 1997).

Algumas características intrínsecas aos membros do grupo coryneforme são: (i) ausência de patogenicidade (maior parte dos representantes); (ii) ausência da habilidade de formação de esporos; (iii) altas taxas de crescimento; (iv) requisitos de crescimento relativamente limitados; (v) ausência de secreção de protease extracelular nativa, e (vi) a relativa estabilidade do genoma corynebacteriano. Todos estes atributos, combinados com um conjunto de ferramentas aprimorados de engenharia genética, tornam este organismo ideal para o desenvolvimento de processos industriais robustos, apresentando competitividade crescente contra *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, por exemplo (MATEOS et al., 2006).

Sob condições ótimas, *C. glutamicum* é capaz de converter glicose, em taxas elevadas, a ácido L-glutâmico em alguns dias. Cerca de 1×10^6 toneladas deste aminoácido eram produzidos anualmente com a utilização de *C. glutamicum* no final dos anos 90, com a finalidade de servir como agente aromatizante. Durante as últimas décadas, vários mutantes desta bactéria foram isolados possuindo a capacidade de produzir quantidades significativas de outros L-aminoácidos. Por exemplo, L-lisina (aminoácido utilizado como aditivo alimentar) é produzida por mutantes desregulados

de *C. glutamicum* por via biossintética numa escala de $4,5 \times 10^5$ toneladas por ano (SAHM; EGGELING; GRAAF, 2000).

Em 1984, o cirurgião escocês Alexander Ogston foi o primeiro a conectar a bactéria hoje conhecida como *Staphylococcus aureus* ao pus encontrado em um abscesso (Ogston, 1984). *S. aureus* é um membro da família *Micrococcaceae*. É uma bactéria Gram-positiva e coagulase positiva, sendo encontrada entre os patógenos humanos de maior sucesso. A colonização assintomática por *S. aureus* de pele e mucosas, particularmente os membros anteriores, é extremamente comum, sendo que 20% da população mundial é acarretada por *S. aureus* de forma crônica e 60%, de forma intermitente (LOWY, 1998; KLUYTMANS; BELKUM; VERBRUGH, 1997).

Em adição à sua alta prevalência, *S. aureus* é reconhecida por sua habilidade de desenvolver resistência a diversos antibióticos. Notavelmente, a resistência da bactéria a antibióticos acontece em ondas epidemiológicas (SHINEFIELD; RUFF, 2009), fazendo com que seja de grande importância o descobrimento de novos antibióticos que possam combater infecções causadas por ela.

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, não esporulante e anaeróbia facultativa em forma de bastão. Foi descoberta em 1885 pelo pediatra alemão Theodor Escherich enquanto este analisava as fezes de indivíduos saudáveis e foi nomeada como *Bacterium coli* por ter sido encontrada no cólon. Em 1895, foi reclassificada como *Bacillus coli* e, então, foi novamente classificada no gênero *Escherichia*, nomeado em homenagem ao seu descobridor. O gênero compõe o grupo bacteriano formalmente conhecido como coliformes e faz parte da família *Enterobacteriaceae* (TAJ et al., 2014).

A bactéria *E. coli* tradicionalmente coloniza o trato gastrointestinal de humanos e de outros animais dentro de algumas horas após o seu nascimento. Usualmente, *E. coli* e seus hospedeiros humanos coexistem de forma sadia e com mútuos benefícios durante décadas. Estas cepas comensais de *E. coli* raramente causam doenças exceto em indivíduos imunocomprometidos ou quando as barreiras gastrointestinais normais são rompidas. A bactéria é uma concorrente de grande sucesso em seu habitat, sendo o anaeróbio facultativo mais abundante da microflora intestinal humana (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

E. coli é facilmente cultivada em laboratório, tendo sua temperatura ótima em 37 °C, sendo que algumas cepas podem chegar a temperaturas de 49 °C. Por ser encontrada em solos e água como resultado de contaminação fecal, sua presença é

utilizada como um indicador de baixa qualidade da água. Dos pontos de vista bioquímico, fisiológico e genético, *E. coli* é um dos organismos melhores entendidos e caracterizados (TAJ et al., 2014; WELCH, 2006).

