

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ROBERTA PAULERT**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CONTROLE DA ANTRACNOSE DO  
FEIJOEIRO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.) UTILIZANDO  
POLISSACARÍDEO E EXTRATOS DA MACROALGA MARINHA *Ulva fasciata***

**FLORIANÓPOLIS  
2005**

**ROBERTA PAULERT**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CONTROLE DA ANTRACNOSE DO  
FEIJOEIRO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.) UTILIZANDO  
POLISSACARÍDEO E EXTRATOS DA MACROALGA MARINHA *Ulva fasciata***

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
como requisito parcial para a obtenção  
do grau de Mestre em Biotecnologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Artur Smânia Júnior  
Co-orientador: Prof. Dr. Marciel J. Stadnik**

**FLORIANÓPOLIS  
2005**

PAULERT, Roberta

Atividade antimicrobiana e controle da antracnose do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando polissacarídeo e extratos da macroalga marinha *Ulva fasciata* / Roberta Paulert. Florianópolis/SC, 2005. 107 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2005.

Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais Flávio e Tereza pelo amor em todos os momentos da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Artur Smânia Júnior, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela valiosa orientação, confiança e incentivo

Ao Prof. Marciel Stadnik, no qual encontrei apoio, coragem, amizade e principalmente incentivo

À minha mãe, que nas horas mais difíceis sempre encontrou a melhor solução e que me ensinou que ser feliz é sempre o mais importante

Ao meu pai, uma das melhores pessoas que já conheci, que embarcou em todas as minhas aventuras

À minha irmã Renata, pelo carinho e companheirismo

Ao Kurt, pelo amor e compreensão em todos os momentos deste trabalho

À Viviane Talamini, que contribui de forma valiosa em várias etapas deste trabalho, sempre se mostrando disponível e paciente

À Prof<sup>a</sup>. Margarida de Matos Mendonça, pelos ensinamentos, idéias e conselhos oferecidos

À Prof<sup>a</sup>. Vetúria Lopes de Oliveira, pelo carinho e amizade

À Prof<sup>a</sup>. Elza Smânia pelo apoio e amizade em todos os momentos

Ao amigo Leandro Borsato do Laboratório de Fitopatologia do CCA, pela ajuda e pela companhia no laboratório

Ao Prof. Moacir Pizzolatti pelo gentil auxílio na identificação das amostras

À Prof<sup>a</sup>. Lenilza Bouzon pela identificação da macroalga

À secretaria da Pós-Graduação em Biotecnologia (Joice e Lígia) pela atenção e paciência

Agradeço a coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC pela oportunidade

À Deus por iluminar sempre o meu caminho e a ajudar a tomar as decisões mais corretas.

**“Andei...**

*Por caminhos difíceis, eu sei.  
Mas olhando o chão sob meus pés, vejo a vida correr.  
E assim a cada passo que der  
Tentarei fazer o melhor que puder.*

**Aprendi...**

*Não tanto quanto quis, mas vi que conhecendo  
O universo ao meu redor e aprendo a me conhecer melhor;  
Assim escutarei o tempo que me ensinará  
A tomar a decisão certa a cada momento.*

**E partirei...**

*Em busca de muitos ideais,  
Mas sei que hoje se encontram meu passado, presente e futuro.  
Hoje sinto em mim a emoção da despedida.  
Hoje é o ponto de chegada.  
Mas, ao mesmo tempo, tempo de partida”.*

(Autor desconhecido)

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais algas marinhas utilizadas na agricultura em diversos países, de acordo com a divisão que pertencem.....	22
<b>Tabela 2.</b> Países onde são encontradas espécies de <i>Ulva</i> .....	33
<b>Tabela 3.</b> Composição química (em 100 g de amostra) de <i>Ulva lactuca</i> coletada em Guaraqueçaba nos meses de outubro e fevereiro de 1996 e de <i>Ulva fasciata</i> coletada na Ilha do Mel em dezembro e fevereiro de 1995.....	39
<b>Tabela 4.</b> Local, quantidade de algas frescas coletadas e o respectivo peso de matéria seca.....	42
<b>Tabela 5.</b> Extratos e ulvana obtidos de <i>Ulva fasciata</i> e as respectivas concentrações utilizadas para o teste de inibição do crescimento miceliano de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	48
<b>Tabela 6.</b> Extratos e ulvana obtidos de <i>Ulva fasciata</i> e as respectivas concentrações utilizadas para o teste de inibição da germinação de conídios de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	50
<b>Tabela 7.</b> Extratos e ulvana obtidos de <i>Ulva fasciata</i> e polissacarídeo B obtido de <i>Ulva</i> sp. e as respectivas concentrações utilizadas para avaliar o efeito sobre a antracnose em plantas feijoeiro comum.....	52
<b>Tabela 8.</b> Escala descritiva da severidade da antracnose do feijoeiro.....	56
<b>Tabela 9.</b> Peso fresco, peso seco e o rendimento das algas coletadas em três praias da Ilha de Florianópolis/SC.....	58
<b>Tabela 10.</b> Efeito do extrato metanólico, extrato insolúvel em metanol e da ulvana obtidos de <i>Ulva fasciata</i> frente bactérias patogênicas para o homem, bactérias fitopatogênicas e levedura.....	62
<b>Tabela 11.</b> Avaliação da atividade antifúngica do extrato metanólico, insolúvel em metanol e da ulvana obtidos de <i>Ulva fasciata</i> , através da determinação da concentração inibitória mínima.....	64
<b>Tabela 12.</b> Índice de velocidade de crescimento miceliano (IVCM) de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> em meio ágar batata dextrose (BDA) contendo diferentes concentrações de extrato metanólico, insolúvel em metanol, extrato etanólico e ulvana.....	65
<b>Tabela 13.</b> Germinação de conídios (%) de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> em presença de extrato metanólico, insolúvel em metanol, extrato etanólico e ulvana obtidos de <i>Ulva fasciata</i> .....	67
<b>Tabela 14.</b> Valores de peso da matéria fresca e da matéria seca da parte aérea das plantas tratadas com os extratos metanólicos obtidos de <i>Ulva fasciata</i> , aplicados duas vezes, quatro e dois dias antes da inoculação do fungo <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	69
<b>Tabela 15.</b> Valores de peso da matéria fresca e da matéria seca da parte aérea das plantas tratadas com polissacarídeo B de <i>Ulva</i> sp. quatro horas, três e seis dias antes da inoculação com o fungo <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	74

**Tabela 16.** Valores de peso da matéria fresca e da matéria seca da parte aérea das plantas tratadas com polissacarídeo B (10 mg/ml) de *Ulva* sp. em três concentrações diferentes três dias antes da inoculação do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*.....76

**Tabela 17.** Valores de peso da matéria fresca e da matéria seca da parte aérea das plantas tratadas com ulvana de *Ulva fasciata* em três concentrações diferentes, por duas vezes, quatro e dois dias antes da inoculação do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*.....79



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Lesões características de antracnose. Massa de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum*, de coloração rosa, formada nos acérvulos, em vagem de feijão infectada.....06
- Figura 2.** Macroalga marinha *Ulva fasciata*.....34
- Figura 3.** Representação esquemática da estrutura principal do polissacarídeo sulfatado (ulvana) de *Ulva*. Fonte: PARADOSSI et al., 1999.....36
- Figura 4.** Efeito do (1) extrato metanólico (1 mg/ml), (2) extrato metanólico (2 mg/ml), (4) da ulvana (10 mg/ml) de *Ulva fasciata* e (3) da testemunha (somente meio de cultura) sobre o crescimento miceliano de *Colletotrichum lindemuthianum* após 20 dias de incubação.....66
- Figura 5.** Efeito da aplicação foliar dos extratos metanólicos de *Ulva fasciata* na severidade da antracnose em plantas de feijão comum, avaliado sete e 14 dias após a inoculação. Os tratamentos foram realizados por duas vezes, quatro e dois dias antes da inoculação das plantas com *Colletotrichum lindemuthianum*.....68
- Figura 6.** Efeito da aplicação foliar do extrato etanólico (10 mg de alga seca/ml) de *Ulva fasciata* na severidade da antracnose em plantas de feijão comum inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* quatro horas, três e seis dias após o tratamento. A avaliação foi realizada sete dias após a inoculação.....71
- Figura 7.** Efeito da pulverização de polissacarídeo B (10 mg/ml) obtido de *Ulva* sp. na severidade da antracnose em plantas de feijão comum inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* quatro horas, três e seis dias após o tratamento, avaliado sete e 14 dias após a inoculação.....73
- Figura 8.** Efeito do polissacarídeo B obtido de *Ulva* sp. nas concentrações de 0,1, 3 e 10 mg/ml na severidade da antracnose em plantas de feijão comum, avaliado sete e 14 dias após a inoculação. Os tratamentos foram realizados três dias antes da inoculação das plantas com *Colletotrichum lindemuthianum*.....75
- Figura 9.** Efeito do tratamento foliar da ulvana (0,1, 1 e 10 mg/ml) obtida de *Ulva fasciata* na severidade da antracnose em plantas de feijão comum, avaliado sete e 14 dias após a inoculação. Os tratamentos foram realizados por duas vezes; quatro e dois dias antes da inoculação das plantas com *Colletotrichum lindemuthianum*.....77

## RESUMO

Compostos presentes em algas marinhas podem desempenhar importantes funções biológicas, entre elas: atividade antimicrobiana direta, influenciando as interações entre planta-patógeno ou ativando mecanismos de defesa das plantas tratadas. O polissacarídeo ulvana, os extratos solúvel e insolúvel em metanol, o extrato etanólico obtidos de *Ulva fasciata* e o polissacarídeo B obtido de *Ulva* sp. foram testados quanto a atividade antimicrobiana e o potencial desta macroalga marinha no controle da antracnose de feijoeiro comum, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. Para a obtenção da ulvana, algas frescas foram autoclavadas com água destilada; a solução resultante foi filtrada e precipitada com etanol. O polissacarídeo foi identificado por RNM-<sup>1</sup>H e RNM-<sup>13</sup>C e I.V. como unidades repetidas de ácido ulvanobiurônico-3-sulfato. Para a obtenção dos extratos metanólicos e do extrato etanólico, algas secas e moídas foram extraídas com metanol em sistema de soxhlet ou com etanol, respectivamente. A atividade antimicrobiana da ulvana e dos extratos metanólicos foi determinada pelo método de difusão em ágar frente a bactérias potencialmente patogênicas ao homem: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, a levedura *Candida albicans* e bactérias fitopatogênicas: *Xanthomonas campestris* e *Erwinia carotovora*. A concentração inibitória mínima, através do método de microdiluição em caldo, foi determinada contra os fungos: *C. lindemuthianum* (fitopatogênico), *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis* (dermatófitos). Além disto, o efeito da ulvana e dos extratos metanólicos foi avaliado, *in vitro*, nos testes de inibição de crescimento miceliano e inibição da germinação de conídios de *C. lindemuthianum*. *In vivo*, foi avaliado o efeito do extrato etanólico, extratos metanólicos, ulvana e polissacarídeo B na proteção de plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) contra antracnose em casa-de-vegetação. Os resultados demonstraram que os extratos metanólicos inibiram o crescimento de bactérias Gram-negativas: *P. aeruginosa*, *X. campestris* e *E. carotovora*. Além disso, o extrato insolúvel (2 mg/ml) em metanol inibiu o crescimento de *T. mentagrophytes* e o extrato solúvel em metanol (1 e 2 mg/ml) inibiu significativamente ( $p < 0,05$ ) o crescimento miceliano de *C. lindemuthianum*. Por outro lado, nenhum dos extratos testados inibiu a germinação dos conídios deste fungo e a ulvana não apresentou nenhuma atividade *in vitro* contra os microrganismos testados. Nos experimentos *in vivo*, observou-se que o extrato etanólico (10 mg de alga seca/ml) e a ulvana (10 mg/ml) de *U. fasciata* apresentaram uma possível indução de resistência quando pulverizados três dias e quatro dias antes da inoculação do fungo, respectivamente.

**Palavras-chave:** *Ulva fasciata*, atividade antimicrobiana, polissacarídeo, *Colletotrichum lindemuthianum*.

## ABSTRACT

Compounds present in seaweeds can play important role against pathogens and on plant-pathogen interactions, through direct antimicrobial action or by inducing a defence mechanism in plants treated with such compounds. The cell-wall polysaccharide ulvan, soluble- and insoluble-methanol extracts from *Ulva fasciata* and the polysaccharide B from *Ulva* sp. were studied for their antimicrobial activity and their potencial to control bean anthracnose, caused by *Colletotrichum lindemuthianum*. Ulvan was extracted by autoclaving, precipited in ethanol and identified by  $^1\text{H}$ , NMR- $^{13}\text{C}$  and I.V. as an ulvanobiuronic acid-3-sulfate repeated structure. In order to obtain the crude extracts, the dried alga was extracted with methanol in soxhet apparatus or with ethanol, respectively. The antimicrobial activity of methanol extracts and ulvan was determined by the agar diffusion method against bacteria and yeast and the minimal inhibitory concentration was determined for fungi using the method of broth dilution. The following human bacterial species and yeast were tested: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* and two plant pathogens: *Xanthomonas campestris* and *Erwinia carotovora*. The filamentous fungi tested were *Colletotrichum lindemuthianum* (plant pathogen), *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporium canis* (dermatophyte pathogen). The effect of ulvan and methanol extracts were tested, *in vitro*, on fungal development against *C. lindemuthianum* (growth mycelium inhibition and fungitoxicity against conidia) and ethanol extract, methanol extracts, ulvan and polysaccharide B were tested on the protection of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) under greenhouse conditions. The results indicated that methanol extracts were active against Gram-negative bacteria *P. aeruginosa*, *X. campestris* and *E. carotovora*. The insoluble-methanol extract (2 mg/ml) inhibited the growth of *T. mentagrophytes* and the soluble-methanol extract (1 and 2 mg/ml) inhibited significantly ( $p < 0,05$ ) the mycelium growth of *C. lindemuthianum*. In contrast, none of extracts tested were able to reduce conidia germination and ulvan did not show *in vitro* activity against the tested microorganisms. In the *in vivo* experiments, ethanolic extract and ulvan (10 mg/ml), reduced ( $p < 0,05$ ) of the severity on the bean anthracnose, could potentially induce resistance in bean against *C. lindemuthianum*.

**Keywords:** *Ulva fasciata*, antimicrobial activity, polysaccharide, *Colletotrichum lindemuthianum*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>v</b>
<b>SUMÁRIO.....</b>	<b>vi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>4</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
3.1. Antracnose do feijoeiro.....	5
3.2. Características e importância das algas marinhas.....	8
3.3. Metabólitos sulfatados e/ou halogenados de macroalgas marinhas.....	12
3.4. Atividades biológicas das algas marinhas.....	13
3.4.1. Atividade antibacteriana.....	14
3.4.2. Atividade antiviral.....	16
3.4.3. Atividade antifúngica.....	18
3.4.4. Outras atividades biológicas das algas marinhas.....	19
3.5. Utilização de algas marinhas na agricultura.....	20
3.5.1. Indução de resistência em plantas.....	25
3.5.1.1. Indução de resistência em plantas por compostos derivados de algas marinhas.....	29
3.6. O gênero <i>Ulva</i> .....	31
3.6.1. <i>Ulva fasciata</i> .....	32
3.6.2. Composição química do gênero <i>Ulva</i> .....	35
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
4.1. Objetivo Geral.....	40
4.2. Objetivos Específicos.....	40
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
5.1. Coleta, secagem e identificação da macroalga.....	41
5.2. Preparo dos extratos e obtenção de ulvana.....	43
5.2.1. Extrato metanólico.....	43
5.2.2. Extrato etanólico.....	43
5.2.3. Obtenção de ulvana.....	43
5.3. Identificação química da ulvana.....	44
5.4. Testes <i>in vitro</i> .....	45
5.4.1. Avaliação da atividade antimicrobiana utilizando o teste de difusão.....	45
5.4.2. Avaliação da atividade antifúngica através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	46
5.4.3. Efeito de extratos e da ulvana sobre o crescimento miceliano de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	47

5.4.4. Efeito de extratos e da ulvana sobre a germinação de conídios de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	49
5.5. Testes <i>in vivo</i> .....	51
5.5.1. Qualidade das sementes de feijão.....	51
5.5.2. Cultivo das plantas.....	51
5.5.3. Tratamento das plantas.....	51
5.5.4. Inoculação do fungo.....	52
5.5.5. Experimento I –Efeito do extrato metanólico e do extrato insolúvel em metanol sobre a severidade da antracnose.....	53
5.5.6. Experimento II – Efeito do extrato etanólico sobre a severidade da antracnose.....	53
5.5.7. Experimento III – Efeito do polissacarídeo B (PS B) sobre a severidade da antracnose.....	54
5.5.8. Experimento IV – Efeito de diferentes concentrações do PS B sobre a severidade da antracnose.....	55
5.5.9. Experimento V – Efeito da ulvana sobre a severidade da antracnose.....	55
5.5.10. Avaliação da severidade da doença.....	55
5.5.11. Determinação do peso da matéria fresca e da matéria seca das plantas.....	56
5.6. Análise dos resultados.....	57
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
6. 1. Rendimento da macroalga coletada.....	58
6.2. Rendimento dos extratos de <i>Ulva fasciata</i> .....	59
6.3. Identificação química da ulvana.....	60
6.4. Testes <i>in vitro</i> .....	61
6.4.1. Avaliação da atividade antimicrobiana utilizando teste de difusão.....	61
6.4.2. Avaliação da atividade antifúngica através da determinação da concentração inibitória mínima .....	64
6.4.3. Avaliação do crescimento miceliano de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	65
6.4.4. Teste de germinação de conídios.....	66
6.5. Testes <i>in vivo</i> .....	68
6.5.1. Experimento I – Efeito de extratos metanólicos sobre a antracnose.....	68
6.5.2. Experimento II – Efeito do extrato etanólico sobre a antracnose.....	70
6.5.3. Experimento III – Efeito do polissacarídeo B (PS B) sobre a antracnose.....	73
6.5.4. Experimento IV – Efeito de diferentes concentrações de polissacarídeo B sobre a antracnose.....	75
6.5.5. Experimento V – Efeito da ulvana sobre a antracnose.....	76
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento biotecnológico é hoje uma realidade, sendo a sociedade surpreendida quase diariamente com novos avanços neste setor. A biotecnologia é encarada pelos países desenvolvidos como a chave para um novo padrão de desenvolvimento econômico. No Brasil, um dos maiores detentores da diversidade biológica do planeta, a biotecnologia deve assumir um papel estratégico dentro de um projeto de desenvolvimento nacional, com especial enfoque nas áreas da saúde e agricultura.

Os organismos marinhos têm recebido atenção durante os últimos anos por serem fonte de compostos naturais; uma nova e promissora área de estudos. Recentemente, um relevante número de substâncias isoladas desses organismos tem sido identificadas com diversos tipos de bioatividades (CLUZET et al., 2004; EL GUEDDARI et al., 2002; GONZÁLEZ DEL VAL et al., 2001; IMMANUEL et al., 2004; LIMA-FILHO et al., 2002; SELVIN e LIPTON, 2004; MAYER e HAMANN, 2005).

Polissacarídeos de algas marinhas são substâncias naturalmente ativas, possuindo importantes aplicações. Ágar, carragenanas e fucoidanas são bem conhecidos por terem vasta aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica e biotecnológica. Entretanto, o interesse pelo potencial dos polissacarídeos de algas marinhas é recente (PENGZHAN et al., 2003a).

Polissacarídeos de algas marinhas têm demonstrado diversos tipos de atividades biológicas, como antitumoral (KAEFFER et al., 1999), antiviral (TEAS et al., 2004; CARLUCCI et al., 1997; TALARICO et al., 2005; TALARICO et al., 2004), antilipêmica (PENGZHAN et al., 2003b) e diferentes extratos de algas possuem atividade antibacteriana (VAIRAPPAN, 2003; IMMANUEL et al., 2004; MAGALLANES; CÓRDOVA; OROZCO, 2003; SELVIN e LIPTON, 2004; VLACHOS;

CRITCHLEY; HOLY, 2000). Embora as macroalgas sejam uma abundante fonte de metabólitos bioativos, ainda são pouco utilizadas para o controle de doenças de plantas (STADNIK, 2003) e poucos trabalhos se referem à atividade antifúngica (BHOSALE; JAGTAP; NAIK, 1999; EDRADA et al., 2002; ABOURRICHE et al., 1999).

Apesar do Brasil ser o maior produtor e consumidor mundial de feijão, a cultura ainda apresenta baixa produtividade média, cerca de 700 kg/ha, decorrente de fatores negativos, tais como a ocorrência de várias doenças (PEREIRA; SANTOS; ABREU, 2004).

Semelhante ao que ocorre em outros países, a produção brasileira de feijão destina-se principalmente ao abastecimento interno, sendo baixo o comércio internacional (ASSUMPÇÃO et al., 2003). Desta forma, o feijão é um alimento de grande importância econômica e social para o Brasil (PEREIRA; SANTOS; ABREU, 2004). Juntamente com o arroz, constitui o cardápio básico da alimentação (ASSUMPÇÃO et al., 2003) por ser uma das principais fontes de proteína e energia de origem vegetal (PEREIRA; SANTOS; ABREU, 2004).

As pragas e doenças, tais como a antracnose, podem causar elevadas perdas na produção e a alta produtividade pode ser garantida somente quando intervenções químicas são realizadas (WORDELL FILHO, 2004). Atualmente, em todos os lugares do mundo onde se pratica a agricultura com fins comerciais, a intervenção para o controle de doenças de plantas é largamente realizada pelo uso de pesticidas. Sem dúvida, o uso racional desses produtos pode ter, a curto prazo, um efeito positivo para o produtor. No entanto, a longo prazo, além do surgimento de isolados dos fitopatógenos resistentes aos fungicidas utilizados, os resultados para a sociedade como um todo e para o meio ambiente podem se tornar negativos devido à poluição

causada pelos seus resíduos. Nesse contexto, termos como “agricultura alternativa”, “agricultura sustentável” ou “manejo ecológico” estimulam a busca de novas medidas de proteção das plantas contra as doenças (STADNIK e TALAMINI, 2004).

A biomassa de *Ulva* é importante fonte de polissacarídeo com capacidade de formar géis com potencial importância econômica (PÁDUA; FONTOURA; MATHIAS, 2004). O polissacarídeo hidrossolúvel obtido desta alga, denominado ulvana, (LAHAYE e AXELOS, 1993) é composto por uma combinação de ramnose, glicose, xilose, manose, galactose, ácidos urônicos e grupos sulfatos (CLUZET et al., 2004; LAHAYE; BRUNEL; BONNIN, 1997; LAHAYE e RAY, 1996).

Na busca de novos compostos elicitores provenientes de organismos marinhos para utilização no controle da antracnose do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e novos compostos com atividade antimicrobiana, foram estudados a ulvana e diferentes extratos obtidos da macroalga marinha *Ulva fasciata*.



## 2. JUSTIFICATIVA

Considerando a abundância de *Ulva fasciata* no litoral sul brasileiro e a potencialidade desta macroalga marinha, tanto na medicina quanto para uso na agricultura, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana, antifúngica e o efeito sobre a antracnose, causada por *Colletotrichum lindemuthianum*, em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*), utilizando diferentes extratos e polissacarídeos obtidos de *Ulva fasciata*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Antracnose do feijoeiro

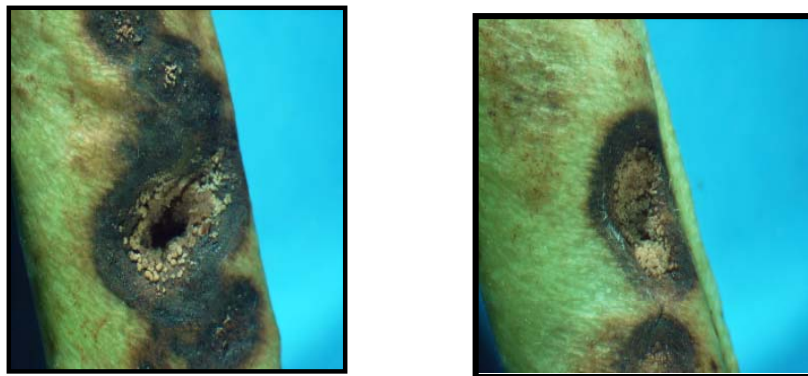
O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) é afetado por inúmeras doenças que, além de diminuir a produtividade da cultura, depreciam a qualidade do produto, provocando importantes perdas econômicas.

