



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



**AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DA
MICROALGA VERMELHA *Porphyridium* sp.**

NATÁLIA POPIOREK DOS SANTOS

RIO GRANDE, 2025

Ficha Catalográfica

S237a Santos, Natália Popiorenk dos.
Avaliação antimicrobiana e antioxidante de extratos da microalga vermelha *Porphyridium* sp. / Natália Popiorenk dos Santos. – 2025.
103 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Rio Grande/RS, 2025.

Orientadora: Dra. Daniela Fernandes Ramos.

Coorientador: Dr. Bruno Galler Kubelka.

1. Rhodophyta 2. Resistência bacteriana 3. Microbiota intestinal
4. Compostos bioativos I. Ramos, Daniela Fernandes II. Kubelka, Bruno Galler III. Título.

CDU 616:561.231

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

ATA DA SESSÃO DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA

A banca examinadora, designada pela Portaria nº 1893/2025 de trinta de maio de dois mil e vinte e cinco, em sessão presidida e registrada pela orientadora Profa. Dra. Daniela Fernandes Ramos, reuniu-se no dia treze de junho de dois mil e vinte e cinco, às quatorze horas, por meio de videoconferência (<https://meet.jit.si/DefesaNat%C3%A1liaPopiorek2025>), para avaliar a Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, intitulada: “Avaliação antimicrobiana e antioxidante de extratos da microalga vermelha *Porphyridium purpureum*” da mestranda Natália Popiorek dos Santos. Para o início dos trabalhos, a Senhora Presidente procedeu à abertura oficial da sessão, com a apresentação dos membros da banca examinadora. A seguir, prestou esclarecimentos sobre a dinâmica de funcionamento da sessão, concedendo o tempo de até 30 (trinta) minutos para a apresentação da dissertação pelo mestrando, que iniciou às 14:10 horas e terminou às 14 horas e 43 minutos. Após a apresentação, passou a palavra aos membros da banca examinadora, para que procedessem à arguição e apresentassem suas críticas e sugestões. Ao término dessa etapa de avaliação, de acordo com os membros da banca examinadora, a dissertação de mestrado avaliada foi **APROVADO**.

Rio Grande, 13 de junho de 2025.

Documento assinado digitalmente

gov.br

DANIELA FERNANDES RAMOS SOARES

Data: 16/06/2025 10:13:43-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Daniela Fernandes Ramos (Orientadora – FURG)

Documento assinado digitalmente

gov.br

BRUNO GALLER KUBELKA

Data: 16/06/2025 12:32:29-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Bruno Galler Kubelka (Co-Orientador – FURG)

Documento assinado digitalmente

gov.br

JULIA OLIVEIRA PENTEADO

Data: 13/06/2025 16:12:29-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Júlia Oliveira Penteado (Externo – UFFS)

Profa. Dra. Andrea Von Groll (Titular – FURG)

Profa. Dra. Luciana Farias da Costa de Avila (Titular – FUR



Documento assinado digitalmente

LUCIANA FARIAS DA COSTA DE AVILA

Data: 14/06/2025 13:59:17-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Mirelle de Oliveira Saes (Suplente - FURG)



Documento assinado digitalmente

NATALIA POPIOREK DOS SANTOS

Data: 16/06/2025 10:07:05-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

CIENTE: _____

Mestranda Natália Popiorek dos Santos



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
GRANDE



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DA
MICROALGA VERMELHA *Porphyridium* sp.**

NATÁLIA POPIOREK DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Fernandes Ramos
Coorientador: Dr. Bruno Galler Kubelka

NATÁLIA POPIOREK DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DA
MICROALGA VERMELHA *Porphyridium* sp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Banca Examinadora

Prof. Dr^a. Luciana Farias da Costa de Avila – FURG

Prof. Dr^a. Júlia Oliveira Penteado – Externo

Prof. Dr^a. Andrea Von Groll – PPGCS FURG

Prof^a. Dr^a. Mirelle de Oliveira Saes (Suplente) – PPGCS FURG

Dr. Bruno Galler Kubelka – FURG (Coorientador)

Prof^a. Dr^a. Daniela Fernandes Ramos – FURG (Orientadora)

RIO GRANDE, 2025

AGRADECIMENTOS

Não imaginava que esse momento chegaria tão cedo, mas só tenho a agradecer.

Em primeiro lugar, agradeço ao meu namorado Wellington, que sempre enxergou uma estrela em mim, mesmo quando eu mesma não conseguia ver. Ele acreditou em mim incondicionalmente, me escutou mesmo sem compreender todos os detalhes do mestrado e me apoiou de uma forma única, como ninguém mais faria.

Aos meus pais, Carmem e Maycon, minha eterna gratidão por sempre valorizarem a educação e me incentivarem a correr atrás dos meus sonhos. Desde cedo, me ensinaram o poder da leitura, e muito do que sei hoje é reflexo do apoio e do incentivo de vocês.

À minha melhor amiga Karina, que há mais de 20 anos caminha ao meu lado, sempre torcendo por mim e celebrando minhas conquistas, obrigada por ser essa presença essencial em minha vida.

Agradeço também às minhas avós Beth e Luizinha, e ao meu avô João, por sempre demonstrarem orgulho pela minha trajetória e me incentivarem ao longo de toda a caminhada acadêmica.

À minha orientadora, Daniela Fernandes Ramos, agradeço profundamente pelos ensinamentos, conselhos, paciência e apoio. Sua orientação foi fundamental para a realização deste trabalho, e sua dedicação e inspiração continuarão a me guiar, agora rumo ao doutorado. Muito do que foi construído aqui só foi possível porque você acreditou em mim.

Aos colegas de laboratório e a todas as pessoas que conheci durante o mestrado, meu muito obrigada pelas trocas, aprendizados e contribuições, diretas ou indiretas, que tornaram este trabalho possível.

Sou grata também à UFPR pela parceria durante a mobilidade acadêmica, e à empresa AlgaSul pela disponibilidade da cepa de *Porphyridium* e pelo apoio técnico durante o cultivo.

À CAPES, pelo apoio financeiro por meio da bolsa concedida durante o mestrado, e ao PPG em Ciências da Saúde, pelos auxílios e pela oportunidade da mobilidade acadêmica.

Por fim, não sei mais como agradecer, mas deixo aqui um registro cheio de emoção: jamais imaginei que uma garotinha lá do Senandes alcançaria o título de mestre. Hoje, com o coração cheio de gratidão, eu digo: conseguimos!

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	11
OBJETIVOS	22
Referências	23
MANUSCRITO 1.....	33
Introdução	36
Material e métodos	37
Resultados e discussão	38
Parâmetros abióticos que influenciam o cultivo de <i>Porphyridium</i> sp	40
Efeitos de parâmetros abióticos na cultura e produção de exopolissacarídeos	41
Composição e aplicações biológicas de exopolissacarídeos (EPS).....	45
Efeito de parâmetros abióticos na composição de exopolissacarídeos.....	47
Considerações finais e perspectivas	48
Referências.....	49
MANUSCRITO 2.....	58
Introdução	60
Resultados.....	61
Discussão.....	72
Experimental	79
Conclusão	86
Referências	87
CONCLUSÕES.....	102

LISTA DE FIGURAS

MANUSCRITO 1

Figura 1. Fatores abióticos e bioprodutos de <i>Porphyridium</i> sp. (A) Parâmetros ambientais críticos para crescimento e síntese de EPS: irradiância, pH, temperatura, nutrientes (N, P) e salinidade, com faixas ótimas indicadas. (B) Bioprodutos gerados, incluindo pigmentos, ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) e exopolissacarídeos (EPS), cuja composição é influenciada pelas condições de cultura.....	37
Figura 2. O fluxograma representa o processo de seleção de artigos para revisão sistemática.....	40
Figura 3. Fórmulas químicas dos componentes presentes em exopolissacarídeos. Fonte: ChemSpider.....	46
Figura 4. Propriedades biológicas de exopolissacarídeos (EPS) de <i>Porphyridium</i> sp.....	46

MANUSCRITO 2

Figura 1. Crescimento de <i>P. purpureum</i> em meio de cultivo F/2 e irradiância a 570 nm.....	62
Figura 2. Rendimento dos extratos de <i>P. purpureum</i> sob diferentes polaridades dos solventes.....	63
Figura 3. Atividade antioxidante dos extratos de <i>P. purpureum</i> na concentração de 800 µg/mL, 400 µg/mL e 200 µg/mL.....	66
Figura 4. Espectro de FTIR de EPS de <i>P. purpureum</i>	67
Figura 5. Cromatograma de CG-EM de <i>P. Purpureum</i> extrato metanólico.....	68
Figura 6. Cromatograma de CG-EM de <i>P. Purpureum</i> extrato hexânico.....	70
Figura 7. Fórmula do rendimento dos extratos de <i>P. purpureum</i>	80
Figura 8. Fórmula do rendimento dos exopolissacarídeos (EPS) de <i>P. purpureum</i>	81
Figura 9. Fórmula Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI).....	83
Figura 10. Fórmula para avaliação da atividade antioxidante.....	84
Figura 11. Fórmula avaliação da concentração inibitória (CI ₅₀) dos extratos.....	86
Figura 12. Fórmula avaliação do índice de seletividade (IS).....	86

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1

Tabela 1: Efeito dos parâmetros abióticos no crescimento e na produção de exopolissacarídeos (EPS) em <i>Porphyridium</i> sp.	38
Tabela 2: Composição química dos exopolissacarídeos (EPS) produzidos por diferentes cepas de <i>Porphyridium</i> sp.	47

MANUSCRITO 2

Tabela 1: Sinergismo dos extratos de <i>P. purpureum</i> e antibióticos de referência à resistência de cada bactéria.....	64
Tabela 2: Classificação CLSI (2020) da sensibilidade aos antibióticos antes e após combinação com extratos de <i>P. purpureum</i>	65
Tabela 3: Compostos identificados no extrato metanólico de <i>P. purpureum</i> , conforme análise por CG-EM.....	69
Tabela 4: Compostos identificados no extrato metanólico de <i>P. purpureum</i> , conforme análise por CG-EM.....	71
Tabela 5: Índice de seletividade dos extratos de <i>Porphyridium purpureum</i>	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABAP	2,2'-Azobis(2-amidinopropano) dihidrocloreto
ARA	Ácido araquidônico
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CI ₅₀	Concentração inibitória
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
DCF	Dicloro-fluoresceína
DCFH	Dicloro-hidrofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EPS	Exopolissacarídeos sulfatados
FIC	Concentração inibitória fracionada
FICI	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
IS	Índice de Seletividade
LA	Ácido linoleico
LC-PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa
MRSA	<i>S. aureus</i> resistentes a meticilina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Ácido palmítico
PLA	Ácido palmitoleico
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados

RESUMO

Santos, N. P. dos. AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DA MICROALGA VERMELHA *Porphyridium* sp. Orientadora: Daniela Fernandes Ramos. Coorientador: Bruno Galler Kubelka. 2025. 104 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2025.

O uso indiscriminado de antibióticos e a escassez de novas alternativas terapêuticas têm impulsionado a busca por compostos naturais com atividades antimicrobiana e antioxidante. Nesse contexto, a microalga vermelha *Porphyridium purpureum* surge como uma fonte promissora de metabólitos bioativos. Este trabalho foi dividido em duas etapas: uma revisão sistemática sobre os fatores abióticos que influenciam o cultivo de *P. purpureum*, com foco na produção de exopolissacarídeos (EPS) e suas aplicações biológicas, e uma etapa experimental. Na parte experimental, os extratos metanólico e hexânico foram obtidos por esgotamento por percolação. A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM), em um intervalo de 800 a 6,25 µg/mL, frente a bactérias potencialmente patogênicas da microbiota intestinal (*E. coli*, *E. faecalis*), patogênicas (*S. typhimurium* e *S. aureus*) e uma bactéria benéfica (*L. rhamnosus*). Adicionalmente, realizou-se o teste de Concentração Inibitória Fracionária pelo método de *Checkerboard* utilizando as mesmas bactérias, exceto para *L. rhamnosus*. A atividade antioxidante foi avaliada pelo ensaio ABAP/DCF. Os EPS foram extraídos com etanol absoluto e caracterizados por espectroscopia no infravermelho. Os compostos bioativos dos extratos foram identificados por GC-MS. A citotoxicidade foi avaliada em células Vero (IC₅₀) e o Índice de Seletividade (IS) calculado. Os extratos não apresentaram atividade antimicrobiana isolada, mas demonstraram sinergismo com antibióticos: o extrato metanólico com vancomicina contra *S. aureus* (FICI = 0,50), ciprofloxacina contra *S. Typhimurium* (FICI = 0,25) e *E. coli* (FICI = 0,13), e com ampicilina contra *E. faecalis* (FICI = 0,38). O extrato hexânico também foi sinérgico com ciprofloxacina contra *E. coli* (FICI = 0,25). O extrato metanólico reduziu a concentração de resistência de *E. coli* de 4 µg/mL para 0,5 µg/mL. A atividade antioxidante foi dose-dependente e significativamente maior nas concentrações mais altas. A caracterização dos EPS por infravermelho revelou bandas características de grupos hidroxila, carbonila e ligações glicosídicas, indicando a presença de polissacarídeos. A análise de GC-MS identificou ácidos graxos bioativos como ARA, LA, PA, PLA e EPA. O extrato metanólico não apresentou citotoxicidade (IC₅₀ > 1600 µg/mL), ao contrário do hexânico (IC₅₀ = 131,54 µg/mL). Este estudo reforça o potencial biotecnológico de *P. purpureum*, especialmente em aplicações combinadas com antibióticos, contribuindo para a descoberta de alternativas terapêuticas frente à resistência microbiana.

Palavras-chave: Rhodophyta, resistência bacteriana, microbiota intestinal, compostos bioativos;

ABSTRACT

Santos, N. P. dos. ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT EVALUATION OF EXTRACTS FROM THE RED MICROALGAE *Porphyridium* sp. Advisor: Daniela Fernandes Ramos. Co-advisor: Bruno Galler Kubelka. 2025. 104 p. Dissertation (master's in health sciences) – School of Medicine, Federal University of Rio Grande, Rio Grande, 2025.

The indiscriminate use of antibiotics and the scarcity of new therapeutic alternatives have driven the search for natural compounds with antimicrobial and antioxidant activities. In this context, the red microalgae *Porphyridium purpureum* emerges as a promising source of bioactive metabolites. This work was divided into two stages: a systematic review of the abiotic factors that influence the cultivation of *P. purpureum*, focusing on the production of exopolysaccharides (EPS) and their biological applications, and an experimental stage. In the experimental part, the methanolic and hexane extracts were obtained by percolation depletion. The antimicrobial activity was evaluated by means of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), in a range of 800 to 6.25 µg/mL, against potentially pathogenic bacteria of the intestinal microbiota (*E. coli*, *E. faecalis*), pathogenic bacteria (*S. typhimurium* and *S. aureus*) and a beneficial bacterium (*L. rhamnosus*). Additionally, the Fractional Inhibitory Concentration test was performed by the *Checkerboard* method using the same bacteria, except for *L. rhamnosus*. The antioxidant activity was evaluated by the ABAP/DCF assay. EPS were extracted with absolute ethanol and characterized by infrared spectroscopy. The bioactive compounds of the extracts were identified by GC-MS. Cytotoxicity was evaluated in Vero cells (IC₅₀) and the Selectivity Index (SI) was calculated. The extracts did not show isolated antimicrobial activity, but demonstrated synergism with antibiotics: the methanolic extract with vancomycin against *S. aureus* (FICI = 0.50), ciprofloxacin against *S. Typhimurium* (FICI = 0.25) and *E. coli* (FICI = 0.13), and with ampicillin against *E. faecalis* (FICI = 0.38). The hexane extract was also synergistic with ciprofloxacin against *E. coli* (FICI = 0.25). The methanolic extract reduced the resistant *E. coli* concentration from 4 µg/mL to 0.5 µg/mL. The antioxidant activity was dose-dependent and significantly higher at higher concentrations. The characterization of EPS by infrared revealed characteristic bands of hydroxyl groups, carbonyl groups and glycosidic bonds, indicating the presence of polysaccharides. GC-MS analysis identified bioactive fatty acids such as ARA, LA, PA, PLA and EPA. The methanolic extract did not show cytotoxicity (IC₅₀ > 1600 µg/mL), unlike the hexane extract (IC₅₀ = 131.54 µg/mL). This study reinforces the biotechnological potential of *P. purpureum*, especially in combined applications with antibiotics, contributing to the discovery of therapeutic alternatives against microbial resistance.

Keywords: Rhodophyta, bacterial resistance, intestinal microbiota, bioactive compounds.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

História dos antimicrobianos

A descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928 foi o principal evento para o desenvolvimento de antimicrobianos no combate a infecções bacterianas (Nicolaou e Montagnon, 2008). Apesar de sua purificação e uso em escala global terem levado mais de uma década para serem concretizados, a Penicilina serviu como base para o desenvolvimento contínuo de terapias antimicrobianas (Gaynes, 2017). A antibioticoterapia da penicilina foi descrita em 1928 como agente antibiótico, mas só foi introduzida como terapia nos anos 1940, após seu processo de industrialização, impulsionado especialmente pela Segunda Guerra Mundial (Chain *et al.*, 1940; Projan e Shlaes, 2004; Quinn, 2013). A partir disso, entre os anos 1940-1960 diferentes fármacos com propriedades antibióticas começaram a surgir, tanto derivados de compostos naturais, como a estreptomicina, a azitromicina e a vancomicina, quanto sintetizados artificialmente, como as Sulfonamidas e as Quinolonas (Guimarães *et al.*, 2010; Lobanovska e Pilla, 2017; Pancu *et al.*, 2021).

Com a crescente disponibilização desses fármacos, a antibioticoterapia representou um grande avanço para a humanidade no combate às bactérias patogênicas, tornando-se a principal estratégia para o tratamento de infecções bacterianas (Cunha *et al.*, 2019; Chou *et al.*, 2022). Esse impacto foi claramente observado nos Estados Unidos, onde a taxa de mortalidade por doenças infecciosas diminuiu significativamente entre 1938 e 1950, (Armstrong *et al.*, 1999) o que correspondeu à introdução do uso de antibiótico como sulfonamidas em 1935, penicilina em 1941 e estreptomicina em 1943 e isoniazida em 1952, introduzido para tratamento de Tuberculose (Baldry, 1976). Essa correlação evidenciou o papel crucial dos antimicrobianos no controle de doenças infecciosas, destacando sua importância global na redução da mortalidade e no avanço da saúde pública (Aminov, 2017).

No entanto, a resistência aos antibióticos já começou a se manifestar no final da década de 1950, quando a maioria dos isolados de *Staphylococcus aureus* desenvolveu resistência à Penicilina, que até então era amplamente utilizada para tratá-los (Stapleton *et al.*, 2002). Com o tempo, novos antibióticos, como a meticilina e a vancomicina, foram desenvolvidos na década de 1960 para superar esses desafios (McGuinness *et al.*, 2017).

Contudo, o desenvolvimento de novos antibióticos não conseguiu acompanhar a crescente resistência bacteriana, um processo natural impulsionado por alterações genéticas no metabolismo bacteriano (Mancuso *et al.*, 2021). Outros fatores agravam esse cenário, como a dificuldade de tratar doenças devido à resistência, aumentando o risco de propagação de infecções entre pessoas e animais. Além disso, o alto custo, as baixas taxas de sucesso no

desenvolvimento de novos antimicrobianos e as burocracias regulatórias, que levam de 10 a 15 anos para aprovar um candidato do estágio pré-clínico ao clínico, são desafios significativos. Também a falta de colaboração entre órgãos governamentais e o setor privado dificulta a aceleração de testes clínicos. Por fim, a pandemia de COVID-19 impactou negativamente o desenvolvimento de antimicrobianos, atrasando ensaios clínicos e direcionando investimentos para outras áreas de pesquisa (Iskandar *et al.*, 2021; WHO, 2022).

Resistência bacteriana

Além dos mecanismos biológicos de resistência das bactérias e dos exemplos citados acima, os fatores socioeconômicos também contribuem significativamente para o avanço da resistência microbiana (Mancuso *et al.*, 2021). O uso excessivo e inadequado de antimicrobianos em humanos e animais, a falta de supervisão médica, a administração indevida em infecções virais e a falta de conhecimento da população intensificam esse problema (Collignon *et al.*, 2018; Collignon *et al.*, 2019).

Nos países subdesenvolvidos, condições sanitárias inadequadas, manuseio impróprio de alimentos, fiscalização deficiente em estabelecimentos de saúde e o uso indiscriminado de antibióticos na agroindústria favorecem ainda mais a disseminação da resistência (Aslam *et al.*, 2018; Larsson e Flach, 2022). O uso excessivo de agentes de amplo espectro também intensifica a pressão seletiva sobre as cepas bacterianas, eliminando as suscetíveis e permitindo a proliferação das resistentes (Alm e Lahiri, 2020; Becattini *et al.*, 2016). Como resultado, a disseminação acelerada da resistência entre as bactérias e a ineficácia dos antibióticos no tratamento de infecções tornam-se uma séria preocupação de saúde pública (Tacconelli, 2017; Alm e Lahiri, 2020).

Diante desse cenário, desde 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publica anualmente uma lista classificando bactérias resistentes aos antimicrobianos, com base na urgência de desenvolvimento de novos antibióticos (WHO, 2017). Essas bactérias são categorizadas por representarem uma ameaça crescente à saúde pública, pois muitas delas já demonstram resistência à maioria dos antibióticos disponíveis no mercado. A lista é dividida em três níveis de prioridade: crítica (*Acinetobacter baumannii* e *Enterobacterales*), alta (*Salmonella Typhi*, *Shigella spp.*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Non-typhoidal Salmonella*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Staphylococcus aureus*) e média (*Group A Streptococci*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Group B Streptococci*) (WHO 2024).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2019 aproximadamente 1,27 milhão de mortes foram diretamente associadas a bactérias resistentes a antibióticos, além de

cerca de 5 milhões de mortes relacionadas (Murray *et al.*, 2022). A resistência antimicrobiana foi incluída pela OMS entre as dez maiores ameaças à saúde pública (WHO, 2019), comprometendo o cumprimento dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS). Apesar dos esforços, o desenvolvimento tecnológico não tem acompanhado a rápida evolução da resistência bacteriana (WHO, 2023). O desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos contribui para o ODS 3 (Saúde e Bem-Estar), que visa combater doenças transmissíveis e fortalecer a capacidade de resposta a riscos à saúde, e a ODS 14 (Vida na Água), que incentiva o uso sustentável dos ecossistemas marinhos e o avanço da pesquisa em biotecnologia marinha. Apesar dos esforços para desenvolver novos antimicrobianos, a tecnologia não tem conseguido acompanhar a rápida evolução da resistência bacteriana (WHO, 2023). Atualmente, há 32 antibióticos em desenvolvimento clínico, mas a maioria pertence a classes já existentes, o que significa que são modificações de moléculas previamente utilizadas, com mecanismos de ação semelhantes (WHO, 2024; Gigante *et al.*, 2024). Isso limita sua eficácia a longo prazo, pois as bactérias já desenvolveram resistência a essas classes. E apenas 12 compostos inovadores estão em fase de desenvolvimento, e apenas quatro são direcionados aos patógenos críticos definidos pela OMS, como *Acinetobacter baumannii* e *Enterobacterales* multirresistentes (WHO, 2024).