As bactérias do gênero *Xanthomonas* compreendem um grupo ubíquo de bactérias patogênicas Gram-negativas que causam uma variedade de doenças em plantações economicamente importantes (AKTAS; NARBERHAUS, 2015). *Xanthomonas campestris* é o agente causador da doença podridão negra em plantas e é um patógeno vascular normalmente restrito ao xilema de folhas de plantas infectadas em estágios precoces de desenvolvimento da doença (CROSSMAN; DOW, 2004). A podridão negra causada por *X. campestris* é uma doença de grande importância, danificando substancialmente de 10 a 50% das plantações em condições ambientais favoráveis. O patógeno infecta um grande número de plantas, incluindo culturas agrícolas importantes como plantas da família Cruciferae (ou Brassicaceae) (brócolis, couve-flor, repolho), nabo, rabanete, plantas ornamentais e ervas daninhas (SINGH; DHAR; YADAVA, 2011).

A doença da podridão negra foi primeiramente descrita no Estado do Kentucky, Estados Unidos, por Garman em 1894. Ele isolou dois tipos de bactérias de plantas infectadas, porém ele não foi capaz de identificar que tipo de bactérias estavam causando a doença. Em Iowa, Estados Unidos, Pammel observou uma doença similar em nabo e demonstrou que a infecção era causada por uma bactéria (que foi nomeada como *Bacillus campestris*) que possuía colônias pigmentadas de amarelo na cultura. Desde então, a doença foi identificada em todos os continentes onde crescem as plantas da família Brassicaceae. Ademais, a podridão negra é considerada a doença vegetal de maior importância dentre os vegetais Brassicaceae de todo o mundo (VICENTE; HOLUB, 2013).

2 JUSTIFICATIVA

P. crispa demonstrou ter diversas aplicações biotecnológicas: atividade bioinseticida contra a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* e a barata *Nauphoeta cinerea* (ZEMOLIN et al., 2014), agente redutor para síntese de nanopartículas de ouro (SHARMA et al., 2014) e neutralização dos efeitos tóxicos de veneno de cobra *Bothrops jararacussu* (SILVA et al., 2017). Levando em consideração esse grande potencial biotecnológico, é possível imaginar que dentre os compostos bioativos de *P. crispa* existam biomoléculas com capacidade antimicrobiana.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Produzir extratos da alga Antártica *Prasiola crispa* e avaliar seus possíveis efeitos antimicrobianos.

3.2 Objetivos Específicos

- Produzir extratos hexânico e hidroalcoólico de *P. crispa*;
- Determinar o melhor solvente para extração de substâncias bioativas de *P. crispa*;
- Avaliar os possíveis efeitos antimicrobianos dos extratos em bactérias Gram-positivas *Corynebacterium glutamicum* e *Staphylococcus aureus*;
- Avaliar os possíveis efeitos antimicrobianos dos extratos em bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Xanthomonas campestris*.
- Determinar a concentração mínima inibitória dos extratos de *P. crispa* para as bactérias testadas.

4 METODOLOGIA

4.1 Material Vegetal

4.1.1 Coleta do material

Os exemplares de *P. crisper* foram coletados na Ilha Halfmoon e próximo à Estação Antártica Comandante Ferraz, ilha King George, na Antártica.

4.1.2 Preparo do material

Foi realizada uma limpeza do material a seco, para retirada de impurezas. Após, *P. crisper* foi submetida a um processo de desinfestação, onde a mesma foi imersa em solução de álcool 70% (v/v) durante 5 minutos, foi filtrada para retirar o excesso de álcool e imersa em hipoclorito de sódio 2,5% por 1 minuto, foi novamente filtrada e enxaguada com água destilada 3 vezes. Em seguida, o material foi disposto em bandejas com papel absorvente e foi secado em temperatura ambiente por 48 horas. Após a secagem, o material foi pesado e os extratos foram preparados.

4.1.3 Produção dos extratos

Os extratos foram produzidos com um solvente polar e um apolar (hidroálcool e hexano, respectivamente).

Foram pesados 100 g da alga para cada extrato e foi realizada uma maceração à seco.

Para a produção do extrato hexânico, o macerado foi submetido à extração com hexano 1:10 (m/v) por 48 horas com agitação em agitador analógico à velocidade de 40 RPM. O recipiente onde a extração ocorreu foi coberto com papel alumínio para evitar a entrada de luz.

O mesmo procedimento foi realizado para a produção do extrato hidroalcoólico: o macerado foi submetido à extração com álcool 90% em proporção 1:10 (m/v) por 48 horas com agitação em agitador analógico à velocidade de 40 RPM. O recipiente onde a extração ocorreu foi coberto com papel alumínio para evitar a entrada de luz.