A antracnose do feijoeiro é uma das doenças de maior importância dessa cultura em todo o mundo. Quanto mais precoce for o aparecimento da doença, maiores poderão ser as perdas (DALLA PRIA; AMORIM; BERGAMIN FILHO, 2003); podendo atingir até 100% da lavoura quando são utilizadas sementes de baixa qualidade, cultivar suscetível e sementes infectadas em condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento (EMBRAPA, 2004; KIMATI et al., 1997).

A antracnose é mais fácil de ser reconhecida nas vagens, onde as lesões que caracterizam os sintomas se apresentam de forma arredondada, deprimida, de tamanho variável e com o centro claro, delimitadas por um anel negro, um pouco saliente, cercado por bordas de cor café avermelhada. Quando as condições de umidade e temperatura são favoráveis forma-se, no centro das lesões, uma massa de esporos de coloração rosada (KIMATI et al., 1997), conforme ilustrado na Figura 1.

Esta doença é de distribuição ampla; já tendo sido constatada em vários países da Europa, África, Ásia e América (RAVA et al., 1993). No Brasil, ocorre nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Espírito Santo, Alagoas, Sergipe e Paraíba (DALLA PRIA; AMORIM; BERGAMIN FILHO, 2003; PEREIRA; SANTOS; ABREU, 2004; BALARDIN, 1997).

O fungo pode aparecer em todos os estádios de crescimento e em toda a parte aérea da planta, provocando lesões em folhas, caule, ramos, vagens e sementes. Quando atinge as nervuras das folhas, promovendo a desestruturação da lamela média e, conseqüentemente, o colapso do sistema de feixes vasculares, reduz a translocação de fotoassimilados, provoca a concentração de carboidratos e diminuição da taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (KIMATI et al., 1997). Além de diminuir o rendimento da cultura, deprecia a qualidade do produto por ocasionar manchas nos grãos, tornando-o impróprio para o consumo (DALLA PRIA; AMORIM; BERGAMIN FILHO, 2003).



**Figura 1.** Lesões características de antracnose. Massa de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum*, de coloração rosa, formada nos acérvulos, em vagem de feijão infectada.

O gênero *Colletotrichum* é o agente etiológico da antracnose, principal doença de uma ampla variedade de espécies cultivadas pelo homem (BALARDIN, 1997). O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus.) Briosi & Cavara pertence ao filo Ascomycota e à classe Coelomycetes. A fase perfeita (teleomorfa ou sexual), também pertencente ao filo Ascomycota, corresponde a *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. & Schrenk f. sp. *phaseoli* e raramente é encontrada em culturas ou na natureza (TU, 1992; ROCA; DAVIDE; MENDES-COSTA, 2003; GUARRO et al., 1998).

Este fungo é patogênico para outras espécies de leguminosas, como *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus acutifolius*, *Phaseolus coccineus*, *Vigna unguiculata* e *Vicia faba* (KIMATI et al., 1997; TU, 1992).

O fungo produz micélio septado e ramificado, de coloração hialina a quase negra, à medida que envelhece. Os conídios são hialinos, unicelulares, podendo ser oblongos, cilíndricos, com pontas arredondadas ou uma delas mais pontiaguda. Medem de 2,5-5,5 x 11-20  $\mu\text{m}$  e podem apresentar uma área clara semelhante a um vacúolo central e são formados no interior de acérvulos (KIMATI et al., 1997).

O fungo sobrevive em restos de cultura, mas sementes infectadas são a principal via de sobrevivência e disseminação (VECHIATO et al., 2001). Respingos de chuva, o homem e insetos também podem disseminar o patógeno (KIMATI et al., 1997).

A temperatura tem grande influência sobre a severidade da antracnose (DALLA PRIA; AMORIM; BERGAMIN FILHO, 2003). É uma doença que ocorre em locais de temperatura baixa a moderada e alta umidade. Por este motivo, é mais problemática em regiões de clima temperado e subtropical. A doença é favorecida por temperaturas entre 13 e 27°C, com ótimo a 21°C, e umidade relativa acima de 91%. Os conídios germinam em 6 e 9 horas sob condições favoráveis, formam tubo germinativo e apressório, penetrando na cutícula e epiderme do hospedeiro (HUTCHISON et al., 2000).

*C. lindemuthianum* forma um apressório melanizado que é a primeira e a mais importante estrutura de infecção formada para a invasão do hospedeiro, pois aumenta a área de contato e a área fixação entre o fungo e a superfície da planta. A partir do apressório, é emitida uma hifa que, por força mecânica e através de liberação de enzimas, penetra na cutícula da célula vegetal (HUTCHISON et al.,

2000). O aparecimento dos sintomas ocorre a partir de 5 dias após o contato do fungo com a planta (KIMATI et al., 1997).

*C. lindemuthianum* apresenta grande variabilidade patogênica (TU, 1992), com mais de 30 raças já identificadas na América Latina (MAHUKU et al., 2002). No sul do país, já foram detectadas mais de 25 raças distintas, com predomínio das raças do grupo Alfa 65, 73, 81 e 89 (BALARDIN, 1997), sendo a raça 73 aquela encontrada frequentemente em Santa Catarina (LOFFAGUEN; TALAMINI; STADNIK, 2005).

Para diminuir as perdas causadas pela doença, recomenda-se a prática integrada das seguintes ações: isolamento da cultura, utilização de sementes sadias, tratamento químico da semente, rotação de culturas, incorporação de restos culturais, aplicação de fungicidas e semeadura de genótipos resistentes (EMBRAPA, 2004; KIMATI et al., 1997). Vários fungicidas têm eficiência no controle da antracnose: entre eles o clorotalonil, benomyl, tiofanato metílico (GIANASI, 2002).

Levando-se em conta a biodiversidade, a conservação do meio ambiente e o excessivo dispêndio com defensivos agrícolas, especialmente os fungicidas, optar por controles alternativos ao controle químico é uma forma de diminuir os impactos da agricultura na natureza. Um exemplo de controle alternativo é a aplicação de extratos de plantas ou de algas marinhas; uma vez que os defensivos agrícolas acima listados e utilizados no controle da antracnose do feijoeiro apresentam diversas formas de agressão ao meio ambiente.

### **3.2. Características e importância das algas marinhas**

Algas marinhas são vegetais sem sistema vascular. Entretanto, suas células podem formar aglomerações, na forma de fios ou de lâminas finas (PÁDUA;

FONTOURA; MATHIAS, 2004; MATIAS, 1999; OLIVEIRA et al., 2005). Encontram-se distribuídas por diferentes habitats: oceanos, corpos de água doce, solos, rochas, sobre a neve e superfície de vegetais; desde que disponham de luz e umidade suficientes (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004). No reino plantae são encontradas as macroalgas, organismos pluricelulares eucariontes e autótrofos, que podem ser classificados em três grupos de acordo com a coloração (PÁDUA; FONTOURA; MATHIAS, 2004). As principais características desses grupos são:

- **Filo Chlorophyta.** São descritas aproximadamente 10.000 espécies (WAALAND; STILLER; CHENEY, 2004). É composto pelas algas verdes, extremamente abundantes nos ambientes aquáticos. Podem habitar águas doces ou salgadas, solos úmidos ou troncos.

- **Filo Rhodophyta.** São descritas aproximadamente 6.000 espécies (WAALAND; STILLER; CHENEY, 2004). Composto pelas algas vermelhas, quase que exclusivamente pluricelulares e marinhas (99%) que vivem fixadas em substratos. A principal característica é a presença do pigmento ficoeritrina em suas células, responsável pela coloração avermelhada desses organismos (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

- **Filo Phaeophyta.** Composto pelas algas marrons, organismos pluricelulares predominantemente marinhos. As algas pardas são as maiores existentes, podendo atingir mais de 25 metros de comprimento. Nesses organismos são encontrados os pigmentos fucoxantina, carotenóides e como substâncias de reserva, óleos e polissacarídeo de reserva (laminarana) (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

Cerca de 4 milhões de toneladas de algas são colhidas anualmente em todo o mundo; sendo os principais produtores a China e o Japão, seguidos pelos Estados Unidos e Noruega. A partir das algas são obtidos produtos imprescindíveis para a

vida do homem moderno, com valores que ultrapassam alguns bilhões de dólares anuais (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

Mais de 250 espécies de algas são exploradas comercialmente, onde 145 espécies são utilizadas na alimentação e 101 espécies para a produção de ficocolóides (ZEMKE-WHITE e OHNO, 1999). Os gêneros de macroalgas mais cultivados para exploração comercial incluem *Porphyra*, *Laminaria*, *Monostroma*, *Enteromorpha* e *Gracilaria* (MOLL e DEIKMAN, 1995).

Diversas rodofíceas são utilizadas comercialmente na extração de ficocolóides, como o ágar, utilizado na fabricação de gomas, laxantes ou como meio de cultura para uso em laboratórios de microbiologia. Outro aspecto de interesse econômico é a extração da carragenana, um hidrocolóide utilizado na fabricação de alimentos, como iogurtes, “flans”, sorvetes, achocolatados, embutidos (salsichas, presuntos), gelatinas e geléias. A carragenana é utilizada, também, como emulsificante e estabilizante; sua aplicação substitui o amido e a gordura na preparação de certos produtos alimentícios, com a vantagem de não ser energética, não ter cheiro, cor e nem sabor. Também são encontradas diversas aplicações em indústrias não alimentícias (tintas, têxteis, perfumes) e farmacêuticas (produtos anticoagulantes e antiinflamatórios) (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

As algas marrons são utilizadas para a alimentação do homem e de animais e também como fertilizantes (FLEURENCE, 1999). São importante fonte de ácidos algínicos, cujas propriedades coloidais são aproveitadas, por exemplo na preparação de pomadas e suspensões (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

As algas verdes são comumente utilizadas como alimentos devido ao alto conteúdo de vitaminas,  $\beta$ -caroteno e minerais (FLEURENCE, 1999). *Ulva* e *Enteromorpha* são espécies consumidas em países asiáticos e, na França,

receberam autorização para consumo humano como vegetais (QUEMENER; LAHAYE; BOBIN-DUBIGEON, 1997). Algumas espécies de *Ulva* já são comercializadas secas acondicionadas em embalagens próprias, como por exemplo Nature- Algues<sup>®</sup>, na França (LAHAYE; BRUNEL; BONNIN, 1997).

*Ulvaria oxysperma* é uma espécie pouco estudada, embora seja utilizada para consumo humano. É coletada por habitantes do município de Guaraqueçaba, no Paraná, e vendida para complementar o orçamento doméstico. A alga é coletada manualmente, seca em temperatura ambiente e embalada para fins comerciais (PÁDUA; FONTOURA; MATHIAS, 2004).

No Brasil, a região costeira compreendida entre o estado do Ceará e o norte do estado do Rio de Janeiro abriga a flora algal mais diversificada do país. Com relação à exploração de espécies para fins comerciais, a atividade de maior porte corresponde à coleta de algas vermelhas (*Gracilaria* e *Hypnea*) no litoral do nordeste, principalmente na costa entre os estados do Ceará e Paraíba. A coleta da *Gracilaria* vem sendo realizada desde a década de 60, de forma manual, para fins de exportação e também para processamento no próprio país, na produção do ágar. Já a *Hypnea* tem sido exportada como matéria prima ou já processada para a produção de carragenana (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

É preciso potencializar os recursos científicos, tecnológicos e financeiros, coordenando os esforços nas áreas ligadas à utilização das algas e à pesquisa básica, para que as propriedades destes organismos possam ser plenamente aproveitadas, priorizando a qualidade de vida humana e respeitando os ecossistemas.



### 3.3. Metabólitos sulfatados e/ou halogenados de macroalgas marinhas

A vida teve origem nos oceanos. Nesse imenso espaço, os organismos aquáticos e o ambiente abiótico estão interrelacionados e interagem entre si. Por isso, os organismos marinhos adaptaram-se às elevadas concentrações de sais do meio e desenvolveram mecanismos para utilizar os nutrientes disponíveis (CARVALHO e ROQUE, 2000).

São numerosas as substâncias sulfatadas isoladas de organismos marinhos que parecem estar envolvidas na transferência do enxofre inorgânico para o orgânico, pois somente em ambientes com altas concentrações do ânion sulfato são observados organismos capazes de acumulá-lo. A sulfatação é também um modo efetivo de tornar determinadas substâncias solúveis em água, favorecendo, assim, sua excreção (CARVALHO e ROQUE, 2000).

Propriedades biológicas dos compostos sulfatados, como por exemplo a atividade antibiótica, são encontradas nos três grupos de algas, ressaltando a importância desses organismos (SMIT, 2004; MAGALLANES; CÓRDOVA; OROZCO, 2003).

Os polissacarídeos sulfatados devem sua importância econômica ao fato de serem atóxicos e possuírem propriedades gelatinizantes e espessantes, o que lhes atribui considerável valor comercial (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004; CARVALHO e ROQUE, 2000). Apresentam também, diversas atividades farmacológicas e são as mais estudadas substâncias sulfatadas provenientes de algas (MAYER e HAMANN, 2005; PENGZHAN et al., 2003a; SMIT, 2004; ZHU et al., 2004).

Dentre as macroalgas, as rodófitas apresentam maior capacidade para sintetizar produtos halogenados. O gênero *Laurencia* apresenta uma grande

variedade de metabólitos halogenados com propriedades biológicas, principalmente com atividades antibacterianas (VAIRAPPAN, 2003; XU et al., 2003).

Apesar da elevada diversidade de espécies de algas marinhas, estas ainda são subutilizadas, principalmente na área agrícola. O fato é que pouco se conhece a respeito das suas potencialidades, mas atualmente é um campo que tem despertado interesse e uma série de pesquisas nessa área foram iniciadas (STADNIK e TALAMINI, 2004).

### **3.4. Atividades biológicas das algas marinhas**

Diversas substâncias de origem marinha com propriedades biológicas, sejam elas metabólitos primários ou secundários, estão sendo estudadas visando a sua utilização como fármacos (MAGALLANES; CÓRDOVA; OROZCO, 2003; ZHU et al., 2004; IMMANUEL et al., 2004; LIMA-FILHO et al., 2002; KAEFFER et al., 1999; GONZÁLEZ DEL VAL et al., 2001; MAYER e HAMANN, 2005). Entre os organismos marinhos, as esponjas e as algas, além de fornecer o maior número de produtos naturais conhecidos, deram origem à cerca de 65% das patentes de produtos antitumorais e antivirais. A síntese de análogos de moléculas naturais tem sido um dos alvos de extenso estudo em todo o mundo, na busca de novos compostos com propriedades farmacológicas (FRUGULHETTI et al., 2005).

Segundo Mayer e Hamann (2005) e Smit (2004), a maioria dos compostos de macroalgas marinhas que apresentam atividades biológicas pertencem à classe de lectinas, terpenos e polissacarídeos sulfatados.

Metabólitos isolados de algas marinhas podem ser compostos bioativos de grande interesse para a indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos medicamentos. Inúmeros pesquisadores têm demonstrado a atividade antiviral,

antibacteriana e/ou antifúngica de compostos extraídos das algas marinhas frente diferentes patógenos e também atividades antitumorais e antiinflamatórias (MAYER e HAMANN, 2005; LIMA-FILHO et al., 2002; SELVIN e LIPTON, 2004).

Nas últimas três décadas, as descobertas de metabólitos com atividades biológicas de macroalgas têm aumentado significativamente. Entretanto, poucos produtos finais têm chegado ao ponto de comercialização (SMIT, 2004).

#### **3.4.1. Atividade antibacteriana**

Algas marinhas são fonte importante de antibióticos com ampla e eficiente atividade antibacteriana (VAIRAPPAN, 2003; XU et al., 2003). O potencial antibacteriano das algas se deve à capacidade de sintetizar, entre outros compostos, os terpenóides, muitos desses halogenados (SMIT, 2004; MAGALLANES; CÓRDOVA; OROZCO, 2003). Esteróis, compostos fenólicos e heterocíclicos são também encontrados nas algas e podem apresentar atividade antibacteriana (SMIT, 2004).

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

Os extratos da macroalga *Amansia multifida* (família Rhodophyceae) foram fracionados com solventes orgânicos: hexano, clorofórmio, etanol e apresentaram atividade antibacteriana frente a espécies Gram-negativas: *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Salmonella cholerae-suis*, *Serratia marcescens*, *Vibrio cholerae* e contra bactérias Gram-positivas: *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. Já o extrato hexânico da alga

*Caulerpa cupressoides*, pertencente à família Chlorophyceae, mostrou atividade antibacteriana somente contra *Morganella morganii*, *B. subtilis* e *S. epidermidis* (LIMA-FILHO et al., 2002).

Doze extratos etanólicos de diferentes espécies de macroalgas da costa central do Peru foram testados quanto à atividade antibacteriana, em estudo realizado por Magallanes, Córdova e Orozco (2003). As algas *Gratelouia doryphora*, *Prionitis decipiens* e *Ahnfeltiopsis durvillaei* (Rhodophyta), *Petalonia fascia* (Phaeophyta) e *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta) apresentaram atividade antibacteriana frente as espécies clínicas *S. aureus* e *Enterococcus faecalis*.

O extrato metanólico da alga verde *Dunaliella primolecta* inibiu o crescimento de *S. aureus*, *B. cereus* e *E. aerogenes*. Apresentou estabilidade em relação a mudanças de pH e a diferentes solventes (CHANG et al., 1993). Já, o extrato metanólico da alga verde *Cladophora prolifera* inibiu o crescimento de *S. aureus* e *V. cholerae*, enquanto que o extrato da alga marrom *Stoechospermum marginarum* inibiu o crescimento de *Klebsiella* sp. e *V. cholerae* (ELY; SUPRIYA; NAIK, 2004).

A partir do extrato metanólico da alga marinha *Rhodomela confervoides* foram isolados bromofenóis. Um desses compostos foi identificado, através de análises espectroscópicas, como 2,3-dibromo-4,5-dihidroxibenzil e mostrou-se um eficiente agente antibacteriano, apresentando concentração inibitória mínima (CIM) de 35 µg/ml para *S. epidermidis* ATCC 12228 e CIM de 70 µg/ml para *S. aureus* ATCC 29213 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 (XU et al., 2003).

Os compostos oleosos halogenados etalol e iso-obtusol foram isolados de *Laurencia majuscula*. Elatol inibiu o crescimento de *S. epidermidis*, *K. pneumoniae* e *Salmonella* sp. e as CIM foram 1 mg/ml, 1 mg/ml e 2 mg/ml, respectivamente. Já, o

iso-obtusol apresentou CIM de 1 mg/ml e 1,5 mg/ml para *Salmonella* sp. e *K. pneumoniae*, respectivamente (VAIRAPPAN, 2003).

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

Um promissor agente antibacteriano é uma furanona halogenada, pertencente a classe das lactonas, de *Delisea pulchra*. É uma substância com perspectivas de uso para tratamento de infecções crônicas por *P. aeruginosa*, bactéria caracterizada pela produção de alginatos e pela formação de biofilmes em pulmão de pacientes portadores de fibrose cística. Esta molécula inibe a colonização bacteriana através da inibição da comunicação de células inter e intra-espécies (HOIBY, 2002). O efeito antibacteriano desta furanona tem sido observado para várias bactérias Gram-negativas: inibição da formação do véu de *Serratia liquefaciens*, inibição do crescimento de espécies patogênicas de *Vibrio* (SMIT, 2004).

#### **3.4.2. Atividade antiviral**

Extrato aquoso de *Undaria* e diterpenos isolados da alga parda *Dictyota menstrualis* e *D. pfaffi* inibem, *in vitro*, a atividade da enzima transcriptase reversa do vírus HIV. Polissacarídeos sulfatados de algas vermelhas, como por exemplo *Aghardhiella tenera* e *Nothogenia fastigiata* e extrato aquoso de *Sargassum* inibem, *in vitro*, os vírus HIV e herpes simples tipo 1 (HSV-1) (TEAS et al., 2004;

FRUGULHETTI et al., 2005) e os diterpenos de *D. menstrualis* e *D. pfaffi* inibem a replicação do vírus HSV-1 em cultura de células (FRUGULHETTI et al., 2005).

Ivanova et al. (1994) isolaram um polissacarídeo com atividade antiviral de *Ulva lactuca*. O polissacarídeo contém arabinose, xilose, ramnose, galactose, manose e glicose (1:9:5:2:5:16), além de um outro açúcar não identificado. A atividade antiviral, *in vitro*, foi observada contra o vírus influenza humano e de aves. Esta propriedade mostrou-se dose-dependente, espécie-específica e seletiva. Já, a atividade antiviral do extrato alcóolico de *Ulva fasciata* foi descrita por Garg et al. (1992).

$\lambda$ -Carragenanas e carragenanas parcialmente ciclizadas ( $\mu/v$ ) isoladas da alga vermelha *Gigartina skottsbergii* demonstraram eficiente efeito antiviral contra HSV 1 e 2 (CARLUCCI et al., 1997).

Uma carragenana, chamada de carraguard, é potente inibidora, *in vitro*, do vírus HIV e está em estudos clínicos de fase III. Para este grupo de compostos não foram observados significantes níveis de citotoxicidade para células de mamíferos ou atividade anticoagulante (SMIT, 2004).

Zhu et al. (2004) isolaram um polissacarídeo sulfatado da alga marrom *Sargassum patens* que inibiu, de forma dose-dependente, a replicação do vírus HSV 2.

Um polissacarídeo sulfatado com atividade antiviral também foi isolado de uma alga marinha verde, *Monostroma latissimum* (LEE et al., 1998). Este polissacarídeo e uma fucana sulfatada de *Sargassum horneri* inibiram a replicação do vírus HSV-1 (HOSHINO et al., 1999).

### 3.4.3. Atividade antifúngica

Diversos trabalhos científicos demonstraram a atividade antifúngica de organismos marinhos, como esponjas, corais e bactérias; porém, poucos estudos se referem a atividade antifúngica de macroalgas marinhas (BHOSALE; JAGTAP; NAIK, 1999).

Substâncias isoladas de bactérias e esponjas marinhas mostraram-se eficientes inibidoras fúngicas (MAYER e HAMANN, 2005). Um composto isolado da esponja marinha *Theonella swinhoei* mostrou-se um potente antifúngico, apresentando CIM de 1,2 e 1,0 µg/ml para *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, respectivamente (EDRADA et al., 2002).

Em relação a atividade antifúngica, Bhosale, Jagtap e Naik (1999), observaram que o extrato metanólico das algas *Amphiroa* sp. e *Poryphyra* sp. possuem propriedades inibitórias frente a *A. japonicus* e *A. niger*, respectivamente. Por outro lado, o extrato metanólico de *U. fasciata* não teve atividade contra *A. fresenii*, *A. japonicus* e *A. niger*.

A partir de *Nostoc commune*, foi isolado um lipopeptídeo de fórmula molecular  $C_{48}H_{76}O_{18}N_{10}$ , chamado de nostofungicidina. Este composto apresentou potente atividade antifúngica contra *Aspergillus candidus* e a sua CIM foi de 1,6 µg/ml (KAJIYAMA et al., 1998).