Bactérias da microbiota intestinal

As bactérias são ubíquas, estando amplamente distribuídas na natureza e nos organismos vivos (Chandra *et al.*, 2021). Elas podem estar presentes tanto na superfície quanto no interior de animais, objetos e no meio ambiente (Sender *et al.*, 2016). No corpo humano, colonizam a pele, cavidades oral e nasal, pulmões, tratos urogenital e gastrointestinal (GI), sendo que a maior parte se encontra no trato gastrointestinal (Rinninella *et al.*, 2019). Nessa região, as bactérias superam em número as células hospedeiras em cerca de dez vezes e abrigam pelo menos 1.000 espécies microbianas diferentes (Fouhy *et al.*, 2012; Chandra *et al.*, 2021). A maioria das bactérias do trato gastrointestinal são comensais, estabelecendo uma relação simbiótica com o organismo (Lin *et al.*, 2021). Essa microbiota se desenvolve desde o nascimento e desempenha um papel essencial na manutenção da saúde do hospedeiro, auxiliando na digestão de polissacarídeos, na biossíntese de vitaminas, na homeostase e na defesa do sistema imunológico (Becattini *et al.*, 2016; Chandra *et al.*, 2021).

Dentre os principais filos da microbiota intestinal, destacam-se Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria e Actinobacteria. As bactérias benéficas incluem gêneros como *Bifidobacterium* (Filo Actinobacteria) e *Lactobacillus* (Filo Firmicutes). Já entre as patogênicas, destacam-se bactérias da família Enterobacteriaceae (Filo Proteobacteria) e do

gênero *Clostridium* (Filo Firmicutes) (Arumugam *et al.*, 2011; Rinninella *et al.*, 2019).

No entanto, diferentes fatores endógenos e exógenos podem influenciar a microbiota e comprometer seu equilíbrio, incluindo fatores genéticos, estresse, dieta, idade, atividades físicas, uso excessivo de antibióticos, infecções intestinais, medicações, radiação, quimioterapia e doenças subjacentes (Buttó *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2018). Essas perturbações podem levar à disbiose, um estado de desequilíbrio da microbiota intestinal, que tem sido associado à progressão de diversas doenças (Jochum e Stecher, 2020). Sob essas condições adversas, algumas bactérias comensais podem sofrer mudanças fenotípicas e tornar-se patogênicas (Buret *et al.*, 2019). Essas bactérias são conhecidas como patobiontes, ou conhecidas como potenciais patogênicos (Casadevall, 2017). O termo foi introduzido por Sarkis Mazmanian em 2008 para descrever *Helicobacter hepaticus* e sua capacidade de causar colite sob certas condições ambientais (Mazmanian *et al.*, 2008). Diferentemente dos patógenos oportunistas, os patobiontes normalmente coexistem inofensivamente com o hospedeiro, mas, quando ocorre um desequilíbrio na homeostase simbiótica, podem induzir inflamação e contribuir para a progressão de doenças (Chow *et al.*, 2011; Chou *et al.*, 2022). Seu impacto no organismo se dá indiretamente, seja por perturbações na microbiota entérica ou pela desregulação do sistema imunológico (Ahlawat *et al.*, 2021).

Entre os patobiontes mais estudados estão *Escherichia coli* invasiva, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Helicobacter pylori*, associadas, respectivamente, à Doença de Crohn, Colite ulcerativa, Colite e úlcera péptica/gastrite (Chandra *et al.*, 2021, Chou *et al.*, 2022). Esses microrganismos, que normalmente coexistem de forma comensal ou em equilíbrio com a microbiota intestinal, podem se tornar patogênicos em condições de disbiose (Chou *et al.*, 2022). A disbiose, frequentemente desencadeada pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, reduz a diversidade e a população de bactérias benéficas, criando um ambiente propício para a proliferação de patobiontes e o surgimento de patógenos resistentes (Matzaras *et al.*, 2022).

O uso de antimicrobianos de amplo espectro influencia essa situação, selecionando cepas resistentes e comprometendo ainda mais a homeostase da microbiota (Alm e Lahiri, 2020). Para minimizar esses efeitos e prevenir doenças associadas à disbiose, é essencial o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais precisas, como ferramentas antimicrobianas de espectro estreito, capazes de modular a microbiota com maior especificidade (Chou *et al.*, 2022). Esse tipo de abordagem poderia controlar os patobiontes e prevenir doenças associadas à disbiose (Zhang *et al.*, 2022). Essa abordagem torna-se ainda mais crucial diante do desafio representado pelas bactérias patogênicas, que em momentos de disbiose intestinal podem facilmente colonizar o hospedeiro e aumentar sua resistência contra antimicrobianos (Pilmis *et al.*, 2020).

Bactérias patogênicas microbiota intestinal

As bactérias patogênicas estão frequentemente associadas à resistência a diversos antimicrobianos de amplo espectro e de primeira geração, sendo conhecidas como “multirresistentes a medicamentos” (Urban-Chmiel *et al.*, 2022). Elas podem invadir o epitélio da superfície, como pele e membranas mucosas, ou acometer órgãos e tecidos internamente, disseminando-se pelo sistema linfático e pela corrente sanguínea (Soni *et al.*, 2024).

Dessa forma, o cenário é agravado pelo uso excessivo e irresponsável de antimicrobianos em setores como agricultura, pecuária e medicina humana, que exercem pressão seletiva e favorecem a disseminação de microrganismos resistentes (Collignon *et al.*, 2018). Sob a perspectiva da abordagem One Health, que interliga a saúde humana, animal e ambiental, a resistência antimicrobiana é um desafio global interconectado (WHO, 2014). Entre os principais mecanismos de resistência estão as bombas de efluxo, a modificação da estrutura da parede celular ou porinas, mutações em genes essenciais e a aquisição de genes de resistência por transferência horizontal (Sun *et al.*, 2019; Sitohy *et al.*, 2024). Esses mecanismos permitem que genes de resistência sejam transferidos entre diferentes espécies e ecossistemas, ampliando o problema (Collignon e McEwen, 2019). Por exemplo, o uso de antimicrobianos em animais, plantas e aquicultura contribui para a seleção de patógenos como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *E. coli* e *S. aureus*, que podem infectar humanos diretamente ou através do ambiente (Collignon e McEwen, 2019). Além disso, a resistência antimicrobiana reduz a eficácia dos tratamentos, aumenta a gravidade das infecções e eleva os custos associados à saúde, reforçando a necessidade de estratégias integradas para mitigar esse problema global (Velazquez-Meza *et al.*, 2022).

Dentre as bactérias patogênicas e multirresistentes que podem infectar a microbiota intestinal, um exemplo é *Salmonella enterica Typhimurium*, uma bactéria Gram-negativa capaz de invadir o epitélio intestinal, desencadear inflamação e diarreia, além de ser a principal causadora da febre tifoide (Elnekave *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2022). Sua transmissão ocorre principalmente pelo consumo de alimentos crus ou mal cozidos, além de água contaminada por matéria fecal, sendo carne, ovos, aves vivas e produtos lácteos os principais veículos de contaminação (Li *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2015). Nos últimos anos, essa espécie tem demonstrado crescente resistência a antimicrobianos de primeira linha, como cloranfenicol, ampicilina e trimetoprima/sulfametoxazol, levando ao uso de fluoroquinolonas, como ciprofloxacino, um antibiótico de amplo espectro no tratamento de infecções (Bhan *et al.*, 2005; Cuyppers *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2022;). Outra bactéria preocupante é a *Staphylococcus aureus*, um patógeno Gram-positivo comumente associado a infecções

cutâneas e de tecidos moles (Tong *et al.*, 2015). No entanto, algumas cepas também colonizam o trato gastrointestinal, causando intoxicação alimentar por meio da produção de exotoxinas termoestáveis, responsáveis pelo desenvolvimento da intoxicação estafilocócica (Hennekinne *et al.*, 2012). A transmissão pode ocorrer através do consumo de produtos prontos para consumo, como leite, queijo e carne enlatada (Mourenza *et al.*, 2021). Embora o processo de pasteurização elimine os estafilococos, muitas vezes não inativa as exotoxinas, que permanecem ativas mesmo após o processamento dos alimentos (Ewida *et al.*, 2020). Além disso, a contaminação pode ocorrer por meio da manipulação de alimentos por indivíduos infectados com *S. aureus* (Castro *et al.*, 2016; Suzuki *et al.*, 2020).

Um dos desafios das infecções por *Staphylococcus aureus* é sua resistência crescente a antibióticos (WHO, 2017; WHO, 2024). Atualmente, a OMS classifica o MRSA (*S. aureus* resistente à meticilina) como uma bactéria de alta prioridade para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (WHO, 2024). No mesmo grupo estão *Salmonella typhimurium* (resistente a fluoroquinolona), *Enterococcus faecium* (resistente a vancomicina) e, no grupo crítico, *Escherichia coli* quando apresenta resistência a carbapenêmicos ou cefalosporinas de terceira geração (WHO, 2024). Essas classificações reforçam a importância de estudos que avaliem alternativas terapêuticas e possíveis sinergias frente a essas cepas multirresistentes.

A presença dessas bactérias patogênicas na microbiota intestinal, associada à resistência aos antimicrobianos, pode agravar quadros de disbiose, favorecendo a seleção de genes de resistência entre patobiontes e tornando-os fenotipicamente patogênicos (Derrien *et al.*, 2017). Além disso, a presença de bactérias patogênicas na microbiota intestinal pode induzir um desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), desencadeando estresse oxidativo. Esse aumento de ROS pode danificar células e tecidos do trato gastrointestinal, contribuindo para inflamações e doenças intestinais (Derrien *et al.*, 2017; Riaz *et al.*, 2021). Portanto, a disbiose intestinal está diretamente ligada ao aumento do estresse oxidativo, uma vez que a simbiose entre hospedeiro e microbiota regula os níveis de ROS no intestino (Hervet- Hernández e Goñi, 2011).

Atividade antioxidante na microbiota intestinal

Nesse contexto, a atividade antioxidante pode neutralizar os radicais livres reduzindo o estresse oxidativo, auxiliando na preservação do epitélio intestinal e favorecendo o crescimento de bactérias benéficas e diminuição das patogênicas (Riaz *et al.*, 2021). Como exemplo, os extratos das microalgas *Spirulina* e *P. tricornutum* além de apresentarem potencial antioxidantes, modular positivamente a microbiota intestinal, promovendo o crescimento de bactérias benéficas, de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e inibem o crescimento de patógenos,

como *Listeria innocua*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Zhou *et al.*, 2022). Da mesma forma, os extratos de microalgas *H. musciformis* e *P. perforata* apresentam potencial antioxidante e ação inibitória sobre *Streptococcus B* e *Candida albicans* (Hmani *et al.*, 2021). Além disso, o probiótico *Lactobacillus plantarum*, combinado com extrato vegetal de *Macleaya cordata*, protege a barreira intestinal, reduz a produção de espécies reativas de oxigênio e estimula enzimas antioxidantes, fortalecendo a defesa do hospedeiro (Chen *et al.*, 2020).

Assim, a regulação indireta da microbiota por compostos antioxidantes naturais contribui para o equilíbrio intestinal e a redução do estresse oxidativo (Shandilya *et al.*, 2022). Dessa forma, os antimicrobianos e antioxidantes de origem natural são uma alternativa para descoberta de novos agentes terapêuticos devido à diversidade química e molecular em comparação a outras matérias primas (Savio *et al.*, 2021; Coulombier *et al.*, 2021). Assim, a exploração de microalgas como fonte de antioxidantes naturais não só beneficia a saúde intestinal, mas desenvolve estratégias alinhadas à sustentabilidade e benefícios terapêuticos (Shandilya *et al.*, 2022).

Biотecnologia de produtos naturais

Os produtos naturais possuem uma ampla diversidade de propriedades farmacêuticas, podendo atuar como agentes anticonvulsivantes, analgésicos, anti-inflamatórios, antimicrobianos, imunomoduladores e antioxidantes (Savio *et al.*, 2021). O uso de produtos naturais com fins terapêuticos vem desde a antiguidade, sendo registrado entre os egípcios por volta de 2900 a.C. (Dias *et al.*, 2012), como exemplo a Salicina, extraída do *Salix alba*, que levou ao desenvolvimento do ácido acetilsalicílico (Aspirina) em 1899, e a morfina, isolada da *Papaver somniferum* em 1826 (Dias *et al.*, 2012). Já na área dos antimicrobianos, temos a Penicilina, descoberta em 1928 a partir do fungo *Penicillium notatum*, revolucionou o tratamento de infecções bacterianas (Nicolaou e Montagnon, 2008). A Estreptomicina, isolada da bactéria *Streptomyces griseus* em 1943, fundamental no combate à tuberculose (Schatz *et al.*, 1944). E a eritromicina, extraída da bactéria *Saccharopolyspora erythraea*, tornou-se um importante antibiótico contra infecções respiratórias e de pele (Roberts, 2014). Esses exemplos reforçam a relevância dos produtos naturais na descoberta de novos fármacos e seu potencial para o desenvolvimento de novas terapias.

Com o avanço da ciência, novas fontes de produtos naturais vêm sendo exploradas, especialmente na biotecnologia azul, que se dedica ao estudo dos recursos marinhos (Savio *et al.*, 2021). O interesse nesse campo se deve à imensa biodiversidade dos ambientes aquáticos e à presença de metabólitos secundários com diversas atividades bioativas, como propriedades anti-inflamatórias (Avila-Roman *et al.*, 2021), antimicrobianas (Stirk e Staden, 2022)

antioxidantes (Coulombier *et al.*, 2021), imunomodulador (Casas-Arrojo *et al.*, 2021), propriedades analgésicas (Trabelsi *et al.*, 2016) e como corante natural (Garcia *et al.*, 2021).

Microalgas como fonte de produtos naturais

Entre os organismos marinhos com grande potencial biotecnológico, as microalgas vêm ganhando destaque devido à sua diversidade taxonômica e à capacidade de produzir metabólitos secundários de valor biotecnológico, como ácidos graxos poli-insaturados, proteínas, pigmentos (β -caroteno, astaxantina, fucoxantina e luteína) e polissacarídeos (Savio *et al.*, 2021; Bayu *et al.*, 2023). Além disso, as algas, como organismos fotossintetizantes, desempenham um papel fundamental nos ecossistemas aquáticos, formando a base da cadeia trófica (Tundisi e Tundisi, 2017). Por meio da fotossíntese, converte energia solar em matéria orgânica de forma mais eficiente do que as plantas terrestres e apresentam maior eficiência na produção de compostos orgânicos em comparação às macroalgas (Guihéneuf e Stengel, 2015). São responsáveis por cerca de 45% da produção primária global, influenciando diretamente os ciclos biogeoquímicos (Field *et al.*, 1998). Além disso, podem se apresentar na forma uni ou pluricelular, micro ou macroscópicas, apresentam diferentes morfologias e ciclos de vidas (Barsanti e Gualtieri, 2014).

As microalgas, em particular, apresentam alta plasticidade metabólica, o que lhes permite adaptar-se a condições ambientais extremas, ativando ou desativando vias metabólicas específicas para a síntese de compostos bioativos (Savio *et al.*, 2021). Outra vantagem é a possibilidade de cultivo em fotobiorreatores, onde os parâmetros físicos e químicos do meio podem ser ajustados para otimizar a produção de metabólitos bioativos (Bayu *et al.*, 2023). Esse potencial tem impulsionado o interesse na bioprospecção da biomassa algal para o desenvolvimento de insumos voltados à saúde humana e a indústria (Liberti *et al.*, 2022).

Porphyridium purpureum

Nesse contexto, as algas vermelhas (Rhodophyta) despertam interesse devido à diversidade de metabólitos que produzem, como exopolissacarídeos sulfatados, pigmentos (clorofila e carotenoides), ficobiliproteínas (aloficocianina e ficoeritrina) e ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) (Casas-Arrojo *et al.*, 2021). Essas características fazem as algas vermelhas serem uma das principais fontes de compostos bioativos com potencial aplicação nas indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia (Aziz *et al.*, 2020).

Entre as microalgas vermelhas, o gênero *Porphyridium sp.* tem ganhado destaque comercial devido às suas propriedades biológicas de interesse para a saúde (Bayu *et al.*, 2023; Nguyen *et al.*, 2024). Esse gênero é composto por quatro espécies: *P. purpureum* (também registrado como *P. cruentum* e *P. marinum*), *P. aerugineum*, *P. sordidum* e *P. wittrocki* (Li *et*

al., 2019), sendo *P. purpureum* a mais estudada e amplamente encontrada em ecossistemas aquáticos marinhos e continentais (Li *et al.*, 2019).

A microalga *Porphyridium purpureum* é unicelular, de formato esférico, com diâmetro entre 8 e 15 µm (Adda *et al.*, 1986), e se destaca por sua coloração avermelhada e pela presença de mucilagem rica em exopolissacarídeos, o que permite a formação de colônias e o que as destaca para o desenvolvimento de novos insumos (You e Barnett, 2004). Além disso, possui alta tolerância à salinidade, um ciclo de produção relativamente curto e elevado biovolume, o que favorece seu rendimento por unidade de cultivo (Bayu *et al.*, 2023). Além disso, *Porphyridium sp.* é capaz de se adaptar a variações ambientais, regulando a produção de seus metabólitos secundários (Nguyen *et al.*, 2024), sendo que os principais fatores que influenciam seu crescimento são a disponibilidade de nitrogênio e fósforo, salinidade, temperatura, irradiância e pH (Li *et al.*, 2019).

Produção de metabólitos secundários de *Porphyridium purpureum*

Dessa forma, devido a necessidade de otimizar a produção de exopolissacarídeos, *Porphyridium spp.* produz predominantemente xilose e galactose, seguidas por glicose e sulfato (Gaignard *et al.*, 2019). Além disso, sua composição pode incluir ácidos urônicos, piruvatos, ramnose, arabinose, ácido galacturônico, manose, fucose e grupos acila de carboidratos ou carboxílicos de aminoácidos (Raposo *et al.*, 2015).

E por causa dessas propriedades de metilação e sulfatação os exopolissacarídeos sulfatados de *Porphyridium sp.* que os tornam promissores para aplicações em alimentos, cosméticos e medicina (Nguyen *et al.*, 2024). Dentre essas características algumas aplicações biológicas podem ser utilizadas como exemplo, a carga aniônica dos polissacarídeos, conferida pela galactose, xilose e grupos sulfato, permite a interação com íons metálicos, tornando-os potenciais agentes para biorremediação (Kumar *et al.*, 2018). Além disso, grupos acetil ligados a ésteres, frações peptídicas, fucose e ramnose conferem propriedades emulsificantes (Costa *et al.*, 2021).

A atividade antimicrobiana e antioxidante dos exopolissacarídeos também tem sido explorada. Netanel *et al.* (2016) demonstraram que os exopolissacarídeos de *Porphyridium spp.* interagem com o zinco, apresentando uma taxa de inibição de 72% contra *Escherichia coli* e uma redução de 35% contra *Bacillus subtilis*. Além disso, esses compostos demonstraram atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *Salmonella sp.* (Gargouch *et al.*, 2021), bem como contra *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica Typhimurium*, devido à presença de ficobiliproteínas (Najdenski *et al.*, 2013).

Os polissacarídeos sulfatados também exibiram atividade contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (Netanel *et al.*, 2020). Além das propriedades antimicrobianas e

antioxidantes, *P. purpureum* tem demonstrado efeitos benéficos na pele e em organismos aquáticos, como *Artemia salina*, devido à presença de polissacarídeos e carotenoides (Agustini e Kusmiati, 2015; Rossi e Machado, 2022). Já Sun *et al.* (2009) observaram que a propriedade antioxidante dos polissacarídeos pode estar inversamente relacionada ao seu peso molecular, já que o fragmento de 6,5 kDa apresenta efeito inibitório maior sobre o dano oxidativo dos que fragmentos de EPS de 256 e 60,6 kDa. Além disso, Tannin-Spitz *et al.* (2005) observaram que a atividade antioxidante dos exopolissacarídeos estava relacionada ao seu conteúdo de sulfato (4,5%) e/ou à presença de glicoproteína. Esses estudos reforçam o potencial biotecnológico dessa microalga para aplicações na saúde humana e ambiental.

Desafios para produção de produtos naturais

Por fim, compreender os fatores bióticos e abióticos que modulam a biossíntese de metabólitos secundários em microalgas é essencial para maximizar seu potencial biotecnológico (Savio *et al.*, 2021; Nguyen *et al.*, 2024). A influência da luminosidade é um fator crucial para o crescimento celular, mas também impacta diretamente a produção de compostos bioativos, como os exopolissacarídeos que apresentem aplicações biológicas (Medina-Cabrera *et al.*, 2020).

No entanto, apesar do crescente interesse científico e comercial, ainda há desafios na padronização e otimização de técnicas de cultivo que garantam um alto rendimento desses compostos de forma sustentável e economicamente viável (Lu *et al.*, 2020; Bayu *et al.*, 2023), além de que muitos estudos avaliam separadamente as propriedades de *Porphyridium purpureum*, ou seja, investigam separadamente as condições de cultivo e as aplicações biológicas. Dessa forma, é fundamental compreender como as modificações nas condições de cultivo podem impulsionar as aplicações biológicas de *Porphyridium purpureum*, impulsionando novas estratégias no desenvolvimento de agentes antimicrobianos e antioxidantes.

Assim, destaca-se a importância de aprofundar o conhecimento sobre as atividades antimicrobianas e antioxidantes de *Porphyridium purpureum* frente a bactérias patobiontes e patogênicas associadas à microbiota intestinal. Para esse fim, esta dissertação foi estruturada em dois manuscritos que contribuem com evidências complementares sobre o potencial biológico dessa microalga.

No manuscrito 1, intitulado “Explorando os exopolissacarídeos da microalga vermelha *Porphyridium* sp.: influência de fatores de cultivo e suas aplicações biológicas” é abordada uma revisão sobre como as condições de cultivo podem influenciar as propriedades biológicas

da microalga *Porphyridium* sp., sendo submetido o artigo de revisão na língua inglesa ao periódico: *Algal Research* (Fator de impacto: 4,6)

O manuscrito 2, “Atividade antioxidante e sinergismo dos extratos de *Porphyridium purpureum* frente a bactéria patogênicas da microbiota intestinal”, apresenta ensaios antimicrobianos realizados frente a bactérias da microbiota intestinal de interesse clínico e avaliação da atividade antioxidante. Além disso, considerando a produção de variabilidade metabólitos durante o cultivo de diferentes espécies de *Porphyridium* sp., conforme relatado no manuscrito 1, foi realizada a caracterização química dos extratos através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Dentre os compostos identificados, destacam-se os ácidos graxos, cuja presença está associada às atividades antimicrobiana e antioxidante observadas.

OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos de *Porphyridium purpureum* e seu efeito sobre bactérias da microbiota intestinal e patógenos de interesse clínico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma revisão sobre a produção de exopolissacarídeos (EPS) por *Porphyridium* sp. em diferentes condições de cultivo e sua relação com atividades antimicrobianas e antioxidantes;
- Produzir extratos de *P. purpureum* utilizando solventes de diferentes polaridades;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de *P. purpureum* e exopolissacarídeos por meio do método de microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), investigando seus efeitos sobre bactérias da microbiota intestinal e patógenos de interesse clínico;
- Avaliar o efeito combinado dos extratos de *P. purpureum* com antibióticos convencionais pelo método de *Checkerboard*, determinando o Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI) e analisando seu impacto sobre bactérias da microbiota intestinal e patógenos de interesse clínico;
- Determinar a atividade antioxidante dos extratos de *P. purpureum*;
- Analisar os grupos funcionais presentes nos exopolissacarídeos de *P. purpureum* por meio de Espectroscopia de Infravermelho (FTIR);
- Caracterizar os compostos bioativos presentes nos extratos de *P. purpureum* por meio de Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos de *P. purpureum* frente a linhagem celular *Vero*.