Após o período de extração, os materiais resultantes foram submetidos à filtração com filtros estéreis para remoção dos materiais particulados do extrato. Então, os solventes foram eliminados em rotaevaporador Heidolph Hei-Vap Precision

à pressão de 400 mbar, 196 RPM e 60 °C para o extrato hidroalcoólico e pressão de 400 mbar, 196 rpm e 50 °C para o extrato hexânico. Após, os produtos restantes da rotaevaporação foram liofilizados, pesados e armazenados em geladeira até a sua solubilização.

4.2 Atividade antimicrobiana

4.2.1 Bactérias utilizadas

As bactérias Gram-positivas *C. glutamicum* e *S. aureus* e as Gram-negativas *E. coli* e *X. campestris* foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Pampa.

4.2.2 Solubilização dos extratos e microdiluição

Os extratos obtidos foram solubilizados utilizando solução de Dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% (v/v) na concentração de 0,1 mg/mL.

Foi então realizada uma microdiluição em série da seguinte maneira: foram adicionados 2 mL de extrato, solução estoque a 0,1 mg/mL, a um microtubo. Então, 1 mL do extrato foi passado para o microtubo seguinte e a este foi acrescentado 1 mL de DMSO 1%, foi realizada homogeneização e retirada de 1 mL para o próximo microtubo, e assim sucessivamente, até completar 10 diluições. Na última diluição, o 1 mL restante foi descartado. Assim, as concentrações finais de cada extrato foram: 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,00625; 0,003125; 0,0015625; 0,00078125; 0,000390625; 0,0001953125 mg/mL, respectivamente.

4.2.3 Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos de *P. crisper*

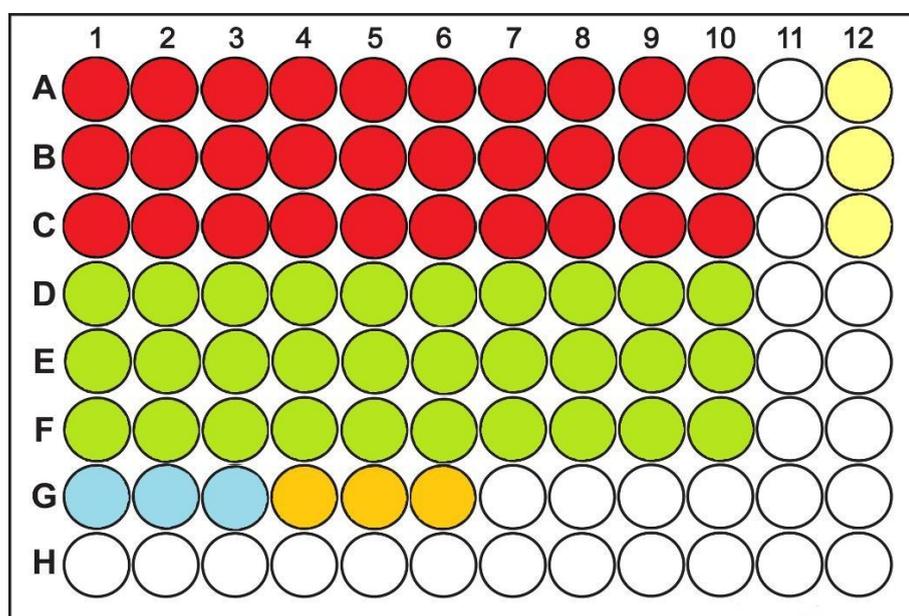
Foi realizado um pré-inóculo das bactérias retirando uma colônia isolada das placas de repique e estas foram inoculadas em 6 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido. Os meios líquidos foram colocados em Incubadora Shaker a 37 °C e 250 RPM por período *overnight*.

No dia seguinte, 5 mL do pré-inóculo foram acrescentados a 50 mL de meio LB líquido estéril e as bactérias foram novamente incubadas a 37 °C e 250 RPM. Foram realizadas leituras em espectrofotômetro UV-Vis a 625 nm até que as bactérias atingissem 0,4 de densidade óptica.