Frações em hexano, éter etílico e diclorometano do extrato da alga marrom *Cystoseira tamariscifolia* apresentaram atividade frente fungos e bactérias. Porém a fração em éter etílico mostrou uma maior atividade para as bactérias *Agrobacterium tumefaciens*, *E. coli* e *S. aureus* e para os fungos fitopatogênicos *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* e *Verticillium albo-atrum* (ABOURRICHE et al., 1999).

#### 3.4.4. Outras atividades biológicas das algas marinhas

*Ulva rigida* apresentou elevadas concentrações de prolina e ácido ascórbico, moléculas utilizadas na síntese do colágeno. Também apresentou ácido glicurônico, um dos principais constituintes do polissacarídeo ulvana, que é um componente importante da condroitina (matriz de mucopolissacarídeos viscosos que atuam como flexíveis conectores entre filamentos de colágeno e as cartilagens) (RAMAZANOV, 2004).

O polissacarídeo ulvana de *Ulva pertusa* e duas frações de menores pesos moleculares apresentaram ações antihiperlipidêmicas: diminuíram o colesterol total plasmático, LDL, triglicerídeos e aumentaram o HDL; sugerindo que a ulvana tem um potencial de prevenção de doenças isquêmicas cardiovasculares e cerebrais (PENGZHAN et al., 2003a,b).

Segundo Sampaio et al. (1993), as hemaglutininas (proteínas com atividade hemaglutinante de células ou glicoconjugados com capacidade de reconhecimento específico e ligação reversível a carboidratos ou compostos contendo carboidratos) de algas marinhas possuem propriedades particulares, tais como: capacidade de aglutinar eritrócitos de coelho tratados enzimaticamente, não apresentar afinidade por monossacarídeos, não requerer íons metálicos, baixas massas moleculares quando comparadas as hemaglutininas de plantas superiores e ocorrência em formas monoméricas.

De todas as hemaglutininas provenientes de algas marinhas isoladas e purificadas, apenas as hemaglutininas da alga vermelha *Ptilota plumosa* e das algas verdes *Codium fragile* e *Ulva lactuca* apresentaram especificidade para os grupos sanguíneos humanos B, A<sub>1</sub> e O(H), respectivamente. A hemaglutinina de *U. lactuca*, além de apresentar especificidade para o grupos sanguíneos humanos, tem a



propriedade de distinguir por intensidade de aglutinação os grupos  $A_2$ ,  $A_2B$  de  $A_1$  e  $A_1B$  (SAMPAIO et al., 1993).

### **3.5. Utilização de algas marinhas na agricultura**

As macroalgas são organismos muito diversificados e de ocorrência freqüente em ambientes marinhos. Apresentam vantagens como o rápido crescimento e produção de grande volume de biomassa, além de terem ampla ocorrência no litoral brasileiro e algumas espécies serem facilmente cultivadas. Estes são atributos importantes que podem possibilitar a exploração comercial para a produção de matéria prima para os mais variados usos, além daqueles já conhecidos, tais como produção de alimentos, fabricação de ágar, fertilizantes, fármacos e cosméticos (STADNIK, 2003).

O uso de pesticidas, em função da sua praticidade e eficiência tornou-se há muitos anos uma prática comum para o controle de doenças de plantas. No entanto, o uso excessivo desses produtos vêm criando sérios problemas para a sociedade, principalmente relacionados a saúde pública e a contaminação das águas.

A demanda por produtos naturais para o controle de doenças de plantas vem aumentando rapidamente, devido às tendências atuais do mercado, que buscam disponibilizar produtos fitossanitários cada vez menos tóxicos ao homem e ao meio ambiente. Trabalhos de bioprospecção buscando moléculas bioativas em plantas, fungos, algas e outros organismos ganharam maior destaque neste século (STADNIK, 2003; BONALDO et al., 2004; KLARZYNSKI et al., 2003; STADNIK, BETTIOL; SAITO, 2003).

Nas relações custo/benefício dos investimentos em pesquisa, os produtos naturais têm os maiores retornos, pois não necessitam de síntese de novas

moléculas. Além disso, atualmente tem-se focado o desenvolvimento de novos produtos fitossanitários que mimetizam moléculas naturais, tendo como finalidade a síntese de novos compostos bioativos capazes de controlar doenças de plantas, com menor impacto na saúde e ambiente (STADNIK, 2003).

Aproximadamente 70% da biosfera são ocupados por biomas marinhos, os quais detêm diversidade taxonômica e bioquímica maior do que os biomas terrestres. Neste contexto, as algas são uma das fontes potenciais para o desenvolvimento destes novos produtos. Embora inúmeros trabalhos científicos relatem diversos compostos bioativos em extratos de algas, entre os quais, aqueles capazes de inibir o crescimento de bactérias e de fungos, estimular o crescimento e/ou fortalecer as defesas das plantas contra o ataque de patógenos, somente na última década produtos extraídos desses organismos despertaram maior interesse da comunidade científica e da iniciativa privada (STADNIK, 2003).

Algumas espécies de algas, usadas na forma seca ou em extratos, já estão sendo comercializadas como bioestimulantes/fertilizantes, como por exemplo os produtos Folical E<sup>®</sup>, Phycarine<sup>®</sup>, Roots<sup>®</sup>, Selecal<sup>®</sup>, Tonialg<sup>®</sup>, comercializados em países da Europa e nos Estados Unidos, sendo capazes de aumentar a resistência de plantas a doenças e a geadas (GOËMAR, 2005). Contudo, o real potencial de macroalgas para a produção de produtos naturais na agricultura permanece pouco explorado (STADNIK, 2003).

Extratos da alga *Ascophyllum nodosum* estimulam processos fisiológicos das plantas, como a fotossíntese, a absorção e a utilização de nutrientes (GOËMAR, 2005). Tasco-Forage, um extrato desta alga, apresenta atividade antioxidante em plantas (ALLEN et al., 2001).

Segundo Zeemke-White e Ohno (1999) diversos gêneros de algas são utilizadas na agricultura em diversos países, conforme mostrado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Principais algas marinhas utilizadas na agricultura em diversos países, de acordo com a divisão que pertencem.

<b>Gênero</b>	<b>País</b>
<b>Divisão Chlorophyta</b>	
<i>Enteromorpha</i> spp.	Portugal
<i>Ulva</i> spp.	Portugal, Itália, França, Chile, Brasil
<b>Divisão Rhodophyta</b>	
<i>Ahnfeltia plicata</i>	Chile
<i>Gracilaria</i> spp.	Portugal
<i>Gracilaria chilensis</i>	Nova Zelândia
<i>Halymenia venusta</i>	Kenya
<i>Laurencia papilosa</i>	Kenya, Filipinas
<i>Lithothamnion corallioides</i>	França, Reino Unido, Irlanda
<i>Phymatolithon calcareum</i>	França, Irlanda, Reino Unido
<b>Divisão Phaeophyta</b>	
<i>Alaria fitulosa</i>	Alasca
<i>Ascophyllum nodosum</i>	França, Canadá, China, Chile
<i>Fucus</i> spp.	França
<i>Fucus gardneri</i>	Canadá
<i>Hydroclathrus clathratus</i>	Filipinas
<i>Laminaria schinzii</i>	África do sul
<i>Macrocystis pyrifera</i>	Austrália
<i>Nereocystis luetkaena</i>	Alasca, Canadá
<i>Sargassum</i> spp.	Brasil, Vietnã

**Fonte:** ZEMKE-WHITE e OHNO, 1999; STADNIK e TALAMINI, 2004; PÁDUA; FONTOURA; MATHIAS, 2004.

A alga calcárea *Corallina pilulifera* apresenta alto conteúdo de elementos minerais: magnésio, cálcio, ferro, zinco, quando comparada a algas verdes, marrons ou vermelhas. Esta alga pode ser cultivada e, portanto, explorada comercialmente para fins agrícolas e para a criação de animais como fornecedora de elementos minerais necessários para o desenvolvimento de plantas e animais (YAN, 1999).

Entre o estado do Espírito Santo e a região de Búzios (RJ), uma característica marcante é a presença de vasta área coberta por fundos de algas calcárias com teor em carbonatos superior a 90%, estendendo-se por várias dezenas de metros de profundidade e aflorando nas marés baixas. Este banco de algas calcárias tem despertado interesse e vem sendo explorado para produção de adubos e aditivos de rações (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

A empresa Göemar, localizada na França, comercializa um produto líquido a base de extrato de alga, chamado de Göemar BM 86<sup>®</sup>, que otimiza o desenvolvimento das plantas (GOËMAR, 2005). Também na França, o grupo Roullier oferece produtos (Lithothamne<sup>®</sup>, Biomag<sup>®</sup>, Magneplus<sup>®</sup> e Maxlith 68<sup>®</sup>) a base de carbonato de cálcio obtidos de uma alga marinha calcárea, *Lithothamnium calcareum*, também chamada de “maërl”. Estes produtos possuem um conteúdo rico em elementos minerais, principalmente cálcio e magnésio, e servem para otimizar o balanço físico-químico de solos ácidos e favorecer o ambiente para a microbiota do solo, deixando-o mais fértil (ROULLIER, 2005).

Em estudos de taxonomia e ecologia, realizados em Santa Catarina, foi constatado que a espécie predominante era *Sargassum vulgare*, representando mais de 47% da biomassa total. Com relação à estrutura do banco de algas calcáreas, de 30 a 48% do recobrimento do ambiente esteve representado por *Lithothamnion heteromorphum* (HORTA, 2005).

O favorecimento do crescimento de algas bentônicas em reservatórios de água com excrementos provenientes da criação de animais é uma vantagem, pois, estas algas convertem o nitrogênio (N) que seria volatilizado para a atmosfera sob a forma de amônia e o fósforo (P) dos excrementos em um rápido crescimento de biomassa (MULBRY et al., 2005). A matéria seca destas algas apresenta um grande acúmulo de nutrientes como nitrogênio (4,9 a 7,1%) e fósforo (1,5 a 2,1%), necessários ao desenvolvimento de plantas. Depois de colhida e seca, a biomassa de algas concentra os nutrientes em um pequeno volume, facilitando assim, o seu armazenamento e diminuindo os custos de transporte (WILKIE e MULBRY, 2002).

O potencial das algas melhorarem as condições do solo para o cultivo agrícola tem recebido mais atenção nas últimas décadas e esta propriedade tem sido atribuída ao fato de que o solo fica revestido por partículas de polissacarídeos que estimulam o crescimento de bactérias e fungos saprófitas do solo, eliminando assim, os microrganismos patogênicos. Além disso, as algas melhoram a agregação do solo, minimizando a erosão e otimizando a aeração, aumentando a capacidade de retenção e de movimentação da água, desenvolvimento de raízes, além de fertilizá-lo (WILKIE e MULBRY, 2002).

Além da atividade direta contra fitopatógenos, algumas espécies de algas produzem moléculas bioativas capazes de induzir a resistência em plantas (CLUZET et al., 2004). Embora as macroalgas sejam uma importante fonte de metabólitos bioativos, ainda são pouco utilizadas para o controle de doenças de plantas (STADNIK, 2003).

### **3.5.1. Indução de resistência em plantas**

O manejo ecológico de doenças pode ser definido como produção econômica de culturas de alta qualidade, utilizando métodos de cultivo ecologicamente seguros, minimizando os efeitos secundários indesejáveis e utilizando métodos de manejo que garantam a saúde dos seres vivos e a preservação do ambiente. Portanto, deve-se ter em mente que a adoção do manejo ecológico não é uma alternativa, mas uma necessidade para a preservação do meio ambiente e a própria sobrevivência da humanidade (WORDELL FILHO, 2004).

A indução de resistência é um fenômeno muito comum na natureza, onde alguns tipos de estresse ou uma pré-infecção com um patógeno tornam as plantas mais resistentes a infecções subseqüentes por outros patógenos. Embora conhecido desde o início do século XX, este fenômeno biológico tem sido investigado com maior persistência somente nas últimas décadas. A indução de resistência é uma estratégia eficiente e alternativa para a proteção de plantas e mostra-se menos agressiva à saúde humana e ao equilíbrio de agroecossistemas (STADNIK e MARASCHIN, 2004).

A indução de resistência foi constatada no trabalho de Chester, em 1933, que demonstrou que plantas inoculadas com um microrganismo atenuado ficavam protegidas contra subseqüentes infecções pelo mesmo microrganismo ou contra outros patógenos. Mas, somente o trabalho de Ross, em 1961, demonstrou que uma infecção localizada pode induzir resistência sistêmica, ou seja, em tecidos distantes do local da primeira infecção, a uma ampla gama de patógenos. A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas (STADNIK e MARASCHIN 2004).

No curso da evolução, as plantas desenvolveram um complexo mecanismo de reações de reconhecimento, ataque e defesa para se protegerem contra patógenos. Em poucos minutos, o reconhecimento de patógenos pelas plantas gera respostas de defesa como, por exemplo, modificação do influxo de íons através da membrana plasmática, fosforilação e desfosforilação de proteínas sinalizadoras, produção de radicais reativos do oxigênio. Em poucas horas, estes eventos são seguidos pela indução de amplo espectro de reações que conferem resistência local contra os microrganismos, incluindo: a) reforços na parede celular pela síntese de lignina; b) produção de metabólitos secundários sinalizadores da via dos fenilpropanóides e octadecanóides, como o ácido salicílico e jasmonatos, respectivamente; c) acúmulo de componentes com atividades antimicrobianas, como as fitoalexinas e proteínas relacionadas a patogênese (PR-proteínas), como por exemplo a PR-1 ácida. Em algumas interações com patógenos, estas respostas de defesa são acompanhadas por reações de hipersensibilidade, causando a morte celular programada nos sítios de ataque do microrganismo (KLARZYNSKI et al., 2003; RAD; MUELLER; DURNER, 2005).

O reconhecimento de microrganismos invasores também pode resultar no aumento da resistência em partes não afetadas da planta, um processo conhecido por resistência sistêmica adquirida, conferindo longo período de resistência a diferentes patógenos, em locais não diretamente tratados (STICHER; MAUCHMANI; MÉTRAUX, 1997).

As plantas detectam o ataque de microrganismos ou de elementos estranhos através de componentes de superfície do invasor (SELITRENNIKOFF, 2001; KLARZYNSKI et al., 2003) ou através de moléculas sinalizadoras, também chamadas de elicitores. Portanto, elicitores são moléculas capazes de acionar as

respostas de defesa de plantas contra patógenos e podem ser ferramentas alternativas no controle de doenças de plantas (CLUZET et al., 2004).

Para o uso de elicitores como protetores de plantas, é importante selecionar compostos que: (1) causem um amplo espectro de respostas; (2) não causem alterações no metabolismo primário da planta e (3) garantam a proteção contra doenças (CLUZET et al., 2004).

Elicitores podem ser moléculas de origem biótica ou abiótica. Os elicitores bióticos podem ser microrganismos viáveis ou inativados (STADNIK e MARASCHIN, 2004; STANGARLIN et al., 1999) e também compreendem moléculas como glicoproteínas, peptídeos, carboidratos e lipídeos (CLUZET et al., 2004). Muitos elicitores têm sido caracterizados como poli ou oligossacarídeos de parede celular, incluindo  $\beta$ -glucanas de microrganismos e oligômeros derivados da quitina (KLARZYNSKI et al., 2003).

Elicitores abióticos são representados por derivados do ácido salicílico, ácido aminobutírico, ácido 2,6-dicloroisonicotínico (BONALDO et al., 2004), benzotiadiazólicos (STADNIK e BUCHENAUER, 2000), luz ultravioleta, fosfatos (BONALDO et al., 2004), entre outros.

Elicitores acionam várias vias sinalizadoras, que também são ativadas em casos de infecção por microrganismos. Geralmente começam com influxo de cálcio e com explosão oxidativa, seguida de síntese de moléculas sinalizadoras como ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno. Genes relacionados com as defesas das plantas levam a um mecanismo de resistência de caráter estrutural, como o fortalecimento das paredes celulares através da formação de anéis de lignificação ao redor das paredes e deposição de papilas lignificadas nos sítios de penetração fúngica (MOERSCHBACHER et al., 1988) ou levam a um mecanismo de resistência



de caráter bioquímico, como a acumulação de compostos antimicrobianos como as fitoalexinas, indução da síntese de proteínas relacionadas à patogênese ( $\beta$ -1,3 glucanase e quitinase, enzimas degradadoras da parede celular de fungos) e proteínas com atividades hidrolíticas ou inibitórias contra microrganismos, como por exemplo peroxidases (CLUZET et al., 2004; STADNIK e MARASCHIN, 2004).

O composto sintético benzo (1,2,3) tiadiazol-7 carbotióico S-éster metílico (BTH) é o primeiro produto pertencente a uma classe de compostos protetores de plantas (benzotiadiazólicos) efetivos na indução de resistência. Em 1996, este composto foi introduzido na Alemanha como constituinte da formulação de um produto chamado Bion<sup>®</sup> (Novartis, Basel) para o controle do oídio do trigo (STADNIK e BUCHENAUER, 2000). Atualmente, é comercializado em diversos países, entre eles, o Brasil.

A variada natureza química dos elicitores demonstra que não há uma característica estrutural única que determine a atividade elicitora e mostra-se como uma estratégia potencial para o controle fitossanitário (STADNIK e MARASCHIN, 2004).

O polissacarídeo quitosana é um polímero natural obtido por desacetilação da quitina, que é o segundo composto orgânico renovável mais abundante (antecedido somente pela celulose), e é encontrado no exoesqueleto de crustáceos, de insetos e no plâncton. Quitosana é um polímero linear, formado por unidades repetitivas de 2-amino-2-deoxi-D-glicose (D-glicosamina) ligadas por  $\beta$ -(1,4) (ASSIS e PESSOA, 2004). Por outro lado, quitosana também é um típico constituinte de parede celular de fungos patogênicos biotróficos. Enzimas como quitinases e, possivelmente, quitosanases de plantas podem degradar essas quitosanas de fungos patogênicos invasores. Isto não somente destrói as paredes celulares de fungos, mas também

libera oligômeros solúveis em água e/ou polímeros de quitina e/ou quitosana que podem atuar como elicitores em reações de defesa das plantas. Portanto, quitosana é um polissacarídeo elicitador das reações de defesas em plantas (VANDER et al., 1998).

#### **3.5.1.1. Indução de resistência em plantas por compostos derivados de algas marinhas**

Algas marinhas representam uma abundante e natural fonte de potenciais elicitores (KLARZYNSKI et al., 2000; KLARZYNSKI et al., 2003; CLUZET et al., 2004), além de apresentarem atividade direta contra fungos e bactérias, conforme descrito em itens anteriores. Diversas plantas tratadas com extratos de algas tornaram-se resistentes à doenças, além de melhorar a germinação de sementes (KLARZYNSKI et al., 2003; CLUZET et al., 2004).

A  $\lambda$ -carragenana, um polissacarídeo sulfatado encontrado na parede celular de algas marinhas vermelhas, é um composto elicitador, dose-dependente, que apresenta atividade a partir de 100  $\mu\text{g/ml}$  induzindo o acúmulo de ácido salicílico e de outros compostos em folhas tratadas de *Nicotiana tabacum*, aumentando a expressão de genes relacionados às defesas contra patógenos (MERCIER et al., 2001).

Extratos da alga marrom *Ascophyllum nodosum* são eficientes para controlar Oomycetes. Em videira, pulverizações foliares com extratos desta alga reduziram o número de folhas infectadas, área foliar lesionada e a taxa de esporulação de *Plasmopora viticola*, em 28, 40 e 50%, respectivamente. Estudos bioquímicos com plantas de pimentão tratadas com extrato de *A. nodosum* revelaram aumento da

atividade de peroxidase e síntese de fitoalexina capsidiol, conseqüentemente, aumentando a resistência das plantas a *Phytophthora capsici* (LIZZI et al., 1998).

O produto Phyllum<sup>®</sup>, registrado como bioestimulante natural, possui em sua formulação extrato de *A. nodosum* e é comercializado no Chile para estimular processos fisiológicos de plantas (STADNIK e TALAMINI, 2004).

Um polímero linear de  $\beta$ -1,3-glucana, chamado de laminarana, foi extraído e purificado da alga marrom *Laminaria digitata* (KLARZYNSKI et al., 2000). Em uma suspensão de cultura de células de tabaco, a concentração de 200  $\mu$ g/ml de laminarana, em poucos minutos, alcalinizou o meio extracelular e aumentou a concentração de peróxido de hidrogênio. Em poucas horas, estimulou a atividade de enzimas, como a fenilalanina amônia liase, lipoxigenase e propiciou o acúmulo de ácido salicílico, sem causar danos as células da cultura. Por outro lado, quando esta concentração foi infiltrada em folhas de tabaco, após 48 horas a laminarana ativou a produção de quatro famílias de PR-proteínas e após cinco dias do tratamento, reduziu a infecção por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, quando comparada com folhas tratadas apenas com água (KLARZYNSKI et al., 2000).

O extrato de *L. digitata* é registrado e comercializado pela empresa Göemar com o nome de Iodus 40<sup>®</sup> (40 g de laminarana por litro) para induzir resistência contra doenças em trigo, tais como fusariose, oídio e septoriose. Esse produto não é fitotóxico e os custos energéticos para a planta, devido a indução de resistência, são baixos ou inexistentes (STADNIK e TALAMINI, 2004).

Fucanas sulfatadas são componentes estruturais comuns em paredes celulares de algas marinhas marrons. Klarzynski et al. (2003), utilizando-se de uma enzima hidrolase isolada de bactéria marinha para preparar oligossacarídeos de fucanas sulfatadas, demonstraram atividade elicitora destes oligômeros em plantas

de fumo, contra o vírus do mosaico do tabaco. Análises bioquímicas de folhas de fumo tratadas com estes oligossacarídeos, mostraram aumento de marcadores de resistência sistêmica adquirida (SAR): acúmulo sistêmico de ácido salicílico e fitoalexina escopoletina, indução das enzimas fenilalanina amônia liase e lipoxigenase e também aumento da expressão de inúmeras proteínas relacionadas a patogênese após 200 µg de oligofucanas infiltradas nas folhas.

### 3.6. O gênero *Ulva*

*Ulva* spp. são algas verdes pertencentes à divisão Chlorophyta. Após um corte transversal, o gênero *Ulva* se diferencia do gênero *Ulvaria*, pois apresenta duas camadas de células, enquanto que este apresenta somente uma camada. Devido a esta característica as lâminas de *U. lactuca* e *U. fasciata* são mais rígidas que as lâminas de *Ulvaria oxysperma*, atualmente chamada de *Monostroma oxysperma* (PÁDUA; FONTOURA; MATHIAS, 2004).

Espécies de *Ulva* spp são encontradas em diversos habitats. Os zoósporos podem se fixar em matéria orgânica ou inorgânica e originam lâminas maiores que 20 centímetros de comprimento. *U. fasciata* utiliza rochas como substrato, enquanto que *U. lactuca* utiliza manguezais e areia para o seu crescimento (PÁDUA; FONTOURA; MATHIAS, 2004).

Segundo estudo realizado por Taquil e Yoneshigue-Valentin (2002) na Praia de Boa Viagem (Niterói, RJ), as espécies *U. fasciata* Delile e *U. rigida* C. Agardh foram encontradas nas quatro estações do ano. Já a espécie *U. lactuca* L. foi encontrada somente na primavera e no inverno. Porém, segundo Lamare e Wing (2001), *U. lactuca* é anual, mas cresce abundantemente no inverno. No ano de 2002, a flora da Praia de Boa Viagem era formada predominantemente por *U.*

*fasciata* e *Enteromorpha compressa*, espécies capazes de reter metais pesados, potencialmente indicadoras de poluição orgânica (LAHAYE, 1998; TAQUIL e YONESHIGUE-VALENTIN, 2002).