REFERÊNCIAS

- Agustini, N. W. S., & Kusmiati, K. (2015). *Potency of Endo-Exopolysaccharide From Porphyridium Cruentum (S.F.Gray) Nägeli as Antioxidant (DPPH) and Biological Toxicity (BSLT). KnE Life Sciences*. 147–156.
- Ahlawat, S., Kumar, P., Mohan, H., Goyal, S., & Sharma, K. K. (2021). Inflammatory bowel disease: tri-directional relationship between microbiota, immune system and intestinal epithelium. *Critical Reviews in Microbiology*, 47(2), 254–273.
- Alm, R. A., & Lahiri, S. D. (2020). *Narrow-Spectrum Antibacterial Agents-Benefits and Challenges. Antibiotics*. 9.
- Amado, L. L., Garcia, M. L., Ramos, P. B., Freitas, R. F., Zafalon, B., Ferreira, J. L. R., Monserrat, J. M. (2009). A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *The Science of the Total Environment*, 407(6), 2115–2123.
- Aminov, R. (2017). History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochemical Pharmacology*, 133, 4–19.
- Armstrong, G. L., Conn, L. A., & Pinner, R. W. (1999). Trends in infectious disease mortality in the United States during the 20th century. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 281(1), 61–66.
- Aroutcheva, A., Simoes, J. A., Shott, S., & Faro, S. (2001). The Inhibitory Effect of Clindamycin on *Lactobacillus in vitro*. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 9(4), 239–244.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174–180.
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., ... Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, 11, 1645–1658.
- Avila-Roman, J., Garda-Gil, S., Rodriguez-Luna, A., Motilva, V., & Talero, E. (2021). Anti-Inflammatory and Anticancer Effects of Microalgal Carotenoids. *Mar. Drugs*, 19.
- Aziz, E., Batool, R., Khan, M. U., Rauf, A., Akhtar, W., Heydari, M., ... Shariati, M. A. (2020). An overview on red algae bioactive compounds and their pharmaceutical applications. *Journal of Complementary & Integrative Medicine*, 17(4).
- Baldry, P. (1976). *The Battle Against Bacteria: A Fresh Look*. New York, NY: Cambridge University Press.

- Bayu, A., Noerdjito, D. R., Rahmawati, S. I., Putra, M. Y., & Karnjanakom, S. (2023). Biological and technical aspects on valorization of red microalgae genera *Porphyridium*. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(14), 12395–12411.
- Becattini, S., Taur, Y., & Pamer, E. G. (2016). Antibiotic-induced changes in the intestinal Microbiota and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 22(6), 458–478.
- Bellio, P., Fagnani, L., Nazzicone, L., & Celenza, G. (2021). New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. *MethodsX*, 8(101543).
- Bhan, M. K., Bahl, R., & Bhatnagar, S. (2005). Typhoid and paratyphoid fever. *Lancet*, 366(9487), 749–762.
- Borges, L., Caldas, S., Montes D'Oca, M. G., & Abreu, P. C. (2016). Effect of harvesting processes on the lipid yield and fatty acid profile of the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. *Aquaculture reports*, 4, 164–168.
- Buret, A. G., Motta, J.-P., Allain, T., Ferraz, J., & Wallace, J. L. (2019). Pathobiont release from dysbiotic gut microbiota biofilms in intestinal inflammatory diseases: a role for iron? *Journal of Biomedical Science*, 26(1).
- Buttó, L. F., Schaubeck, M., & Haller, D. (2015). Mechanisms of microbe-host interaction in crohn's disease: Dysbiosis vs. Pathobiont selection. *Frontiers in Immunology*, 6, 555.
- Caprara, C. da S. C., Mathias, T. K., Santos, M. de F. C., D'Oca, M. G. M., D'Oca, C. D. R. M., Roselet, F., ... Ramos, D. F. (2023). Application of ¹H HR-MAS NMR-based metabolite fingerprinting of marine microalgae. *Metabolites*, 13(2), 202.
- Casadevall, A. (2017). The pathogenic potential of a microbe. *mSphere*, 2(1).
- Casas-Arrojo, V., Decara, J., de Los Ángeles Arrojo-Agudo, M., Pérez-Manríquez, C., & Abdala-Díaz, R. T. (2021). Immunomodulatory, antioxidant activity and cytotoxic effect of sulfated polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. (S.f.gray) nägeli. *Biomolecules*, 11(4), 488.
- Castro, A., Santos, C., Meireles, H., Silva, J., & Teixeira, P. (2016). Food handlers as potential sources of dissemination of virulent strains of *Staphylococcus aureus* in the community. *Journal of Infection and Public Health*, 9(2), 153–160.
- Chain, E., Florey, H. W., Gardner, A. D., Heatley, N. G., Jennings, M. A., Orr-Ewing, J., & Sanders, A. G. (1940). Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet*, 236(6104), 226–228.
- Chandra, H., Sharma, K. K., Tuovinen, O. H., Sun, X., & Shukla, P. (2021). Pathobionts: mechanisms of survival, expansion, and interaction with host with a focus on *Clostridioides difficile*. *Gut Microbes*, 13(1), 1979882.

- Chen, K., Liu, Y., Cheng, Y., Yan, Q., Zhou, C., He, Z., ... Tan, Z. (2020). Supplementation of *Lactobacillus plantarum* or *Macleaya cordata* extract alleviates oxidative damage induced by weaning in the lower gut of young goats. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 10(4), 548.
- Chou, S., Zhang, S., Guo, H., Chang, Y.-F., Zhao, W., & Mou, X. (2022). Targeted antimicrobial agents as potential tools for modulating the gut microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 13, 879207.
- Chow, J., Tang, H., & Mazmanian, S. K. (2011). Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease. *Current Opinion in Immunology*, 23(4), 473–480.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
- Collignon, P. J., & McEwen, S. A. (2019). One Health-its importance in helping to better control antimicrobial resistance. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(1).
- Collignon, P., & Beggs, J. J. (2019). Socioeconomic enablers for contagion: Factors impelling the antimicrobial resistance epidemic. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 8(3), 86.
- Collignon, P., Beggs, J. J., Walsh, T. R., Gandra, S., & Laxminarayan, R. (2018). Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. *The Lancet. Planetary Health*, 2(9), e398–e405.
- Costa, J. A. V., Lucas, B. F., Alvarenga, A. G. P., Moreira, J. B., & de Moraes, M. G. (2021). Microalgae polysaccharides: An overview of production, characterization, and potential applications. *Polysaccharides*, 2(4), 759–772.
- Coulombier, N., Jauffrais, T., & Lebouvier, N. (2021). Antioxidant Compounds from Microalgae: A Review. *Mar. Drugs*, 19.
- Coulombier, N., Jauffrais, T., & Lebouvier, N. (2021). Antioxidant compounds from microalgae: A review. *Marine Drugs*, 19(10), 549.
- Cristofoli, N. L., Lima, A. R., Rosa da Costa, A. M., Evtugun, D., Silva, C., Varela, J., & Vieira, M. C. (2023). Structural characterization of exopolysaccharides obtained from *Porphyridium cruentum* exhausted culture medium. *Food and Bioproducts Processing*, 138, 162–171.
- Cuypers, W. L., Jacobs, J., Wong, V., Klemm, E. J., Deborggraeve, S., & Van Puyvelde, S. (2018). Fluoroquinolone resistance in *Salmonella*: insights by whole-genome sequencing. *Microbial Genomics*, 4(7).
- Raposo, M. F., de Moraes, A. M. M. B., & de Moraes, R. M. S. C. (2015). Bioactivity and Applications of Polysaccharides from Marine Microalgae. Em *Polysaccharides* (p. 1683–1727). Cham: Springer International Publishing.

- Derrien, M., & Veiga, P. (2017). Rethinking diet to aid human-microbe symbiosis. *Trends in Microbiology*, 25(2), 100–112.
- Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, 2(2), 303–336.
- D'OCA, M. G. M. *et al.* Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, n. 4, p. 1533–1538, abr. 2011.
- Elnekave, E., Hong, S. L., Lim, S., Johnson, T. J., Perez, A., & Alvarez, J. (2020). Comparing serotyping with whole-genome sequencing for subtyping of non-typhoidal *Salmonella enterica*: a large-scale analysis of 37 serotypes with a public health impact in the USA. *Microbial Genomics*, 6(9).
- Ewida, R. M., & Al-Hosary, A. A. T. (2020). Prevalence of enterotoxins and other virulence genes of *Staphylococcus aureus* caused subclinical mastitis in dairy cows. *Veterinary World*, 13(6), 1193–1198.
- Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T., & Falkowski, P. (1998). Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5374), 237–240.
- Fouhy, F., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C., & Cotter, P. D. (2012). Composition of the early intestinal microbiota: knowledge, knowledge gaps and the use of high-throughput sequencing to address these gaps: Knowledge, knowledge gaps and the use of high-throughput sequencing to address these gaps. *Gut Microbes*, 3(3), 203–220.
- Gaignard, C., Gargouch, N., Dubessay, P., Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., ... Michaud, P. (2019). New horizons in culture and valorization of red microalgae. *Biotechnology Advances*, 37(1), 193–222.
- García, A. B., Longo, E., Murillo, M. C., & Bermejo, R. (2021). Using a B-phycoerythrin extract as a natural colorant: Application in milk-based products. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(2), 297.
- Gargouch, N., Elleuch, F., Karkouch, I., Tabbene, O., Pichon, C., Gardarin, C., ... Laroche, C. (2021). Potential of exopolysaccharide from *Porphyridium marinum* to contend with bacterial proliferation, biofilm formation, and breast cancer. *Marine Drugs*, 19(2), 66.
- Gaynes, R. (2017). The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use. *Emerging infectious diseases*, 23(5), 849–853.
- Gigante, V., Alm, R. A., Melchiorri, D., Rocke, T., Arias, C. A., Czaplewski, L., Cameron, A. M. (2024). Multi-year analysis of the global preclinical antibacterial pipeline: trends and gaps. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 68(8), e0053524.

- Guihéneuf, F., & Stengel, D. B. (2015). Towards the biorefinery concept: Interaction of light, temperature and nitrogen for optimizing the co-production of high-value compounds in *Porphyridium purpureum*. *Algal Research*, 10, 152–163.
- Guillard, R. R. L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Em *Culture of Marine Invertebrate Animals* (p. 29–60). Boston, MA: Springer US.
- Guimarães, D. O., Momesso, L. da S., & Pupo, M. T. (2010). Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quimica nova*, 33(3), 667–679.
- Halicki, P. C. B. (2020). Antibiofilm Potential of Arenecarbaldehyde 2- Pyridinyldrazone Derivatives Against *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Drug Resistance*, 26(12), 1429–1436.
- Hennekinne, J.-A., De Buyser, M.-L., & Dragacci, S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 815–836.
- Hervet-Hernández, D., & Goñi, I. (2011). Dietary polyphenols and human gut Microbiota: A review. *Food Reviews International*, 27(2), 154–169.
- Hmani, I., Ktari, L., Ismail, A., M'dallel, C., & El Bour, M. (2021). Assessment of the antioxidant and antibacterial properties of red algae (Rhodophyta) from the north coast of Tunisia. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration*, 6(1).
- Jochum, L., & Stecher, B. (2020). Label or concept - what is a pathobiont? *Trends in Microbiology*, 28(10), 789–792.
- Iskandar, K., Molinier, L., Hallit, S., Sartelli, M., Hardcastle, T. C., Haque, M., ... Roques, C. (2021). Surveillance of antimicrobial resistance in low- and middle-income countries: a scattered picture. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 10(1), 63.
- Khan, M., & Shamim, S. (2022). Understanding the mechanism of antimicrobial resistance and pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Microorganisms*, 10(10), 2006.
- Kumar, D., Kastanek, P., & Adhikary, S. P. (2018). Exopolysaccharides from Cyanobacteria and Microalgae and Their Commercial Application. *Current science*, 115(2), 234.
- Larsson, D. G. J., & Flach, C.-F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews. Microbiology*, 20(5), 257–269.
- Li, Q. (2022). Mechanisms for the invasion and dissemination of *Salmonella*. *Journal Canadien Des Maladies Infectieuses et de La Microbiologie Medicale [The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology]*, 2022, 1–12.
- Li, S., Ji, L., Shi, Q., Wu, H., & Fan, J. (2019). Advances in the production of bioactive substances from marine unicellular microalgae *Porphyridium* spp. *Bioresource Technology*, 292(122048), 122048.

- Li, S., Li, X., Chang, H., Zhong, N., Ren, N., & Ho, S.-H. (2023). Comprehensive insights into antibiotic resistance gene migration in microalgal-bacterial consortia: Mechanisms, factors, and perspectives. *The Science of the Total Environment*, 901(166029), 166029.
- Liberman, G. N., Ochbaum, G., Mejubovsky-Mikhelis, R., & Bitton, S. (2020). Physico-chemical characteristics of the sulfated polysaccharides of the red microalgae *Dixoniella grisea* and *Porphyridium aerugineum*. *Int J Biol Macromol*, 145, 1171–1179.
- Liberti, D., Imbimbo, P., Giustino, E., D’Elia, L., Ferraro, G., Casillo, A., ... Monti, D. M. (2023). Inside out *Porphyridium cruentum*: Beyond the Conventional Biorefinery Concept. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 11(1), 381–389.
- Lin, L., Du, Y., Song, J., Wang, W., & Yang, C. (2021). Imaging commensal Microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Accounts of Chemical Research*, 54(9), 2076–2087.
- Liu, W., Chen, G., Dou, K., Yi, B., Wang, D., Zhou, Q., & Sun, Y. (2023). Eugenol eliminates carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* via reactive oxygen species mechanism. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1090787.
- Lobanovska, M., & Pilla, G. (2017). Penicillin’s Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *Yale J Biol Med*. *Yale J Biol Med*, 90(1), 135–145.
- Lu, X., Nan, F., Feng, J., Lv, J., Liu, Q., Liu, X., & Xie, S. (2020). Effects of different environmental factors on the growth and bioactive substance accumulation of *Porphyridium purpureum*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(7), 2221.
- Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial antibiotic resistance: The most critical pathogens. *Pathogens*, 10(10), 1310.
- Mazmanian, S. K., Round, J. L., & Kasper, D. L. (2008). A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*, 453(7195), 620–625.
- McGuinness, W. A., Malachowa, N., & DeLeo, F. R. (2017). Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 90(2), 269–281.
- Medina-Cabrera, E. V., Rühmann, B., Schmid, J., & Sieber, V. (2020). Optimization of growth and EPS production in two *Porphyridium* strains. *Bioresource Technology Reports*, 11(100486), 100486.
- Metcalf, L. D., & Schmitz, A. A. (1961). The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*, 33(3), 363–364.
- Mourenza, Á., Gil, J. A., Mateos, L. M., & Letek, M. (2021). Novel treatments and preventative strategies against food-poisoning caused by staphylococcal species. *Pathogens*, 10(2), 91.
- Mouton, J. W., & Vinks, A. A. (2005). Pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling of antibacterials in vitro and in vivo using bacterial growth and kill kinetics: the minimum

inhibitory concentration versus stationary concentration: The minimum inhibitory concentration versus stationary concentration. *Clinical Pharmacokinetics*, 44(2), 201–210.

Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*, 399(10325), 629–655.

Najdenski, H. M., Gigova, L. G., Iliev, I. I., Pilarski, P. S., Lukavský, J., Tsvetkova, I. V., Kussovski, V. K. (2013). Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(7), 1533–1540.

Netanel Liberman, G., Ochbau, M., Malis Arad, S., & Bitton, R. (2016). The sulfated polysaccharide from a marine red microalga as a platform for the incorporation of zinc ions. *Carbohydr. Polym.*, 152, 658–664.

Nguyen, A. Q., Mohammadi, M., Alian, M., Muralitharan, G., Chauhan, V. S., & Balan, V. (2024). Exploring the versatility of Porphyridium sp.: A comprehensive review of cultivation, bio-product extraction, purification, and characterization techniques. *Biotechnology Advances*, 77(108471), 108471.

Nicolaou, K. C., & Montagnon, T. (2008). Molecules that Changed the World. *Molecules that Changed the World*.

Pancu, D. F., Scurtu, A., Macasoi, I. G., Marti, D., Mioc, M., Soica, C., Dehelean, C. (2021). Antibiotics: Conventional therapy and natural compounds with antibacterial activity-A pharmaco-toxicological screening. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(4), 401.

Pilmis, B., Monnier, L., & Zahar, A. (2020). Gut Microbiota, Antibiotic Therapy and Antimicrobial Resistance: A Narrative Review. *Microorganisms*, 8.

Pilmis, Benoit, Le Monnier, A., & Zahar, J.-R. (2020). Gut Microbiota, antibiotic therapy and antimicrobial resistance: A narrative review. *Microorganisms*, 8(2), 269.

Projan, S. J., & Shlaes, D. M. (2004). Antibacterial drug discovery: is it all downhill from here? *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10, 18–22.

Quinn, R. (2013). Rethinking antibiotic research and development: World War II and the penicillin collaborative. *American Journal of Public Health*, 103(3), 426–434.

Riaz Rajoka, M. S., Thirumdas, R., Mehwish, H. M., Umair, M., Khurshid, M., Hayat, H. F., Barba, F. J. (2021). Role of food antioxidants in modulating gut microbial communities: Novel understandings in intestinal oxidative stress damage and their impact on host health. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(10), 1563.

Ribeiro da Cunha, B., Fonseca, L. P., & Calado, C. R. C. (2019). Antibiotic discovery: Where have we come from, where do we go? *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 8(2), 45.

Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiaro, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the healthy gut Microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, 7(1), 14.

Roberts, D. J. (2014). Erythromycin. Em *Encyclopedia of Toxicology* (p. 453–458). Elsevier.

Rossi, A. J., & Machado, K. E. (2022). The potential use of the microalgae *Porphyridium cruentum* in the prevention of skin aging. ID on Line. *Revista de Psicologia*, 16(61), 347–360.

Savio, S., Congestri, R., & Rodolfo, C. (2021). Are we out of the infancy of microalgae-based drug discovery? *Algal Research*, 54(102173), 102173.

Schatz, A., Bugle, E., & Waksman, S. A. (1944). Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 55(1), 66–69.

Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biology*, 14(8), e1002533.

Shandilya, S., Kumar, S., Kumar Jha, N., Kumar Kesari, K., & Ruokolainen, J. (2022). Interplay of gut microbiota and oxidative stress: Perspective on neurodegeneration and neuroprotection. *Journal of Advanced Research*, 38, 223–244.

Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., & Petrovick, P. R. ([s.d.]). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis.

Sitohy, M., Enan, G., Abdel-Shafi, S., El-Wafa, N. A., El-Gazzar, N., Osman, A., & Sitohy, B. (2024). Mapping pathogenic bacteria resistance against common antibiotics and their potential susceptibility to methylated white kidney bean protein. *BMC Microbiology*, 24(1), 49.

Soni, J., Sinha, S., & Pandey, R. (2024). Understanding bacterial pathogenicity: a closer look at the journey of harmful microbes. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1370818.

Stapleton, P. D., & Taylor, P. W. (2002). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Science Progress*, 85(Pt 1), 57–72.

Stirk, W. A. ([s.d.]). Bioprospecting for Bioactive Compounds in Microalgae: Antimicrobial Compounds. *J. Bioprospecting for Bioactive Compounds in Microalgae: Antimicrobial Compounds. Biotechnol. Adv*, 2022.

Sun, D., Jeannot, K., Xiao, Y., & Knapp, C. W. (2019). Editorial: Horizontal gene transfer mediated bacterial antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1933.

Sun, L., Wang, C., Shi, Q., & Ma, C. (2009). Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities. *International journal of biological macromolecules*, 45(1), 42–47.

Suzuki, Y., Ono, H. K., Shimojima, Y., Kubota, H., Kato, R., Kakuda, T., Sadamasu, K. (2020). A novel staphylococcal enterotoxin SE02 involved in a staphylococcal food poisoning outbreak that occurred in Tokyo in 2004. *Food Microbiology*, 92(103588), 103588.

Tacconelli, E. (2017). WHO Pathogens Priority List Working Group. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*, 18(3), 318–327.

Tannin-Spitz, T., Bergman, M., van-Moppes, D., Grossman, S., & Arad, S. (malis). (2005). Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *Journal of Applied Phycology*, 17(3), 215–222.

Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G., Jr. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603–661.

Trabelsi, L., Chaieb, O., Mnari, A., Abid-Essafi, S., & Aleya, L. (2016). Partial characterization and antioxidant and antiproliferative activities of the aqueous extracellular polysaccharides from the thermophilic microalgae *Graesiella* sp. *BMC Complement. Altern. Med.*

Tundisi, J. G., & Tundisi, T. M. (2017). *Limnology*. Londres, England: CRC Press.

Urban-Chmiel, R., Marek, A., Stępień-Pyśniak, D., Wieczorek, K., Dec, M., Nowaczek, A., & Osek, J. (2022). Antibiotic resistance in bacteria—A review. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(8), 1079.

Velazquez-Meza, M. E., Galarde-López, M., Carrillo-Quiróz, B., & Alpuche-Aranda, C. M. (2022). Antimicrobial resistance: One Health approach. *Veterinary World*, 15(3), 743–749.

WHO. World Health Organization. Antimicrobial Resistance:Global Report on Surveillance. 2014.

WHO Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2017.

WHO Ten threats to global health in 2019. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>

WHO. (2022). 2021 Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

WHO Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis. Geneva: World Health Organization; 2023.

WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization; 2024.

Wu, G., Liu, L., Qi, Y., Sun, Y., Yang, N., Xu, G., Li, X. (2015). Splenic gene expression profiling in White Leghorn layer inoculated with the *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Animal Genetics*, 46(6), 617–626.

Xu, M., Pokrovskii, M., Ding, Y., Yi, R., Au, C., Harrison, O. J., Littman, D. R. (2018). c-MAF-dependent regulatory T cells mediate immunological tolerance to a gut pathobiont. *Nature*, 554(7692), 373–377.

You, T., & Barnett, S. M. (2004). Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochemical Engineering Journal*, 19(3), 251–258.

Zhang, H., Jiang, F., Zhang, J., Wang, W., Li, L., & Yan, J. (2022). Modulatory effects of polysaccharides from plants, marine algae and edible mushrooms on gut microbiota and related health benefits: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 204, 169–192.

Zhou, J., Wang, M., Bäuerl, C., Cortés-Macías, E., Calvo-Lerma, J., Carmen Collado, M., & Barba, F. J. (2023). The impact of liquid-pressurized extracts of *Spirulina*, *Chlorella* and *Phaedactylum tricornutum* on in vitro antioxidant, antiinflammatory and bacterial growth effects and gut microbiota modulation. *Food Chemistry*, 401(134083), 134083.

MANUSCRITO 1

Explorando os exopolissacarídeos da microalga vermelha *Porphyridium* sp.: influência de fatores de cultivo e suas aplicações biológicas

Artigo de revisão submetido na língua inglesa ao periódico: Algal Research (Fator de impacto: 4,6)

As normas de submissão podem ser acessadas por meio do endereço:
<https://www.sciencedirect.com/journal/algal-research/publish/guide-for-authors>

Highlights

- Optimal cultivation conditions for *Porphyridium* sp. were identified as 21-28°C, green light (30-100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), pH 8.0-8.5, and controlled nitrogen/phosphorus limitation, with intermediate salinity (35‰)
- *P. purpureum* synthesizes methylated glucuronic acid, while *P. sordidum* produces sulfate-rich EPS. These structural differences directly impact bioactivity
- EPS show antimicrobial effects against *E. coli*, *B. subtilis* and *Salmonella enteritidis*, immunostimulatory effects enhancing shrimp (*Litopenaeus vannamei*) immunity against *Vibrio harveyi*, and antioxidants capacity linked to sulphate content and low molecular weight fractions
- EPS composition (xylose, galactose, glucose, glucuronic acid) varies significantly between strains and cultivation conditions
- While cosmetic applications advance, pharmaceutical uses lag due to limited industrial-scale studies and insufficient research connecting cultivation parameters to bioactivity

Exploring the exopolysaccharides of the red microalgae *Porphyridium* sp.: influence of cultivation parameters and their biological applications

Natália Popiorek dos Santos ^{a,c}, Bruno Galler Kubelka ^{a,b}, Débora Carvalho Rodrigues^c, Rodolfo Moreira Baptista^{a,b}, Daniela Fernandes Ramos ^{a,b,c*}

^a Pos-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina (FAMED), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rua General Osório S/N, Rio Grande, RS 96200-000, Brasil.