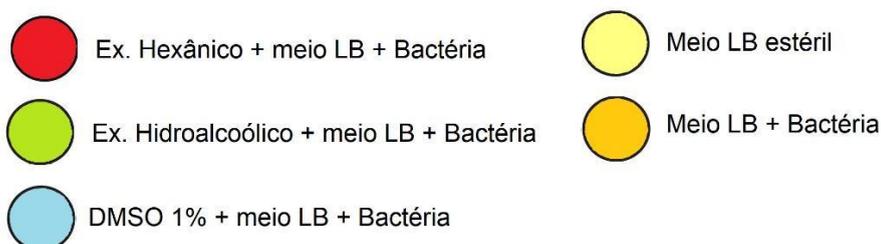
Em microplaca de 96 poços, as amostras foram adicionadas seguindo estes passos: na linha A, coluna 1, foi adicionado 80 µL de extrato hexânico concentração 0,1 mg/mL. Linha A, coluna 2, foi adicionado 80 µL de extrato hexânico concentração

0,05 mg/mL, e assim sucessivamente até a última diluição na coluna 10. Nas linhas B e C foram realizadas as replicatas do extrato hexânico. Na linha D, coluna 1, foi adicionado 80 μ L de extrato hidroalcoólico concentração 0,1 mg/mL. Linha D, coluna 2, foi adicionado extrato hidroalcoólico em concentração 0,05 mg/mL, e assim sucessivamente até a última diluição na coluna 10. Nas linhas E e F foram realizadas as replicatas do extrato hidroalcoólico. Então, foram adicionados 120 μ L de meio LB estéril em cada poço e, após, 5 μ L de bactérias em densidade óptica de 0,4. Foram realizados também os seguintes controles: controle DMSO (DMSO 1%, meio LB estéril e inóculo), controle de crescimento (meio LB estéril e inóculo) e controle de esterilidade (meio LB estéril sem adição de bactérias). Foi utilizada uma microplaca para *C. glutamicum*, uma para *S. aureus*, uma para *E. coli* e uma para *X. campestris*, todas preparadas da maneira descrita acima. Um desenho esquemático das placas pode ser observado na Figura 2. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas.

Figura 2: desenho esquemático da montagem da placa de 96 poços.



Legenda:



Fonte: do Autor.

Após o período de incubação, a análise dos resultados foi realizada visualmente. O crescimento bacteriano foi caracterizado pela turbidez do meio de cultura e a concentração mínima inibitória foi considerada como sendo a menor concentração na qual houve inibição completa de crescimento bacteriano.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extratos

Após os processos de extração e filtração dos extratos, foram recuperados cerca de 800 mL de cada um (Figura 3).

Figura 3: extratos hidroalcoólico (esquerda) e hexânico (direita) posteriormente aos processos de filtração e extração.



Fonte: do Autor.

Já após os processos de rotaevaporação e liofilização, foram recuperados 21 mg de extrato hexânico e 882 mg de extrato hidroalcoólico.

Outros extratos de *P. crispera* com diferentes finalidades já foram produzidos. Marinho e colaboradores (2017) produziram extratos com os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol com o intuito de isolar o composto 7-ketostigmasterol e testá-lo contra o herpesvírus equino 1. Silva e colaboradores (2017) utilizaram a mesma metodologia de extração e os mesmos solventes para testar os efeitos neutralizantes de *P. crispera* contra o veneno de *Bothrops jararacussu*. O grupo demonstrou que os extratos misturados da alga inibiram eficientemente os efeitos tóxicos do veneno de *B. jararacussu*.

Já Zemolin e colaboradores (2014), produziram extratos a partir metanol, etanol e acetato de etila para testar seus efeitos contra a mosca da fruta *D. melanogaster* e a barata *Nauphoeta cinerea*. Os extratos produzidos causaram baixa taxa de sobrevivência, danos neurolocomotores e morte em *D. melanogaster*. Já em *N. cinerea*, os extratos produziram sinais cardiotóxicos em corações semi-isolados de barata, comprovando o potencial uso bioinseticida de *P. crispera*.

5.2 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana de extratos de algas depende basicamente de dois fatores: da espécie da alga e da eficiência de seu método de extração (LIMA-FILHO et al., 2002). O extrato hexânico foi o mais efetivo em suas capacidades de extrair os compostos bioativos relacionados à eficácia antibiótica de *P. crispera* (Tabela 1 e Tabela 2). Lima-Filho (2002) também demonstrou uma maior eficácia do extrato hexânico contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, corroborando os resultados aqui apresentados.

Tabela 1: Atividade antimicrobiana do Extrato Hexânico baseada na turbidez do meio. -: inibição de crescimento microbiano; +: princípio de inibição de crescimento microbiano; ++: crescimento microbiano.