*Ulva* representa uma importante biomassa ainda pouco utilizada (LAHAYE; BRUNEL; BONNIN, 1997). Algumas das espécies de *Ulva* são utilizadas como alimento para o homem, por serem ricas em fibras (LAMARE e WING, 2001; LAHAYE; BRUNEL; BONNIN, 1997; GARG et al., 1992). *U. lactuca* é utilizada na alimentação de animais ruminantes (VENTURA e CASTAÑÓN, 1998; LAHAYE, 1998; PÁDUA; FONTOURA; MATHIAS, 2004) e como fertilizantes na agricultura (GARG et al., 1992). *U. reticulata* também é utilizada na agricultura como condicionador de solo (VAIRAPPAN e SUZUKI, 2000).

As espécies de *Ulva* são encontradas em diversos países, conforme descrito na Tabela 2.

### **3.6.1. *Ulva fasciata***

*U. fasciata* é uma alga verde (Figura 2) que apresenta ampla distribuição no litoral catarinense (HORTA et al., 2001) e cresce abundantemente na Ilha do Mel, litoral do Paraná (PÁDUA; FONTOURA; MATHIAS, 2004). Esta macroalga, também conhecida como alface do mar (*sea lettuce*), pertence à divisão Chlorophyta, ordem Ulvales, família Ulvaceae e gênero *Ulva*. É constituída por talos muito finos, que se apresentam sob a forma de extensas lâminas. Aproximadamente 10 a 15 cm da base, essas lâminas começam a afilarem-se gradualmente até atingirem 2,5 cm de largura; podendo chegar a mais de 1 metro de comprimento. Na base, são lâminas largas que se dividem em muitas tiras com margens regulares, freqüentemente onduladas. Mantêm-se presas às rochas através de pequenas raízes escuras. As

lâminas são verdes brilhantes ou verdes escuras, douradas nas bordas em fase de reprodução (JOLY, 1965).

**Tabela 2.** Países onde são encontradas espécies de *Ulva*.

Local	Espécie de <i>Ulva</i>	Referência
Brasil (PR, SC, RJ, CE)	<i>Ulva fasciata</i> , <i>Ulva lactuca</i> , <i>Ulva rigida</i>	PÁDUA; FONTOURA, MATHIAS, 2004; TAQUIL e YONESHIGUE-VALENTIN, 2002; PEREIRA et al., 2000; HORTA et al., 2001
França	<i>Ulva rigida</i> , <i>Ulva rotundata</i> , <i>Ulva armoricana</i> , <i>Ulva olivascens</i> , <i>Ulva scandinavica</i>	CLUZET et al., 2004; RAY e LAHAYE, 1995a; LAHAYE et al., 1999; BRIAND e MORAND, 1997; LAHAYE e AXELOS, 1993
China	<i>Ulva fasciata</i> ; <i>Ulva pertusa</i>	WANG et al., 2004; PENGZHAN et al., 2003a; LEE e CHEN, 1998
Hawaii	<i>Ulva fasciata</i>	UNIVERSITY OF HAWAII, 2004
Espanha	<i>Ulva gigantea</i> , <i>Ulva rigida</i>	LAHAYE et al., 1999; GONZÁLEZ DEL VAL et al., 2001
Índia	<i>Ulva fasciata</i> , <i>Ulva lactuca</i>	SELVIN e LIPTON, 2004; GARG et al., 1992; BHOSALE; JAGTAP; NAIK, 1999; IMMANUEL et al., 2004
Peru	<i>Ulva nematoidea</i>	MAGALLANES; CÓRDOVA; OROZCO, 2003
Estados Unidos	<i>Ulva lactuca</i>	SCHLOSSER et al., 2005
Malásia	<i>Ulva reticulata</i>	VAIRAPPAN e SUZUKI, 2000
Tanzania	<i>Ulva reticulata</i>	MSUYA e NEORI, 2002
Nova Zelândia	<i>Ulva lactuca</i>	LAMARE e WING, 2001
Portugal	<i>Ulva</i> spp.	ZEMKE-WHITE e OHNO, 1999
Itália	<i>Ulva rigida</i> , <i>Ulva armoricana</i> , <i>Ulva lactuca</i> , <i>Ulva rotundata</i> ,	PARADOSSI et al., 1999; PARADOSSI; CAVALIERI; CHIESSI, 2002; ZEMKE-WHITE e OHNO, 1999

Os talos com as lâminas expandidas apresentam somente duas finas camadas de células. A divisão celular pode ocorrer em qualquer parte do talo, mas sempre em um plano perpendicular a sua superfície. As células são geralmente retangulares, com 8 a 20  $\mu\text{m}$  de largura por 14 a 40  $\mu\text{m}$  de comprimento,

irregularmente arranjadas. As paredes das células são constituídas de celulose (UNIVERSITY OF HAWAII, 2004).



**Figura 2.** Macroalga marinha *Ulva fasciata*.

É comumente encontrada em paredões rochosos ou rochas isoladas com ondas fortes e baixas, com poucos herbívoros (JOLY, 1965). Frequentemente abundante em áreas de água fresca corrente com grande oferta de nutrientes, perto de córregos, riachos ou onde desembocam canos. Sua presença indica zonas poluídas ou de maré forte, sendo encontrada nos oceanos Pacífico, Atlântico e Índico (UNIVERSITY OF HAWAII, 2004).

*U. fasciata* e *Enteromorpha flexuosa* são geralmente as primeiras macroalgas a colonizar novos substratos em áreas de maré com elevada oferta de nutrientes. Esta característica pode ser atribuída a sua simples morfologia e reprodução. A facilidade de reprodução dessa alga se deve a capacidade fotossintética das células reprodutivas, que podem sintetizar moléculas que auxiliam na mobilidade e no rápido crescimento após a fixação ao substrato. As células reprodutivas de *U. fasciata* possuem similar capacidade fotossintética do que as células adultas vegetativas, porém com maior capacidade respiratória. Esta ampla distribuição também se deve ao poder invasivo. Águas costeiras próximas a portos, complexos industriais e

residenciais com elevada oferta de nutrientes favorecem o aumento rápido de espécies de *Ulva* (“blooms”) (UNIVERSITY OF HAWAII, 2004).

No Hawai, *U. fasciata* é uma alga marinha muito utilizada na alimentação. É incluída nas saladas, sopas (RAMAZANOV, 2004) ou utilizada como tempero (UNIVERSITY OF HAWAII, 2004).

### 3.6.2. Composição química das algas do gênero *Ulva*

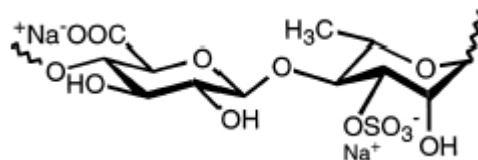
*Ulva* contém três principais componentes polissacarídicos: (a) celulose amorfa, que pode ser convertida em uma forma mais cristalina por tratamento térmico em solução aquosa de ácido clorídrico; (b) polissacarídeos aniônicos solúveis em água contendo grupos sulfatos; e (c) amido. Os polissacarídeos a e b estão localizados na parede celular, enquanto que o amido é a forma de armazenamento da glicose. A grande concentração de enxofre é atribuída a presença dos polissacarídeos aniônicos sulfatados e a presença de íons de cálcio e de magnésio é atribuída a elevada concentração de carbonatos. Não possui íons sódio. Também contém clorofilas a e b e muitos compostos carotenóides, incluindo  $\beta$ -caroteno (PARADOSSI et al., 1999).

Polissacarídeos da parede celular de *U. rigida* foram extraídos sequencialmente com oxalato de sódio, hidróxido de potássio (KOH) 1 e 4 M, cloreto de sódio e KOH a 4 M novamente. A composição química dos extratos solúveis e insolúveis e de frações de polissacarídeos solúveis obtidas de uma coluna de DEAE-Sepharose foi determinada. Através desta metodologia, Ray e Lahaye (1995a) obtiveram três principais famílias de polissacarídeos. A principal família foi composta de polissacarídeo ácido, formado principalmente de ramnose (23,8-26,3 mol%), ácido urônico (18,4-22,6 mol%), sulfato (38,4-41,9 mol%), xilose (10,2-12,3 mol%) e



traços de glicose unidos sob a forma de glicuronoramnoxiloglicanas sulfatadas em uma mesma cadeia e o rendimento, em relação ao peso de alga seca utilizada na extração, foi de 10,52 %. Esta família de polissacarídeos sulfatados ramificados de *Ulva* foi denominada **ulvana** por Lahaye e Axelos em 1993. As outras duas famílias isoladas são cadeias hemicelulósicas lineares solúveis em meio alcalino, compostas de  $\beta$ -1,4-glicuronanas e  $\beta$ -1,4-glicoxilanas. Em menor quantidade, uma quarta fração consistiu em polissacarídeos neutros sulfatados, extraídos com KOH a 1 e 4 M e cloreto de sódio, contendo principalmente glicose, xilose e em menor concentração ramnose, ácidos urônicos e sulfatos, além de apresentar também proteínas.

As ulvanas, são compostas, então, principalmente por unidades dissacarídicas regulares formadas por ácido  $\beta$ -D-glicuronosilurônico (1 $\rightarrow$ 4)-L-ramnose ou simplesmente ácido ulvanobiurônico ou ácidos aldobiourônicos, conforme ilustrado na Figura 3 (PARADOSSI et al., 1999).



**Figura 3.** Representação esquemática da estrutura principal do polissacarídeo sulfatado (ulvana) obtido de *Ulva*. Fonte: PARADOSSI et al., 1999.

A ulvana encontra-se em todas as paredes celulares (BOBIN-DUBIGEON et al., 1999), representando a maior fração de biopolímeros da parede (PARADOSSI; CAVALIERI; CHIESSI, 2002). Segundo Ray e Lahaye (1995a), glicoproteínas sulfatadas, compostas de ácido glicurônico, glicose, ramnose e xilose também foram encontradas em extratos obtidos de *U. lactuca* com hidróxido de sódio (NaOH) a 1 M e xilose, glicose e galactose foram obtidas de extrações com KOH 4 M.

As hidrólises enzimática e ácida permitem a obtenção de oligômeros deste polissacarídeo: ácido urônico, que pode ser conjugado com a glicose formando ácido glicurônico (RAY e LAHAYE, 1995b), ramnose sulfatada, xilose (LAHAYE e RAY, 1996; PARADOSSI et al., 1999) e em menores concentrações glicose e galactose (RAY e LAHAYE, 1995a). Devido a esta estrutura química particular, os ácidos aldobiourônicos são resistentes a hidrólise ácida, a enzimas digestivas humanas e a fermentações *in vitro* pela biota fecal humana, impedindo assim a quebra das ligações entre glicose e ramnose (RAY e LAHAYE, 1995b). Estes polissacarídeos são solúveis em água (RAY e LAHAYE, 1995a) e possuem a capacidade de formar géis na presença de íons cálcio e borato (PARADOSSI et al., 1999).

Estudos de desulfatação, de redução e espectroscopia de RNM de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  evidenciaram que na ulvana o O-3 da ramnose e o O-2 da xilose são sítios de sulfatação e que aproximadamente 16,8-20,7% da ramnose está ramificada em O-2 e sulfatada em O-3 (RAY e LAHAYE, 1995b; LAHAYE e RAY, 1996)

Os polissacarídeos insolúveis em soluções básica são muito semelhantes entre as espécies. Em *U. lactuca*, são compostos de celulose de cadeias lineares de  $\beta$ -1,4-xiloglicanas (LAHAYE e RAY, 1996). A ramnose é freqüentemente encontrada em exopolissacarídeos de bactérias ou em alguns polissacarídeos vegetais, mas ramificações em O-2 de (1 $\rightarrow$ 4) ácido- $\beta$ -D-glicurônico ligado a L-ramnose somente foram descritas no exopolissacarídeo produzido pela bactéria *Arthrobacter* sp. (LAHAYE e RAY, 1996).

A maioria das cadeias possui na extremidade uma unidade de ácido glicurônico, que é o principal carboidrato do polissacarídeo solúvel em água (ulvana) dos membros da ordem Ulvales (RAY e LAHAYE, 1995b). Devido as suas

características estruturais, a ulvana é similar a classe dos polissacarídeos naturais chamados de mucopolissacarídeos (PARADOSSI et al., 1999). O comprimento da cadeia ainda é desconhecido e não é possível afirmar que os sítios de ligações dos sulfatos e dos açúcares são os mesmos entre ulvanas de diferentes espécies de *Ulva* (LAHAYE e RAY, 1996).

*Enteromorpha intestinalis* também possui polissacarídeos sulfatados (LEE et al., 1998) formados por glicuronoxiloramana, contendo 43% de ramnose, 19,8% de íons sulfatos e 17% de ácidos urônicos. Esta composição é comparável a de outras algas da família Ulvaceae. Porém, os extratos obtidos com oxalato de amônio a 75°C contém galactose e menores valores de viscosidade, provavelmente como resultado da quebra de ligações lábeis entre cadeias (REVIERS e LEPROUX, 1993). Este polissacarídeo apresenta uma potente atividade anticoagulante (LEE et al., 1998)

Poucas famílias de enzimas degradadoras de polissacarídeos de algas têm sido descritas. Foram descritas alginatos liases e galactanas hidrolases ( $\beta$ - e  $\alpha$ -agarases,  $\kappa$ - e  $\iota$ -carragenases) para estudos de estrutura química dos seus substratos e para a produção de protoplastos de algas. Para a degradação de ulvana, Lahaye; Brunel e Bonnin (1997), obtiveram uma enzima a partir de uma bactéria Gram-negativa formadora de pequenas colônias de coloração alaranjada isolada de lama contendo *Ulva* sp. em decomposição, apresentando atividade máxima em pH próximo a 9,0 e à temperatura entre 40-50°C. Esta enzima gerou várias unidades de ácido ulvanobiurônico, confirmando que estas unidades são as principais unidades de construção do esqueleto da ulvana.

Em um estudo realizado por Pádua, Fontoura e Mathias (2004), a alga *U. lactuca*, coletada em Guraraqueçaba nos meses de outubro e fevereiro, apresentou

16,79% de proteínas, 1,20% de lipídeos, 10,78 de fibras e 58,03% de carboidratos, em média. Já, a alga *U. fasciata* coletada na Ilha do Mel durante os meses de verão (dezembro e fevereiro) apresentou menores porcentagens de proteínas, lipídeos e carboidratos, porém apresentou a mesma porcentagem de fibras, conforme ilustrado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Composição química (em 100 g de amostra) de *Ulva lactuca* coletada em Guaraqueçaba nos meses de outubro e fevereiro de 1996 e de *Ulva fasciata* coletada na Ilha do Mel em dezembro e fevereiro de 1995.

Parâmetros analisados	<i>Ulva lactuca</i> <sup>1</sup>	<i>Ulva lactuca</i> <sup>2</sup>	<i>Ulva fasciata</i> <sup>3</sup>	<i>Ulva fasciata</i> <sup>4</sup>
<b>Proteínas</b>	15,2	18,3	13,3	16,1
<b>Lipídeos</b>	1,2	1,1	1,9	0,3
<b>Fibras</b>	11,9	9,6	10,8	9,3
<b>Carboidratos</b>	58,4	57,6	53,3	56,5

**Fonte:** PÁDUA; FONTOURA; MATHIAS, 2004.

<sup>1</sup>Coletada em Guaraqueçaba em outubro.

<sup>2</sup>Coletada em Guaraqueçaba em fevereiro.

<sup>3</sup>Coletada na Ilha do Mel em dezembro.

<sup>4</sup>Coletada na Ilha do Mel em fevereiro.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo Geral

- Avaliar, *in vitro*, a atividade antibacteriana e antifúngica e, *in vivo*, o efeito sobre a antracnose do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) de extratos e polissacarídeos da macroalga marinha *Ulva fasciata*, obtidos por diferentes processos de extração.

### 4.2. Objetivos Específicos

- Avaliar, *in vitro*, o efeito de extratos e de ulvana obtidos de *Ulva fasciata* sobre a germinação de conídios e sobre o crescimento miceliano de *Colletotrichum lindemuthianum*;

- Avaliar, *in vitro*, a atividade antibacteriana e antifúngica de extratos e ulvana através de método qualitativo, utilizando difusão em ágar;

- Avaliar, *in vitro*, a atividade antifúngica de extratos e ulvana através de método quantitativo, utilizando microdiluição em caldo;

- Estudar o efeito local e sistêmico de extratos e polissacarídeos no controle da antracnose em plantas de feijoeiro comum;

- Avaliar o efeito do tratamento foliar com extratos e polissacarídeos sobre o peso de matéria fresca e peso de matéria seca das plantas de feijoeiro comum.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

O preparo dos extratos da macroalga marinha, o teste de difusão em ágar e a determinação da concentração inibitória mínima foram conduzidos no Laboratório de Antibióticos do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os demais testes *in vitro* e *in vivo* foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia e em casa-de-vegetação, respectivamente, no Centro de Ciências Agrárias (CCA), também localizado na UFSC.

### 5.1. Coleta, secagem e identificação da macroalga

A coleta da alga foi realizada manualmente, em horários de maré baixa, nos costões rochosos da Praia Mole, Praia da Daniela, Praia do Forte e Praia da Armação do litoral de Florianópolis, Santa Catarina.

Foram realizadas 9 coletas de algas; sendo que, 3 destas foram realizadas na Praia Mole, no período compreendido entre julho e setembro de 2004; 3 foram realizadas na Praia da Daniela e na Praia do Forte, durante os meses de janeiro e fevereiro de 2005 e 3 coletas na Praia da Armação nos meses de fevereiro a abril de 2005 (Tabela 4).

Imediatamente após a coleta, todo material foi levado ao laboratório em sacos plásticos e as amostras foram submetidas a uma limpeza manual, para eliminação dos contaminantes: areia, sal, organismos epífitos, fauna acompanhante e separação de outras espécies de alga. Após, o material selecionado foi lavado abundantemente com água corrente.

Após a lavagem, as algas foram pesadas e imediatamente colocadas em estufa com aeração a 40-45°C, por 24 a 48 horas. Após o material estar completamente seco, foi triturado até a obtenção de um pó fino, o qual foi pesado e

armazenado em temperatura de  $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração. O rendimento foi calculado em relação ao peso de matéria fresca da alga.

Amostras de alga fresca foram enviadas ao Laboratório de Biologia Celular Vegetal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, sob responsabilidade da Professora Dra. Zenilda Laurita Bouzon, para a identificação do material coletado. Com base em sua morfologia, as algas coletadas foram identificadas, segundo Joly (1965), como *Ulva fasciata*

**Tabela 4.** Local, quantidade de algas frescas coletadas e o respectivo peso de matéria seca.

<b>Coletas (data)</b>	<b>Local da coleta</b>	<b>Peso fresco (g)</b>	<b>Peso seco (g)</b>
1 (21/07/04)	Praia Mole	1.545,6	115,4
2 (28/07/04)	Praia Mole	1.322,3	97,7
3 (20/09/04)	Praia Mole	1.215,4	105,1
4 (17/01/05)	Praia da Daniela e Praia do Forte	2,153,1	179,8
5 (26/01/05)	Praia da Daniela e Praia do Forte	1.091,9	86,8
6 (08/02/05)	Praia da Daniela e Praia do Forte	500,0	78,2
7 (09/02/05)	Praia da Armação	210,5	26,6
8 (10/03/05)	Praia da Armação	424,1	51,5
9 (20/04/05)	Praia da Armação	200,1	27,87

## **5.2. Preparo dos extratos e obtenção de ulvana**

### **5.2.1. Extrato metanólico**

Para a obtenção do extrato metanólico, 202,13 g de alga seca e moída foram extraídos com metanol em sistema de Soxhlet. O solvente permaneceu em contato com o material até a extração exaustiva das substâncias.

Todo o solvente do extrato bruto, assim obtido, foi evaporado em evaporador rotatório sob vácuo a 45-50°C e o extrato concentrado foi armazenado à temperatura de 6±2°C. No momento da realização dos testes, o extrato concentrado foi diluído em água destilada ou em dimetilsulfóxido (DMSO) para obter-se as concentrações de 1 mg/ml e 2 mg/ml. O rendimento do extrato em relação à quantidade de alga seca utilizada na extração foi determinado.

### **5.2.2. Extrato etanólico**

Para a obtenção do extrato etanólico, 10 g de alga seca e moída foi extraída com 10 ml de etanol P.A. durante 24 horas. Após esse período, o extrato foi filtrado em papel filtro e todo solvente foi evaporado em evaporador rotatório sob vácuo a 45-50°C. No momento da realização dos testes, o extrato bruto foi diluído com água destilada até a obtenção de uma relação de peso/volume de 10 mg de alga seca/ml de água.

### **5.2.3. Obtenção de ulvana**

Para a obtenção de compostos de alto peso molecular (polissacarídeos) da parede celular da alga, 10 g de alga seca e moída foram autoclavadas com 300 ml de água destilada durante 2 horas a 110°C (PENGZHAN et al., 2003a). Paralelamente, também foram utilizadas algas frescas para a obtenção de



polissacarídeo. Para tal, foram autoclavadas 100 g de alga fresca em 300 ml de água destilada, também durante 2 horas a 110°C (CLUZET et al., 2004). O líquido foi filtrado, concentrado por evaporação em estufa a 50°C até aproximadamente 80 ml e então, precipitado com 3 volumes de etanol P.A. e armazenado a – 20°C por 48 horas. Após esse período, o sobrenadante aquoso foi desprezado, o precipitado foi recuperado por filtração e seco em estufa a 50±2°C durante aproximadamente 24 horas até peso constante para a determinação do rendimento, em relação ao peso da alga fresca ou seca. Logo após, o polissacarídeo foi armazenado em temperaturas de 6±2°C até o momento do uso; quando dissolvido em água destilada, sob agitação, para a obtenção das concentrações de 0,1, 1, 5 e 10 mg/ml.

O polissacarídeo de *Ulva* sp., extraído segundo a metodologia de Maraschin et al. (2000) e denominado de polissacarídeo B, foi fornecido pelo Professor Dr. Marcelo Maraschin do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da UFSC, também utilizado nos testes *in vivo*.

### **5.3. Identificação química da ulvana**

A composição do polissacarídeo da alga em estudo foi determinada pelo Professor Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti do Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSC através de espectros de ultravioleta (U.V.), infra-vermelho (I.V.) e ressonância nuclear magnética de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (<sup>1</sup>H-RNM e <sup>13</sup>C-RNM). Para tal, fragmentos do polissacarídeo foram analisados por espectroscopia no Infra-Vermelho em espectrofotômetro Perkin Elmer FT-16PC com transformada de Fourier. Os espectros de RNM <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram obtidos em D<sub>2</sub>O em espectrômetro Bruker AC-200 a 200 MHz e 50 MHz respectivamente.

#### **5.4. Testes *in vitro***

Os testes *in vitro* realizados no Laboratório de Antibióticos tiveram como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica de diferentes extratos e da ulvana obtidos de *U. fasciata* em relação a bactérias patogênicas ao homem, bactérias fitopatogênicas, fungos dermatófitos, fitopatogênico e levedura. Já, os testes *in vitro* realizados no Laboratório de Fitopatologia tiveram como objetivo verificar o efeito de diferentes extratos e da ulvana sobre o crescimento miceliano e sobre a germinação de conídios de *C. lindemuthianum*

##### **5.4.1. Avaliação da atividade antimicrobiana utilizando o teste de difusão**

Foram utilizadas as estirpes potencialmente patogênicas ao homem: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus cereus* MIP 96016 (MIP, Departamento de Microbiologia de Parasitologia da UFSC), *Micrococcus luteus* MIP 200401 e *Candida albicans* ATCC 14053. Também foram utilizadas as bactérias fitopatogênicas: *Xanthomonas campestris* var. *vesicatoria* MIP 2002001 e *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* MIP 2002003 que permaneceram em temperatura de  $6\pm 2^{\circ}\text{C}$  no Laboratório de Antibióticos, em caldo BHI (“brain heart infusion”), até o momento da realização dos testes.