^b Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais Costeiros, Estação Marinha de Aquacultura, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rua do Hotel 02, Rio Grande, RS 96210-030, Brasil

^c Núcleo de Desenvolvimento de Novos Fármacos (NUDEFA), Faculdade de Medicina (FAMED), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rua General Osório S/N, Rio Grande, RS 96200-000, Brasil.

* Corresponding author: Center for New Drug Development - NUDEFA, Rua General Osório, s/nº, Campus Saúde, 2nd floor. Postal Code: 96.200-400.

E-mail address : daniferamos@gmail.com (Daniela Ramos).

Abstract

The optimization of exopolysaccharide production by the red microalgae *Porphyridium* sp. has aroused biotechnological interest due to its physicochemical properties, which allow applications in the pharmaceutical, cosmetic and food industries, standing out for its antioxidant and antimicrobial activities. Through a systematic review of literature from the last decade (2014–2024) in PubMed and Web of Science, we evaluated abiotic parameters influencing exopolysaccharide (EPS) synthesis in *Porphyridium* sp. The main environmental factors affecting EPS production include temperature, irradiance, salinity, pH, and nutrient availability. We identified optimal cultivation conditions for EPS like temperature (21–28°C), irradiance (30–100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), pH 8.0–8.5, and controlled nitrogen/phosphorus limitation. Salinity (35‰) maximizes sulfate content (14.7%), while strain-specific adaptations yield distinct EPS chemistries - *P. purpureum* produces methylated glucuronic acid dimers whereas *P. sordidum* generates highly sulfated polymers. These structural differences correlate with bioactive performance: antimicrobial (72.5% growth inhibition of *E. coli*, 35% against *B. subtilis*, and 19% reduction in *Salmonella enteritidis*), non-toxic immunostimulation in shrimp (*Litopenaeus vannamei*), enhancing innate immunity against *Vibrio harveyi*, and antioxidant effects linked to sulfate content and glycoproteins, with low-MW fragments (6.5 kDa) showing superior activity. However, industrial applications remain constrained by small-scale studies and insufficient data linking cultivation parameters to bioactivity. While cosmetic uses are commercially established, pharmaceutical potential requires deeper investigation of structure-function relationships. Future research should address pilot-scale production and standardized characterization protocols to fully exploit these biopolymers.

Keywords: Rhodophyta, algal biotechnology, polysaccharide, bioactive compounds, cultivation optimization.

1 Introduction

The biotechnological development of microalgae has aroused interest in the development of bioproducts such as pigments, polyunsaturated fatty acids and polysaccharides [1]. The biochemical composition of microalgae allows the production of biomass that can be applied in different sectors such as food supplements, feed, nutraceuticals, cosmetics, bioeffluent treatment and biorefinery [2;3]. The most studied and produced microalgae genera on an industrial scale are *Chlorella*, *Nannochloropsis*, *Isochrysis*, *Muriellopsis*, *Odontella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Rhodella* and *Porphyridium* [4].

The red microalgae genus *Porphyridium* (Rhodophyta) has attracted the attention of researchers since the late 1950 [5] due to its nutritional value and its ability to synthesize a variety of bioactive compounds, such as extracellular polysaccharides (EPS), phycobiliprotein pigments (PBPs), proteins, and long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) [6;7]. The morphology of genus *Porphyridium* is unicellular, spherical, and with a size ranging from 8 to 15 μm [8], and is composed of four species: *P. purpureum* (also recorded as *P. cruentum* and *P. marinum*), *P. aeruginum*, *P. sordidum*, and *P. wittrocki* [9], where the species *P. purpureum* is the most studied and widely found in aquatic ecosystems and moist soil [3;10]. It has high tolerance to salinity, a relatively short production cycle and high biovolume, which can result in high yield per unit [3]. Studies indicate that *Porphyridium* is capable of adapting to environmental changes by regulating the production of secondary metabolites, which can be exploited to increase the accumulation of bioactive substances [11;12]. The main environmental factors that affect the growth of microalgae include nitrogen and phosphorus concentration, salinity, temperature, light and pH [10] (Figure 1A). However, although there are several studies on the biomass production of *Porphyridium* spp. and its ability to synthesize biomolecules of interest, such as phycoerythrin (B-PE), polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and EPS, the available information is scattered, making it difficult to define optimized approaches to maximize the production of specific bioactive compounds [3;13] (Figure 1B).

Porphyridium derived polysaccharides can be categorized into two types: storage polysaccharides in the cytoplasm and those secreted into the medium, known as exopolysaccharides [14;15]. During the logarithmic growth phase of the microalgae, the layer is thinner, becoming thicker in the stationary phase. Over time, it dissolves into the medium, enriching and making the medium viscous at the end of cultivation [3]. EPS play a crucial role in *Porphyridium* cells, providing a mucilaginous layer that provides stability and protection against extreme environmental changes and microorganisms, such as bacteria, fungi and viruses [16;17]. In addition, they are essential for physiological functions, including tolerance to desiccation, osmotic stress and removal of toxic substances [18]. The predominant chemical structure of EPS in *Porphyridium* is composed mainly of heteropolysaccharides, formed by glucose and galactose linked by bonds [19]. These EPS have several applications in the pharmaceutical, cosmetic and food industries due to their rheological properties [10]. Unlike bacterial and fungal EPS, the exopolysaccharide from microalgae such as *Porphyridium* can present specific functional substituents, such as methyl (CH_3 -) and sulfate (SO_4^-)

²) groups [20]. Their applications include in cosmetics [21;22], anticoagulants [23], as biolubricant [24], antioxidants [25] and antibacterials [26]. Due to their chemical composition and biological activity, *Porphyridium* exopolysaccharides are of great interest in biotechnology, offering numerous opportunities for innovation in different sectors of science and industry [27;28]. This review aims to elucidate the different modifications in the cultivation parameters to optimize the production of EPS in *Porphyridium*, present the composition of these exopolysaccharides and the possible biological applications.

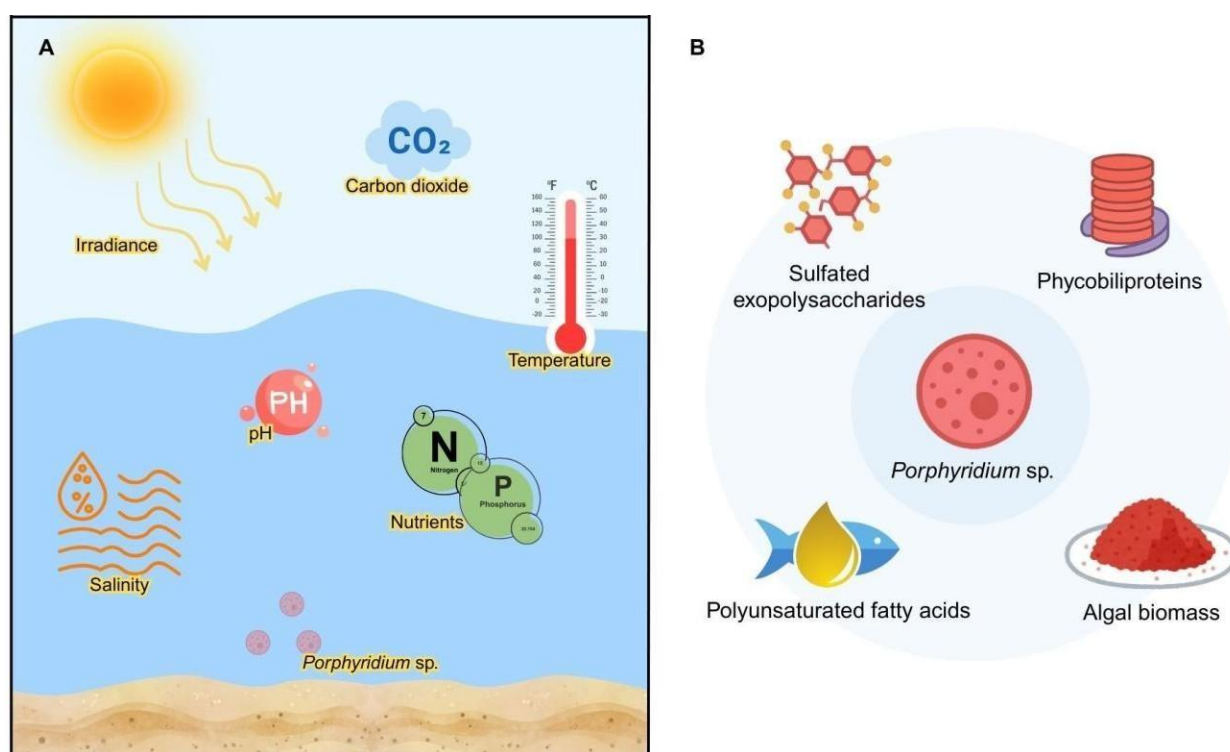


Figure 1. Abiotic factors and bioproducts of *Porphyridium* sp. (A) Critical environmental parameters for growth and EPS synthesis: irradiance, pH, temperature, nutrients (N, P) and salinity, with optimal ranges indicated. (B) Bioproducts generated, including pigments, polyunsaturated fatty acids (PUFA) and exopolysaccharides (EPS), whose composition is influenced by culture conditions.

2 Material and methods

A systematic review was carried out using the Web of Science and PubMed databases, with the aim of analyzing the production of exopolysaccharides by *Porphyridium* sp. under different cultivation conditions and its relationship with biological activities. The search strategy employed the following descriptors: “porphyridium” AND “cultivation” AND “light” OR “salinity” OR “temperature” OR “CO₂” OR “nitrogen”.

The inclusion criteria adopted were: experimental studies published between 2014 and 2024, in English or Spanish, which investigated the production of exopolysaccharides by *Porphyridium* sp. in different cultivation parameters, such as temperature, salinity, pH, concentration of CO₂, nitrogen and phosphorus and irradiance.

As exclusion criteria, bibliographic or systematic review articles and studies that did not quantitatively evaluate the production of exopolysaccharides in *Porphyridium* sp. were eliminated. The article selection process occurred in three stages: (1) initial screening based on the analysis of titles and abstracts; (2) full reading of the pre-selected articles; and (3) final selection of studies that presented information on at least one cultivation parameter and its relationship with the production of exopolysaccharides.

Finally, the selected articles were organized and analyzed considering three main aspects: cultivation parameters evaluated for EPS production, chemical composition of the exopolysaccharides obtained under different conditions and potential biological applications of the EPS produced.

3 Results and discussion

The systematic search in the Web of Science and PubMed databases initially identified 206 articles (170 from Web of Science and 36 from PubMed). After the screening and selection process, 13 articles met all the inclusion criteria and were selected for detailed analysis, as illustrated in Figure 2. A comprehensive summary of these studies, including the abiotic factors used in the experimental designs and their results on dry weight, biomass, and EPS yield, is presented in Table 1.

Table 1: Effect of abiotic parameters on growth and exopolysaccharide (EPS) production in *Porphyridium* sp.

Microalgae	Parameter	Dry weight (g/L)	Biomass (g/L/d)	EPS (mg/L)	Reference
<i>P. purpureum</i>	Salinity	17.1 g/L	-	90 mg/L	[12]
<i>P. purpureum</i>	pH	-	1.5715 g/L	104.4 mg/L	[38]
	Salinity	-	1.5715 g/L	90.5 mg/L	
	Nitrogen and phosphorus	-	1.5715 g/L	105 mg/L	
<i>P. cruentum</i>	CO ₂	-	-	11.41 mg/L and 218.4 mg/L	[44]
<i>P. cruentum</i>	Irradiance	2.93 g/L	-	0.256 mg/L	[51]
	Phosphorus	2.85 g/L	-	0.0041 mg/L	
<i>P. purpureum</i>	CO ₂	-	-	7.26 mg/L	[45]
	Temperature	7.75 g/L	-	2.89 mg/L	
	Salinity	8.68 g/L	-	2.33 mg/L	
<i>P. marinum</i>	Temperature	-	-	100 mg/L/d and 149 mg/L/d	[48]
<i>P. purpureum</i>	Irradiance	2.97 g/L	-	17,51 mg/L/d	[54]
<i>P. cruentum</i>	Irradiance	2.93 g/L	-	255.62 mg/L	[50]

<i>P. cruentum</i>	Salinity	-	-	45 mg/L/d	[62]
<i>P. purpureum</i>	Salinity	-	66 g/L	691.4 mg/L	[67]
<i>P. purpureum</i>	Nitrogen and phosphorus	-	3.2 g/L/d	0.24 mg/L	[74]
<i>P. sordidum</i>	Phosphorus	-	4.1 g/L/d	0.16 mg/L	
<i>P. purpureum</i>	Nitrogen	5.54 g/L	-	0.342 mg/L	[76]
<i>P. purpureum</i>	Nitrogen and phosphorus	16.24 g/L	-	1.66 mg/L	[78]

This table summarizes the effects of abiotic parameters on the growth and exopolysaccharide (EPS) production in different species of *Porphyridium* microalgae. The evaluated parameters include salinity, pH, CO₂ concentration, irradiance, temperature, nitrogen, and phosphorus availability. Key metrics reported are dry weight (g/L), biomass productivity (g/L/d), and EPS (exopolysaccharide) concentration (mg/L).

The selected studies cover different strains of *Porphyridium*, namely: most studies focused on *P. purpureum* (8 studies) which includes strains classified as *P. cruentum* and some marine variants now reclassified as *P. marinum*, demonstrates remarkable habitat plasticity, thriving in freshwater, brackish, and marine environments [10]. In contrast, the less studied *P. sordidum* (1 studie), isolated from seawater may produce EPS with unique properties reflecting its specialized marine habitat [3]. While *P. cruentum* (5 studies) shares close phylogenetic ties with *P. purpureum*, subtle metabolic differences between these strains could lead to variations in EPS yield and composition and in taxonomic classification [3,10].

These studies evaluated several cultivation parameters that influence the production and characteristics of EPS, whose specific effects will be discussed individually in the subsequent sections, with emphasis on the optimal conditions identified to maximize EPS production and on the variations observed in the composition of exopolysaccharides in response to different cultivation conditions.

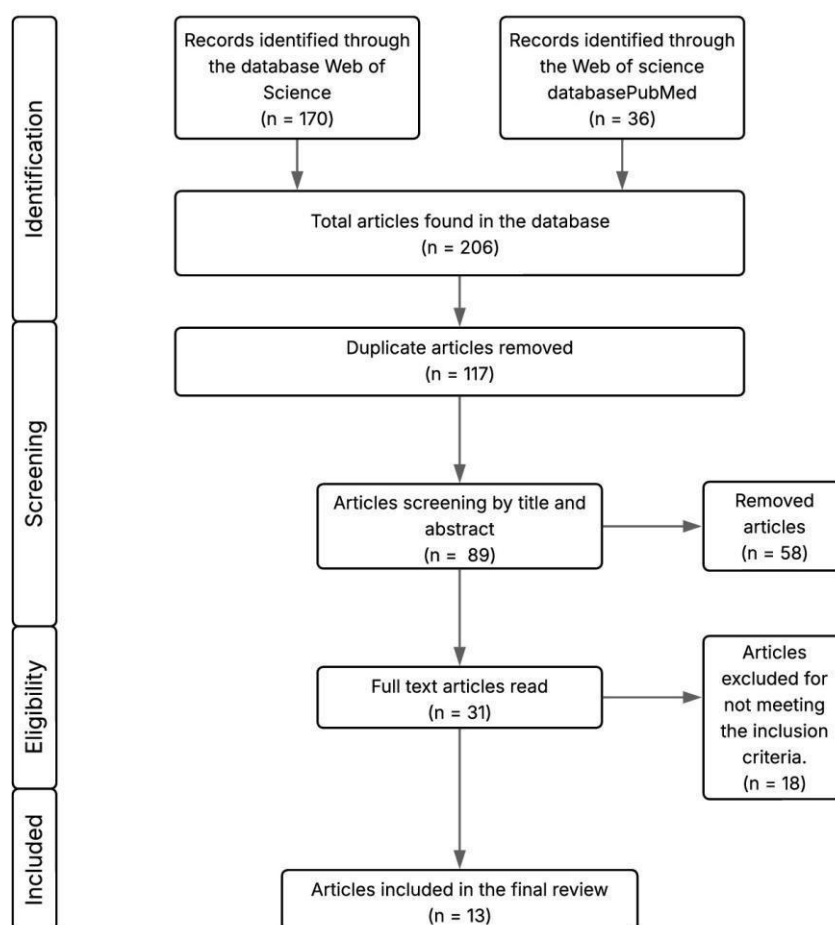


Figure 2. Flowchart represents the process of selecting articles for systematic review. The identification stage shows the initial search in databases (Web of Science and PubMed), resulting in 206 articles. During the screening phase, we removed 117 duplicate records and excluded 58 additional articles after reviewing titles and abstracts. These exclusions primarily involved studies that either: (1) did not focus on *Porphyridium* cultivation, (2) investigated secondary metabolites other than exopolysaccharides (EPS), or (3) were review articles without original experimental data. In the eligibility phase, we assessed 31 full-text articles and excluded 17 that failed to meet our inclusion criteria, particularly those lacking controlled cultivation parameter analysis or quantitative EPS yield measurements. Ultimately, 13 studies meeting all criteria - original research reporting EPS production under defined cultivation conditions in *Porphyridium* species - were selected for final analysis.

3.1 Abiotic parameters influencing the cultivation of *Porphyridium* sp.

The cultivation of *Porphyridium* sp. and its production of exopolysaccharides (EPS) are directly influenced by abiotic parameters, which must be balanced to optimize both cell growth and the synthesis of secondary metabolites. These parameters include light, thermal, chemical and nutritional conditions, whose ideal ranges were established by previous studies [3,4,9,10].

Considering the ideal conditions proposed for the biomass growth of this species, an irradiance has been reported to be between 50–100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ensuring efficient photosynthesis without causing photoinhibition [30]; range of optimal temperature for growth between 21–25 °C, although the species tolerates wider conditions (≤ 20 °C to > 35 °C), albeit with reduced productivity [3,31] and pH of the medium maintained between 6.0 and 8.5, with 8.0 being the most favorable value for biomass accumulation [3,11].

The composition of the culture medium is equally critical, with formulations such as KOCH, ASW, and F/2 being widely used [33]. Nitrogen (e.g., nitrate), present in these media, accelerates the logarithmic phase and increases biomass, however, excessive concentrations can lead to nutritional imbalance, limiting the availability of phosphorus, metals, and vitamins, which impairs cellular metabolism [34]. The recommended initial inoculum is 1.59×10^6 cells/mL, a concentration that favors both growth and EPS production [32]. Furthermore, *Porphyridium* sp. exhibits high tolerance to salinity, developing in ranges of 12–32% [10,35], and responds positively to aeration with CO_2 (1–5%), which stimulates biomass and metabolite productivity [36,37].

4 Effects of abiotic parameters on culture and exopolysaccharide production

4.1 pH

The production of exopolysaccharides by *Porphyridium* sp. demonstrates greater efficiency under alkaline conditions, regarding pH influence on EPS production in *Porphyridium* sp. remains limited to a single controlled study [38]. The work of Lu [38], carried out with ASW + Kock medium, revealed that the maximum EPS production (10.44% of biomass) occurred at pH 8, while pH 7 (7.81%) and pH 6 (7.66%) presented lower yields, although statistically equivalent to each other. The joint analysis of cell growth and EPS production shows that the optimal cell density (7×10^5 cells/mL) was also reached at pH 8, suggesting a positive correlation between cell proliferation and EPS synthesis in alkaline medium. From a metabolic point of view, this pattern can be explained by the greater stability of the photosynthetic process in the pH range 7.5–8.5 [39], which favors the allocation of fixed carbon to the EPS biosynthetic pathway. These results indicate that although EPS production is not drastically affected by pH variations (6.0–8.5), its maximum yield is associated with conditions that also optimize cell growth.

4.2 CO_2 and aeration

Carbon dioxide and aeration systems represent fundamental parameters in the cultivation of *Porphyridium* sp., directly influencing both cell growth and exopolysaccharide (EPS) production. As the main source of inorganic carbon in photoautotrophic cultures, CO_2 is assimilated for the synthesis of intracellular monosaccharides, reserve polysaccharides and exopolysaccharides [40], being alternatively replaceable by sodium bicarbonate (NaHCO_3), which is metabolically converted via photosynthesis [19]. Adequate aeration is essential to overcome operational challenges characteristic of *Porphyridium* cultivation. The increasing viscosity of the medium,

resulting from the continuous secretion of EPS, promotes cell agglutination and precipitation, inhibiting growth [41,42]. Efficient aeration systems not only provide CO₂, but also improve crop homogeneity by reducing self-shading and optimizing light and temperature distribution [43]. Comparative studies demonstrate the differential impact of CO₂ concentration at different crop scales. Yin *et al.* [44] observed that *P. cruentum* reaches maximum EPS production (218.4 mg/L in a closed system and 11.41 mg/L in an open system) with 5% CO₂, highlighting the influence of controlled abiotic factors on carbon fixation efficiency. This relationship was corroborated by Li *et al.* [45], who reported that *P. purpureum* has a carbon sequestration rate (1.66 g CO₂ /g biomass/day) with 4.7% CO₂, associated with a 44% increase in EPS production (7.26 g/L compared to 5.04 g/L in the control). Therefore, optimizing CO₂ tension is shown to be a strategy that increases photosynthetic efficiency and biomass [46,47], maximizes EPS production and mitigates operational challenges inherent to the high viscosity of the medium [41,43]. These findings reinforce the interdependence between physicochemical parameters in *Porphyridium* cultivation, where precise control of CO₂ and aeration must be integrated with the management of other abiotic factors to optimize cultivation.

4.3 Temperature

The influence of temperature on the production of exopolysaccharides (EPS) by *Porphyridium* sp. has been investigated together with other abiotic parameters. Soansen *et al.* [48] demonstrated that *P. marinum* grown in Provasoli medium under irradiance of 360 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ reached maximum EPS production (0.15 g/L/day) at 28°C, a temperature that is in line with the optimal growth range for the genus. In contrast, suboptimal conditions (24°C and 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) resulted in lower yield (0.10 g/L/day), evidencing the synergistic effect between temperature and irradiance [48,49,50]. Additional studies highlight how temperature interacts with medium composition. Li *et al.* [45] observed that *Porphyridium* grown in 50% ASW at 25°C showed accelerated cell growth after the 6th day, reaching 7.75 g/L of biomass on the 18th day. Under these conditions, EPS production reached 2.89 g/L (37.29% of dry biomass), representing a 25.3% increase compared to the ASW control medium (1.73 g/L). These results suggest that higher temperatures (25-28°C) enhance both growth and EPS synthesis, especially when combined with adjustments in salinity and nutrients. Furthermore, this evidence reinforces that the optimization of EPS production in *Porphyridium* depends on the integration of temperature with other parameters, such as irradiation. The range of 25-28°C emerges as ideal for EPS synthesis, provided it is accompanied by adequate irradiance and balanced composition of the culture medium [45,48,51]. These findings highlight the need for multivariate approaches to maximize the yield of these biopolymers.