Concentrações (mg/mL)	Bactérias			
	<i>C. glutamicum</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>X. campestris</i>
0,1	-	-	++	-
0,05	-	-	++	-
0,025	+	+	++	+
0,0125	+	+	++	+
0,00625	+	++	++	++
0,003125	++	++	++	++
0,0015625	++	++	++	++
0,00078125	++	++	++	++
0,000390625	++	++	++	++
0,0001953125	++	++	++	++

Fonte: do Autor.

Tabela 2: Atividade antimicrobiana do Extrato Hidroalcoólico baseada na turbidez do meio. -: inibição de crescimento microbiano; +: princípio de inibição de crescimento microbiano; ++: crescimento microbiano.

Concentrações (mg/mL)	Bactérias			
	<i>C. glutamicum</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>X. campestris</i>
0,1	+	+	++	+
0,05	+	+	++	+
0,025	+	+	++	+
0,0125	+	+	++	+
0,00625	+	++	++	++
0,003125	++	++	++	++
0,0015625	++	++	++	++
0,00078125	++	++	++	++
0,000390625	++	++	++	++
0,0001953125	++	++	++	++

Fonte: do Autor.

Segundo Kausalya e Rao (2015), dependendo da sua solubilidade e polaridade, diferentes solventes podem demonstrar diferentes capacidades antimicrobianas. Chingizova e colabs. (2017) ressaltam o fato de que existe uma grande variedade de solventes utilizados na procura de compostos antimicrobianos em algas e que ainda é incerto que tipo de solvente é o mais efetivo e adequado para a extração de compostos bioativos, já que foi demonstrado que tanto extratos de alga lipofílicos quanto hidrofílicos podem possuir capacidade antimicrobiana.

As bactérias Gram-positivas foram sensíveis tanto ao extrato hexânico quanto ao extrato hidroalcoólico. Já entre as Gram-negativas, houve uma diferença nos resultados, sendo que *E. coli* foi a única bactéria a não demonstrar sensibilidade a nenhum dos extratos e *X. campestris* demonstrou sensibilidade semelhante a das bactérias Gram-positivas.

Não foi possível definir a concentração mínima inibitória do extrato hidroalcoólico, dado que não houve inibição completa do crescimento bacteriano em nenhuma das concentrações estudadas. Apesar deste fato, houve uma pequena inibição do crescimento bacteriano, sendo esta constatada por uma menor turbidez do meio em relação às outras concentrações e ao controle de crescimento. *C. glutamicum* foi levemente inibida nas concentrações mais altas (0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,00625 mg/mL, respectivamente). *S. aureus* e *X. campestris* foram levemente inibidas nas concentrações de 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125 mg/mL, respectivamente.

Em relação ao extrato hexânico, houve inibição completa de crescimento de *C. glutamicum*, *S. aureus* e *X. campestris* nas concentrações de 0,1 mg/mL e de 0,05 mg/mL. Houve, também, uma pequena inibição do crescimento populacional da bactéria *C. glutamicum* nas concentrações de 0,025; 0,0125; 0,00625 mg/mL, respectivamente; ademais, houve inibição de *S. aureus* e de *X. campestris* nas concentrações de 0,025 e 0,0125 mg/mL.

A concentração mínima inibitória é aquela em que ocorre a inibição completa do crescimento microbiano. Portanto, constata-se que a concentração mínima inibitória (CMI) do extrato hexânico para 3 das 4 bactérias utilizadas foi de 0,05 mg/mL. Coronel (2016) testou a ação de extratos de algas contra 12 diferentes espécies de bactérias e, em seus resultados, relata que o CIM entre as bactérias variou de 2,442 a 312,5 mg/mL. Porém, não é possível atestar que *P. crisper* possui um efeito antibiótico maior do que os das algas testada por Coronel. Hood, Wilkinson e Cavanagh (2013) afirmam que não é plausível fazer comparações diretas entre

pesquisas de atividades antimicrobianas de extratos e óleos vegetais devido à falta de padronização metodológica.

Alguns exemplos na literatura que confirmam que bactérias Gram-positivas são mais sensíveis a extratos de algas (UMA; SIVASUBRAMANIAN; DEVARAJ, 2011; VLACHOS; CRITCHLEY; HOLY, 1997). Ademais, Vlachos, Critchley e Holy (1997) demonstraram uma menor susceptibilidade de bactérias Gram-negativas frente ao uso de extratos de algas. Assim como nos resultados aqui apresentados, Rajasulochana e colabs. (2009) também comprovaram que o extrato hexânico de algas foi eficaz contra *S. aureus*, porém não contra *E. coli*.