O método de difusão em ágar foi utilizado para estudo qualitativo da atividade antibacteriana e antifúngica do extrato metanólico, do extrato insolúvel em metanol e da ulvana. Para tal, volumes de 18 ml de ágar Müeller-Hinton foram vertidos em placas de Petri e após a solidificação do meio foram feitos 5 orifícios de 7 mm de diâmetro em cada placa.

O inóculo bacteriano foi preparado a partir de 300 µl de cada cultura estoque transferidos para 3 ml de caldo BHI. A incubação foi mantida durante 24 horas a 36°C±1°C, sendo a pureza das culturas confirmada após as primeiras 8 horas de incubação em meio ágar sangue. Após esse procedimento, a suspensão bacteriana foi diluída em solução fisiológica (0,9%) até corresponder a 10<sup>6</sup> UFC/ml (SMANIA et al., 1999).

Os extratos metanólicos foram ressuspensos em DMSO, a fim de se obter a concentração final de 4 mg/50 µl e a ulvana foi ressuspensa em água destilada esterilizada, obtendo-se também uma concentração final de 4 mg/50 µl (Valgas, 2002). Os orifícios foram preenchidos com 50 µl dos extratos a serem testados. 50 µl de DMSO foram utilizados como de teste toxicidade do solvente frente aos microrganismos testados. As placas foram incubadas durante 20 horas a 36±1°C. O resultado positivo foi definido quando houve a formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano ou fúngico (SMANIA et al., 1999), revelando, então, a produção de substâncias antibióticas.

#### **5.4.2. Avaliação da atividade antifúngica através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM)**

Para a determinação da CIM foram utilizados o extrato metanólico, o extrato insolúvel em metanol e a ulvana contra *Trichophyton mentagrophytes* MIP 2005001, *Microsporum canis* MIP 2005003 (dermatófitos). Estas culturas permaneceram em temperatura de 6±2°C no Laboratório de Antibióticos, em batata dextrose ágar (BDA), até o momento da realização dos testes. A CIM dos extratos e da ulvana também foi determinada em relação ao isolado de *Colletotrichum lindemuthianum* raça 73 Labfitop 001-03, obtido do Laboratório de Fitopatologia, previamente

identificado por Loffaguen et al. (2005). O fungo foi conservado em meio ágar batata dextrose (BDA) em temperatura de  $6\pm 2^{\circ}\text{C}$  e também pelo método de Castelani em temperatura ambiente até o momento da realização dos testes.

Quatro miligramas dos extratos e da ulvana foram dissolvidos em 200  $\mu\text{l}$  DMSO e água destilada, respectivamente, diluídos em 1800  $\mu\text{l}$  caldo nutritivo e após, diluídos seriadamente (2 a 0,0156 mg/ml). Cem microlitros de cada diluição foram depositados em orifícios de uma placa de microdiluição, aos quais foram adicionados 5  $\mu\text{l}$  do inóculo fúngico contendo  $1,2 \times 10^4$  conídios/ml de *C. lindemuthianum* e  $10^5$  UFC/ml dos fungos dermatófitos. As placas foram incubadas a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Após este período, a leitura foi realizada em leitor de ELISA, utilizando-se o comprimento de onda de 530 nm. Como controle de crescimento de cada fungo e toxicidade do solvente foram utilizados em um orifício somente meio de cultura e o inóculo e em outro meio de cultura acrescido de DMSO, respectivamente. A CIM foi considerada a menor concentração da substância onde foi observada inibição total do crescimento fúngico. Cada teste foi realizado em duplicata e o resultado médio foi expresso em mg/ml (SMANIA et al., 2005).

#### **5.4.3. Efeito de extratos e da ulvana sobre o crescimento miceliano de *Colletotrichum lindemuthianum***

Foi avaliado o efeito de extratos e da ulvana sobre o crescimento miceliano de *C. lindemuthianum*. Para tal, os extratos e a ulvana em diferentes concentrações (Tabela 5), previamente solubilizados em água destilada, foram diluídos em meio de cultura BDA (na temperatura de  $55^{\circ}\text{C}$ ) e 15 ml foram distribuídos em cada placa de Petri. Após a solidificação do meio, discos de 7 mm contendo micélio de uma cultura fúngica em placa de Petri contendo BDA foram transferidos para o centro de cada

placa e incubadas em câmara de crescimento a 21° C com fotoperíodo de 12 horas. O tratamento testemunha incluiu apenas meio BDA.

Os parâmetros avaliados foram medições do diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas) a cada dois dias, durante 20 dias.

As medidas foram iniciadas 24 horas após a realização do experimento e foram conduzidas até o momento em que as colônias fúngicas testemunhas atingiram 2/3 da superfície do meio de cultura (após 20 dias de incubação). Foram utilizadas seis repetições para cada tratamento e o delineamento foi inteiramente casualizado. O resultado, analisado estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), foi expresso em relação ao índice de velocidade de crescimento miceliano (IVCM) do fungo em cada tratamento, calculado pela seguinte equação:

$$IVCM = \frac{\sum (D - D_a)}{N}$$

Onde,

IVCM: Índice de velocidade de crescimento miceliano

D: Diâmetro médio atual

Da: Diâmetro médio anterior

N: número de dias de crescimento

**Tabela 5.** Extratos e ulvana obtidos de *Ulva fasciata* e as respectivas concentrações utilizadas para o teste de inibição do crescimento miceliano de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Extratos	Concentrações utilizadas (mg/ml)
Extrato metanólico	1 e 2
Extrato insolúvel em metanol	1 e 2
Extrato etanólico	10 <sup>a</sup>
Ulvana	0,1, 5 e 10

<sup>a</sup>mg/ml de matéria seca.

#### **5.4.4. Efeito de extratos e da ulvana sobre a germinação de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum***

Para a realização dos testes de germinação de conídios de *C. lindemuthianum*, os conídios foram obtidos segundo a metodologia de Dalla Pria et al. (2003). Vagens de feijão foram esterilizadas em autoclave a 121°C durante 2 horas. Cada vagem, fixada em aproximadamente 3 ml de ágar batata dextrose, foi inoculada com um disco de micélio fúngico de 6 mm de diâmetro, obtido a partir de culturas fúngicas em meio BDA em placa de Petri e incubada durante 14-20 dias a 20°C, com fotoperíodo de 12 horas em estufa B.O.D.

Após a incubação, as vagens foram transferidas para um becker e foram homogeneizadas com água destilada esterilizada para a obtenção de uma suspensão de conídios. Para o teste de germinação de conídios, as vagens foram transferidas para um becker e os conídios coletados foram homogeneizados com uma solução de dextrose a 4% (p/p).

A concentração de conídios por ml foi determinada através da contagem dos conídios em 5 subcompartimentos do retículo central do hemacitômetro tipo Neubauer. A média das cinco contagens foi obtida e aplicada na fórmula abaixo para a obtenção da concentração total de esporos na solução.

- Número de esporos totais na solução = número médio de esporos no retículo central x  $2,5 \times 10^5$

A concentração da suspensão de esporos foi ajustada em água destilada até a obtenção da concentração de  $1,2 \times 10^4$  conídios/ml, utilizando-se a fórmula:  $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ .

A atividade antifúngica dos extratos foi avaliada microscopicamente através da inibição da germinação dos conídios de *C. lindemuthianum*. Foram utilizadas lâminas escavadas (26 x 76 mm) com 30  $\mu$ l da suspensão de esporos ( $1,2 \times 10^4$

conídios/ml de solução de dextrose a 4%) e 30 µl de extrato. Foram utilizados os extratos metanólicos, etanólico e a ulvana, conforme a Tabela 6. Como testemunha foram utilizados 30 µl da suspensão de conídios e 30 µl de solução de dextrose a 4%. As lâminas foram incubadas em câmara úmida dentro de placas de Petri vedadas com filme de polietileno, em temperatura de 20±1°C e fotoperíodo de 12 horas. Os experimentos foram realizados em duplicata e os valores médios foram comparados pelo teste de Tukey ( $p<0,05$ ).

**Tabela 6.** Extratos e ulvana obtidos de *Ulva fasciata* e as respectivas concentrações utilizadas para o teste de inibição da germinação de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum*.

<b>Extratos</b>	<b>Concentrações utilizadas (mg/ml)</b>
Extrato metanólico	2
Extrato insolúvel em metanol	2
Extrato etanólico	10 <sup>a</sup>
Ulvana	0,1, 5 e 10

<sup>a</sup>mg/ml de matéria seca.

A porcentagem de conídios germinados foi determinada 48 horas após o início do experimento, através da adição de uma gota do corante azul de Aman para paralisar a germinação. A avaliação foi realizada através da observação dos conídios ao microscópio ótico com aumento de 400 vezes. Foram contados 200 conídios em cada repetição, totalizando-se a observação de 400 conídios por tratamento. Foram considerados como conídios germinados aqueles que apresentaram a emissão do tubo germinativo (BONALDO et al, 2004).

## **5.5. Testes *in vivo***

### **5.5.1. Sementes de feijão**

As sementes certificadas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) cultivar Uirapuru, utilizadas nos testes *in vivo*, foram gentilmente fornecidas pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) de Palotina, Paraná.

As sementes de feijão desta cultivar foram utilizadas para o desenvolvimento dos experimentos *in vivo* por serem suscetíveis a raça 73 do fungo *C. lindemuthianum*, em experimentos anteriores (LOFFAGUEN; TALAMINI; STADNIK, 2005).

Em análises laboratoriais de germinação e sanidade, segundo Vechiato et al. (2001), verificou-se que a germinação do lote usado era de 83% e as sementes eram isentas de patógenos.

### **5.5.2. Cultivo das plantas**

Plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) cultivar Uirapuru foram cultivadas em vasos plásticos, contendo aproximadamente 3 kg de solo orgânico, mantidas em casa-de-vegetação e irrigadas periodicamente, conforme as necessidades hídricas da cultura.

### **5.5.3. Tratamento das plantas**

Plantas com aproximadamente 24 dias de crescimento em casa-de-vegetação, quando o primeiro trifólio apresentou-se totalmente expandido, foram pulverizadas (tratadas) com os extratos: metanólico, extrato insolúvel em metanol, etanólico, com diferentes concentrações de ulvana e de polissacarídeo B em 5 experimentos distintos (Experimento I, II, III, IV e V), conforme descrito na Tabela 7. Como



testemunha, plantas foram pulverizadas somente com água. A aplicação dos extratos, polissacarídeos e da água foi realizada em toda a parte aérea das plantas com bomba pulverizadora manual até o ponto de escorrimento (aproximadamente 4 ml/planta).

**Tabela 7.** Extratos e ulvana obtidos de *Ulva fasciata* e polissacarídeo B obtido de *Ulva* sp. e as respectivas concentrações utilizadas para avaliar o efeito sobre a antracnose em plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*).

Experimentos	Extratos	Concentrações utilizadas (mg/ml)
I	Extrato metanólico	2
	Extrato insolúvel em metanol	2
II	Extrato etanólico	10 <sup>a</sup>
III	Polissacarídeo B	10
IV	Polissacarídeo B	0,1, 3 e 10
V	Ulvana	0,1, 1 e 10

<sup>a</sup>mg/ml de matéria seca.

#### 5.5.4. Inoculação do fungo

Após o tratamento das plantas com os extratos, polissacarídeos ou água, quatro horas, três ou seis dias, conforme o delineamento experimental, com auxílio de uma bomba pulverizadora manual, todas as partes aéreas das plantas foram inoculadas com uma suspensão de conídios ( $1,2 \times 10^5$  ou  $1,2 \times 10^6$  conídios/ml) preparada conforme procedimento descrito no item 5.4.4, até o ponto de escorrimento (aproximadamente 4 ml/planta).

Para testar o efeito local (ação direta) dos extratos e polissacarídeos contra o fungo, as plantas foram inoculadas quatro horas após o tratamento das plantas (tempo necessário para secagem completa do extrato na planta). Por outro lado, para testar a ação residual e sistêmica dos extratos e polissacarídeos, as plantas

foram inoculadas três e seis dias após os tratamentos e tanto o primeiro trifólio tratado quanto o segundo trifólio não tratado foram inoculados com o fungo.

Logo após as inoculações, as plantas permaneceram em câmara úmida, por 48 horas a  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$  e com umidade relativa em torno de 98%, mantendo assim, as condições necessárias para a germinação dos conídios do fungo e desenvolvimento do processo infeccioso. Após o período em câmara úmida, as plantas permaneceram novamente em casa-de-vegetação até o momento das avaliações da severidade da doença.

#### **5.5.5. Experimento I – Efeito do extrato metanólico e do extrato insolúvel em metanol sobre a severidade da antracnose**

Para este experimento, 12 plantas (quatro vasos com três plantas em cada) foram pulverizadas com água como testemunhas, 12 plantas (quatro vasos com três plantas em cada) foram pulverizadas com 2 mg/ml de extrato metanólico e 12 plantas (quatro vasos com três plantas em cada) com 2 mg/ml de extrato insolúvel em metanol. Após 2 dias, as plantas foram pulverizadas novamente com o mesmo tratamento e após 2 dias desse segundo tratamento, cada planta foi inoculada com aproximadamente 4 ml de uma suspensão de conídios ( $1,2 \times 10^5$  conídios/ml).

#### **5.5.6. Experimento II – Efeito do extrato etanólico sobre a severidade da antracnose**

Para a realização deste experimento, 36 plantas (12 vasos, escolhidos ao acaso, contendo três plantas de feijão em cada, com o primeiro trifólio expandido) foram tratadas com extrato etanólico na concentração de 10 mg de alga seca/ml de água destilada, conforme procedimento descrito no item 5.5.3. Da mesma forma, 36

plantas (12 vasos contendo três plantas de feijão em cada) foram pulverizadas com água destilada como testemunha.

Quatro horas após as pulverizações, com a finalidade de verificar efeito local e direto do extrato sobre o fungo, foram escolhidos quatro vasos (ao acaso) pulverizados com água, e quatro pulverizados com o extrato etanólico, e então, inoculados com uma suspensão contendo  $1,2 \times 10^6$  conídios/ml, previamente preparada conforme descrito no item 5.4.4, de forma que cada planta recebesse aproximadamente 4 ml do inóculo (ponto de escorrimento).

Três dias após as pulverizações, com a finalidade de verificar efeito sistêmico do extrato sobre a antracnose, foram escolhidos ao acaso quatro vasos pulverizados com água, e outros quatro pulverizados com o extrato etanólico. Estes oito vasos foram inoculados com suspensão contendo  $1,2 \times 10^6$  conídios/ml, até o ponto de escorrimento.

Seis dias após as pulverizações, os quatro vasos restantes tratados com água e os quatro vasos pulverizados com extrato foram inoculados com uma suspensão de  $1,2 \times 10^6$  conídios/ml.

#### **5.5.7. Experimento III – Efeito do polissacarídeo B (PS B) sobre a severidade da antracnose**

O procedimento deste experimento é igual ao do experimento II, porém as folhas foram tratadas com PS B na concentração de 10 mg/ml e não com extrato etanólico e a concentração do inóculo foi de  $1,2 \times 10^5$  conídios/ml.

#### **5.5.8. Experimento IV – Efeito de diferentes concentrações do PS B sobre a severidade da antracnose**

Para este experimento, 12 plantas (quatro vasos com três plantas em cada) foram pulverizadas com água como testemunhas, 12 plantas (quatro vasos com três plantas em cada) foram pulverizadas com 0,1 mg/ml de PS B, 12 plantas (quatro vasos com três plantas em cada) com 3 mg/ml de PS B e 12 plantas (quatro vasos com três plantas em cada) com 10 mg/ml de PS B. Após três dias do tratamento, todas as plantas foram inoculadas com aproximadamente 4 ml de uma suspensão de conídios ( $1,2 \times 10^5$  conídios/ml).

#### **5.5.9. Experimento V – Efeito da ulvana sobre a severidade da antracnose**

Doze plantas (quatro vasos com três plantas em cada) foram pulverizadas com água como testemunhas, 12 plantas (quatro vasos com três plantas em cada) foram pulverizadas com 0,1 mg/ml de ulvana, 12 plantas (quatro vasos com três plantas em cada) com 1 mg/ml de ulvana e 12 plantas (quatro vasos com três plantas em cada) com 10 mg/ml de ulvana. Assim como no experimento II, após 2 dias, as plantas foram pulverizadas novamente com os mesmos tratamentos e após 2 dias deste segundo tratamento, cada planta foi inoculada com aproximadamente 4 ml de uma suspensão de conídios ( $1,2 \times 10^5$  conídios/ml).

#### **5.5.10. Avaliação da severidade da doença**

Nos experimentos descritos acima, a severidade da antracnose nas plantas foi avaliada da seguinte maneira: sete dias após a inoculação do fungo foi realizada uma primeira avaliação e 14 dias após a inoculação foi realizada uma segunda

avaliação em cada folíolo da planta, utilizando uma escala descritiva de notas proposta por Tamayo (1995), apresentada na Tabela 8. Exceto o experimento I, que teve somente a primeira avaliação. Posteriormente, as notas foram transformadas em porcentagem de área lesionada, fornecendo assim, a severidade de antracnose de cada planta.

**Tabela 8.** Escala descritiva da severidade da antracnose do feijoeiro.

<b>Nota</b>	<b>Severidade de Antracnose (%)</b>	<b>Descrição dos sintomas de antracnose</b>
1	0	Ausência de sintomas visíveis da doença
3	1	Poucas lesões pequenas, geralmente nas nervuras da face inferior da folha, aproximadamente 1% de área foliar atacada
5	5,5	Muitas lesões pequenas no pecíolo e nas nervuras primárias e secundárias da face inferior da folha
7	10	Numerosas lesões grandes na face inferior da folha. Lesões necróticas nas hastes e nos pecíolos. Nas nervuras, presença de lesões medianas (mais de 2 mm de diâmetro). Sinais de esporulação. Lesões em aproximadamente 10% das nervuras
9	25	Necrose em folhas, pecíolos, ramos e gema apical, cobrindo mais de 25% dos tecidos da planta. Morte dos tecidos. Presença abundante de acérvulos esporulando

**Fonte:** TAMAYO, 1995.

#### **5.5.11. Determinação do peso da matéria fresca e seca das plantas**

Após a segunda avaliação, as plantas foram cortadas na base do caule rente ao solo e toda a parte aérea foi pesada, obtendo-se assim o peso da matéria fresca. Após isto, as plantas foram acondicionadas imediatamente em embalagens de papel, onde permaneceram por 48 horas na estufa a 110°C para a determinação do peso da matéria seca.

### **5.6. Análise dos resultados**

Os resultados foram analisados com auxílio do programa Statlets<sup>®</sup> para determinação como paramétricos ou não-paramétricos. Os resultados foram classificados como paramétricos e assim submetidos à Análise de Variância no Programa Statlets<sup>®</sup> e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) ou por regressão linear no software Sisvar<sup>®</sup>, da Universidade Federal de Lavras.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6. 1. Rendimento da macroalga coletada

O peso da matéria fresca, o peso da matéria seca e o rendimento das algas obtidas em nove coletas, estão apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Peso da matéria fresca, da matéria seca e o rendimento das algas coletadas em três praias da Ilha de Florianópolis/SC.

Local de coleta das algas	Peso da matéria fresca (g)	Peso da matéria seca (g)	Rendimento (%) $\pm$ Desvio Padrão
Praia Mole	4.083,3	318,3	7,8 $\pm$ 1,1
Praia da Daniela e Praia do Forte	3.745,3	344,8	10,6 $\pm$ 7,0
Praia da Armação	834,6	105,9	12,9 $\pm$ 1,5

As algas apresentaram em média 10,4% de matéria seca. As algas da Praia Mole, coletadas durante o inverno, foram as que apresentaram a menor porcentagem de matéria seca (7,8%), enquanto as algas coletadas na Praia da Armação, durante o verão, apresentaram a maior porcentagem de matéria seca (12,9%). Pádua; Fontoura e Mathias (2004) determinaram as porcentagens de fibras, proteínas, lipídeos e carboidratos de amostras de *U. fasciata* coletadas em dezembro e amostras coletadas em fevereiro no estado do Paraná. As algas coletadas em fevereiro foram as que apresentaram as maiores porcentagens de carboidratos e proteínas (aumento de 6%). *U. lactuca*, coletada também em fevereiro, apresentou maior porcentagem de proteínas (aumento de 3%) do que amostras de *U. lactuca* coletadas em outubro. Portanto, a maior porcentagem de matéria seca das algas coletadas na Praia da Armação pode ser, então, devida a um

maior acúmulo de proteínas e/ou carboidratos durante os meses de verão ou pode ser devido às condições ambientais diferentes (temperatura da água, quantidade de nutrientes disponíveis, poluição, luminosidade).

## 6.2. Rendimento dos extratos de *Ulva fasciata*

A partir de 202,13 g da alga seca, foram obtidos 1,77 g de extrato metanólico bruto pastoso, de coloração verde escura. O rendimento deste extrato em relação a matéria seca foi de 0,88%.

Após o resfriamento do extrato metanólico, uma fração que era solúvel a 50°C, permaneceu insolúvel no fundo do balão, originando o extrato insolúvel em metanol (0,61 g); o qual foi utilizado tanto para testes *in vitro* quanto para testes *in vivo*. O rendimento foi de 0,30% em relação ao peso de alga seca utilizada na extração. O rendimento do extrato etanólico não foi determinado.

Após o procedimento descrito no item 5.2.3 (material e métodos), o rendimento da ulvana de *U. fasciata* foi determinado por duas metodologias diferentes: utilizando a alga fresca e alga seca moída. Utilizando-se a alga seca para a obtenção do polissacarídeo, o rendimento foi de  $37,3\% \pm 2,3$ . Por outro lado, quando o polissacarídeo foi obtido a partir de alga fresca, o rendimento foi de  $4,0\% \pm 0,3$ .

Cem gramas de alga fresca correspondem, em média, a 10 g de alga seca (item 6.1). Então, o rendimento da ulvana foi de 4 g em 100 g de algas frescas (4%), o equivalente a 4 g em 10 g de algas secas (40%). Já, o rendimento da ulvana foi de 3,7 g em 10 g de algas secas (37%). Então, para a obtenção desse polissacarídeo, como o rendimento é o mesmo, não é necessário o dispêndio de tempo e energia na



secagem e trituração das algas antes da extração. Porém, a extração deve ser imediatamente após a coleta, pois as algas são perecíveis. Por outro lado, algas secas e trituradas podem ser facilmente armazenadas.

Pengzhan e colaboradores (2003a) obtiveram ulvana de *U. pertusa*, utilizando-se de 200 g de alga seca em 40 vezes o volume de água, autoclavando por duas horas a 110°C. O rendimento foi de  $22,5 \pm 0,8\%$  de ulvana, após diálise do polissacarídeo por 48 horas. Por outro lado, Ray e Lahaye (1995a) extraíram ulvana de *U. rigida* seca, após duas extrações com solução de oxalato de sódio 0,05M em banho-maria a 100°C e o rendimento obtido foi de 20,54%.

Para comparar o rendimento da ulvana obtida de *U. fasciata* com o rendimento da ulvana de *U. pertusa*, descrito por Pengzhan et al. (2003a), seria necessário uma diálise de 48 horas, após a extração. Por outro lado, não é possível comparar o rendimento da ulvana obtida de *U. fasciata* com o rendimento de ulvana de *U. rigida* obtida por Ray e Lahaye (1995a) porque as extrações utilizam solventes diferentes. Porém, a metodologia de extração de ulvana com oxalato de sódio apresentou um menor rendimento, quando comparada às extrações com água em autoclave, conforme os resultados obtidos e aqueles apresentados por Pengzhan et al. (2003a).