4.4 Irradiance

Irradiance is a determining factor in the metabolism of *Porphyridium* sp., directly influencing photosynthesis, cell growth and the production of exopolysaccharides (EPS). Microalgae of this genus present efficiency of up to 48% in the use of light energy in the visible spectrum (400-700 nm) [52], with light being essential for the synthesis of biomolecules such as proteins, pigments and polysaccharides [53]. However, the natural variability of solar irradiance poses challenges to productivity, making it necessary to use artificial sources for controlled cultivations [52,53].

Studies demonstrate that the photosynthetic response of *Porphyridium* follows a saturable curve, with optimum productivity around $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Intensities above this threshold cause photoinhibition, reducing both growth and EPS synthesis through damage to chloroplasts and enzymatic inactivation [19,54,55]. Among artificial sources, LEDs stand out for their energy efficiency, long lifespan (~ 50.000 hours) and ability to emit specific spectra, such as blue (400-500 nm), which stimulates the activity of RuBisCO (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) the key enzyme in photosynthetic carbon fixation that converts CO_2 into organic compounds, that including the production of carbohydrates and EPS [54,56,57].

The ideal irradiance range for *Porphyridium* is between $30\text{-}100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, with studies reporting maximum EPS production in *P. purpureum* and *P. cruentum* under these conditions [30,58]. Values above $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tend to reduce polysaccharide yield, highlighting the need for precise adjustment of light intensity. The critical interaction between irradiance and temperature is also noteworthy, in which high temperatures potentiate the deleterious effects of excess light [3], and the heterogeneity in light distribution due to cellular self-shading [52,59]. Strategies such as aeration control with CO_2 [60,61] and the use of irradiances with specific spectra are solutions to optimize productivity that allow for uniform light distribution, avoid photooxidative stress and direct metabolism towards EPS synthesis, demonstrating that integrated management of irradiance with other abiotic parameters is essential to maximize biotechnological yield.

4.5 Salinity

Salinity is one of the most important environmental factors for the growth of microalgae [62], influencing the synthesis and composition of polysaccharides that aid in cellular osmoregulation, homeostasis and protection in saline environments with excess sodium and chloride ions [62,63]. Variations in saline concentration trigger adaptive responses such as osmoregulatory adjustments and modifications in the EPS mucilaginous layer, which acts as a protective barrier against ionic stress [64]. High saline conditions also have benefits by inhibiting the growth of culture-contaminating organisms such as bacteria and cyanobacteria [10].

The determination of the optimum salinity range has generated discussion in the literature. According to Lee *et al.* [66] reported 36 years ago that extreme salinity values do not favor EPS synthesis, and showed that optimum growth is at concentrations of 26 and 47 g/L of NaCl, while recent works such as Ferreira *et al.* [12] identified 32 g/L as optimum for EPS production (150 mg/L), and while Decamp *et al.* [62] reported maximum productivity at 25 g/L (0.22 g/L/day of biomass). These discrepancies may reflect differences between strains or specific experimental conditions.

The influence of salinity on the production of exopolysaccharides by *Porphyridium* sp. presents a complex and multifactorial relationship. Studies by Lu [38] and Li [67] demonstrate that saline concentrations between 17-20‰ represent the optimal conditions for EPS synthesis, promoting metabolic balance and cell growth. Under these conditions, cells maintain their ionic homeostasis, preserve photosynthetic efficiency and minimize the production of reactive oxygen species (ROS) [68]. However, in the same study by Li [67] demonstrated that extreme saline stress conditions (5‰ or 50‰) significantly reduce EPS yield and cell growth, but on the other hand, it increases the production of uronic acid and sulfate groups in EPS, giving them greater antioxidant capacity.

This protective mechanism occurs via chelation of metal ions (Fe^{2+} and Cu^{2+}), inhibiting the formation of hydroxyl radicals and protecting cells against oxidative damage [68,69]. Confirmation of this adaptive phenomenon was obtained in later studies with *P. purpureum* [45], where cultures in 70% artificial seawater (ASW) showed maximum EPS production (2.33 g/L) during the stationary phase, demonstrating the remarkable metabolic plasticity of these organisms in the face of environmental variations [38]. Understanding these mechanisms opens interesting perspectives for biotechnological applications, where controlled manipulation of salinity can be used to direct the production of EPS with specific characteristics, either to maximize yield or to obtain biopolymers with improved functional properties [38,45,67, 69].

4.6 Nitrogen and phosphorus

Nitrogen and phosphorus stand out as essential macronutrients for the metabolism of *Porphyridium* sp., acting in a complementary manner in cell growth and in the production of exopolysaccharides (EPS) [38,70,71]. Phosphorus, present mainly as H_2PO_4^- and HPO_4^{2-} in culture media [10], plays crucial structural roles as a component of nucleic acids, proteins and membrane phospholipids, in addition to actively participating in chlorophyll synthesis [72]. Its limitation negatively affects the production of biomass, saturated fatty acids, proteins and carbohydrates in *P. purpureum* [13]. In parallel, nitrogen regulates fundamental physiological processes, from the formation of photosynthetic pigments to the activity of photosystem II, and its availability is decisive for the metabolic balance between proteins, lipids and carbohydrates [10,70,72,73].

Medina-Cabrera and collaborators [74] demonstrated that *P. purpureum* presents greater efficiency in the absorption of nitrate and phosphate compared to *P. sordidum*, resulting in greater EPS production (0.24 g/L), consequently. These differences can be attributed to distinct morphological and physiological characteristics, such as cell size and ecological origin of the strains [74,75].

These considerations on the characteristics of microalgae strains raise questions about the relationship between available nutrients and EPS production. Low N/P ratios (<4.9) favor EPS production, while high values (35-50) prioritize cell growth [38]. The optimal ratio of 14:1 proposed by Lu *et al.* [38] allows the simultaneous depletion of both nutrients, resulting in a yield of 10.50% EPS. However, different cultivation strategies have been explored, as in the study by Li *et al.* [76], where nitrogen limitation (3.5 mM KNO_3) in *P. purpureum* showed the highest EPS yield (0.342 g/L).

The response mechanism to nutritional limitation involves metabolic changes. Nitrogen and phosphorus shortages induce the accumulation of carbon compounds such as polysaccharides and triacylglycerols [38], while blocking cell division, leading to the release of EPS into the medium and increased culture viscosity [34,77]. Interestingly, some studies report higher EPS production under rich nutritional conditions, such as in the work of Li *et al.* [78] with 1.66 g/L of EPS in C/N 12.82, and the study of Gujar [51] with 4.071 $\mu\text{g/L}$ in high concentrations of KNO_3 and NaHCO_3 , suggesting that the metabolic response varies significantly between strains.

These observations highlight the complex interaction between nutritional availability and EPS production in *Porphyridium* sp., where the balance between nitrogen and phosphorus, the growth stage and the intrinsic characteristics of each strain determine the metabolic profile. Understanding

these mechanisms is essential for the development of optimized cultivation strategies for specific biotechnological applications [38,51,76,78].

5 Composition and biological applications of exopolysaccharides (EPS)

Porphyridium culture medium allows investigating the biological and physicochemical applications of polysaccharides [3]. The chemical composition and structure of exopolysaccharides depend on the taxonomy of the species, cultivation optimization, abiotic stress, presence of metal ions and nutrient concentration [79]. Their complexity and biological properties may vary according to the composition of monosaccharides, molecular weight, sulfate and uronic acid content, type of bonds and distribution in the molecule [80; 81]. In general, *Porphyridium* spp. EPS are predominantly composed of galactose, xylose, and sulfate groups, all water-soluble constituents, followed by glucose [4]. Additionally, they may contain uronic acids, pyruvates, rhamnose, arabinose, galacturonic acid, mannose, fucose, and acyl or carboxyl groups from carbohydrates or amino acids (Figure 3) [79, 81]. This molecular complexity endows the EPS with unique biological properties, schematically represented in Figure 4.

The anionic nature of EPS, resulting from the presence of sulfate and carboxyl groups, provides high affinity for metal ions, making them promising for bioremediation applications, for example, in aquatic environments biofilms release negatively charged EPS that trap heavy metals (e.g: Mn, Cu, Pb, and Hg), and EPS can also prevent soil erosion [20]. In parallel, the presence of acetyl groups, peptide moieties, fucose and rhamnose confers hydrophobic characteristics that enable their use as emulsifiers with potential food industry applications [82]. The specific combination of galactose, xylose and sulfate demonstrated antimicrobial potential, as observed by Netanel *et al.* [83], who reported an increase in antibacterial activity when complexing EPS with zinc ions, the sulfated EPS alone was more effective against *E. coli* (72.5% growth reduction) than *B. subtilis* (35%), likely due to cell wall differences. Similar results were obtained by Raposo *et al.* [81], who found a 19% reduction in the growth of *Salmonella enteritidis* though observed lower antimicrobial efficacy against *E. coli* and *S. aureus*. Their study additionally revealed reduction in antiviral activity in *Herpes simplex* 1 and 2. And, additionally, Risjani *et al.* [98] demonstrate that *Porphyridium cruentum* EPS acts as a non-toxic immunostimulant in shrimp *Litopenaeus vannamei*, enhancing innate immunity and protecting against infections of *Vibrio harveyi*. The molecular weight of EPS represents another critical factor for their biological properties [108]. Sun *et al.* [85] demonstrated that 6.5 kDa fragments present greater antioxidant activity than larger polymers (60.6 and 256 kDa), while Tannin-Spitz *et al.* [25] associated this activity with the sulfate content (4.5%) and the presence of glycoproteins (66 kDa). In this context, the EPS from *Porphyridium cruentum* exhibit potent immunostimulatory which activate macrophages, exert antioxidant effects, display selective anticancer cytotoxicity, and show excellent biocompatibility - properties supporting their nutraceutical applications [95]. Thus Liberman *et al.* [86] emphasized the significance of sulfated polysaccharides from *Porphyridium* due to their unique rheological properties and promising bioactivities, such as anticoagulant and antioxidant effects, as well as applications in controlled drug delivery systems. These findings reinforce that both the molecular weight and the chemical composition of EPS can be modulated by culture conditions to optimize their functional properties [82]. Physically, EPS present solubility in water and the ability to form

viscous solutions even at low concentrations (0.25%), exhibiting non-Newtonian rheological behavior [86,87]. This viscosity results from the formation of extensive hydrogen bond networks between hydroxyl and amino groups [86], a property that, combined with their environmental stability and resistance to enzymes such as hyaluronidase, makes them attractive for applications as biolubricants [24,88]. EPS biosynthesis involves three steps, the production of nucleotide precursors, oligosaccharide assembly and secretion of the final polymer [89]. This complex metabolic pathway justifies the need for detailed structural analyses to understand the relationship between chemical composition and biological properties [90].

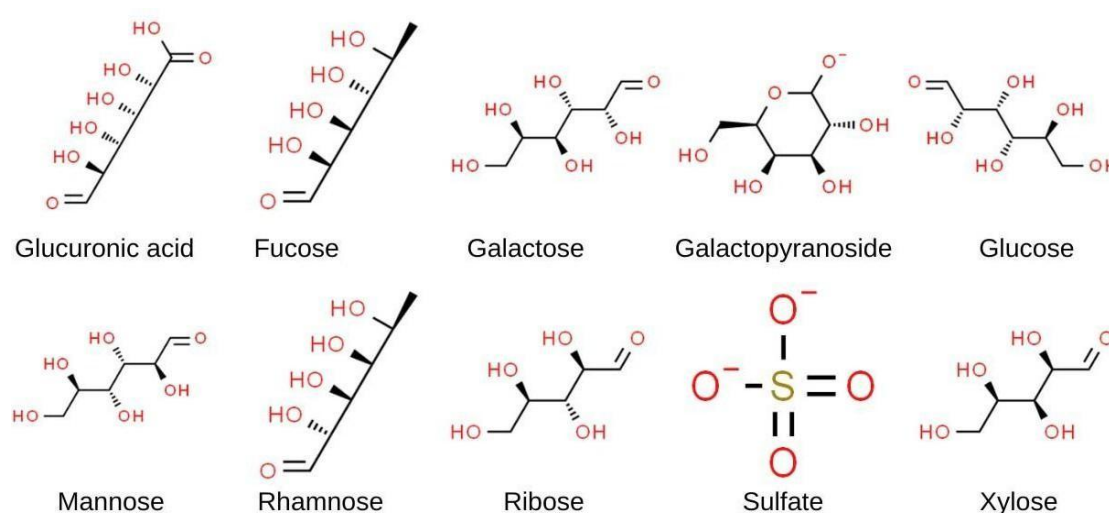


Figure 3. Chemical formulas of the components present in exopolysaccharides. Source: [ChemSpider | Search and share chemistry](https://chemspider.com/)

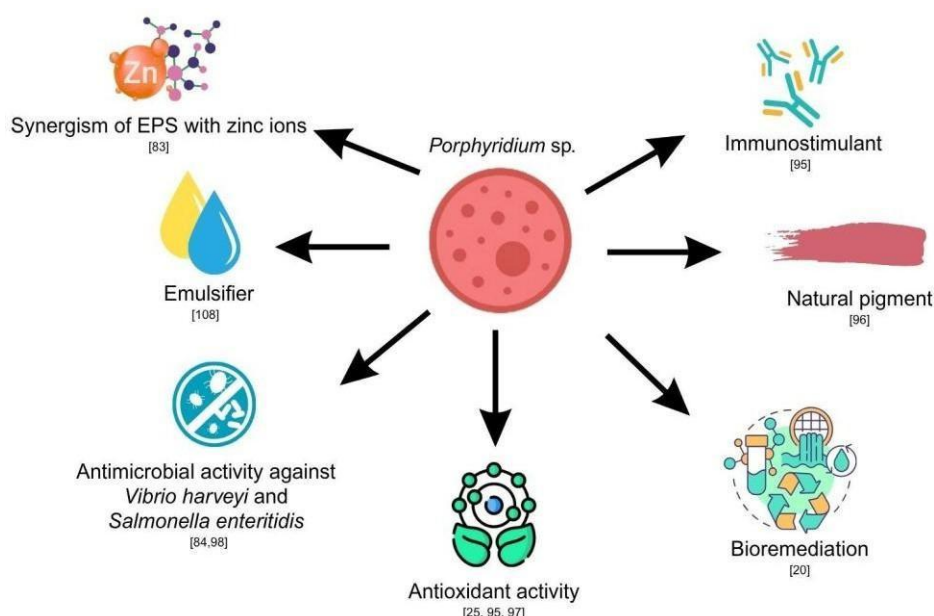


Figure 4. Biological properties of exopolysaccharides (EPS) from *Porphyridium* sp. The diagram illustrates the applications of EPS, including synergistic antimicrobial activity when complexed

with zinc ions [83]; emulsifying capabilities valuable for food industries, attributed to hydrophobic components like acetyl and rhamnose [82,108]; and effective pathogen inhibition against *Vibrio harveyi* and *Salmonella enteritidis* [84,98]. The polysaccharides demonstrate significant immunostimulatory effects, enhancing macrophage activity and shrimp immunity [95], while their anionic nature enables heavy metal bioremediation [20]. Antioxidant properties, correlated with sulfate content (4.5%) and lower molecular weight fractions (6.5 kDa) [25,85,97], further highlight their nutraceutical potential. This functional versatility, combined with their rheological properties, positions *Porphyridium* EPS as valuable biomolecules for environmental, industrial, and biomedical applications.

6 Effect of abiotic parameters on exopolysaccharide composition

The analysis of exopolysaccharides produced by different strains of microalgae shows structural and functional variations, with important implications for their biotechnological applications. Comparative studies highlight how phylogenetic divergence among *Porphyridium* species translates to distinct EPS chemistries (Table 2). Medina-Cabrera *et al.* [74] when investigating *P. purpureum* and *P. sordidum*, identified similarities in chemical composition, but significant differences in the sulfation and methylation pattern. While *P. sordidum* presented a higher sulfate content, *P. purpureum* showed specific methylation in a glucuronic acid dimer, contrasting with the presence of methyl pentose and methyl hexose in *P. sordidum*. These differences likely reflect evolutionary adaptations to different ecological niches. Salinity emerges as a critical factor in modulating EPS composition. Ferreira *et al.* [12] observed that low salinities (18 g/L NaCl) result in distinct sulfation patterns at specific xylose and glucose positions, while high salinities (50 g/L NaCl) produce a different profile. Li *et al.* [67] complement these findings, demonstrating that low salinity (5‰) favors higher xylose (31.8%), galactose (41.1%) and uronic acid (14.4%) contents, while high salinity (50‰) increases protein (13.7%) and glucose (40.8%) contents. Interestingly, the intermediate salinity of 35‰ showed the highest sulfate content (14.7%), suggesting a complex adaptive mechanism. These variations may be related to balance osmoregulation and the regulation of the adenosyl sulfate transferase gene, which modulates EPS synthesis under salt stress, affecting the expression of enzymes involved in oligosaccharide assembly [91,92]

A detailed understanding of these relationships between cultivation conditions (e.g. pH, temperature and nutrient availability), chemical composition and functional properties is essential for optimizing the production of EPS with specific characteristics for industrial and biotechnological applications [93].

Table 2. Chemical composition of exopolysaccharides (EPS) produced by different strains of *Porphyridium* sp.

Strain	Glucose	Galactose	Xylose	Sulfate	Acid. Glucuronic	Uronic Acid	Fructose	Mannose	Arabinose
<i>P. purpureum</i> [12]	X	X	X	-	-	X	-	-	-
<i>P. purpureum</i> [45]	X	-	-	-	-	-	X	X	X
<i>P. purpureum</i> [67]	X	X	X	X	X	-	-	-	-
<i>P. sordidum</i> [74]	X	-	X	X	X	-	-	-	-
<i>P. purpureum</i> [74]	X	X	-	X	X	-	-	-	-

Comparison of the chemical composition of exopolysaccharides (EPS) produced by different *Porphyridium* strains. x = present; - = not present.

7 Final remarks and perspectives

This review identified the optimal conditions for exopolysaccharide (EPS) production by *Porphyridium* sp., including temperature (21-28°C), irradiance (30-100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), alkaline pH (8.0-8.5), and controlled nitrogen and phosphorus limitation. However, EPS production in *Porphyridium* sp. is influenced by different interactions between abiotic factors, highlighting the need for further research on the combined effects of light and temperature, the relationship between cell growth and EPS production, and differences between strains. A critical challenge is the scarcity of industrial-scale studies, as most research has been conducted at small scale (<5 L). To enable practical applications, research is essential to evaluate cultivation parameters in larger-scale systems, relate production conditions to the biological properties of EPS (antioxidant, antimicrobial and immunostimulant activity), and develop protocols for the production of EPS with specific characteristics. The composition of EPS (mainly xylose, galactose, glucose and glucuronic acid) varies in response to cultivation conditions, directly influencing their functional properties. However, studies evaluating cultivation parameters, biological activities and chemical characterization of polysaccharides are still scarce. Although promising results have been achieved in the cosmetic field where *Porphyridium* EPS is already used in commercial products [21] applications in the health sector are still limited and require further investigation. Future studies should focus on the relationship between molecular structure and biological activity, targeting pharmaceutical and cosmetic applications. The combination of industrial-scale research with detailed characterization of EPS will be essential to overcome current limitations and explore the full potential of these biopolymers.

Acknowledgements

This work was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). D. F. Ramos is productivity research fellows from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (process number PQ 306806/2022-3). Authors thanks Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) by the financial support INOVA CLUSTERS TECNOLÓGICOS (22/2551-0000840-2). We also acknowledge AlgaSul Microalgae Biotechnology for their collaboration and support throughout this research.

Author contributions: CRediT

Natália Popiorek dos Santos: Writing-original draft, Writing-review & editing, Methodology, Investigation, Data curation. **Bruno Galler Kubelka:** Writing-review & editing. Formal analysis, Data curation. **Débora Carvalho Rodrigues:** Data curation. **Rodolfo Moreira Baptista:** Data curation. **Daniela Fernandes Ramos:** Writing-review & editing, Formal analysis, Supervision, Project administration, Conceptualization.

Financing: Not applicable

References

- [1] Savio, S., Congestri, R., & Rodolfo, C. (2021). Are we out of the infancy of microalgae-based drug discovery? *Algal Research*, 54 (102173), 102173.
- [2] Ruiz J, Olivieri G, de Vreese J, Bosma R, Willems P, Reith JH, Eppink MHM, Kleinegris DMM, Wjifels RH, Barbosa MJ (2016) Towards industrial products from microalgae, *Energy Environ. Sci* 9:3036–3043
- [3] Bayu, A., Noerdjito , DR, Rahmawati , SI, Putra, MY, & Karnjanakom , S. (2023). Biological and technical aspects on valorization of red microalgae genera *Porphyridium*. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13 (14), 12395–12411.
- [4] Gaignard C, Gargouch N, Dubessay P, Delattre C, Pierre G, Laroche C, Fendri I, Abdelkaf S, Michaud P (2019) New horizons in culture and valorization of red microalgae. *Biotech Adv* 37:193–222
- [5] Brody, M., Vatter, A.E., 1959. Observations on cellular structures of *Porphyridium cruentum*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5, 289–294.
- [6] Gargouch, N., Elleuch , F., Karkouch , I., Tabbene , O., Pichon, C., Gardarin , C., Rihouey , C., Picton , L., Abdelkafi , S., Fendri , I., & Laroche, C. (2021). Potential of exopolysaccharide from *Porphyridium marinum* to cope with bacterial proliferation, biofilm formation, and breast cancer. *Marine Drugs*, 19 (2), 66.
- [7] Assuncao MFG, Varejao JMTB, Santos LMA (2017) Nutritional characterization of the microalga *Ruttenella lamellosa* compared to *Porphyridium purpureum*. *Algal Res* 26:8–14
- [8] Patel, A.K., *et al.* Separation and fractionation of exopolysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Bioresour. Technol.* (2013)
- [9] Nguyen, A.Q., Mohammadi, M., Alian, M., Muralitharan, G., Chauhan, V.S., & Balan, V. (2024). Exploring the versatility of *Porphyridium* sp.: A comprehensive review of cultivation, bio-product extraction, purification, and characterization techniques. *Biotechnology Advances*, 77 (108471), 108471.
- [10] Li, S., Ji, L., Shi, Q., Wu, H., & Fan, J. (2019). Advances in the production of bioactive substances from marine unicellular microalgae *Porphyridium* spp. *Bioresource Technology*, 292 (122048), 122048.