Apesar de também ser uma bactéria Gram-negativa, *X. campestris* foi sensível principalmente ao extrato hexânico, tendo resultado similar aos resultados de Paulert (2005), que demonstrou em seu estudo que o extrato apolar de *Ulva fasciata* inibiu o crescimento de algumas bactérias Gram-negativas, incluindo *X. campestris*.

As diferenças apresentadas pelos métodos de extração com diferentes solventes podem ser devidas ao fato de que podem ocorrer diferenças na capacidade dos protocolos de extração de recuperar os metabólitos ativos e a diferenças nos métodos dos testes implementados que poderiam suscitar em diferentes susceptibilidades das cepas utilizadas nos estudos (TÜNEY et al., 2006).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de não haver muita literatura sobre o potencial de algas terrestres como agentes antibióticos, *Prasiola crispa* demonstrou que não são somente as algas marinhas que possuem compostos bioativos contra bactérias. *P. crispa* foi eficaz tanto contra bactérias Gram-positivas quanto contra bactérias Gram-negativas, excetuando *Escherichia coli*. O extrato hexânico foi o mais efetivo na extração destes compostos bioativos, tendo sua concentração mínima inibitória em 0,05 mg/mL. Até o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo buscando compostos antimicrobianos na alga Antártica *Prasiola crispa*. Com base nos resultados obtidos, é possível afirmar que *P. crispa* tem capacidade de produzir metabólitos relacionados à atividade antimicrobiana.

7 PERSPECTIVAS

- Otimizar os processos de extração;
- Testar outros solventes para extração das substâncias bioativas com capacidade antimicrobiana de *P. crispa*;
- Testar outras concentrações dos extratos;
- Testar os extratos de *P. crispa* em mais cepas bacterianas;
- Testar os extratos de *P. crispa* em fungos e leveduras;
- Caracterizar os compostos bioativos com ação antimicrobiana de *P. crispa*.

8 REFERÊNCIAS

AKTAS, M.; NARBERHAUS, F. **Unconventional membrane lipid biosynthesis in *Xanthomonas campestris***. *Environmental Microbiology*. 17(9), 3116–3124 (2015).

BACIOR, M. et al. **Extreme dehydration observed in Antarctic *Turgidosculum complicatulum* and in *Prasiola crispa***. *Extremophiles*. 21:331–343 (2017).

BENNINGHOFF, W. S. **The Antarctic Ecosystem**. *Environment International*, Vol. 13, pp. 9-14 (1987).

BYAPPANAHALLI, M. N. et al. **Growth and survival of *Escherichia coli* and enterococci populations in the macro-alga *Cladophora* (Chlorophyta)**. *FEMS Microbiology Ecology*, 46, 203-211 (2003).

CARVALHO, E. L. et al. **Draft Plastid and Mitochondrial Genome Sequences from Antarctic Alga *Prasiola crispa***. *Genome Announc.* 3(5):e01151-15. doi:10.1128/genomeA.01151-15.

CHINGIZOVA, E. A. et al. **Antimicrobial activity of marine algal extracts**. *International Journal of Phytomedicine*. 9, 113-122 (2017).

CHWEDORZEWSKA, K. J. **Terrestrial Antarctic ecosystems in the changing world: An overview**. *Polish Polar Research*. 30 (3): 263–276 (2009).

CONVEY, P. **Antarctic Terrestrial Ecosystems: Responses to Environmental Change**. *Polarforschung*. 75 (2–3), 101 – 111 (2006).

CONVEY, P et al. **Antarctic climate change and the environment**. *Antarctic Science*. 21(6), 541–563 (2009).

CONVEY, P. **Terrestrial biodiversity in Antarctica - Recent advances and future challenges**. *Polar Science*. 4, 135-147 (2010).

CORONEL, L. G. **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de algas frente a bactérias patogênicas para aquicultura**. 2016. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis (2016).