### **6.3. Identificação química da ulvana**

Os espectros de infra-vermelho do polissacarídeo obtido de *U. fasciata* evidenciaram amplas bandas de absorção em  $3353 \text{ cm}^{-1}$  atribuídas a grupo hidroxilas, em  $1643 \text{ cm}^{-1}$  e  $1096 \text{ cm}^{-1}$  atribuídas ao estiramento da ligação C=O dos ácidos urônicos e vibrações C-O-C de ligações glicosídicas. Três outras importantes

bandas foram visualizadas em  $1230\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas ao estiramento das ligações C-O-S, e em  $835$  e  $788\text{ cm}^{-1}$ , indicando a presença de substituições éster-sulfato.

O espectro de RNM- $^1\text{H}$  apresentou um perfil de polissacarídeo com sinais localizados em  $\delta$  1,19 (H-6 da ramnose) e ressonância de H-1 da ramnose-3-sulfato em  $\delta$  4,90. Já, no espectro de RNM- $^{13}\text{C}$  o polissacarídeo apresentou sinais em  $\delta$  175,0 e 18,4 facilmente reconhecidos como C-6 dos ácidos urônicos e C-6 da ramnose, respectivamente. A comparação dos outros sinais obtidos com resultados previamente descritos para polissacarídeos de *Ulva* sp. revelou que os sinais predominantes foram de ácido-3-sulfato-ulvanobiurônico, demonstrando que as estruturas básicas que se repetem no polissacarídeo são as mesmas estruturas presentes em ulvanas, previamente descritas nos trabalhos de Lahaye (1998); Lahaye et al. (1999); Pengzhan et al. (2003a).

Os componentes da ulvana não puderam ser quantificados devido a uma dificuldade em realizar hidrólise ácida. Mas, segundo Lahaye (1998), ulvana extraída a partir de *U. rigida* e degradada com uma preparação enzimática (ulvana-liase) extraída de bactéria marinha, apresentou 26,9 mol% de ramnose, 21,5 mol% de ácido urônico, 10,6 mol% de xilose e 36,7 mol% de íons sulfato. Por outro lado, ulvana extraída de *U. pertusa* apresentou 13,7% de ramnose, 6,4% de xilose, 4,0% de glicose e 23,2% de ácido urônico.

*Monostroma latissimum*, assim como o gênero *Ulva* pertence a divisão Chlorophyta e apresenta também polissacarídeo constituído de ramnose (67,9%), ácido urônico (7,6%), xilose (8,3%) e glicose (11,9%) (LEE et al., 1998).

## 6.4. Testes *in vitro*

### 6.4.1. Avaliação da atividade antimicrobiana utilizando teste de difusão

Os resultados do teste de difusão em ágar estão apresentados na Tabela 10. A ulvana de *U. fasciata* não foi ativa (ou seja, não inibiu o crescimento) frente as bactérias testadas, nem contra a levedura *C. albicans*. Porém, os extratos metanólico e insolúvel em metanol inibiram o crescimento de bactérias Gram-negativas: *P. aeruginosa*, *X. campestris* e *E. carotovora*, não sendo ativos em relação as estirpes Gram-positivas.

A bibliografia envolvendo testes de avaliação do potencial antibacteriano dos extratos de algas, menciona que os processos de extração a quente e com álcoois oferecem maiores vantagens na obtenção de substâncias bioativas (MAGALLANES; CÓRDOVA; OROZCO, 2003).

**Tabela 10.** Efeito do extrato metanólico, extrato insolúvel em metanol e da ulvana obtidos de *Ulva fasciata* no crescimento bactérias patogênicas para o homem, bactérias fitopatogênicas e levedura.

Microrganismos	Extrato metanólico	Extrato insolúvel em metanol	Ulvana
<i>Micrococcus luteus</i>	- <sup>a</sup>	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	++	-
<i>Xanthomonas campestris</i>	++	++	-
<i>Erwinia carotovora</i>	++	+	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-

<sup>a</sup>(-) Não houve inibição do extrato sobre o crescimento bacteriano; (+) halo < 10 mm de inibição; (++) halo de inibição de > 10 mm.

Extratos com atividade antibacteriana de *U. rigida* foram obtidos após extração com diferentes solventes. Já, *U. reticulata* foi extraída com benzeno, éter e tampão fosfato resultando em três extratos com atividade antibacteriana. O extrato benzênico apresentou atividade frente a bactérias Gram-negativas: *Aeromonas hydrophila*, *V. alginolyticus*, *E. coli* e *V. parahaemolyticus* e o extrato em éter etílico também apresentou atividade frente a *A. hydrophila*, *V. parahaemolyticus*. O extrato

obtido com o tampão fosfato apresentou atividade frente a *Azomonas* sp., *E. coli* e *V. parahaemolyticus* (VAIRAPPAN e SUZUKI, 2000).

Segundo Lima-Filho et al. (2002), o extrato em hexano de *U. fasciata* não apresentou atividade antibacteriana frente a bactérias Gram-positivas: *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *S. aureus* e bactérias Gram-negativas: *Citrobacter freundii*, *E. coli*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *M. morgani*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *S. enteritidis*. Extrato etanólico (obtido com etanol a 80% a 20°C) de *U. nematoidea* também não apresentou atividade antibacteriana frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *E. faecalis* e *E. coli* (MAGALLANES;CÓRDOVA; OROZCO, 2003). Por outro lado, extrato em n-butanol de *U. lactuca* inibiu o crescimento de *V. parahaemolyticus* (IMMANUEL et al., 2004), extrato metanólico (algas secas moídas extraídas com metanol sob agitação por 15 minutos) de *U. rigida* apresentou atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *B. subtilis*, porém não apresentou inibição de *P. aeruginosa*, *S. marcescens* e *Mycobacterium smegmatis* (GONZÁLEZ DEL VAL et al., 2001).

*U. fasciata* e *Hypnea musciformis* secas foram extraídas com metanol-diclorometano (1:1). O extrato de *U. fasciata* inibiu o crescimento de *B. cereus*, *E. coli*, *Micrococcus luteus*, *P. aeruginosa*, *V. alginolitycus*, *Vibrio harvey* e *A. hydrophila* em experimentos conduzidos a 20°C e menores atividades foram verificadas em experimento conduzidos a 30°C. O extrato de *Hypnea* apresentou atividade antibacteriana frente a *M. luteus* e *P. aeruginosa* a 20°C. O menor crescimento bacteriano a 20°C pode ter sido a razão do aumento da atividade dos extratos destas algas (SELVIN e LIPTON, 2004).

Segundo os dados da literatura, os extratos de espécies de *Ulva* que inibiram o crescimento das bactérias, Gram-negativas ou Gram-positivas, foram extratos

brutos (metanólico, benzênico, em diclorometano, em éter, tampão fosfato), ou seja, não foram extratos fracionados. Já, quando o extrato metanólico foi fracionado em hexano, não apresentou nenhuma atividade antibacteriana (LIMA-FILHO et al., 2002). Porém, não foram encontrados trabalhos relacionados à atividade antibacteriana de substâncias isoladas de espécies de *Ulva*.

Estudos realizados na África do Sul, consideram que o grupo das algas marrons e vermelhas são as que apresentam o maior número de espécies com potencial antibacteriano (VLACHOS; CRITCHLEY; HOLY, 2000). Entretanto, os resultados obtidos, que corroboram com trabalhos de outros autores (MAGALLANES;CÓRDOVA, OROZCO, 2003; GONZÁLEZ DEL VAL et al., 2001), confirmam a existência de macroalgas verdes produtoras de compostos antibacterianos.

#### **6.4.2. Avaliação da atividade antifúngica através da determinação da concentração inibitória mínima**

Os valores obtidos no teste de microdiluição do extrato metanólico, insolúvel em metanol e da ulvana de *U. fasciata* contra *C. lindemuthianum*, *T. mentagrophytes* e *M. canis* estão apresentados na Tabela 11.

Os extratos testados não inibiram o crescimento fúngico na maior concentração testada (2 mg/ml). Apenas o extrato insolúvel em metanol inibiu o crescimento de *T. mentagrophytes* na concentração de 2 mg/ml, que pode ser comparada a outros extratos naturais com atividades antifúngicas (SMANIA et al., 2005; SMANIA et al., 2003). Porém, uma substância chamada de swinhoeiamida A, isolada da esponja marinha *Theonella swinhoei*, inibiu o crescimento fúngico em concentrações expressivamente menores do que os extratos brutos. Esta substância

apresentou atividade antifúngica contra *C. albicans* e *Aspergillus fumigatus* em concentrações mínimas inibitórias de 1,2 e 1,0 µg/ml, respectivamente (EDRADA et al., 2002).

**Tabela 11.** Avaliação da atividade antifúngica do extrato metanólico, insolúvel em metanol e da ulvana obtidos de *Ulva fasciata*, através da determinação da concentração inibitória mínima.

Microrganismos testados	Extrato metanólico	Extrato insolúvel em metanol	Ulvana
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	> 2 <sup>a</sup>	> 2	> 2
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	> 2	2	> 2
<i>Microsporium canis</i>	> 2	> 2	> 2

<sup>a</sup>Média de duas repetições expressa em mg/ml.

Extrato metanólico de *U. rigida* não apresentou atividade contra *A. fumigatus* e *C. albicans* (GONZÁLEZ DEL VAL et al., 2001). Da mesma forma, o extrato metanólico de *U. fasciata* não teve atividade contra *A. fresenii*, *A. japonicus* e *A. niger* (BHOSALE; JAGTAP; NAIK, 1999).

#### **6.4.3. Avaliação do crescimento miceliano de *Colletotrichum lindemuthianum***

Os resultados médios para o ensaio de inibição do crescimento miceliano estão representados na Tabela 12 e Figura 4. Verificou-se que o extrato metanólico na concentração de 1 e 2 mg/ml de meio de cultura conseguiu diminuir significativamente o crescimento miceliano de *C. lindemuthianum*, quando comparado à testemunha ( $p < 0,05$ ). O extrato insolúvel em metanol nas concentrações de 1 e 2 mg/ml não interferiu no crescimento miceliano do fungo, pois apresentou valores idênticos de IVCM à testemunha.

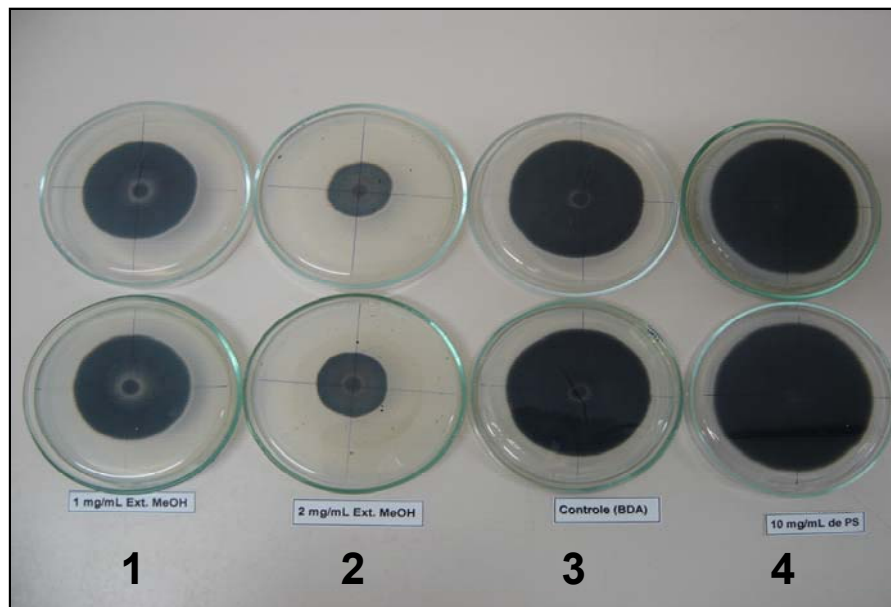
**Tabela 12.** Índice de velocidade de crescimento miceliano (IVCM) de *Colletotrichum lindemuthianum* em meio ágar batata dextrose (BDA) contendo diferentes concentrações de extrato metanólico, insolúvel em metanol, extrato etanólico e ulvana.

Extratos testados	Concentrações (mg/ml)	IVCM (mm/dia)	Alteração do crescimento miceliano (%) <sup>a</sup>
Extrato metanólico	1	2,33 a <sup>b</sup>	↓ 17,0,8
Extrato metanólico	2	1,24 b	↓ 55,87
Extrato insolúvel em metanol	1	2,80 c	↓ 0,01
Extrato insolúvel em metanol	2	2,81 c	0
Extrato etanólico <sup>c</sup>	10	3,08 c	↑ 9,6
Ulvana	0,1	3,23 d e	↑ 14,95
Ulvana	5	3,42 e f	↑ 21,71
Ulvana	10	3,47 f	↑ 23,49
Testemunha (BDA)	-	2,81 c	-

<sup>a</sup>Inibição (↓) do crescimento miceliano ou aumento (↑) do crescimento miceliano quando comparados à testemunha.

<sup>b</sup>Valores médios obtidos a partir de 6 repetições. Os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

<sup>c</sup>mg/ml de matéria seca



**Figura 4.** Efeito do (1) extrato metanólico (1 mg/ml), (2) extrato metanólico (2 mg/ml), (4) da ulvana (10 mg/ml) de *Ulva fasciata* e (3) da testemunha (somente meio de cultura) sobre o crescimento miceliano de *Colletotrichum lindemuthianum* após 20 dias de incubação.

Utilizando o extrato metanólico na concentração de 2 mg/ml de meio de cultura, foi observado 55,8% de inibição do crescimento miceliano do fungo testado, quando comparado à testemunha. Por outro lado, quando utilizou-se o polissacarídeo ulvana na concentração de 10 mg/ml de meio de cultura, houve 23,49% de aumento do crescimento miceliano de *C. lindemuthianum*. O efeito do estímulo do polissacarídeo sobre o fungo pode ser atribuído, possivelmente, aos nutrientes presentes e disponíveis, principalmente carboidratos (predominantemente a ramnose), na composição química deste polissacarídeo incorporado junto ao meio BDA.

#### **6.4.4. Teste de germinação de conídios**

Os resultados médios para este ensaio *in vitro* estão representados na Tabela 13. Somente a ulvana na concentração de 0,1 mg/ml apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no teste de germinação de conídios, porém aumentou a porcentagem de germinação dos conídios em 16,75% quando comparada com a testemunha. Este fato pode ser explicado, assim como no teste de inibição do crescimento miceliano do fungo, pela quantidade de carboidrato possivelmente na forma assimilável, presente na composição química deste polissacarídeo.

Apenas 29,5% dos conídios germinaram no tratamento testemunha. Esta porcentagem é menor do que aquela apresentada por outros autores. Por exemplo, a germinação de *Colletotrichum lagenarium* no tratamento controle (água destilada) foi de 92%, em trabalho realizado por Bonaldo et al. (2004).

O extrato metanólico na concentração de 2 mg/ml, apesar de reduzir o crescimento miceliano não alterou significativamente ( $p < 0,05$ ) a germinação dos conídios de *C. lindemuthianum*. No entanto, o extrato etanólico de *U. fasciata* reduziu, *in vitro*, a



germinação de esporos de *Puccinia graminis*, fungo causador da ferrugem em plantas de trigo (STADNIK; EL-GUEDDARI; MOERSCHBACHER, 2005), demonstrando um possível efeito direto do extrato etanólico contra este fungo.

**Tabela 13.** Germinação de conídios (%) de *Colletotrichum lindemuthianum* em presença de extrato metanólico, insolúvel em metanol, extrato etanólico e ulvana obtidos de *Ulva fasciata*.

<b>Extratos testados</b>	<b>Concentrações (mg/ml)</b>	<b>Conídios germinados (%)<sup>a</sup></b>
Ulvana	0,1	46,25 d <sup>b</sup>
Ulvana	1	28,75 a b
Ulvana	5	40,43 b c d
Ulvana	10	42,25 c d
Extrato metanólico	2	19,99 a
Extrato etanólico <sup>c</sup>	10	32,75 a b c
Extrato insolúvel em metanol	2	28,70 a b
Testemunha <sup>d</sup>	-	29,50 a b c

<sup>a</sup>Média de 2 repetições com 2 contagens em cada uma.

<sup>b</sup>Os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

<sup>c</sup>mg/ml de matéria seca.

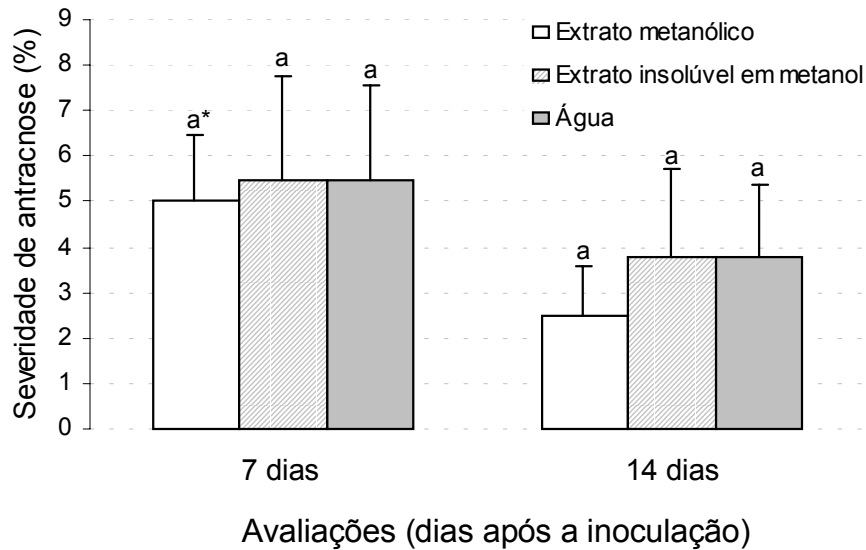
<sup>d</sup>Somente água destilada foi utilizada como testemunha.

## **6.5. Testes *in vivo***

### **6.5.1. Experimento I – Efeito de extratos metanólicos sobre a antracnose**

Os resultados do efeito do extrato metanólico, do extrato insolúvel em metanol, e das plantas testemunhas que foram tratadas apenas com água destilada estão na Figura 5.

Ambos os extratos testados, quando aplicados por duas vezes (quatro e dois dias) antes da inoculação, não conseguiram diminuir a severidade da doença, pois não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação às plantas testemunhas; apesar do extrato metanólico ter diminuído, *in vitro*, o crescimento miceliano do fungo conforme descrito no item 6.4.3.



**Figura 5.** Efeito da aplicação foliar dos extratos metanólicos de *Ulva fasciata* na severidade da antracnose em plantas de feijão comum, avaliado sete e 14 dias após a inoculação. Os tratamentos foram realizados por duas vezes, quatro e dois dias antes da inoculação das plantas com *Colletotrichum lindemuthianum*.

\*Barras seguidas da mesma letra, no mesmo período de avaliação, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Como a segunda avaliação foi realizada 14 dias após a inoculação do fungo e sete dias após a primeira, seria esperado um aumento na porcentagem da severidade de antracnose nas plantas, uma vez que o fungo se dissemina através de inóculo secundário tornado disponível à medida que a colonização aumenta. No entanto, este fato não foi verificado na Figura 5, pois quando a 2ª avaliação ocorreu, através do modelo de avaliação proposto por Tamayo (1995), a maioria dos folíolos já se encontravam necrosados e haviam se desprendido da planta, sendo que suas respectivas porcentagens de severidade (que seria em torno de 25%) não foram somadas. Desta forma, houve uma diminuição da porcentagem da severidade. Essas observações levam a concluir que somente uma avaliação deve ser realizada, conforme descrito no trabalho de indução de resistência em feijão de Bigirimana e Höfte (2002), a qual foi realizada sete dias após a inoculação com o patógeno.

Quando uma segunda avaliação foi realizada, esta deve ser feita poucos dias após a primeira ou deve-se atribuir nota máxima para os folíolos ausentes.

Após a segunda avaliação, a parte aérea das plantas foi cortada para a determinação do peso da matéria fresca e da matéria seca. Os valores estão descritos na Tabela 14.

**Tabela 14.** Peso da matéria fresca e da matéria seca da parte aérea das plantas tratadas com os extratos metanólicos obtidos de *Ulva fasciata*, aplicados duas vezes, 4 e 2 dias antes da inoculação do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*.

Tratamento	Concentração testada (mg/ml)	Peso de matéria fresca <sup>a</sup>	Peso de matéria seca <sup>a</sup>
Extrato metanólico	2	22,84 a <sup>b</sup>	2,36 a
Extrato insolúvel em metanol	2	22,68 a	2,40 a
Testemunha <sup>c</sup>	-	20,60 a	1,98 a

<sup>a</sup>Os valores de ambos os pesos são valores médios de 15 plantas (5 repetições ou seja, 5 vasos e cada um contendo 3 plantas), expressos em g/planta.

<sup>b</sup>Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), dentro do mesmo peso.

<sup>c</sup>As plantas testemunha (15 plantas) foram tratadas somente com água destilada.

Os valores do peso da matéria fresca e da matéria seca das plantas tratadas com os extratos de *U. fasciata* e das plantas tratadas apenas com água destilada (testemunhas) não diferiram estatisticamente. Portanto, o extrato metanólico e o insolúvel em metanol não interferem no crescimento das plantas, quando pulverizados sobre as superfícies foliares, além de não reduzirem a severidade da antracnose, tal como observado na Figura 5.

Entretanto, apesar de não se detectar uma diferença significativa entre os pesos de matérias frescas e pesos de matérias secas das plantas tratadas com os

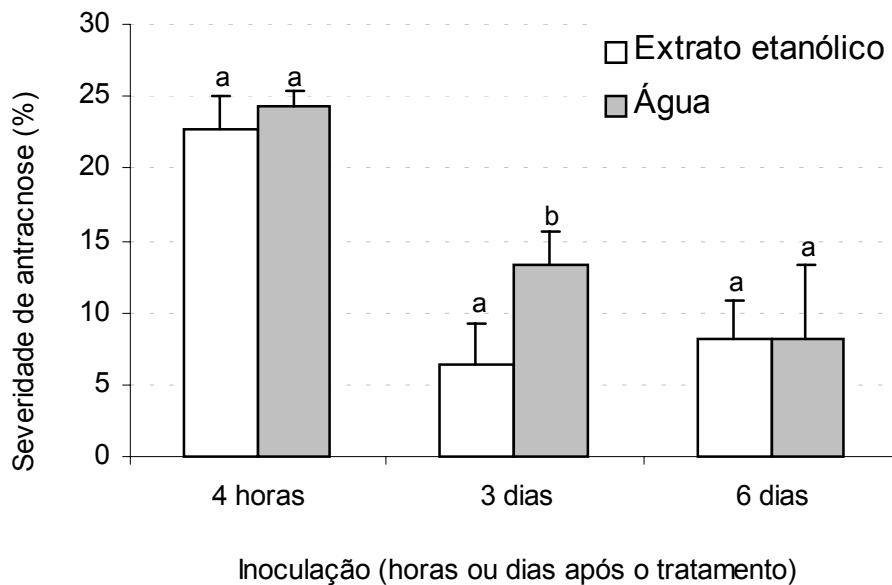
extratos metanólicos e das plantas testemunhas, houve uma tendência para um aumento dos pesos das plantas tratadas com os extratos. Yan (1999), Allen et al. (2001), Zemke-White e Ohno (1999) têm relatado que extratos de algumas espécies de algas tais como: *Ascophyllum nodosum*, *Corallina pilulifera*, *Enteromorpha* sp., *Laurencia papillosa*, *Gracilaria* spp., *Lithothamnion corallioides*, entre outras promovem o crescimento das plantas tratadas.

### **6.5.2. Experimento II – Efeito do extrato etanólico sobre a antracnose**

Os resultados do efeito do extrato etanólico sobre a antracnose em plantas de feijão estão apresentados na Figura 6. Quando a inoculação com *C. lindemuthianum* foi realizada quatro horas ou seis dias depois da aplicação do extrato etanólico, não se observou redução da severidade da doença, que foi de 22,75 e 8,12%, respectivamente, quando comparada às plantas testemunhas, onde a severidade foi de 24,25 e 8,20%, respectivamente. Por outro lado, quando as plantas de feijão foram inoculadas três dias após o tratamento com o extrato de *U. fasciata*, a severidade da doença foi reduzida significativamente em 48,24%, quando comparada às plantas testemunhas.