- [11] Lu, XD, Nan, FR, Feng, J., Lv, JP, Liu, Q., Liu, XD, *et al.* (2020). Effects of different environmental factors on the growth and bioactive substance accumulation of *Porphyridium purpureum*. *Int. J. Environ . Public Health Res.* 17 (7), 2221.
- [12] Ferreira, A. S., Mendonça, I., Póvoa, I., Carvalho, H., Correia, A., Vilanova, M., Silva, T. H., Coimbra, M. A., & Nunes, C. (2021). Impact of growth medium salinity on galactoxylan exopolysaccharides of *Porphyridium purpureum*. *Algal Research*, 59 (102439), 102439.
- [13] Gaomin , S., Jiao, K., Li, Z., Guo, X., Chang, J., *Ndikubwimana* , T., Sun, Y., Zeng , Bioprocess and Biosystems Engineering. 39(7), 1129-1136.
- [14] Paniagua-Michel, J. de J., Olmos-Soto, J., & Morales-Guerrero, E. R. (2014). Algal and microbial exopolysaccharides: new insights as biosurfactants and bioemulsifiers. *Advances in Food and Nutrition Research*, 73 , 221–257.
- [15] Mayers, J.J., Vaiciulyte, S., Malmhäll -Bah, E., Alcaide-Sancho, J., Ewald, S., Godhe , A., Ekendahl , S., & Albers, E. (2018). Identifying a marine microalgae with high carbohydrate productivity under stress and potential for efficient flocculation. *Algal Research*, 31, 430–442.
- [16] S. Geresh , SM Arad, O. Levy- Ontman , W. Zhang, Y. Tekoah , R. Glaser, Isolation and characterization of poly- and oligosaccharides from the red microalga *Porphyridium* sp. *Carbohydr . Res* 344 (2009) 343–349. [9] V. Gloaguen , G. Ruiz, H. Morvan , A. Mouradi-Givernaud , E. Maes , P. Krausz, G. Strecker, The extracellular polysaccharide of *Porphyridium* sp.: an NMR study of lithium-resistant oligosaccharidic fragments, *Carbohydr . Res.* 339 (2004) 97–103
- [17] Arad (Malis), S., Levy- Ontman , O., 2010. Red microalgal cell- wall polysaccharides : biotechnological aspects. *Curr. Opinion. Biotechnol .* 21, 358–364
- [18] Xiao, R., and Zheng, Y. (2016). Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnol. Adv.* 34 (7), 1225–1244
- [19] Babiak , W., and Krzemińska , I. (2021). Extracellular polymeric substances (EPS) as microalgal bioproducts: A review of factors affecting EPS synthesis and application in flocculation processes. *Energies* 14 (13), 4007.
- [20] Kumar, D.; Kaštánek, P.; Adhikary, SP Exopolysaccharides from cyanobacteria and microalgae and their commercial application. *Curr. Sci.* 2018, 115, 234–241.
- [21] Oran. (2023, September 13). *Porphyridium cruentum*. Blog.xelliss.com. https://blog.xelliss.com/en_US/porphyridium-cruentum/
- [22] *Porphyridium cruentum* extract: Functions and description of cosmetic ingredients. (n.d.). SafetyMakeup. <https://safetymakeup.com.br/ingredients/porphyridium-cruentum-extract>
- [23] Wijesekara , I., Pangestuti , R., & Kim, S.-K. (2011). Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers* , 84 (1), 14–21.

- [24] Arad, S. M., Rapoport, L., Moshkovich, A., van Moppes, D., Karpasas, M., Golan, R., & Golan, Y. (2006). Superior biolubricant from a species of red microalgae. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 22 (17), 7313–7317.
- [25] Tannin-Spitz, T.; Bergman, M.; Grossman, S.; Arad, S. Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *J. Appl. Phycol.* 2005, 17, 215–222
- [26] Liberman GN, Ochbaum G, Arad SM, Bitton R (2016) The sulfated polysaccharide from a marine red microalga as a platform for the incorporation of zinc ions. *Carbohydr Polym* 152:658–664
- [27] Kumar, D., Kastanek, P., & Adhikary, S. P. (2018). Exopolysaccharides from Cyanobacteria and Microalgae and Their Commercial Application. *Current Science*, 115 (2), 234.
- [28] Prasad B, Lein W, Thiyam G, Lindenberger CP, Buchholz R, Vadakedath N (2019) Stable nuclear transformation of rhodophyte species *Porphyridium purpureum*: advanced molecular tools and an optimized method. *Photosynth Res* 140:173–188
- [29] Kathiresan S, Sarada R, Bhattacharya D, Ravishankar GA (2007) Culture media optimization for growth and phycoerythrin production from *Porphyridium purpureum*. *Biotechnol Bioeng* 96:456–463
- [30] Guiheneuf F, Stengel DB (2015) Towards the biorefinery concept: Interaction of light, temperature and nitrogen for optimizing the co-production of high-value compounds in *Porphyridium purpureum*. *Algal Res* 10:152–163
- [31] Asgharpour M, Rodgers B, Hestekin JA (2015) Eicosapentaenoic acid from *Porphyridium cruentum*: increasing growth and productivity of microalgae for pharmaceutical products. *Energies* 8:10487–10503
- [32] Singh, S., Arad, S., Richmond, A., 2000. Extracellular polysaccharide production in outdoor mass cultures of *Porphyridium* sp. in flat plate glass reactors. *J. Appl. Phycol.* 12, 269–275.
- [33] Li S, Ji L, Chen C, Zhao S, Sun M, Gao Z, Wu H, Fan J (2020) Efficient accumulation of high-value bioactive substances by carbon to nitrogen ratio regulation in marine microalgae *Porphyridium purpureum*. *Bioresour Technol* 309:1–9
- [34] Razaghi, A., Godhe, A., & Albers, E. (2014). Effects of nitrogen on growth and carbohydrate formation in *Porphyridium cruentum*. *Open Life Sciences*, 9 (2), 156–162.
- [35] Aizdaicher NA, Stonik IV, Boroda AV (2014) The development of *Porphyridium purpureum* (Bory de Saint-Vincent) Drew et Ross, 1965 (Rhodophyta) from Amursky Bay, Sea of Japan, in a Laboratory Culture. *Russian J Mar Biology* 40:279–285
- [36] Han, J., Wang, JH, Ai-Fen, LI, 2013. Effect of CO₂ concentration and nitrogen source addition on growth and major metabolic substances accumulation in *Porphyridium* sp. *Ecol. Sci.* 32, 51–56.

- [37] Su, GM, Guo, XY, Chang, JY, Liu, J. Xiamen. University. 6, 790–795
- [38] Lu, X., Nan, F., Feng, J., Lv, J., Liu, Q., Liu, X., & Xie, S. (2020). Effects of different environmental factors on the growth and bioactive substance accumulation of *Porphyridium purpureum*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17 (7), 2221.
- [39] Gardarin C, Rihouey C, Picton L, Abdelkaf S, Fendri I, Laroche C (2021) Potential of exopolysaccharide from *Porphyridium marinum* to cope with bacterial proliferation, biofilm formation, and breast cancer. *Mar Drugs* 19:1–19
- [40] Borowitzka, Michael A.; Beardall, John; Raven, John A. (2016). *The Physiology of Microalgae | Exocellular Polysaccharides in Microalgae and Cyanobacteria: Chemical Features, Role and Enzymes and Genes Involved in Their Biosynthesis.*, 10.1007/978-3-319-24945-2(Chapter 21), 565–590.
- [41] Griffiths, DJ, Thresher, CL, Street, HE, 1960. The heterotrophic nutrition of *Chlorella vulgaris* (Brannon No. 1 strain): with two figures in the text. *Ann. Bot.* 24, 1–11
- [42] Camacho FG, Gomez AC, Sobczuk TM, Grima EM (2000) Effects of mechanical and hydrodynamic stress in agitated, sparse cultures of *Porphyridium cruentum*. *Process Biochem* 35:1045–1050
- [43] Huang, J., 2005. Analysis of the nutritional composition in *Porphyridium cruentum*. *Food. Ferment. Ind.* 31, 105–106.
- [44] Yin HC, Sui JK, Han TL, Liu TZ and Wang H (2022) Integration Bioprocess of B-Phycoerythrin and Exopolysaccharides Production From Photosynthetic Microalga *Porphyridium cruentum*. *Front. Mar Sci* 8:836370.
- [45] Li, Y., Wu, S., Chen, H., Xiao, W., Li, C., Peng, Z., Li, Z., Liu, J., Lin, L., & Zeng, X. (2024). Inorganic salt starvation improves the polysaccharide production and CO₂ fixation by *Porphyridium purpureum*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 47 (7), 1017–1026.
- [46] Li, S. Y., Shabtai, Y., & (Malis) Arad, S. (2000). Production and composition of the sulfated cell wall polysaccharide of *Porphyridium* (Rhodophyta) as affected by CO₂ concentration. *Phycologia* , 39 (4), 332–336.
- [47] Borovkov , AB; Gudvilovich , IN; Maltseva , IA; Rylkova , OA; Maltsev, YI Growth and B-Phycoerythrin Production of Red Microalga *Porphyridium purpureum* (Porphyridiales , Rhodophyta) under Different Carbon Supply. *Microorganisms* 2022, 10, 2124.
- [48] Soanen , N., Da Silva, E., Gardarin , C., Michaud, P., Laroche, C., Improvement of exopolysaccharide production by *Porphyridium marinum*, *Bioresource Technology* (2016).
- [49] Coward, T., Fuentes-Grünwald , C., Silkina , A., Oatley-Radcliffe, D.L., Llewellyn, G., & Lovitt , R.W. (2016). Utilizing light-emitting diodes of specific narrow wavelengths for the

optimization and co-production of multiple high-value compounds in *Porphyridium purpureum*. *Bioresource Technology*, 221 , 607–615.

[50] Huang, Z., Zhong, C., Dai, J., Li, S., Zheng, M., He, Y., Wang, M., & Chen, B. (2021). Simultaneous enhancement on renewable bioactive compounds from *Porphyridium cruentum* via a novel two-stage cultivation. *Algal Research*, 55 (102270), 102270.

[51] Gujar, A.; Cui, H.; Ji, C.; Kubar, SM; Li, R. Optimizing culture system to promote cell growth and optimizing culture system to promote cell growth and polysaccharide contents of *Porphyridium cruentum*. *Fresenius Environ. Bull.* 2020, 29, 6738–6747.

[52] Park, JBK, Craggs, RJ, Shilton, AN, 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresour. Technol.* 102, 35–42.

[53] PS Schulze, LA Barreira, HG Pereira, JA Perales, JC Varela, Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production, *Trends Biotechnol.* 32 (2014) 422–430

[54] You, T. and Barnett, SM (2004) Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochem. Eng J* 19:251-258.

[55] Iqbal, M., & Zarfar, S. I. (1993). Effects of photon flux density, CO₂, aeration rate, and inoculum density on growth and extracellular polysaccharide production by *Porphyridium cruentum*. *J. Folia Microbiol*, 38 (6), 509–514.

[56] Wang, S.-K., Stiles, A. R., Guo, C., & Liu, C.-Z. (2014). Microalgae cultivation in photobioreactors: An overview of light characteristics. *Engineering in Life Sciences*, 14 (6), 550–559.

[57] Glemser, M., Heining, M., Schmidt, J., Becker, A., Garbe, D., Buchholz, R., & Brück, T. (2016). Application of light-emitting diodes (LEDs) in cultivation of phototrophic microalgae: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (3), 1077–1088.

[58] Liqin, S., Wang, C., & Lei, S. (2008). Effects of light regime on extracellular polysaccharide production by *Porphyridium cruentum* cultured in flat plate photobioreactors. 2008 2nd *International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering*.

[59] Luo HP, Dahhan MH (2012) Airlift column photobioreactors for *Porphyridium* sp. culturing: Part I. effects of hydrodynamics and reactor geometry. *Biotech Bioeng* 109:932–941

[60] Merchuk JC, Gluz M, Mukmenev I (2000) Comparison of photobioreactors for cultivation of the red microalga *Porphyridium* sp. *J Chem Technol Biotechnol* 75:1119–1126

[61] Rodas-Zuluaga LI, Castillo-Zacarias C, Nunez-Goitia G, Martinez-Prado MA, Rodriguez-Rodriguez J, Lopez-Pacheco IY, Sosa -Hernandez JE, Iqbal HMN, Parra-Saldivar R (2021) Implementation of kLa-based strategy for scaling up *Porphyridium purpureum* (red marine microalgae) to produce high-value phycoerythrin, fatty acids, and proteins. *Mar Drugs* 19:29

- [62] Decamp, A., Martineau, E., Grizeau, D., Pruvost, J., & Gonçalves, O. (2023). Effects of the salinity on the biosynthesis of the polysaccharides of the marine microalgae *Porphyridium cruentum*. *Algal Research*, 71 (103089), 103089.
- [63] Lu, IF, Sung, MS, and Lee, TM (2006). Salinity stress and hydrogen peroxide regulation of antioxidant defense system in *Ulva fasciata*. *Mar. Biol.* 150 (1), 1–15.
- [64] Shetty, P., Gitau, M. M., and Maroti, G. (2019). Salinity stress responses and adaptation mechanisms in eukaryotic green microalgae. *Cells* 8 (12), 1657.
- [65] Xiao, R., and Zheng, Y. (2016). Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnol. Adv.* 34 (7), 1225–1244.
- [66] Lee, Y. K., Tan, H. M., and Low, C. S. (1989). Effect of salinity of medium on cellular fatty acid composition of marine alga *Porphyridium cruentum* (Rhodophyceae). *J. Appl. Phycol.* 1, 19–23.
- [67] Li Q, Chen Y, Liu X, Li Y, Xu J, Li T, Xiang W and Li A (2023) Effect of salinity on the biochemical characteristics and antioxidant activity of exopolysaccharide of *Porphyridium purpureum* FACHB 806. *Front. Mar. Sci.* 9:1097200.
- [68] Martínez-Roldán, A.J., Perales-Vela, H.V., Cañizares-Villanueva, R.O., and Torzillo, G. (2014). Physiological response of *Nannochloropsis* sp. to saline stress in laboratory batch cultures. *J. Appl. Phycol.* 26(1), 115–121.
- [69] Zhong, Q. W., Wei, B., Wang, S. J., Ke, S. Z., Chen, J. W., Zhang, H. W., *et al.* (2019). The antioxidant activity of polysaccharides derived from marine organisms: An overview. *Mar. Drugs* 17 (12), 674.
- [70] Steinberg, CEW, Hartmann, HM, 1988. Planktonic bloom-forming cyanobacteria and the eutrophication of lakes and rivers. *Freshw. Biol.* 20, 279–287.
- [71] Zhao, L.-S.; Li, K.; Wang, Q.-M.; Song, X.-Y.; Su, H.-N.; Xie, B.-B.; Zhang, X.-Y.; Huang, F.; Chen, X.-L.; Zhou, B.-C. Nitrogen Starvation Impacts the Photosynthetic Performance of *Porphyridium cruentum* as Revealed by Chlorophyll a Fluorescence. *Sci. Rep.* 2017, 7, 8542.
- [72] Tao You; Stanley M Barnett (2004). *Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of Porphyridium cruentum*. 19(3), 251–258.
- [73] Pancha, I.; Chokshi, K.; Maurya, R.; Trivedi, K.; Kumar-Patidar, S. Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresour. Technol.* 2015, 189, 341–348.
- [74] Medina-Cabrera, E.V., Rühmann, B., Schmid, J., & Sieber, V. (2020). Characterization and comparison of *Porphyridium sordidum* and *Porphyridium purpureum* concerning growth characteristics and polysaccharide production. *Algal Research*, 49 (101931), 101931.

- [75] S. Morin, M. Coste , F. Delmas, A comparison of specific growth rates of periphytic diatoms of varying cell size under laboratory and field conditions, *Hydrobiologia* 614 (2008) 285–297.
- [76] Li, T., Xu, J., Wu, H., Jiang, P., Chen, Z., & Xiang, W. (2019). Growth and biochemical composition of *Porphyridium purpureum* SCS-02 under different nitrogen concentrations. *Marine Drugs*, 17 (2), 124.
- [77] Lien T., Knutsen G., Synchronous cultures of *Chlamydomonas reinhardtii* . Synthesis of repressed and derepressed phosphatase during the life cycle, *Biochim . Biophys . Acta.*, 1972, 287, 154-163
- [78] Li, S., Ji, L., Chen, C., Zhao, S., Sun, M., Gao, Z., Wu, H., Fan, J., Efficient accumulation of high-value bioactive substances by carbon to nitrogen ratio regulation in marine microalgae *Porphyridium purpureum*, *Bioresource Technology* (2020)
- [80] Garza-Rodríguez, Z.B., Hernández-Pérez, J., Santacruz , A., Jacobo-Velázquez, D.A., & Benavides, J. (2022). Prospective on the application of abiotic stresses to enhance the industrial production of exopolysaccharides from microalgae. *Current Research in Biotechnology*, 4 , 439–444.
- [81] Raposo, MF, de Moraes, AM, de Moraes, RM, 2014. Influence of sulphate on the composition and antibacterial and antiviral properties of the exopolysaccharide from *Porphyridium cruentum*. *Life Sci.* 101 (1–2), 56–63
- [82] Costa, JAV; Lucas, B.F.; Alvarenga, AGP; Moreira, JB; de Moraes , MG Microalgae Polysaccharides: An Overview of Production, Characterization, and Potential Applications. *Polysaccharides* 2021, 2, 759–772.
- [83] Netanel Liberman, G., Ochbau, M., Malis Arad, S., Bitton, R., 2016. The sulfated polysaccharide from a marine red microalga as a platform for the incorporation of zinc ions. *Carbohydr . Polym .* 152, 658–664.
- [84] Raposo, MF, de Moraes, AM, de Moraes, RM, 2014. Influence of sulphate on the composition and antibacterial and antiviral properties of the exopolysaccharide from *Porphyridium cruentum*. *Life Sci.* 101 (1–2), 56–63
- [85] Sun, L.; Wang, C.; Shi, Q.; Ma, C. Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities. *Int. J. Biol. Macromol .* 2009, 45, 42–47
- [86] Liberman GN, Ochbaum G, Mejubovsky-Mikhelis R, Bitton SMA (2020) Physico -chemical characteristics of the sulfated polysaccharides of the red microalgae *Dixoniella grisea* and *Porphyridium aerugineum*. *Int J Biol Macromol* 145:1171–1179

- [87] Bernaerts , TMM; Kyomugasho , C.; Loooveren , NV; Gheysen , L.; Foubert , I.; Hendrickx , ME; Loey , AMV Molecular and rheological characterization of different cell wall fractions of *Porphyridium cruentum*. Carbohydr. Polym. 2018, 195, 542–550.
- [88] Lapidot M, Shrestha RP, Weinstein J, Arad SM (2010) Red Microalgae: from basic know-how to biotechnology, in: Seckbach J, Chapman DJ (eds) Red algae in the genomic age. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology, Springer, Dordrecht, vol. 13, pp. 205–225
- [89] Prybylski, N.; Toucheteau , C.; Alaoui , HE; Bridiau , N.; Maugard , T.; Abdelkafi , S.; Fendri, I.; Delattre, C.; Dubessay , P.; Pierre, G.; *et al.* Bioactive polysaccharides from microalgae. In Handbook of Microalgae-Based Processes and Products; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020; pp. 533–571
- [90] Pierre, G.; Delattre, C.; Dubessay, P.; Jubeau, S.; Vialleix, C.; Cadoret, J.-P.; Probert, I.; Michaud, P. What Is in Store for EPS Microalgae in the Next Decade? Molecules 2019, 24, 4296.
- [91] Pacholak, A., Gao, Z.L., Gong, X.Y., Kaczorek, E., and Cui, Y.W. (2021). The metabolic pathways of polyhydroxyalkanoates and exopolysaccharides synthesized by *Haloferax mediterranei* in response to elevated salinity. J. Proteomics 232, 104065.
- [92] Pereira, S., Zille , A., Micheletti, E., Moradas-Ferreira, P., De Philippis , R., and Tamagnini , P. (2009). Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: Composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. FEMS Microbiol. Rev. 33 (5), 917–941
- [93] Xie, J. H., Shen, MY, Nie, S. P., Liu, X., Zhang, H., and Xie, MY (2013). Analysis of monosaccharide composition of cyclocarya paliurus polysaccharide with anion exchange chromatography. Carb. Polym 98 (1), 976–981
- [94] Risjani , Y.; Mutmainnah , N.; Manurung , P.; Wulan , SN; Yunianta . Exopolysaccharide from *Porphyridium cruentum* (purpureum) is Not Toxic and Stimulates Immune Response against Vibriosis: The Assessment Using Zebrafish and White Shrimp *Litopenaeus vannamei* . Mar. Drugs 2021, 19, 133.7
- [95] Casas-Arrojo V, Decara J, de Los Ángeles Arrojo-Agudo M, Pérez- Manríquez C, Abdala-Díaz RT. Immunomodulatory, Antioxidant Activity and Cytotoxic Effect of Sulfated Polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. (S. F.Gray) Nægeli. Biomolecules. 2021 Mar 24;11(4):488.
- [96] García AB, Longo E, Murillo MC, Bermejo R. Using a B-Phycoerythrin Extract as a Natural Colorant: Application in Milk-Based Products. Molecules. 2021 Jan 8;26(2):297.
- [97] IVANOVA, JG *et al.* Antioxidant and Anticancer Potential of Extracellular Polysaccharide from *Porphyridium aerugineum* (Rhodophyta). Fermentation, vol. 10, no. 5, p. 259, 2024.

[98] Risjani Y, Mutmainnah N, Manurung P, Wulan SN, Yunianta . Exopolysaccharide from *Porphyridium cruentum* (*purpureum*) is Not Toxic and Stimulates Immune Response against Vibriosis: The Assessment Using Zebrafish and White Shrimp *Litopenaeus vannamei* . Mar Drugs. 2021 Feb 28;19(3):133.

MANUSCRITO 2

Atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos de *Porphyridium purpureum* frente a bactéria patogênicas da microbiota intestinal

Artigo a ser submetido em língua inglesa ao periódico: Natural Product Research (Fator de impacto: 2,48)

As normas de submissão podem ser acessadas por meio do endereço:
<https://www.tandfonline.com/action/authorSubmission?show=instructions&journalCode=gnpl>
[20](#)

A versão em língua portuguesa encontra-se nas páginas seguintes desta dissertação.

Atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos de *Porphyridium purpureum* frente a bactéria patogênicas da microbiota intestinal

Natália Popiorek dos Santos^a, Bruno Galler Kubelka^{a,b}, Clécio Fernando Klitzke^c, Marcelo Gonçalves Montes D'oca^{c,d}, Daniela Fernandes Ramos^{a,e*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.

^b AlgaSul Biotecnologia de Microalgas, Rio Grande, RS, Brasil.

^c Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

^d Laboratório Kolbe de Síntese Orgânica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

^e Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais Costeiros, Estação Marinha de Aquacultura, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.

*Correspondência: daniferamos@gmail.com; Tel.: + 55 53 3237-4634; Núcleo de Desenvolvimento de Novos Fármacos - NUDEFA, Rua General Osório, s/nº, Campus Saúde, 2º andar. Rio Grande, Rio Grande do Sul - Brasil. CEP: 96.200-400.

RESUMO:

Porphyridium purpureum é uma microalga vermelha com potencial biotecnológico pouco explorado. Avaliar sua ação sinérgica com antimicrobianos e sua atividade antioxidante pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas frente à resistência bacteriana. O extrato metanólico e hexânico de *P. purpureum* foram obtidos e testados frente a cepas bacterianas, isoladamente e em combinação com antibióticos. Já a atividade antioxidante foi avaliada pelo método ABAP/DCF, enquanto a composição química foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Embora os extratos não tenham demonstrado atividade antimicrobiana direta, revelaram efeito sinérgico com antibióticos, especialmente o extrato metanólico em combinação com ciprofloxacina, revertendo o perfil de resistência de *E. coli* para sensibilidade. Ambos os extratos exibiram atividade antioxidante, com análise química revelando a presença de ácidos graxos como ácidos araquidônico, linoleico e palmítico. Dessa forma, este estudo destaca o potencial dos extratos de *P. purpureum* como adjuvantes antimicrobianos e antioxidantes

Palavras-chaves: Rhodophyta; checkerboard assay; bioactive fatty acids; antimicrobial, intestinal microbiota.