- COWAN, M. M. **Plant Products as Antimicrobial Agents**. Clinical Microbiology Review. Vol. 12, No. 4 (1999).
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. **Natural Products (Secondary Metabolites)**. In: Buchanan B., Grissem W., Jones R. (Eds.) Biochemistry & Molecular Biology of Plants, Rockville: American Society of Plant Physiologists, p.1250-1318 (2000).
- CROSSMAN, L.; DOWN, J. M. **Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris***. Microbes and Infection. 6, 623–629 (2004).
- GUIRY, G.M. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 24 November 2017.
- HEESCH, S. et al. **Prasiolales (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) of the Svalbard Archipelago: diversity, biogeography and description of the new genera Prasionella and Prasionema**. European Journal of Phycology. DOI: 10.1080/09670262.2015.1115557 (2016).
- HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. **Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases**. Phytomedicine. 15, 639–652 (2008).
- HOLZINGER, A. et al. **Ultrastructure and photosynthesis in the supralittoral green macroalga *Prasiola crispa* from Spitsbergen (Norway) under UV exposure**. Phycologia. Volume 45 (2), 168–177 (2006).
- HOOD, J. R.; WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. **Evaluation of Common Antibacterial Screening Methods Utilized in Essential Oil Research**. J. Essent. Oil Res., 15, 428-433 (2003).
- JACOB, A. et al. **Physiological Responses of the Antarctic Green Alga *Prasiola crispa* ssp. antarctica to Salinity Stress**. Journal of Plant Physiology. 139, 57-62 (1991).
- JACOB, A. et al. **Physiology and Ultrastructure of Desiccation in the Green Alga *Prasiola crispa* from Antarctica**. Botanica Marina. Vol. 35, pp. 297-303 (1992).
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. **Pathogenic *Escherichia coli***. Nature Reviews | Microbiology. Volume 2. P. 123-140 (2004).

KAUSALYA, M.; RAO, G. M. N. **Antimicrobial activity of marine algae.** J. Algal Biomass Utiln. 6 (1): 78- 87 (2015).

KINOSHITA, S.; UDAKA, S.; SHIMONO, M. **Studies on the Amino Acid Fermentation. Part. I. Production of L-glutamic Acid by Various microorganisms.** J. Gen. Appl. Microbiol. Vol. 3, No, 3 (1957).

KLUYTMANS, J.; BELKUM, A. V.; VERBRUGH, H. **Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, Underlying Mechanisms, and Associated Risks.** Clinical Microbiology Reviews. Vol. 10, No. 3, p. 505–520 (1997).

KOVACIK, L; PEREIRA, A. B. **Green alga *Prasiola crispa* and its lichenized form *Mastodia tessellata* in Antarctic environment: General aspects.** Algae and extreme environments. Ecology and Physiology. Nova Hedwigia, Beiheft 123: 465-478 (2001).

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

LOWY, F. D. ***Staphylococcus aureus* Infections.** The New England Journal of Medicine. Volume 339, Number 8, P. 520-532 (1998).

LUD, D. et al. **DNA Damage And Photosynthetic Performance In The Antarctic Terrestrial Alga *Prasiola Crispa* Ssp. *Antarctica* (Chlorophyta) Under Manipulated UV-B Radiation.** J. Phycol. 37, 459–467 (2001).

MAGALLANES, C.; CÓRDOVA, C.; OROZCO, R. **Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú.** Rev. peru. biol. 10(2): 125- 132 (2003).

MAREGESI, S. M. et al. **Screening of some Tanzanian medicinal plants from Bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities.** Journal of Ethnopharmacology. 119, 58–66 (2008).

MARINHO, R. S. S. et al. **Antiviral activity of 7-keto-stigmasterol obtained from green Antarctic algae *Prasiola crispa* against equine herpesvirus 1.** J Appl Phycol. 29:555–562 (2017).

MATEOS, L. M. et al. ***Corynebacterium glutamicum* as a model bacterium for the bioremediation of arsenic.** International Microbiology. 9:207-215 (2006).

MONIZ, M. B. J. et al. **Molecular Phylogeny Of Antarctic *Prasiola* (Prasiolales, Trebouxiophyceae) Reveals Extensive Cryptic Diversity.** J. Phycol. 48, 940–955 (2012).

MENDES, L. P. M. et al. **Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*.** Rev Ciênc Farm Básica Apl.; 32(1):121-125 (2011).

Classics in infectious diseases. “**On abscesses**”: Alexander Ogston (1844–1929). Rev Infect Dis 1984;6:122–8.

PANE, G. et al. **Assessment of the Antimicrobial Activity of Algae Extracts on Bacteria Responsible of External Otitis.** Mar. Drugs, 13, 6440-6452 (2015).