Embora a concentração de conídios fosse a mesma, plantas inoculadas quatro horas após o tratamento com o extrato foram mais severamente atacadas por *C. lindemuthianum* em comparação às plantas inoculadas três e seis dias após o tratamento. Por outro lado, com base na Figura 6, não se pode descartar totalmente o efeito direto do extrato etanólico sobre o fungo, pois a severidade da doença (22,75 e 24,25% para as plantas tratadas com extrato e água, respectivamente) foi muito elevada, onde quase todas as folhas das plantas já estavam praticamente mortas. Este fato talvez possa ser explicado devido às condições ambientais mais

favoráveis ao desenvolvimento do fungo quando a inoculação foi realizada quatro horas após o tratamento, uma vez que Campos et al. (2003) não observaram variação da indução de resistência em plantas de feijão em diferentes estádios de desenvolvimento das plantas.



**Figura 6.** Efeito da aplicação foliar do extrato etanólico (10 mg de alga seca/ml) de *Ulva fasciata* na severidade da antracnose em plantas de feijão comum inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* quatro horas, três e seis dias após o tratamento. A avaliação foi realizada sete dias após a inoculação.

\*Barras seguidas da mesma letra, no mesmo período de inoculação, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Embora o extrato etanólico de *U. fasciata* apresente atividade direta (redução significativa do crescimento miceliano), *in vitro*, contra *C. lindemuthianum*, conforme relatado por Abreu (2005), nenhum efeito significativo foi observado quando as plantas foram inoculadas quatro horas após o tratamento. Por outro lado, constatou-se uma redução significativa da severidade de antracnose quando a inoculação do patógeno ocorreu três dias após o tratamento. Esse efeito deve ser explicado por uma fraca indução de resistência na planta por aproximadamente três dias, pois quando o fungo foi inoculado seis dias após o tratamento esse efeito não foi mais

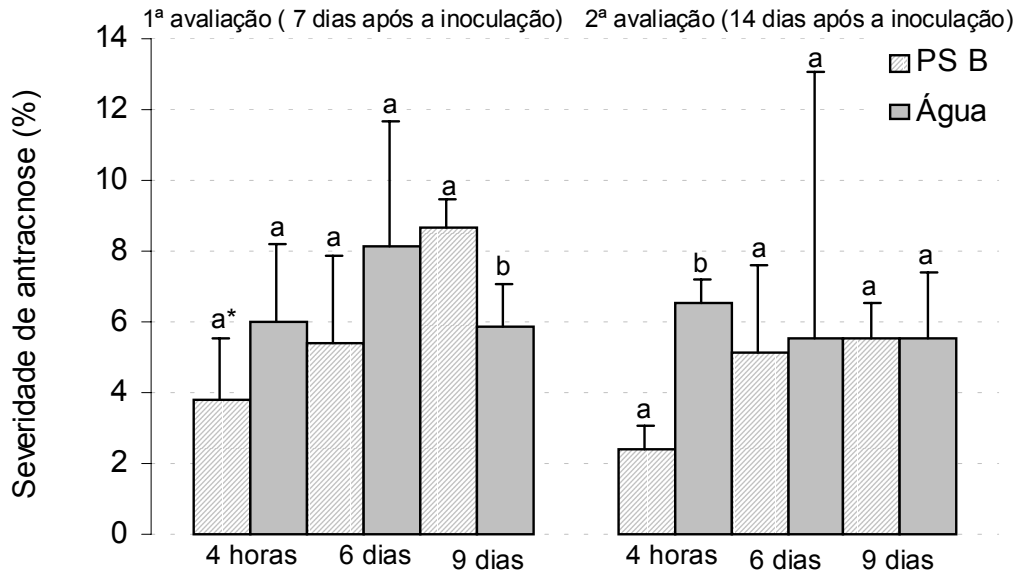
verificado e vale ressaltar que nestes dois períodos de inoculação as plantas tratadas com o extrato apresentaram níveis semelhantes de severidade.

Portanto, sugere-se que o extrato etanólico de *U. fasciata* possa induzir temporariamente resistência em plantas de feijoeiro contra *C. lindemuthianum* na concentração testada não apresentando aparente efeito direto sobre o fungo. Para que ocorra a resistência, provavelmente há necessidade de um intervalo de tempo em torno de três dias entre o tratamento e a inoculação. Por outro lado, o extrato etanólico de *U. fasciata*, em estudos realizados pelo Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Catarina, reduziu entre 80 e 45% o número de colônias de oídio (*Erysiphe polygoni*) em folhas de feijoeiro comum tratadas quatro horas antes da inoculação, quando comparadas ao controle (STADNIK e ZEFERINO, 2004; LEONETTI et al., 2003). Estudos microscópicos têm sugerido que o extrato etanólico afeta diretamente a germinação de uredósporos de *Puccinia graminis*, fungo causador da ferrugem em plantas de trigo (*Triticum aestivum*) (STADNIK; EL-GUEDDARI; MOERSCHBACHER, 2005).

Para analisar conclusivamente o envolvimento da indução de resistência na redução da severidade da antracnose pelo extrato etanólico, torna-se necessário a determinação da atividade de enzimas relacionadas à defesa das plantas contra patógenos (CAMPOS et al., 2003). Pode-se quantificar também, compostos que auxiliam na formação ou rigidez da parede celular (MOERSCHBACHER et al., 1988), para avaliar se o extrato etanólico teve a capacidade de aumentar a síntese de compostos de parede celular para a construção de uma parede mais rígida, impedindo a penetração pelo fungo e, portanto, reduzindo a severidade da doença. Também é necessário o conhecimento do mecanismo pelo qual o extrato propiciou a diminuição da severidade, para que se possa maximizar o potencial.

### 6.5.3. Experimento III – Efeito do polissacarídeo B (PS B) sobre a antracnose

Os resultados do efeito do PS B de *Ulva* sp. sobre a severidade da antracnose na primeira e segunda avaliação estão apresentados na Figura 7.



**Figura 7.** Efeito da pulverização de polissacarídeo B (10 mg/ml) obtido de *Ulva* sp. na severidade da antracnose em plantas de feijão comum inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum* quatro horas, três e seis dias após o tratamento, avaliado sete e 14 dias após a inoculação.

\*Barras seguidas da mesma letra, no mesmo período de inoculação, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Neste experimento, as plantas tratadas com o PS B na concentração de 10 mg/ml apresentaram redução estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na severidade da antracnose, quando comparadas às testemunhas, no período de inoculação aos seis dias, na primeira avaliação. Porém na segunda avaliação, apresentaram redução significativa ( $p < 0,05$ ) quando inoculadas quatro horas após o tratamento com PS B. Tais efeitos devem ser explicados pela indução de resistência na planta após aplicação do polissacarídeo e, para isto ocorrer, provavelmente há necessidade de um intervalo entre o tratamento e a inoculação de aproximadamente seis a sete dias para a planta iniciar a seqüência de eventos importantes para o

estabelecimento da defesa. Em primeiro lugar, influxo de cálcio, aumento da alcalinidade extracelular, seguido de produção de substâncias antimicrobianas, síntese de ácido salicílico, lignificação da parede celular e por último a ativação de sinais sistêmicos de defesa em partes da planta não tratada, como a ativação de genes de PR-proteínas relacionadas à defesa (MEZIANE et al., 2005; CLUZET et al., 2004; CAMPOS et al., 2003).

Assim como explicado no experimento I, na segunda avaliação a severidade da doença foi menor que na primeira avaliação.

Após a segunda avaliação, a parte aérea das plantas foi cortada para a determinação do peso de matéria seca e de matéria fresca sendo que os valores estão apresentados na Tabela 15. Os valores do peso da matéria fresca e da matéria seca das plantas tratadas com polissacarídeo B e as tratadas apenas com água destilada não foram estatisticamente diferentes.

**Tabela 15.** Peso da matéria fresca e da matéria seca da parte aérea das plantas tratadas com polissacarídeo B (10 mg/ml) de *Ulva* sp. quatro horas, três e seis dias antes da inoculação o fungo *Colletotrichum lindemuthianum*.

Tratamento	Peso de matéria fresca <sup>a</sup>	Peso de matéria seca <sup>a</sup>
Polissacarídeo B – 4 horas	17,40 a <sup>b</sup>	2,54 a
Testemunha** – 4 horas	14,28 a	2,20 a
Polissacarídeo B – 3 dias	ND	ND
Testemunha** – 3 dias	ND	ND
Polissacarídeo B – 6 dias	11,96 a	2,40 a
Testemunha <sup>c</sup> – 6 dias	7,64 a	2,20 a

<sup>a</sup>Os valores de ambos os pesos são valores médios de 12 plantas (4 repetições ou seja, 4 vasos e cada um contendo 3 plantas), expressos em g/planta.

<sup>b</sup>Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), dentro do mesmo peso.

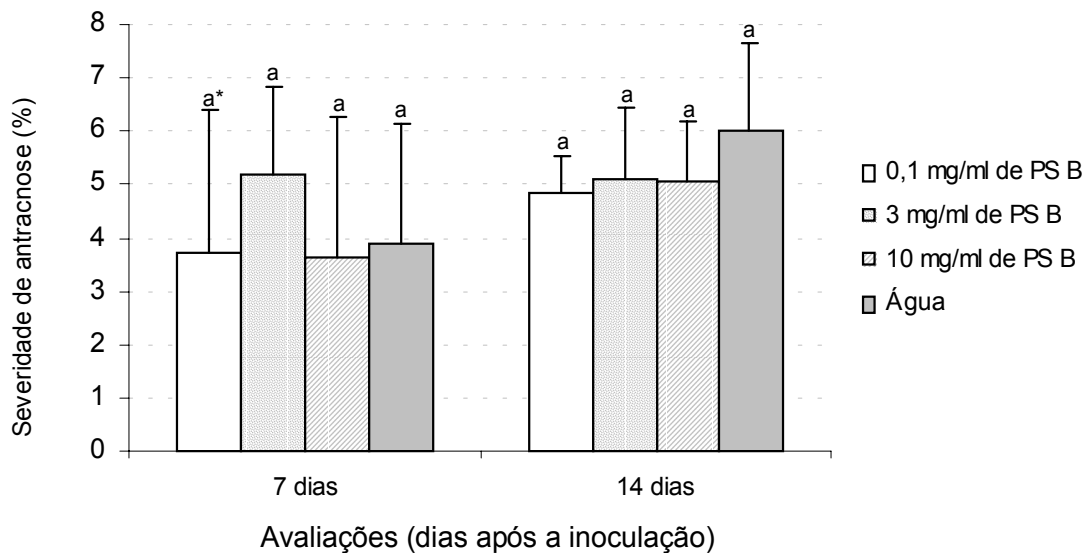
ND – Não determinado

<sup>c</sup>As plantas testemunha (12 plantas) foram tratadas somente com água destilada.



#### 6.5.4. Experimento IV – Efeito de diferentes concentrações de polissacarídeo B sobre a antracnose

Os resultados do efeito de diferentes concentrações de PS B sobre a antracnose nas plantas estão na Figura 8. As plantas testemunhas foram tratadas apenas com água destilada. O tratamento foliar com PS B três dias antes da inoculação do fungo em nenhuma das três concentrações testadas reduziu significativamente a severidade da antracnose das plantas tratadas, quando comparadas às plantas testemunhas tratadas apenas com água, assim como verificado no experimento anterior. Este fato pode ser devido ao alto desvio padrão das repetições dentro de um mesmo tratamento.



**Figura 8.** Efeito do polissacarídeo B obtido de *Ulva* sp. nas concentrações de 0,1, 3 e 10 mg/ml na severidade da antracnose em plantas de feijão comum, avaliado sete e 14 dias após a inoculação. Os tratamentos foram realizados 3 dias antes da inoculação das plantas com *Colletotrichum lindemuthianum*.

\*Barras seguidas pela mesma letra, dentro da mesma avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os valores do peso da matéria fresca e da matéria seca das plantas tratadas com polissacarídeo B e as tratadas apenas com água destilada não foram estatisticamente diferentes (Tabela 16), assim como no experimento anterior.

Portanto, pode-se observar que o polissacarídeo B não interferiu no crescimento das plantas em nenhuma das concentrações testadas.

**Tabela 16.** Peso da matéria fresca e da matéria seca da parte aérea das plantas tratadas com polissacarídeo B de *Ulva* sp. em três concentrações diferentes 3 dias antes da inoculação do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*.

Tratamento	Concentração testada (mg/ml)	Peso de matéria fresca <sup>a</sup>	Peso de matéria seca <sup>a</sup>
Polissacarídeo B	0,1	19,24 a <sup>b</sup>	3,56 a
Polissacarídeo B	3	21,46 a	3,70 a
Polissacarídeo B	10	20,04 a	3,74 a
Testemunha <sup>c</sup>	-	19,24 a	3,68 a

<sup>a</sup>Os valores de ambos os pesos são valores médios de 15 plantas (5 repetições ou seja, 5 vasos e cada um contendo 3 plantas), expressos em g/planta.

<sup>b</sup>Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), dentro do mesmo peso.

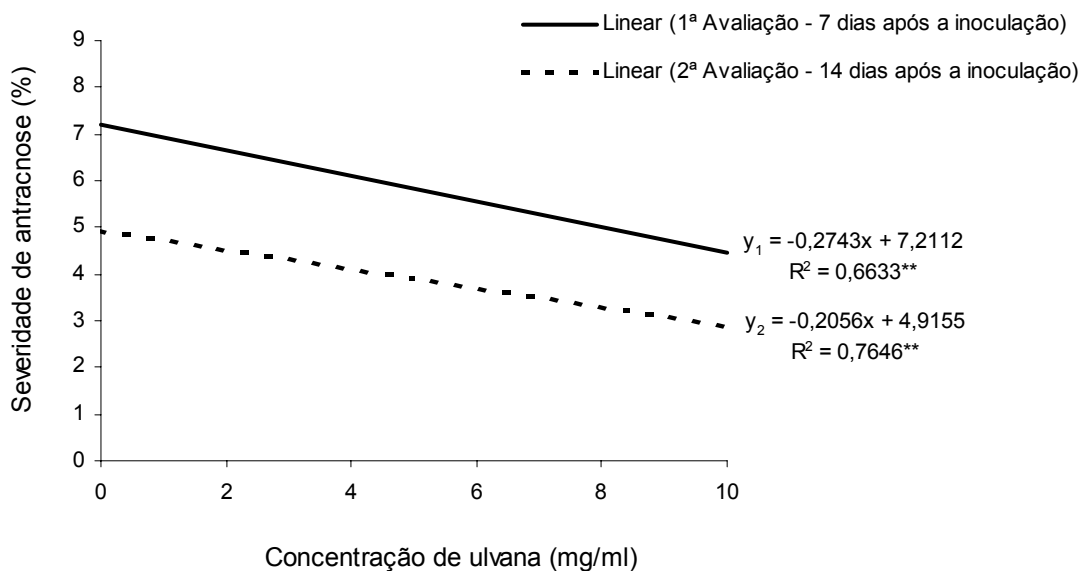
<sup>c</sup>As plantas testemunha (12 plantas) foram tratadas somente com água destilada.

#### 6.5.5. Experimento V – Efeito da ulvana sobre a antracnose

Os resultados do efeito da pulverização foliar de ulvana em diferentes concentrações estão na Figura 9. Tanto na primeira como na segunda avaliação, as plantas de feijoeiro inoculadas com *C. lindemuthianum* quatro dias após o tratamento com a ulvana (10 mg/ml) de *U. fasciata*, observou-se uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na severidade da doença, em comparação às plantas testemunhas. Por outro lado, quando as plantas foram inoculadas com 0,1 ou 1 mg/ml de ulvana não se observou redução da severidade da doença. Portanto, sugere-se que ulvana de *U. fasciata* pode induzir resistência em plantas de feijoeiro inoculadas com *C. lindemuthianum*, dependendo da concentração utilizada. Provavelmente há uma concentração mínima necessária para ativar os mecanismos de defesa das plantas.

Segundo Stadnik e Maraschin (2004), a indução de resistência é caracterizada, entre outros fatores, pela necessidade de um intervalo de tempo entre a exposição da planta ao indutor e a expressão da resistência, falta de relação entre magnitude da resistência expressa e quantidade do indutor aplicado.

Embora seja conhecido que algas marrons e vermelhas dispõem de polissacarídeos elicitores de defesas nas plantas, como por exemplo laminarana extraída de *Laminaria digitata* e carragenanas extraídas de *Eucheuma spinosa*, *Gigartina acicularis* e *G. pistillata*, o relato da presença de elicitores em algas verdes é recente (CLUZET et al., 2004; ABREU, 2005).



**Figura 9.** Efeito do tratamento foliar da ulvana (0,1, 1 e 10 mg/ml) obtida de *Ulva fasciata* na severidade da antracnose em plantas de feijão comum, avaliado sete e 14 dias após a inoculação. Os tratamentos foram realizados por duas vezes, quatro e dois dias antes da inoculação das plantas com *Colletotrichum lindemuthianum*.

\*\*Valores de  $R^2$  são significativos ( $p < 0,01$ ).

Polissacarídeos obtidos de espécies de *Ulva* spp. (principalmente *U. armoricana*) demonstraram atividade elicitora em uma outra leguminosa, *Medicago truncatula*. Isto foi verificado quando as folhas foram pulverizadas com uma solução de 0,5 mg/ml de polissacarídeo. Houve aumento, após dois dias do tratamento, na

expressão do gene PR10 e na expressão de diversos genes adicionais envolvidos na defesa da planta, incluindo os genes relacionados com a biossíntese de fitoalexinas, outros genes de PR proteínas e de proteínas de parede celular. Em contraste, a expressão de genes relacionados com o metabolismo primário da planta não foi alterado. Portanto, o tratamento prévio com polissacarídeos de *Ulva* protege *Medicago trunculata* contra infecções de *Colletotrichum trifolii* pelo mecanismo de indução de resistência (CLUZET et al., 2004).

Tratamentos com alguns microrganismos não patogênicos, como por exemplo as rizobactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens* e fungos como *Botrytis cinerea*, *B. allii* (BIGIRIMANA e HÖFTE, 2002; MEZIANE et al., 2005; SOYLU et al., 2002) e vários compostos abióticos também podem ser considerados como potenciais indutores de respostas de defesa em plantas, como ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA), ácido  $\beta$ -aminobutírico, ácido salicílico, entre outros (BOYLE e WALTERS, 2005; SOYLU et al., 2002). No entanto, muitos destes compostos podem apresentar fitotoxicidade e/ou causar a morte de células ou da planta se usados em elevadas concentrações (BOYLE e WALTERS, 2005); ao contrário da ulvana, que não apresentou nenhum sinal de toxicidez na maior concentração testada (10 mg/ml) sobre as plantas.

Assim como nos experimentos anteriores, após a segunda avaliação, a parte aérea das plantas foi destacada para a determinação do peso de matéria seca e peso de matéria fresca e os valores estão descritos na Tabela 17.

Os valores do peso da matéria fresca e peso da matéria seca das plantas tratadas com ulvana e das plantas tratadas apenas com água destilada (testemunhas) não foram estatisticamente diferentes, assim como nos experimentos anteriores. Portanto, pode-se concluir que a ulvana não interfere no crescimento das

plantas de feijão comum, quando pulverizada sobre a superfície foliar. Da mesma forma, a aplicação foliar ou a aplicação no solo de sacarina (possível indutor de resistência) em plantas de feijão (*Vicia faba*) não apresentou significativo efeito no peso da matéria fresca, da matéria seca ou na área foliar das plantas tratadas (BOYLE e WALTERS, 2005)

**Tabela 17.** Valores de peso da matéria fresca e peso da matéria seca da parte aérea das plantas tratadas com ulvana de *Ulva fasciata* em três concentrações diferentes, por duas vezes, 4 e 2 dias antes da inoculação do fungo *Colletotrichum lindemuthianum*.

Tratamento	Concentração testada (mg/ml)	Peso de matéria fresca <sup>a</sup>	Peso de matéria seca <sup>a</sup>
Ulvana	0,1	24,22 a <sup>b</sup>	2,92 a
Ulvana	1	24,48 a	2,98 a
Ulvana	10	24,70 a	2,88 a
Testemunha <sup>c</sup>	-	23,76 a	3,14 a

<sup>a</sup>Os valores de ambos os pesos são valores médios de 15 plantas (5 repetições ou seja, 5 vasos e cada um contendo 3 plantas), expressos em g/planta.

<sup>b</sup>Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), dentro do mesmo peso.

<sup>c</sup>As plantas testemunha (12 plantas) foram tratadas somente com água destilada.

## 7. CONCLUSÕES

- O polissacarídeo identificado é composto por unidades repetidas de ácido ulvanobiurônico-3-sulfato, chamado de ulvana
- O extrato metanólico e insolúvel em metanol apresentaram inibição no crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Erwinia carotovora* e *Xanthomonas campestris* no teste de difusão em ágar
- O extrato insolúvel em metanol apresentou concentração mínima inibitória de 2 mg/ml contra *Trichophyton mentagrophytes*
- O extrato metanólico (1 e 2 mg/ml) inibiu, *in vitro*, o crescimento miceliano de *Colletotrichum lindemuthianum*
- Nenhum dos extratos testados inibiu, *in vitro*, a germinação dos conídios de *C. lindemuthianum* nas concentrações testadas
- O extrato etanólico (10 mg de alga seca/ml) reduziu a severidade de antracnose, quando aplicado 3 dias antes da inoculação do fungo
- Ulvana na concentração de 10 mg/ml (em duas aplicações consecutivas) apresentou possível indução de resistência, quando aplicada quatro dias antes da inoculação do fungo
- O extrato metanólico e insolúvel em metanol não apresentaram efeito *in vivo*, nos modelos testados
- São necessárias dosagens de enzimas relacionadas à patogênese e análise de expressão gênica para comprovar esta possível indução de resistência da ulvana contra *C. lindemuthianum*.

## REFERÊNCIAS

ABOURRICHE, A.; CHARROUF, M.; BERRADA, M.; BENNAMARA, A.; CHAIB, N.; FRANCISCO, C. Antimicrobial activities and cytotoxicity of the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 611-614, 1999.

ABREU, G. F. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina. Bioprospecção de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para o controle da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), 2005.

ALLEN, V. G.; POND, K. R.; SAKE, K. E.; FONTENOT, J. P.; BAGLEY, C. P.; IVY, R. L.; EVANS, R. R.; SCHMIDT, R. E.; FIKE, J. H.; ZHANG, X.; AYAD, J. Y.; BROWN, C. P.; MILLER, M. F.; MONTGOMERY, J. L.; MAHAN, J.; WESTER, D. B.; MELTON, C. Tasco: Influence of a brown seaweed on antioxidants in forages and livestock – a review. **J. Anim. Sci.**, v. 79 (suppl. E), p. 21-31, 2001.

ASSIS, O. B. G.; PESSOA, J. D. C. Preparation of thin films of chitosan for use as edible coatings to inhibit fungal growth on sliced fruits. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 7, n. 1, p. 17-22, 2004.

ASSUMPÇÃO, R.; SILVA, J. R.; FERREIRA, C. T.; KIYUNA, I. Análise do dispêndio com defensivos agrícolas na cultura do feijão no Brasil, 1991 a 2001. **Informações Econômicas**, v. 33, n. 4, p. 57-62, 2003.

BALARDIN, R. S. Identificação de raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* no Rio Grande de Sul – Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 1-4, 1997.

BHOSALE, S. H.; JAGTAP, T. G.; NAIK, C. G. Antifungal activity of some marine organisms from India, against food spoilage *Aspergillus* strains. **Mycopathologia**, v. 147, p. 133-138, 1999.