1. Introdução

A resistência antimicrobiana (RAM) representa uma das maiores ameaças à saúde pública global (WHO, 2019). Estima-se que, entre 1990 e 2021, mais de 1 milhão de mortes tenham ocorrido por causa da resistência bacteriana, sendo que somente em 2019, aproximadamente 1,27 milhão de pessoas morreram por infecções causadas por bactérias resistentes, e outras 5 milhões de mortes associadas a esse tipo de infecção (GBD, 2021; Murray *et al.*, 2022). A perspectiva é que até 2050, a RAM poderá causar mais de 39 milhões de mortes em todo o mundo (GBD, 2021). Diante desse cenário, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece a resistência antimicrobiana como uma das dez principais ameaças à saúde pública e um desafio para o cumprimento dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (WHO, 2019).

Um dos principais fatores que impulsionam o avanço da RAM é o uso indiscriminado de antibióticos, que, além de favorecer a seleção de cepas resistentes, impacta negativamente a microbiota humana, especialmente a intestinal, que desempenha funções essenciais como digestão, síntese de vitaminas e regulação do sistema imunológico (Becattini *et al.*, 2016; Rinninella *et al.*, 2019; Chandra *et al.*, 2021). As alterações na composição dessa microbiota, conhecidas como disbiose, podem ser causadas por fatores como dieta, idade, infecções, doenças crônicas e, principalmente, o uso excessivo de antimicrobianos (Buttó *et al.*, 2015; Jochum e Stecher, 2020).

Em condições de disbiose, microrganismos comensais podem adquirir características patogênicas, tornando-se patobiontes. Diferentemente dos patógenos oportunistas, esses microrganismos coexistem em equilíbrio com o hospedeiro, mas, diante de perturbações da homeostase, podem desencadear processos inflamatórios e agravos à saúde (Mazmanian *et al.*, 2008; Chou *et al.*, 2022). A disbiose também favorece a proliferação de cepas resistentes e o aumento da suscetibilidade a infecções por patógenos (Matzaras *et al.*, 2022; Alm e Lahiri, 2020).

Entre os patógenos intestinais e que são alta prioridade da OMS para o desenvolvimento de novos antimicrobianos são *Salmonella enterica* Typhimurium, uma bactéria Gram-negativa, amplamente conhecida por meio da ingestão de alimentos contaminados e que tem demonstrado crescente resistência a antimicrobianos como ampicilina e cloranfenicol, exigindo o uso de fármacos mais potentes como fluoroquinolonas (Khan *et al.*, 2022). E *Staphylococcus aureus*, um patógeno Gram-positivo, comumente associado a infecções de pele, tecidos moles e à corrente sanguínea, sendo uma das principais causas de morbidade hospitalar (Tong *et al.*, 2015). Entretanto, também pode causar infecção alimentar através do consumo de produtos prontos para consumo, como leite, queijo e carne enlatada (Mourenza *et al.*, 2021), que podem conter

exotoxinas termoestáveis, responsáveis pelo desenvolvimento da intoxicação estafilocócica (Hennekinne *et al.*, 2012).

Infelizmente, o desenvolvimento de novos antimicrobianos não acompanha a velocidade da resistência bacteriana (WHO, 2023). Atualmente, dos 32 antibióticos em fase clínica, apenas quatro compostos inovadores visam os patógenos críticos definidos pela OMS, o que limita a eficácia a longo prazo (WHO, 2024; Gigante *et al.*, 2024). Esse cenário destaca a necessidade de novas abordagens terapêuticas, como antimicrobianos de espectro estreito ou compostos naturais com propriedades bioativas capazes de modular seletivamente a microbiota e inibir patógenos sem prejudicar as bactérias benéficas (Zhang *et al.*, 2022).

Uma alternativa é o uso de microalgas, como *Porphyridium purpureum*, conhecida por seu potencial biotecnológico devido à produção de exopolissacarídeos sulfatados, ácidos graxos, pigmentos e proteínas com atividade antimicrobiana e antioxidante (Guihéneuf e Stengel, 2015; Li *et al.*, 2024). Os exopolissacarídeos sulfatados (EPS) desta microalga, compõem uma camada de mucilagem externa (Bayu *et al.*, 2023), composta de monossacarídeos como xilose, galactose e glicose, além do sulfato (Gaignard *et al.*, 2019), cujas características estruturais inclui atividades antimicrobiana, antioxidante, antiviral e imunomoduladora (Gaignard *et al.*, 2019; Raposo *et al.*, 2015; Netanel *et al.*, 2020). Além disso, destaca-se pela composição lipídica, que inclui ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFAs), como o ácido eicosapentaenoico (EPA), o ácido docosahexaenoico (DHA) e o ácido araquidônico (ARA), e ácidos graxos saturados como o palmítico e o esteárico, que representam até 46% e 10% do total de lipídios, respectivamente (Bayu *et al.*, 2021; Saini e Keum, 2018). Esses compostos conferem à microalga propriedades anti-inflamatórias, cardiovasculares e neuroprotetoras, tornando seus derivados valiosos para as indústrias farmacêutica, cosmética e nutracêutica (Gaignard *et al.*, 2019).

Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos da microalga *P. purpureum* contra bactérias patogênicas resistentes e suas propriedades antioxidantes, visando a modulação da microbiota intestinal.

2. Resultados

2.1 Crescimento da biomassa de *P. purpureum*

Durante os nove dias de cultivo de *P. purpureum* em meio F/2, a microalga foi mantida

em condições controladas, utilizando-se água salgada natural com salinidade de 32 g/L, previamente tratada e enriquecida com nutrientes do meio F/2. O cultivo foi conduzido sob irradiância a 570 nm (12h/12), com temperatura média de 25 °C e pH em torno de 9. O volume total do cultivo foi de 15 litros, com monitoramento diário da taxa de crescimento por meio da densidade óptica a 750 nm.

Observou-se um crescimento logarítmico da biomassa durante o cultivo a partir dos dias 1 ao 8 dia de cultivo, conforme ilustrado na Figura 1. Foi possível observar nos primeiros dias (0–4) aumento da densidade óptica, de 0,063 (dia 0) para 0,374 (dia 4), demonstrando a adaptação e divisão celular no meio de cultivo. A partir do dia 8, o crescimento atingiu seu máximo (0,567), e após, no 9º dia leve redução (0,556), indicando o início da fase estacionária.

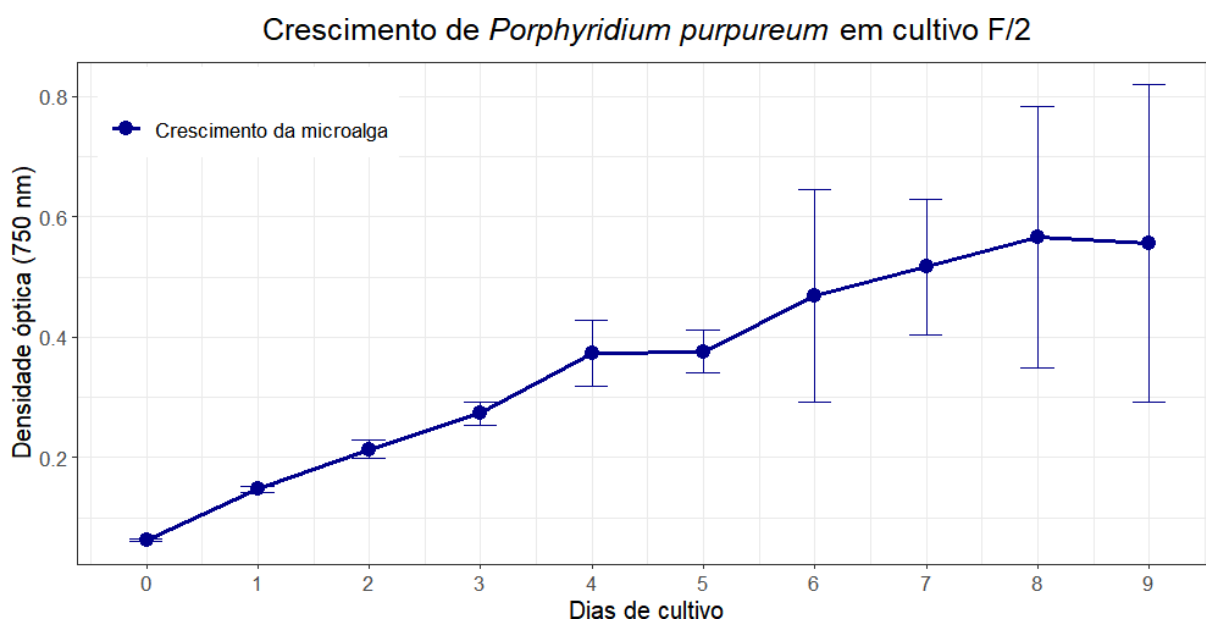


Figura 1: Crescimento de *P. purpureum* em meio de cultivo F/2 e irradiância a 570 nm. O gráfico mostra a densidade óptica (750 nm) ao longo de nove dias de cultivo, com médias e desvios padrão para o cultivo.

2.2 Rendimento extratos de *P. purpureum*

Após a secagem da biomassa úmida em liofilizador, foi possível obter o rendimento da biomassa de *P. purpureum* no processo de extração pelo método de esgotamento por percolação, utilizando uma proporção de 1:6 (biomassa (g)/solvente (mL)). Os rendimentos dos extratos variaram conforme a polaridade dos solventes, sendo que os valores referem-se à massa seca dos extratos obtida após a evaporação completa dos solventes por rotaevaporação. Dessa forma, o

extrato obtido com metanol apresentou o maior rendimento, alcançando 56% (p/p), enquanto o extraído com hexano resultou em 29,5% (p/p) (Figura 2).

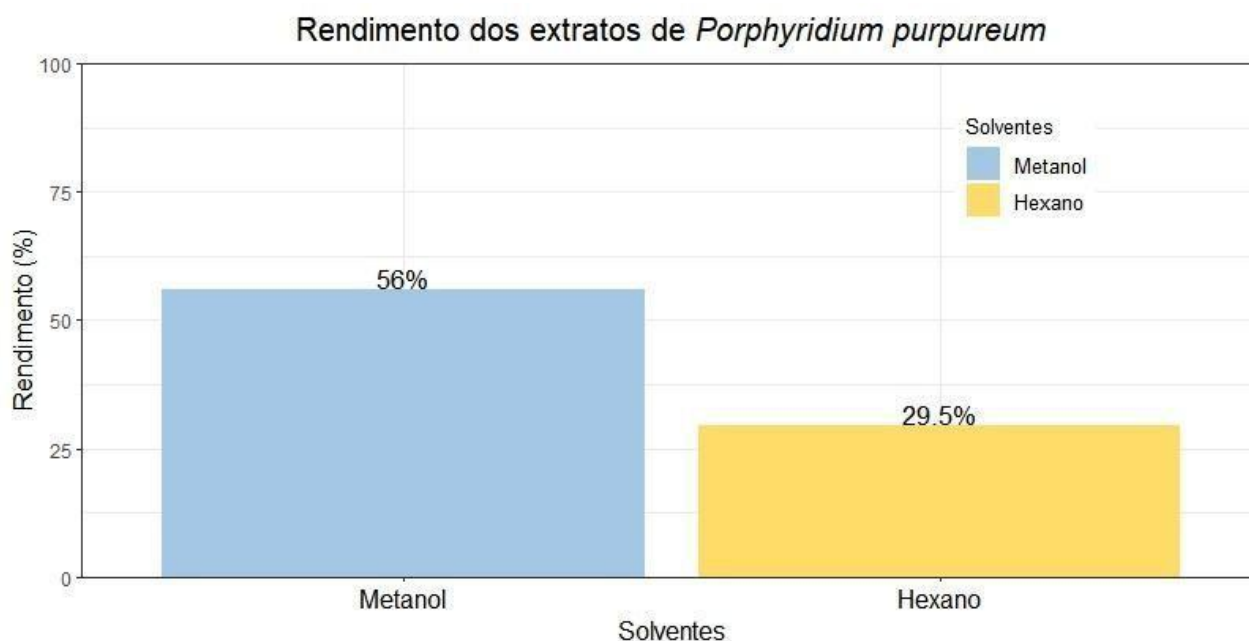


Figura 2. Rendimento dos extratos de *P. purpureum* sob diferentes polaridades dos solventes.

2.3 Avaliação da atividade antimicrobiana *P. purpureum*

2.3.1 Avaliação antimicrobiana dos extratos de *P. purpureum*

Na avaliação da atividade antimicrobiana através do método de microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), dos extratos de metanol e hexano *P. purpureum* nas concentrações de 800 µg/mL a 6,25 µg/mL, não apresentaram efeito inibitório contra as bactérias patogênicas intestinais (*S. typhimurium* e *S. aureus*), nem as patobiontes da microbiota (*E. coli* e *E. faecalis*). Além disso, os exopolissacarídeos (EPS) de *P. purpureum* também não demonstraram atividade antimicrobiana nas concentrações avaliadas. Da mesma forma, não foi observado efeito inibitório sobre a bactéria benéfica *Lactobacillus rhamnosus*, indicando que os extratos/exopolissacarídeos não afetam negativamente micro-organismos comensais importantes para a manutenção da saúde intestinal.

2.3.2 Avaliação da combinação dos extratos de *P. purpureum* com antibióticos

A avaliação da combinação dos extratos de *P. purpureum* com antibióticos frequentemente utilizados na clínica, utilizou-se o método de *Checkerboard* para determinar o Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI). De acordo com os critérios estabelecidos, valores de $FICI \leq 0,5$ indicam sinergia, ou seja, a combinação dos compostos aumenta a atividade inibitória. Os resultados obtidos para os extratos de *P. purpureum* demonstraram sinergismo com os antibióticos testados, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Sinergismo dos extratos de *P. purpureum* e antibióticos utilizados na clínica.

Bactéria	ATCC nº	Agente	CIM (µg/mL)		FIC	FICI	Interpretação
			Sozinho	Combinado			
<i>S. aureus</i>	12598	Vancomicina	8	4	0,5	0,50	Sinergismo
		PP metanol	800	6,25	0,007		
		Vancomicina	8	4	0,5	0,625	Indiferente
		PP hexano	800	100	0,125		
<i>S. typhimurium</i>	14028	Ciprofloxacino	8	2	0,25	0,25	Sinergismo
		PP metanol	800	6,25	0,007		
		Ciprofloxacino	8	8	1	1,50	Indiferente
		PP Hexano	800	400	0,5		
<i>E. coli</i>	25922	Ciprofloxacino	4	0,5	0,125	0,13	Sinergismo
		PP metanol	800	6,25	0,007		
		Ciprofloxacino	4	1	0,25	0,25	Sinergismo
		PP Hexano	800	6,25	0,007		
<i>E. faecalis</i>	51299	Ampicilina	4	1	0,25	0,38	Sinergismo
		PP metanol	800	100	0,125		
		Ampicilina	4	4	1	1,12	Indiferente
		PP hexano	800	100	0,125		

Legenda: PP: *Porphyridium purpureum*; ATCC: Código de identificação da cepa bacteriana fornecido pela American Type Culture Collection; CIM: Concentração Inibitória Mínima; FIC: Concentração Inibitória Fracionária; FICI: Índice de Concentração Inibitória Fracionária.

Os resultados demonstraram que o extrato metanólico apresentou efeito sinérgico quando combinado com a vancomicina contra *S. aureus*, promovendo a redução da CIM do antibiótico de 8 µg/mL para 4 µg/mL. Apesar da diminuição, a bactéria *S. aureus* ainda foi classificada como de sensibilidade intermediária (I), conforme os critérios do CLSI (2020) e apresentado na Tabela 2.

Esse mesmo extrato, na concentração de 6,25 µg/mL também potencializou a ação do ciprofloxacino contra *S. Typhimurium*, reduzindo a CIM do antibiótico de 8 µg/mL para 2 µg/mL, e contra *E. coli*, cuja CIM diminuiu de 4 µg/mL para 0,5 µg/mL. Nesse último caso, o perfil de resistência da bactéria, antes classificado como resistente (R), passou a ser sensível (S) para o antibiótico ciprofloxacino.

Além disso, o extrato metanólico mostrou sinergismo com a ampicilina contra *E. faecalis*, reduzindo sua CIM de 4 µg/mL para 1 µg/mL, porém a bactéria manteve a mesma classificação de sensibilidade sensível ao antibiótico. Também o extrato hexânico demonstrou atividade sinérgica quando combinado com ciprofloxacino contra *E. coli*, diminuindo a CIM do antibiótico de 4 µg/mL para 1 µg/mL, mas sem mudar a classificação de sensibilidade.

É importante destacar que os extratos foram utilizados nas menores concentrações testadas, variando de 800 a 6,25 µg/mL, e isoladamente não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano. No entanto, no método *Checkerboard*, observou-se sinergismo dos extratos com os antibióticos, evidenciando a potencialização da ação dos antibióticos. Ou seja, a combinação do extrato com o antibiótico resultou na redução da CIM dos antibióticos frente às bactérias testadas.

Por outro lado, a combinação da vancomicina com o extrato hexânico resultou em efeito apenas aditivo (FICI = 0,63), enquanto a associação da ampicilina com o mesmo extrato foi considerada indiferente (FICI = 1,13), indicando que os extratos não influenciaram a eficácia dos antibióticos.

Tabela 2: Classificação CLSI (2020) da sensibilidade das bactérias antes e após combinação dos antibióticos com extratos de *P. purpureum*.

Bactéria	Antibiótico	Extrato	Classificação CLSI - CIM (µg/mL)	
			Sozinho	Combinado
<i>S. aureus</i>	Vancomicina	PP metanol	8 (I)	4 (I)
<i>S. typhimurium</i>	Ciprofloxacino	PP metanol	8 (R)	2 (R)
<i>E. faecalis</i>	Ampicilina	PP metanol	4 (S)	1 (S)
<i>E. coli</i>	Ciprofloxacino	PP metanol	4 (R)	0,5 (S)
	Ciprofloxacino	PP hexano	4 (R)	1 (R)

Legenda: PP: *Porphyridium purpureum*; S (Sensível), I (Intermediário), R (Resistente) aos antibióticos.

2.4 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada com base na capacidade dos extratos de reduzir a fluorescência induzida pela oxidação do DCFH pelo composto ABAP, que causa estresse oxidativo. Dessa forma, quanto menor a fluorescência detectada, maior é o potencial antioxidante do extrato de *P. purpureum*. A avaliação foi realizada após 1 hora de exposição dos extratos obtidos com diferentes solventes (metanol e hexano), e os resultados foram expressos em termos

percentuais de inibição da fluorescência (%) (Figura 3).

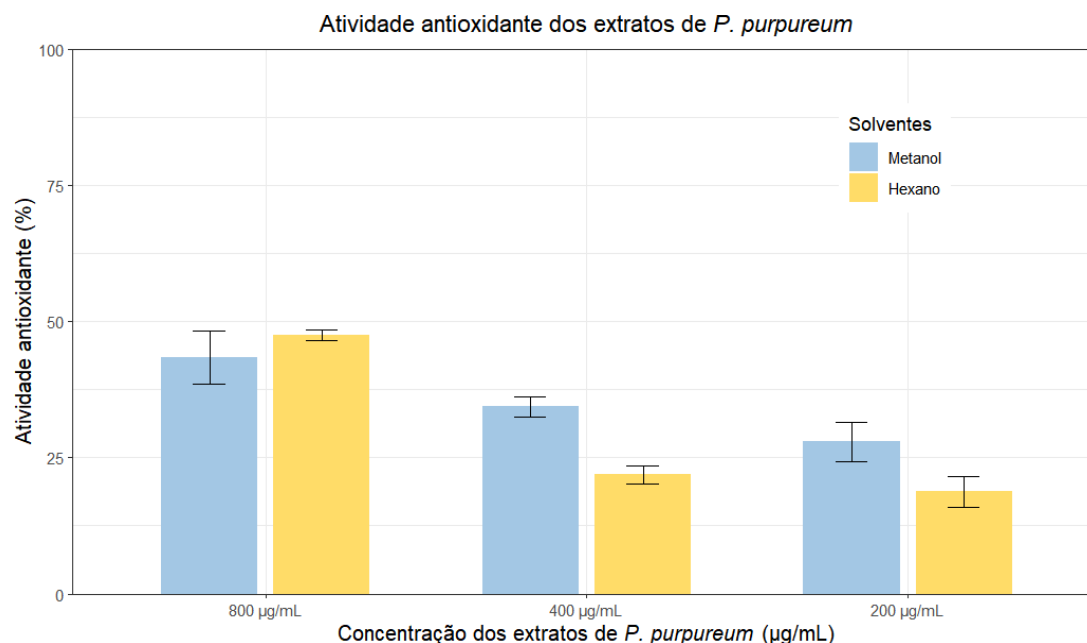


Figura 3. Atividade antioxidante dos extratos de *P. purpureum* na concentração de 800 µg/mL, 400 µg/mL e 200 µg/mL.

Os resultados indicam que a atividade antioxidante é dose-dependente, ou seja, à medida que a concentração do extrato aumenta, a atividade antioxidante também aumenta. Na concentração mais alta (800 µg/mL), o extrato metanólico apresentou uma atividade antioxidante de $43,36 \pm 4,89\%$, enquanto o extrato em hexano alcançou $47,46 \pm 0,97\%$. Na concentração intermediária (400 µg/mL), os valores foram de $34,35 \pm 1,88\%$ para metanol e $21,91 \pm 1,68\%$ para hexano. Já na menor concentração (200 µg/mL), observou-se uma atividade de $27,91 \pm 3,69\%$ no extrato metanólico e de $18,80 \pm 2,80\%$ no extrato hexânico.

Na análise estatística, a atividade antioxidante variou entre as concentrações testadas ($P = 0,0004$), independentemente do extrato utilizado. No entanto, não foi observada interação entre concentração e tipo de extrato ($P = 0,0877$).

Entre as concentrações do extrato metanólico, houve diferença significativa entre 800 µg/mL e 200 µg/mL ($P = 0,0287$), indicando maior atividade antioxidante na maior concentração.

Para o extrato hexânico, observou-se diferença significativa entre 800 µg/mL e 400 µg/mL ($P = 0,0018$) e entre 800 µg/mL e 200 µg/mL ($P = 0,0008$), mostrando que a maior concentração apresentou maior atividade antioxidante. Não houve diferença entre as concentrações de 400 µg/mL e 200 µg/mL ($P = 0,7964$).

Entre os extratos metanólico e hexânico dentro de cada concentração, não foram observadas diferenças em nenhuma das concentrações: 800 µg/mL ($P = 0,4050$), 400 µg/mL ($P = 0,0222$), e 200 µg/mL ($P = 0,0788$). Porém, a diferença em 400 µg/mL foi significativa ($P = 0,0222$), demonstrando maior atividade no extrato metanólico nessa concentração.

2.5 Caracterização dos compostos bioativos presentes em *P. purpureum*

2.5.1 Análise de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) dos exopolissacarídeos de *P. purpureum*

A partir da cultura de *P. purpureum*, foram extraídos exopolissacarídeos (EPS), com rendimento de 841 mg/L, obtido a partir de 1 mL de cultivo. Os EPS foram analisados por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), técnica na qual cada pico do espectro representa a vibração de uma ligação química específica presente na amostra, resultante da absorção de radiação infravermelha. O espectro FTIR foi representado em gráfico, o número de onda (cm^{-1}) no eixo horizontal e a transmitância (%) no eixo vertical (Figura 4).