PARSAEIMEHR, A.; CHEN, F. **Algal bioactive diversities against pathogenic microbes.** In: MÉNDEZ-VILAS, A, editor. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, Vol 2. Badajoz: Formatex, p.796-803 (2013).

PAULERT, R. **Atividade antimicrobiana e controle da antracnose do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando polissacarídeo e extratos da macroalga marinha *Ulva fasciata*.** 2005. 107f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) – Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (2005).

PRATT, R. et al. **Chlorellin. An antibacterial substance from *Chlorella*.** Science. 99:351-352 (1944).

RAJASULOCHANA, P. et al. **Antibacterial Activity of the Extracts of Marine Red and Brown Algae.** Journal of American Science. 5(3) 20-25 (2009).

RINDI, F. et al. **Molecular Phylogeny Of The Green Algal Order Prasiolales (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*).** J. Phycol. 43, 811–822 (2007).

SAHM, H.; EGGELING, L.; GRAAF, A. A. **Pathway Analysis and Metabolic Engineering in *Corynebacterium glutamicum*.** Biol. Chem., Vol. 381, pp. 899 – 910 (2000).

SCHAAF, J; WALTER, M. H.; HESS, D. **Primary Metabolism in Plant Defense.** Plant Physiol. 108: 949-960 (1995).

SHAFAY, S. M. E.; ALI, S. S.; EL-SHEEKH, M. M. **Antimicrobial activity of some seaweeds species from Red sea, against multidrug resistant bacteria.** Egyptian Journal of Aquatic Research 42, 65–74 (2016).

SHARMA, B. et al. **Biosynthesis of gold nanoparticles using a freshwater green alga, *Prasiola crispa*.** Materials Letters. 116, 94–97 (2014).

SHINEFIELD, H. R.; RUFF, N. L. **Staphylococcal Infections: A Historical Perspective.** Infect Dis Clin N Am, 23, 1–15 (2009).

SILVA, A. C. R. **The seaweed *Prasiola crispa* (Chlorophyta) neutralizes toxic effects of *Bothrops jararacussu* snake venom.** J Appl Phycol. 29:781–788 (2017).

SINGH, D; DHAR, S; YADAVA, D. K. **Genetic and Pathogenic Variability of Indian Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Causing Black Rot Disease in Crucifers.** Curr Microbiol. 63:551–560 (2011).

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L. **Proposal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria* classis nov.** International Journal Of Systematic Bacteriology. Vol. 47, No. 2. p. 479-491 (1997).

TAJ, M. K. ***Escherichia coli* As A Model Organism.** Int. J. Engg. Res. & Sci. & Tech. Vol. 3, No. 2 (2014).

TURNER et al. **Record low surface air temperature at Vostok station, Antarctica.** Journal Of Geophysical Research. Vol. 114, D24102 (2009).

TÜNEY, I. et al. **Antimicrobial Activities of the Extracts of Marine Algae from the Coast of Urla (Üzmir, Turkey).** Turk J Biol. 30, 171-175 (2006).

UMA, R.; SIVASUBRAMANIAN, V.; DEVARAJ, S. N. **Preliminary phytochemical analysis and in vitro antibacterial screening of green micro algae, *Desmococcus Olivaceous*, *Chlorococcum humicola* and *Chlorella vulgaris*.** J. Algal Biomass Utln. 2 (3): 74– 81 (2011).

VICENTE, J. G.; HOLUB, E. B. ***Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops.** *Molecular Plant Pathology*. 14(1), 2–18 (2013).

VLACHOS, V.; CRITCHLEY, A. T.; HOLY, A. **Antimicrobial activity of extracts from selected southern African marine macroalgae.** *South African Journal of Science*. Vol. 93. P. 328-332 (1997).

WELCH, R. A. **The Genus *Escherichia*.** Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, editors. *The prokaryotes*, vol. 6. 3rd edition. New York: Springer Science, Business Media LLC; 2006. p. 60–71. Chapter 3.3.3.

WIJESEKARA, I.; KIM, S. **Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitors from Marine Resources: Prospects in the Pharmaceutical Industry.** *Mar. Drugs*. 8, 1080-1093 (2010).

YUKAWA, H. et al. **Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R.** *Microbiology*. 153, 1042–1058 (2007).

ZEMOLIN, A. P. P. et al. **Toxicity Induced By *Prasiola crispa* To Fruit Fly *Drosophila melanogaster* And Cockroach *Nauphoeta cinerea*: Evidence For Bioinsecticide Action.** *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 77:115–124 (2014).