BIGIRIMANA, J.; HÖFTE, M. Induction of systemic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in bean by a benzothiadiazole derivative and rhizobacteria. **Phytoparasitica**, v. 30, n. 2, p. 1-10, 2002.

BOBIN-DUBIGEON, C.; LAHAYE, M.; GUILLON, F.; BARRY, J.L.; GALLANT, D. J. Factors limiting the biodegradation of *Ulva* sp cell-wall polysaccharides. **Journal of the Sciences of Food and Agriculture**, v. 75, n. 3, p. 341-351, 1999.

BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TESSMANN, D. J.; SCAPIM, C. A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n.2, p. 128-134, 2004.

BOYLE, C.; WALTERS, D. Induction of systemic protection against rust infection in broad bean by saccharin: effects on plant growth and development. **New Phytologist**, v. 167, n. 2, p. 607-612, 2005.

BRIAND, X.; MORAND, P. Anaerobic digestion of *Ulva* sp. Relationship between *Ulva* composition and methanisation. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 511-524, 1997.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; SILVA, J. B.; OSÓRIO, V. A. Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 15, n. 3, p. 129-134, 2003.

CARLUCCI, M. J.; PUJOL, C. A.; CIANCIA, M.; NOSEDA, M. D.; MATULEWICZ, M. C.; DAMONTE, E. B.; CERESO, A. S. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 20, p. 97-105, 1997.

CARVALHO, L. R.; ROQUE, L. F. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. **Química Nova**, v. 26, n 6, p. 757-764, 2000.

CHANG, T.; OHTA, S.; IKEGAMI, N.; MIYATA, H.; KASHIMOTO, T.; KONDO, M. Antibiotic substances produced by a marine green alga, *Dunaliella primolecta*. **Bioresource Technology**, v. 44, n. 2, p. 149-153, 1993.

CLUZET, S.; TORREGROSA, C.; JACQUET, C.; LAFITE, C.; FOURNIER, J.; MERCIER, L.; SALAMAGNE, S.; BRIAND, X.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T.; DUMAS, B. Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp. **Plant, Cell and Environment**, v. 27, p. 917-928, 2004.

DALLA PRIA, M. AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Quantificação dos componentes monocíclicos da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 401-407, 2003.



EDRADA, R. A.; EBEL, R.; SUPRIYONO, A.; WRAY, V.; SCHUPP, P.; STEUBE, K.; SOEST, R.; PROKSCH, P. Swinhoeiamide A, a new highly active calyculin derivatives from the marine sponge *Theonella swinhoei*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1168-1172, 2002.

EL GUEDDARI, N. E.; RAUCHHAUS, U.; MOERSCHBACHER, B. M.; DEISING, H. B. Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cells walls of plant pathogenic fungi. **New Phytologist**, v. 156, p. 103-112, 2002.

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

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Agropecuária. Disponível em: <[www.cnpaf.embrapa.br/tecnolog/dn\\_feij.htm](http://www.cnpaf.embrapa.br/tecnolog/dn_feij.htm)>. Acesso em: junho de 2004.

FLEURENCE, J. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potencial uses. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 25-28, 1999.

FRUGULHETTI, I. C. P. P.; AMORIM, L. M F.; TEIXEIRA, V. L.; PEREIRA, R. C. Estudos da atividade antiviral e anticâncer de substâncias isoladas de algas marinhas. **Potencial Biotecnológico das Macroalgas Marinhas**. Oficina de Trabalho, Angra dos Reis, 2005.

GARG, H. S.; SHARMA, M.; BHAKUNI, D. S.; PRAMANIK, B. N.; BOSE, A. K. An antiviral sphingosine derivative from the green alga *Ulva fasciata*. **Tetrahedron Letters**, v. 33, n. 12, p. 1641-1644, 1992.

GIANASI, L. Patossistema feijoeiro – antracnose: efeito do trifetil acetato de estanho no crescimento do hospedeiro e no progresso da doença. **Ciênc. Agrotec.**, v. 26, n. 2, p. 309-317, 2002.

GOËMAR LABORATORIES. Disponível em: < [www.goemar.com/cgi-bin/client/entree.pl?shop=goemar&langue=2](http://www.goemar.com/cgi-bin/client/entree.pl?shop=goemar&langue=2)>. Acesso em: julho de 2005.

GONZÁLEZ DEL VAL, A.; PLATAS, G.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; GORROCHATEGUI, J.; SUAY, I.; VICENTE, F.; PORTILLO, E.; JIMÉNEZ DEL RÍO, M.; REINA, G. G.; PELÁEZ, F. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). **Int. Microbiol.**, v. 4, p. 35-40, 2001.

GUARRO, J.; SVIDZINSKI, T. E.; ZAROR, L.; FORJAZ, M. H.; GENÉ, J.; FISCHMAN, O. Subcutaneous hyalohyphomycosis caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 37, p. 4170-1473, 1998.

HOIBY, N. Understanding bacterial biofilms in patients with cystic fibrosis: current and innovative approaches to potential therapies. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 1, p. 249–254, 2002.

HORTA, P. A.; AMANCIO, E.; COIMBRA, C. S.; OLIVEIRA, E. C. Considerações sobre a distribuição e origem da flora de macroalgas marinhas brasileiras. **Hoehnea**, v. 28, n. 3, 2001.

HORTA, P. Diferentes aspectos da diversidade e aplicabilidade das macroalgas no sul do Brasil. Potencial Biotecnológico das Macroalgas Marinhas. **Oficina de Trabalho**, Angra dos Reis, 2005.

HOSHINO, T.; HAYASHI, T.; HAYASHI, K.; HAMADA, J.; LEE, J. B. SANKAWA, U. An antivirally active sulphated polysaccharide from *Sargassum horneri*. **Biol Pharm. Bull**, v. 21, p. 730-734, 1999.

HUTCHISON, K. A.; PERFECT, S. E.; O'CONNELL, R. J.; GREEN, J. R. Immunomagnetic purification of *Colletotrichum lindemuthianum* appressoria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3464-3467, 2000.

IMMANUEL, G.; VINCYBAI, V. C.; SIVARAM, A.; PALAVESAM, A.; MARIAN, M. P. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. **Aquaculture**, v. 236, p. 53-65, 2004.

IVANOVA, V.; ROUSEVA, R.; KOLAROVA, M.; SERKEDJIVA, J.; RACHEV, R. E MANOLOVA. Isolation of a polysaccharide with antiviral effect from *Ulva lactuca*. **Preparative Biochemistry**, v. 24, n. 2, p. 83-97, 1994.

JOLY, A. B. Flora marinha do litoral norte do estado de São Paulo e regiões circunvizinhas. Separata do Boletim 294. **Fac. Fil., Ciênc. e Letras da USP, Botânica**, v. 21, p. 31-33, 1965.

KAEFFER, B.; BENARD, C.; LAHAYE, M.; BLOTTIERE, H. M.; CHERBUT, C. Biological properties of ulvan, a new source of green seaweed with sulfated polysaccharides, on cultured normal and cancerous epithelial cells. **Panta Med.**, v. 65, n. 6, p. 527-531, 1999.

KAJIYAMA, S-I.; KANZAKI, H.; KAWAZU, K.; KOBAYASHI, A. Nostofungicide, an antifungal lipopeptide from the field-grown terrestrial blue-green alga *Nostoc commune*. **Tetrahedron Letters**, v. 39, p. 3737-3740, 1998.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. In: **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**, 2ª edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo/SP, v. 2, p. 383-385, 1997.

KLARZYNSKI, O.; DESCAMPS, V.; PLESSE, B.; YVIN, J-C.; KLOAREG, B.; FRITIG, B. Sulfated fucan oligosaccharides elicit defense responses in tobacco and local and systemic resistance against tobacco mosaic virus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, n. 2, p. 115-122, 2003.

KLARZYNSKI, O.; PLESSE, B.; JOUBERT, J-M.; YVIN, J-C.; KOPP, M.; KLOAREG, B.; FRITIG, B. Linear  $\beta$ -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. **Plant Physiology**, v. 124, p. 1027-1037, 2000.

LAMARE, M. D.; WING, S. R. Calorific content of New Zealand marine macrophytes. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 35, p. 335-341, 2001.

LAHAYE, M.; CIMADEVILLA, A-C.; KUHLENKAMP, R.; QUEMENER, B.; LOGNONÉ, V.; DION, P. Chemical composition and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic characterisation of ulvans from *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 11, p. 1-7, 1999.

LAHAYE, M. NMR spectroscopic characterisation of oligosaccharides from two *Ulva rigida* ulvan samples (Ulvales, Chlorophyta) degraded by a lyase. **Carbohydrate Research**, v. 314, p. 1-12, 1998.

LAHAYE, M.; BRUNEL, M.; BONNIN, E. Fine chemical structure analysis of oligosaccharides produced by an ulvan-lyase degradation of the water-soluble cell-wall polysaccharides from *Ulva* sp. (Ulvales, Chlorophyta). **Carbohydrate Research**, v. 304, p. 325-333, 1997.

LAHAYE, M.; RAY, B. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta) – NMR analysis of ulvan oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 283, p. 161-173, 1996.

LAHAYE, M.; AXELOS, M. A. V. Gelling properties of water-soluble polysaccharides from proliferating marine green seaweed (*Ulva* spp.). **Carbohydrate Polymers**, v. 22, n. 4, p. 261-265, 1993.

LEE, T-M.; CHEN, M-H. Hyposaline effect on polyamine accumulation in *Ulva fasciata* (Ulvales, Chlorophyta). **Bol. Bull. Acad. Sin.**, v. 39, p. 167-174, 1998.

LEE, J-B.; YAMAGAKI, T.; MAEDA, M.; NAKANISHI, H. Rhamnan sulfate from cell walls of *Monostroma latissimum*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 6, p. 921-925, 1998.

LEONETTI, D. B.; GONZAGA, F.; HORTA, P. A.; STADNIK, M. J. Eficiência de extratos de macroalgas marinhas no controle de bactérias fitopatogênicas e do oídio do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28 (suppl.), p. 380, 2003.

LIMA-FILHO, J. V.; CARVALHO, A.; FREITAS, S. M.; MELO, V. M. Antibacterial activity of extracts of six macroalgae from the northeastern Brazilian coast. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 311-313, 2002.

LIZZI, Y.; COULOMB, C.; POIAN, C.; COULOMB, P. J.; COULOMB, P. O. L'algue face au Mildiou quel avenir? **Phytoma**, v. 508, p. 29-30, 1998.

LOFFAGUEN, J. C.; TALAMINI, V.; STADNIK, M, J. Identificação da raça 73 de *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose-do-feijoeiro, em dois municípios do Alto Vale do Itajaí, SC. **Agropecuária Catarinense**, v. 18, n. 2, p. 87-89, 2005.

MAGALLANES, C.; CÓRDOVA, C.; OROZCO, R. Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. **Rev. Peru Biol.**, v. 10, n. 2, p. 125-132, 2003.

MAHUKU, G. S.; JARA, C. E.; CAJIAO, C.; BEEBE, S. Sources of resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in the secondary gene pool of *Phaseolus vulgaris* and in crosses of primary and secondary gene pools. **Plant Disease**, v. 86, n. 12, p. 1383-1387, 2002.

MARASCHIN, M.; CAROBREZ, S. G.; PERSIKE, D.; PEIXOTO, M. L.; FERREIRA, A. G.; FERRACIN, R., VERPOORTE, R.; FONTANA, J. D. Cell wall polysaccharides from *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) cultured cells: extraction and chemical structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, p. 55-60, 2000.

MATIAS, W. G. Algas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, n.8, p. 16-17, 1999.

MAYER, A. M. S.; HAMANN, M. T. Marine pharmacology in 2001-2002: Marine compounds with antihelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 140, p. 265-286, 2005.

MERCIER, L.; LAFITTE, C.; BORDERIES, G.; BRIAND, X.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M-T.; FOURNIER, J. The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant defence. **New Phytologist**, v. 149, p. 43-51, 2001.

MEZIANE, H., VAN DER SLUIS, I.; VAN LOON, L. C.; HÖFTE, M.; BAKKER, P. A. H. M. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. **Molecular Plant Pathology**, v. 6, n.2, p. 177-185, 2005.

MOERSCHBACHER, B. M.; NOLL, U, M.; FLOTT, B. E.; REISENER, H. J. Lignin biosynthetic enzymes in stem rust infected, resistant and susceptible near-isogenic wheat lines. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 33, p. 33-46, 1988.

MOLL, B.; DEIKMAN, J. *Enteromorpha clathrata*: a potencial seawater-irrigated crop. **Bioresource Technology**, v. 52, p. 225-260, 1995.

MULBRY, W.; WESTHEAD, K.; PIZARRO, C.; SIKORA, L. Recycling of manure nutrients: use of algal biomass from dairy manure treatment as a slow release fertilizer. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 451-458, 2005.

MSUYA, F. E.; NEORI, A. *Ulva reticulata* and *Gracilaria crassa*: macroalgae that can biofilter effluent from tidal fishponds in Tanzania. **Western Indian Ocean Journal of Marine Science**, v. 1, n. 2, p. 117-126, 2002.

OLIVEIRA, E. C.; HORTA, P. A.; AMANCIO, C. E.; SANT'ANA, C. L. Algas e angiospermas marinhas bênticas do litoral brasileiro. Disponível em: <<http://www.bdt.fat.org.br/workshop/costa/algas>>. Acesso em: junho de 2005.

PÁDUA, M.; FONTOURA, P. S. G.; MATHIAS, A. L. Chemical composition of *Ulvaria oxysperma* (Kützting) Bliding, *Ulva lactuca* (Linnaeus) and *Ulva fasciata* (Delile). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 1, p. 49-55, 2004.

PARADOSSI, G.; CAVALIERI, F.; CHIESSI, E. A conformational study on the algal polysaccharide ulvan. **Macromolecules**, v. 35, p. 6404-6411, 2002.

PARADOSSI, G.; CAVALIERI, F.; PIZZOFERATO, L.; LIQUORI, A. M. A physico-chemical study on the polysaccharide ulvan from hot water extraction of the macroalga *Ulva*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 309-315, 1999.

PENGZHAN, Y.; QUANBIN, Z.; NING, L.; ZUHONG, X.; YANMEI, W.; ZHI'EN, L. Polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and preliminary studies on their antihyperlipidemia activity. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, p. 21-27, 2003a.

PENGZHAN, Y.; NING, L.; XIGUANG, L.; GEGEI, Z.; QUANBIN, Z.; PENGCHENG, L. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). **Pharmacological Research**, v. 48, p. 543-549, 2003b.

PEREIRA, H. S.; SANTOS, J. B.; ABREU, A. F. B. Linhagens de feijoeiro com resistência à antracnose selecionadas quanto a características agronômicas desejáveis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 3, p. 209-215, 2004.

QUEMENER, B.; LAHAYE, M.; BOBIN-DUBIGEON, C. Sugar determination in ulvans by a chemical-enzymatic method coupled to high performance anion exchange chromatography. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 179-188, 1997.

RAD, U.; MUELLER, M. J.; DURNER, J. Evaluation of natural and synthetic stimulants of plant immunity by microarray technology. **New Phytologist**, v. 165, p. 191-202, 2005.

RAMAZANOV, Z. New wave of health from the sea. **Nutraceuticals World**, v. 2, n. 6, p. 38-39. Disponível em: <<http://www.rhodiolarosea.org/sea-vegetables.pdf>>. Acesso em: julho de 2004.

RAVA, C. A.; MOLINA, J.; KAUFFMANN, M.; BRIONES, I. Determinación de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* en Nicaragua. **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, n. 3, p. 388-391, 1993.

RAY, B.; LAHAYE, M. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta). Extraction and chemical composition. **Carbohydrate Research**, v. 274, p. 251-261, 1995a.

RAY, B.; LAHAYE, M. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta). Chemical structure of ulvan. **Carbohydrate Research**, v. 274, p. 313-318, 1995b.

REVIERS, B.; LEPROUX, A. Characterization of polysaccharides from *Enteromorpha intestinalis* (L.) link, chlorophyta. **Carbohydrate Polymers**, v. 22, n. 4, p. 253-259, 1993.

ROCA, M. G.; DAVIDE, L. C.; MENDES-COSTA, M. C. Cytogenetics of *Colletotrichum lindemuthianum* (*Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 367-373, 2003.

ROULLIER GROUPE. Disponível em: <[www.roullier.com/eng/metiers/agrofourniture/mat\\_premieres.php](http://www.roullier.com/eng/metiers/agrofourniture/mat_premieres.php)>. Acesso em: julho de 2005.

SAMPAIO, A. H.; AINOUS, I. L.; FREITAS, A. L.; BENEVIDES, N. M .B. Hemaglutininas de algas marinhas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, n. 2, p. 171-177, 1993.

SCHLOSSER, S.; LUPATSCH, I.; LAWRENCE, J. M.; LAWRENCE, A. L.; SHPIGEL, M. Protein and energy digestibility and gonad development of the European sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) fed algal and prepared diets during spring and fall. **Aquaculture Research**, v. 36, p. 972-982, 2005.

SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2883-2894, 2001.

SELVIN J.; LIPTON, A. P. Biopotentials of *Ulva fasciata* and *Hypnea musciformis* collected from the peninsular coast of India. **Journal of Marine Science and Technology**, v. 12, n.1, p. 1-6, 2004.

SMANIA, A. Jr.; SMANIA E. F. A.; DELLE MONACHE, F.; PIZZOLATTI, M.; DELLE MONACHE, G. Derivatization does not influence antimicrobial and antifungal activities of applanoxidic acids and sterols from *Ganoderma* spp. **Zeitschrift für Naturforschung**, 2005 (*in press*).

SMANIA, E. F. A.; DELLE MONACHE, F.; SMANIA, A. Jr.; YUNES, R. A.; CUNEO, R. S. Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 375-377, 2003.

SMANIA, A. Jr.; DELLE MONACHE, F.; SMANIA, E. F. A.; CUNEO, R.S. Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (Aphyllorphoromycetideae) Fruit Body. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 325-330, 1999.

SMIT, A. J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: a review. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, p. 245-262, 2004.

SOYLU, S.; BENNETT, M. H.; MANSFIELDS, J. W. Induction of phytoalexin accumulation in broad bean (*Vicia faba* L.) cotyledons following treatments with biotic and abiotic elicitors. **Turk J. Agric. For**, v. 26, p. 343-348, 2002.

STADNIK, M. J.; BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, p. 25-34, 2000.

STADNIK, M. J. Potential use of algae in the control of plant diseases. **VIII Reunião de Controle Biológico de Fitopatógenos**, Cepec, Ilhéus/BA, p. 70-74, 2003.

STADNIK, M. J.; BETTIOL, W.; SAITO, M. L. Bioprospecting for plant and fungus extracts with systemic effect to control the cucumber powdery mildew. **Journal of Plant Disease and Protection**, v. 110, n. 4, p. 383-393, 2003.

STADNIK, M. J.; ZEFERINO, S. A. D. B. Effect of marine macroalgae extracts on the severity of bean powdery mildew. **Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanst**, v. 396, p. 470, 2004.

STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: Stadnik, M. J.; Talamini, V. (eds.). **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis, p. 55-57, 2004.

STADNIK, M. J.; MARASCHIN, M. Indução de resistência de plantas a fitopatógenos. In: Stadnik, M. J.; Talamini, V. (eds.). **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis, p. 221-244, 2004.

STADNIK, M. J.; EL-GUEDDARI, N. E.; MOERSCHBACHER, B. M. Effect of *Ulva fasciata* extract and chitosan on the uredospore germination of *Puccinia graminis* and peroxidase activity in wheat. **Summa Phytopathologica**, v. 31(suppl.), n. 24, 2005.



STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 11, p.16-21, 1999.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 235-270, 1997.

TALARICO, L. B.; PUJOL, C. A.; ZIBETTI, R. G. M.; FARIA, P. C. S.; NOSEDA, M. D.; DUARTE, M. E. R.; DAMONTE, E. B. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. **Antiviral Research**, v. 66, n. 2-3, p. 103-110, 2005.

TALARICO, L. B.; ZIBETTI, R. G. M.; FARIA, P. C. S.; SCOLARO, L. A.; DUARTE, M. E. R.; NOSEDA, M. D.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, n. 1-2, p. 63-71, 2004.

TAMAYO, P. J. Manejo y control de las enfermedades del frijol voluble. Rio Negro: Piloto, 1995, 40 p.

TAQUIL, A.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. Alterações na composição florística das algas na Praia de Boa Viagem (Niterói, RJ). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 4, p. 405-412, 2002.

TEAS, J.; HEBERT, J. R.; FITTON, J. H.; ZIMBA, P. V. Algae – a poor man's HAART? **Medical Hypotheses**, v. 62, p. 507-510, 2004.

TU, J. C. *Colletotrichum lindemuthianum* on bean: population dynamics of the pathogen and breeding of resistance. In: Bailey, J. A.; Jeger, M. J. (eds). **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. British Society for Plant Pathology, p. 203-224, 1992.

UNIVERSITY OF HAWAII. Botany Department. Algae: invasive native *Ulva fasciata*. Disponível em: <[http://www.hawaii.edu/reefalgae/invasive\\_algae/chloro/ulva\\_fasciata.htm](http://www.hawaii.edu/reefalgae/invasive_algae/chloro/ulva_fasciata.htm)>. Acesso em: julho de 2004.

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

VAIRAPPAN, C. S.; SUZUKI, M. Dynamics of total surface bacteria and bacterial species counts during desiccation in the Malaysian sea lettuce, *Ulva reticulata* (Ulvales, Chlorophyta). **Phycological Research**, v. 48, p. 55-61, 2000.

VANDER, P.; VARUM, K. M.; DOMARD, A.; EL GUEDDARI, N. E.; MOERSCHBACHER, B. M. Comparison of the ability of partially *N*-acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. **Plant Physiology**, v. 118, p. 1353-1359, 1998.

VECHIATO, M. H.; LASCA, C. .C; KOHARA, E. Y.; CHIBA, S. Antracnose do feijoeiro: tratamento de sementes e correlação entre incidência em plantas e infecção de sementes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 1, p. 83-87, 2001.

VENTURA, M. R.; CASTAÑÓN, J. I. R. The nutritive value of seaweed (*Ulva lactuca*) for goats. **Small Ruminant Research**, v. 29, p. 325-327, 1998.

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

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

XU, N.; FAN, X.; YAN, X.; LI, X.; NIU, R.; TSENG, C. K. Antibacterial bromophenols from the marine red alga *Rhodomela confervoides*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 1221-1224, 2003.

ZEMKE-WHITE, W. L.; OHNO, M. World seaweed utilisation: and end-of-century summary. **Journal of Applied Phycology**, v. 11, p. 369-376, 1999.

ZHU, W.; CHIU, L. C. M.; OOI, V. E. C.; CHAN, P. K. S.; ANG JR.; P O. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 2. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 81-85, 2004.

YAN, X. Assessment of calcareous alga *Corallina pilulifera* as elemental provider. **Biomass and Bioenergy**, v. 16, p. 357-360, 1999.

WAALAND, J. R.; STILLER, J. W.; CHENEY, D. P. Macroalgal candidates for genomics. **Journal of Phycology**, v. 40, p. 26-33, 2004.

WANG, S.; ZHONG, F-D.; ZHANG, Y-J.; WU, Z-J.; LIN, Q-Y.; XIE, L-H. Molecular characterization of a new lectin from the marine alga *Ulva pertusa*. **Acta Biochimica et Biophysica**, v. 36, n. 2, p. 111-117, 2004.

WILKIE, A. C.; MULBRY, W. W. Recovery of dairy manure nutrients by benthic freshwater algae. **Bioresource Technology**, v. 84, p. 81-91, 2002.

WORDELL FILHO, J. A. Manejo ecológico de doenças de plantas em Santa Catarina. In: Stadnik, M. J.; Talamini, V. (eds.). **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis, p. 31, 2004.