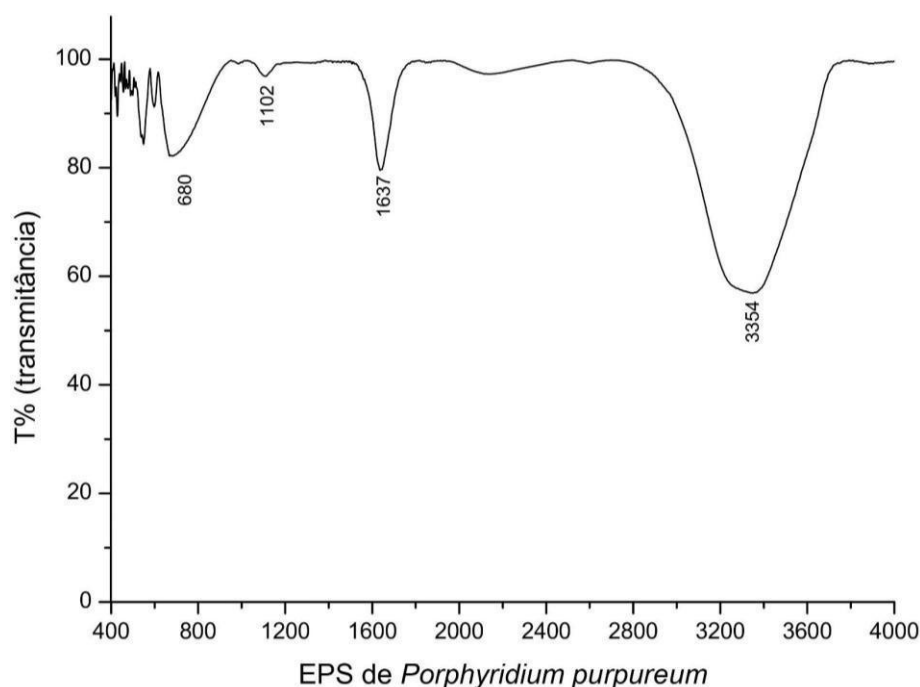


Figura 4. Espectro de FTIR de EPS de *P. purpureum*.

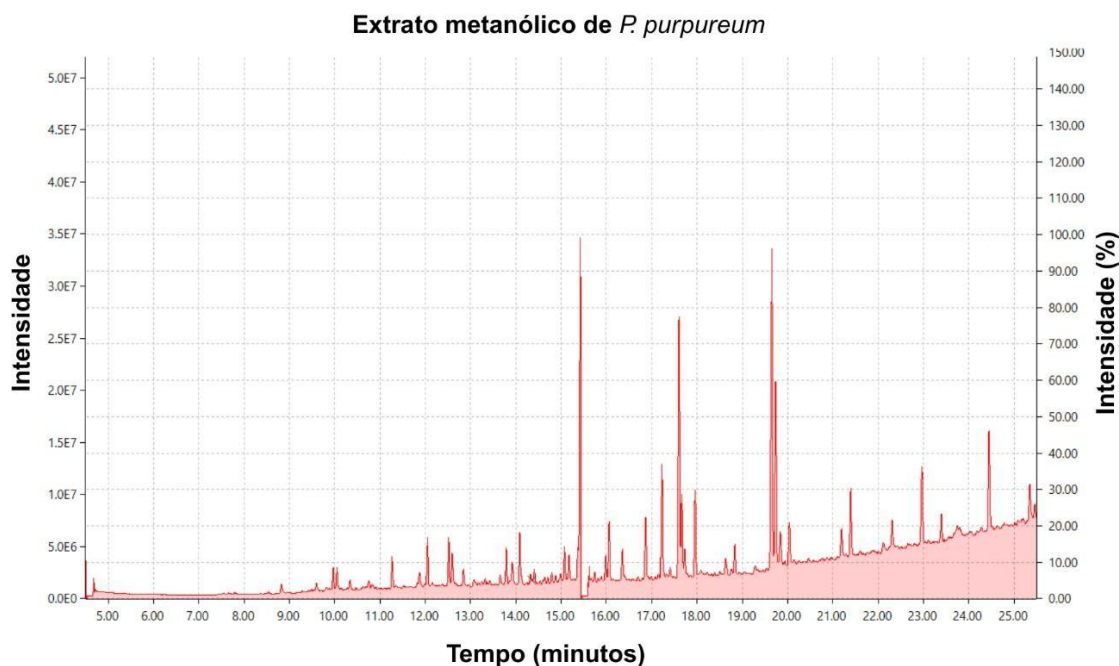
A interpretação dos picos do espectro de FTIR foi correlacionada com estudos que avaliaram exopolissacarídeos de *P. purpureum*. A banda de maior intensidade, observada em

3354 cm^{-1} , é característica da vibração de grupos hidroxila (-OH) (Karbowski *et al.*, 2011; Cristofoli *et al.*, 2023). A banda em 1637 cm^{-1} foi atribuída à vibração de grupos carbonila (C=O), o que sugere a presença de ácidos urônicos ou compostos com ligações amida (Delattre *et al.*, 2016). A absorção em 1102 cm^{-1} é associada às ligações glicosídicas C–O–C, podendo também estar relacionada a grupos sulfato (Ziadi *et al.*, 2018; Cristofoli *et al.* 2023). Por fim, o pico em 680 cm^{-1} indica possíveis ligações C–H (Jayaraman *et al.*, 2016).

2.5.2 Análise em Cromatografia Gasosa acoplado a Espectrometria de massas (CG-EM) dos extratos de *Porphyridium purpureum*

O perfil da biomassa de *P. purpureum* foi caracterizado por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM). As análises foram realizadas por 25 minutos utilizando um cromatógrafo gasoso Shimadzu modelo GC-2010 Plus – QP2010 SE, equipado com um injetor split/splitless acoplado a um detector de massa. A composição visual do cromatograma obtido a partir do extrato metanólico é apresentada na Figura 5.

Figura 5. Cromatograma de CG-EM de *P. purpureum* extrato metanólico.



Através da análise do cromatograma do extrato metanólico, foram identificados ácidos graxos, como o 5,8,11,14-eicosatetraenoato de metila (éster metílico do ácido araquidônico) (27,55% da área, TR 19,66 min), seguido pelo 9,12-octadecadienoato de metila (cis,cis)- (éster

metílico do ácido linoleico) (21,32%, TR 17,60 min) e o hexadecanoato de metila (éster metílico do ácido palmítico) (20,11%, TR 15,43 min). Também foram detectados em quantidades menores o 11-octadecenoato de metila (6,18%), o 2-metilbutanoato de fitila (5,32%) e o tetradecanoato de metila (éster metílico do ácido mirístico) (12,84%), conforme demonstrado na tabela 3.

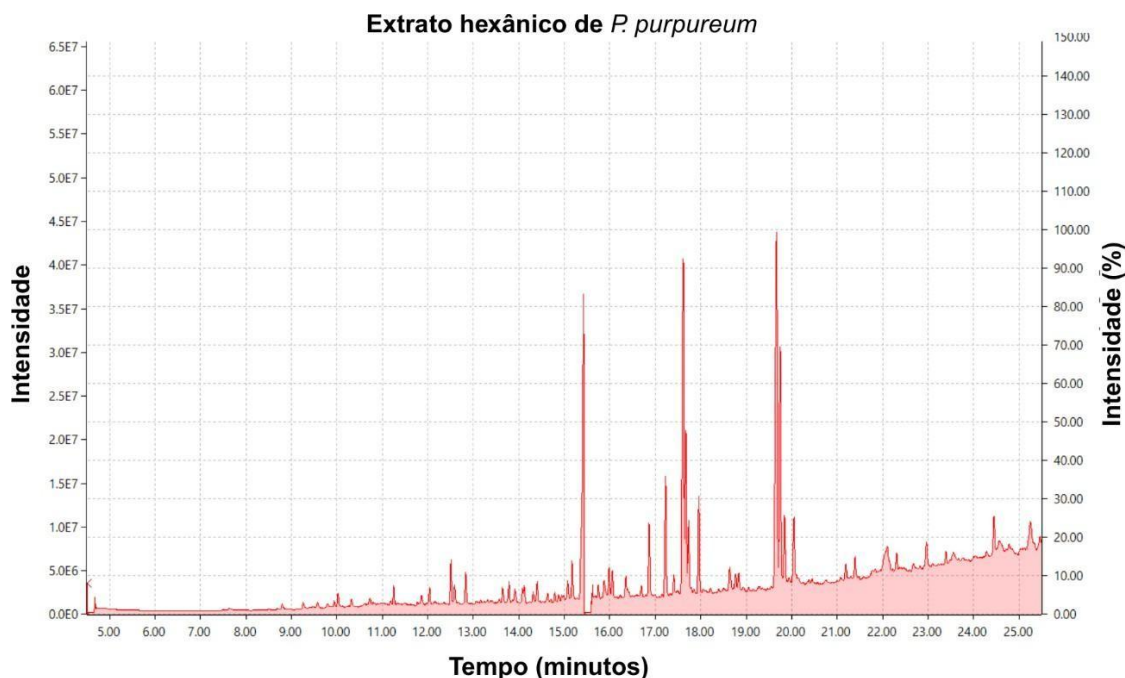
Tabela 3. Compostos identificados no extrato metanólico de *P. purpureum*, conforme análise por CG-EM.

Nº	Área (%)	TR*	Nome do Composto	Fórmula
1	12.84	1,35	Tetradecanoato de metila	C ₁₅ H ₃₀ O ₂
2	13.66	0,69	Pentadecanoato de metila	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
3	14.95	0,06	10,13-Dimetiltetradecanoato de metila	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
4	15.18	1,87	(Z)-Hexadec-11-enoato de metila	C ₁₇ H ₃₂ O ₂
5	15.37	3,84	Ácido palmitoleico	C ₁₆ H ₃₀ O ₂
6	15.43	20,11	Hexadecanoato de metila	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
7	16.70	0,35	Heptadecanoato de metila	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
8	16.87	5,32	2-Metilbutanoato de fitila	C ₂₅ H ₄₈ O ₂
9	17.41	0,77	Linolenato de metila	C ₁₉ H ₃₂ O ₂
10	17.60	21,32	9,12-Octadecadienoato de metila (cis,cis)-	C ₁₉ H ₃₄ O ₂
11	17.67	6,18	11-Octadecenoato de metila	C ₁₉ H ₃₆ O ₂
12	19.66	27,55	5,8,11,14-Eicosatetraenoato de metila (todos-cis)-	C ₂₁ H ₃₄ O ₂
13	19.85	2,33	8,11,14-Eicosatrienoato de metila (cis,cis,cis)--	C ₂₁ H ₃₆ O ₂
14	19.94	0,29	Docosapentaenoato de metila	C ₂₃ H ₃₆ O ₂
15	20.05	3,98	11,14-Eicosadienoato de metila	C ₂₁ H ₃₈ O ₂
16	20.06	3,98	Acetato de cis-7,cis-11-hexadecadien-1-ila	C ₁₈ H ₃₂ O ₂

Legenda: TR*: tempo de retenção em minutos.

O cromatograma obtido a partir do extrato hexânico está apresentado na Figura 6, e sua composição detalhada está descrita na Tabela 4.

Figura 6. Cromatograma de CG-EM de *P. purpureum* extrato hexânico.



No cromatograma do extrato hexânico, predominaram os ácidos graxos 5,8,11,14-eicosatetraenoato de metila (éster metílico do ácido araquidônico) (21,43%, TR 19,67 min), seguido por 9,12-octadecadienoato de metila (cis,cis) (éster metílico do ácido linoleico) (17,14%, TR 17,62 min) e hexadecanoato de metila (éster metílico do ácido palmítico) (14,64%, TR 15,43 min). Também foi detectado o 5,8,11,14,17-eicosapentaenoato de metila (éster metílico do ácido eicosapentaenoico) (10,97%, TR 19,75 min), composto que esteve ausente no extrato metanólico.

Tabela 4. Compostos identificados no extrato hexânico de *P. purpureum*, conforme análise por CG-EM.

Nº	Área (%)	TR*	Nome do Composto	Fórmula
1	12.84	1.23	Tetradecanoato de metila	C ₁₅ H ₃₀ O ₂
2	13.16	0.14	Undecanodioato de dimetila	C ₁₃ H ₂₄ O ₄
3	14.13	0.72	Pentadecanoato de metila	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
4	14.95	0.21	Hexadecanoato de metila	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
5	15.17	1.54	(Z)-9-Hexadecenoato de metila	C ₁₇ H ₃₂ O ₂
6	15.38	3.71	(Z)-7-Hexadecenoato de metila	C ₁₇ H ₃₂ O ₂
7	15.43	14.64	Hexadecanoato de metila	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
8	15.87	1.09	Ácido hexadecanoico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
9	16.7	0.43	Heptadecanoato de metila	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
10	16.87	3.22	2-Metilbutanoato de fitila	C ₂₅ H ₄₈ O ₂
11	17.41	0.76	Linolenato de metila	C ₁₉ H ₃₂ O ₂
12	17.62	17.14	9,12-Octadecadienoato de metila (cis,cis)-	C ₁₉ H ₃₄ O ₂
13	17.67	6.72	cis-13-Octadecenoato de metila	C ₁₉ H ₃₆ O ₂

14	17.73	1.83	trans-13-Octadecenoato de metila	C ₁₉ H ₃₆ O ₂
15	17.85	0.12	11-Octadecenoato de metila	C ₁₉ H ₃₆ O ₂
16	17.96	3.84	Estearato de metila	C ₁₉ H ₃₈ O ₂
17	18.05	0.21	(E)-11-Metiloctadec-12-enoato de metila	C ₂₀ H ₃₈ O ₂
18	19.06	0.17	cis-10-Nonadecenoato de metila	C ₂₀ H ₃₈ O ₂
19	19.67	21.43	5,8,11,14-Eicosatetraenoato de metila (todos-cis)-	C ₂₁ H ₃₄ O ₂
20	19.75	10.97	5,8,11,14,17-Eicosapentaenoato de metila (todos-cis)-	C ₂₁ H ₃₂ O ₂
21	19.85	2.41	8,11,14-Eicosatrienoato de metila (cis,cis,cis)-	C ₂₁ H ₃₆ O ₂
22	20.05	3.46	cis-11,14-Eicosadienoato de metila	C ₂₁ H ₃₈ O ₂
23	20.06	3.46	11,14-Eicosadienoato de metila	C ₂₁ H ₃₈ O ₂
24	20.1	0.31	cis-13-Eicosenoato de metila	C ₂₁ H ₄₀ O ₂
25	20.38	0.24	Eicosanoato de metila	C ₂₁ H ₄₂ O ₂

Legenda: TR*: tempo de retenção em minutos.

Além disso, observou-se que os maiores picos em ambos os cromatogramas correspondem a 5,8,11,14-eicosatetraenoato de metila (éster metílico do ácido araquidônico), 9,12-octadecadienoato de metila (cis,cis)- (éster metílico do ácido linoleico) e hexadecanoato de metila (éster metílico do ácido palmítico), indicando similaridade nos compostos majoritários de ambos os extratos.

2.6 Avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade *in vitro* dos extratos metanólico e hexânico de *P. purpureum* foi avaliada em células da linhagem Vero através do ensaio colorimétrico de resazurina. As células foram expostas por 24 horas a diferentes concentrações dos extratos (1600 µg/mL - 200 µg/mL). Para o extrato metanólico não foi observada citotoxicidade nas concentrações testadas (IC₅₀ = >1600 µg/mL). Por outro lado, o extrato hexânico demonstrou toxicidade, com IC₅₀ calculada em 131,54 µg/mL.

A seletividade dos extratos foi avaliada pelo Índice de Seletividade (IS), calculado pela entre o IC₅₀ em células Vero e a CIM obtida na combinação entre os extratos e antibióticos que deram sinergismo, conforme Tabela 5. Dessa forma, o Índice de Seletividade (IS) funciona como um indicador da segurança farmacológica do extrato. Valores elevados de IS apontam para uma maior seletividade contra o microrganismo e menor toxicidade para as células Vero.

Tabela 5. Índice de seletividade dos extratos de *P. Purpureum*.

Bactéria	ATCC	Extrato	CIM combinado (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IS
<i>S. aureus</i>	12598	PP metanol	6,25	1.600	256
<i>S. typhimurium</i>	14028	PP metanol	6,25	1.600	256
<i>E. faecalis</i>	51299	PP metanol	100	1.600	16
<i>E. coli</i>	25922	PP metanol	6,25	1.600	256
		PP Hexano	6,25	131,54	21,05

Legenda: PP: *Porphyridium purpureum*; ATCC: Código de identificação da cepa bacteriana fornecido pela American Type Culture Collection; CIM: Concentração Inibitória Mínima; IC₅₀: Concentração inibitória para 50% das células Vero; IS: Índice de Seletividade.

3. Discussão

3.1 Crescimento da biomassa de *P. purpureum*

O cultivo de *P. purpureum* em meio F/2 exibiu um padrão de desenvolvimento em observação com outros estudos que avaliaram seu crescimento em fotobiorreatores utilizando o mesmo meio (Fuentes-Grünwald *et al.*, 2015; Coward *et al.*, 2016). Inicialmente, nos primeiros dois dias, observou-se a fase *lag*, correspondente ao período de adaptação das células ao novo meio de cultura, caracterizada por uma menor taxa de crescimento (Borovkov *et al.*, 2025). A partir do 2º até o 8º dia, a cultura entrou em fase de crescimento exponencial, período que registrou maior taxa de acúmulo de biomassa e em seguida no nono dia, caracterizando o início da fase estacionária, período em que ocorre o esgotamento de um ou mais nutrientes essenciais para divisão celular ou o auto-sombreamento no cultivo devido a alta densidade celular (Luo *et al.*, 2017).

3.2 Rendimento do processo extrativo de *P. Purpureum*

Estudos sobre a extração da biomassa de *P. purpureum* ainda são incipientes de investigações de ensaios experimentais. A maioria dos estudos tem como foco a extração e a avaliação de compostos específicos presentes na biomassa de microalgas, como exopolissacarídeos (Risjani *et al.*, 2021), pigmentos (Ardiles *et al.*, 2020; Garcia *et al.*, 2021) e ácidos graxos (Li *et al.*, 2021), os quais são isolados previamente antes dos testes biológicos (Li

et al., 2021; Huang *et al.*, 2021; Nguyen *et al.*, 2024). Diferentemente, nosso estudo se destaca por testar diretamente o extrato da microalga *P. purpureum*, além dos EPS isolados. Para isso, foi realizada a produção dos extratos por meio do método de esgotamento por percolação proposto por D'Oca *et al.* (2011), que apresenta vantagens como economia de solvente e simplicidade operacional.

Nossos resultados demonstraram uma maior eficiência do metanol (56% p/p) como solvente na extração de biomassa de *P. purpureum*. Isso pode ser atribuído à sua natureza polar, que favorece a solubilização e, conseqüentemente, a extração de compostos polares presentes na microalga, como os polissacarídeos sulfatados e pigmentos (Gairola *et al.*, 2021). Portanto é importante destacar que, embora os polissacarídeos possam estar presentes no extrato metanólico, eles não foram identificados na análise de cromatografia gasosa, possivelmente devido às limitações dessa técnica na identificação de macromoléculas de alta massa molar e baixa volatilidade (Otero *et al.*, 2021).

Ainda assim, foram identificados 15 compostos no extrato metanólico, evidenciando sua eficácia na extração de diferentes substâncias, o que é esperado considerando que *P. purpureum* é rica em compostos polares como polissacarídeos sulfatados extracelulares e proteínas, incluindo ficoeritrina (Li *et al.*, 2019). Por outro lado, o extrato hexânico, um solvente de natureza apolar, apresentou menor rendimento de extração (29,5% p/p), mas demonstra maior seletividade para compostos apolares, como lipídios e outras moléculas hidrofóbicas (Zarrinmehr *et al.*, 2022). Esta seletividade do hexano para a fração lipídica e outros compostos apolares, como carotenoides, em *P. purpureum* é bem documentada, sendo a alga uma fonte reconhecida desses tipos de moléculas (Nguyen *et al.*, 2024). Isso é corroborado pelos dados cromatográficos, nos quais foram identificados 25 compostos no extrato hexânico, refletindo sua capacidade de extrair substâncias apolares.

3.3 Avaliação da atividade antimicrobiana *P. purpureum*

3.3.1 Atividade antimicrobiana da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Na avaliação da atividade antimicrobiana por microdiluição, nossos extratos de *P. purpureum* não apresentaram efeito inibitório pela CIM contra as cepas patogênicas de *S. typhimurium* e *S. aureus*, nem contra as patobiontes da microbiota intestinal (*E. coli* e *E. faecalis*) em concentrações que variaram de 800 µg/mL a 6,25 µg/mL. Esse resultado difere dos achados

de Gargouch *et al.* (2021), que relataram atividade antimicrobiana de exopolissacarídeos de *P. marinum* frente a *E. coli* e *Salmonella* sp., assim como o estudo de Najdenski *et al.* (2013), que demonstraram ação da ficobiliproteínas isoladas de *P. aerugineum* e *P. cruentum* contra *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus* e *S. typhimurium*. Também, Raposo *et al.* (2014) descrevem atividade de *P. cruentum* contra *E. coli*, *S. enteritidis* e *S. aureus*. Todos esses estudos utilizaram o ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) para avaliar a atividade antimicrobiana. Porém, a diferença nos nossos resultados em comparação a esses artigos pode ser atribuída devido à diversidade entre as cepas de *Porphyridium* sp., além de condições de cultivo diferentes para biomassa, o método de extração e ao tipo de solvente utilizado (Raposo *et al.*, 2014). Além disso, no nosso estudo foi utilizado o extrato de *Porphyridium* e não compostos isolados, fator que pode impactar na atividade antimicrobiana.

Por outro lado, o presente estudo não evidenciou inibição da CIM sobre a bactéria benéfica *Lactobacillus rhamnosus*, que é essencial para a homeostase e a prevenção de infecções na microbiota gastrointestinal (Capurso, 2019). Embora a maioria das pesquisas envolvendo *Porphyridium* sp. concentrem-se na atividade contra bactérias patogênicas (Najdenski *et al.*, 2013; Raposo *et al.*, 2014; Liberman *et al.*, 2020; Gargouch *et al.*, 2021), a avaliação do impacto sobre a microbiota benéfica constitui um diferencial em nosso estudo. Visto que no desenvolvimento de novos antimicrobianos, torna-se fundamental garantir que as bactérias benéficas não sejam prejudicadas, prevenindo, assim, a disbiose intestinal (Matzaras *et al.*, 2022).

3.3.1 Atividade antimicrobiana do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI)

Os estudos que avaliam o sinergismo da atividade antimicrobiana de *Porphyridium* sp. ainda é incipiente. Até o momento, apenas Netanel *et al.* (2016) têm demonstrado que exopolissacarídeos de *Porphyridium* sp. junto com íons de zinco tem efeito sinérgico em reduzir 72 % de *E. coli* e 35 % de *Bacillus subtilis*. Em nosso trabalho, o extrato metanólico de *P. purpureum* apresentou efeito sinérgico com três antibióticos: a vancomicina contra *S. aureus*, a ciprofloxacina contra *S. typhimurium* e *E. coli*, e a ampicilina contra *E. faecalis*. Já o extrato hexânico mostrou sinergismo apenas com ciprofloxacina em *E. coli*. Esses achados corroboram com resultados de outros produtos naturais, por exemplo curcumina combinada com vancomicina diminuiu a CIM em 17 de 20 cepas de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), com FICI entre 0,04 e 0,56. E extratos aquosos de *Rheum palmatum* reduziram a CIM da vancomicina contra MRSA de 2 para 0,03 µg/mL (FICI = 0,25), valor próximo ao observado em nosso trabalho (FICI = 0,50) (Guleria *et al.*, 2025; He *et al.*, 2024).

Quanto à ciprofloxacina, extratos metanólicos de bagaço de uva, ricos em compostos fenólicos, mostraram sinergia contra *E. coli* e *S. aureus*, com FICI variando de 0,031 a 0,155 e 0,028, respectivamente, sendo parecido com nosso FICI de 0,13 (Sanhueza *et al.*, 2017). De modo semelhante, extratos hexânicos de *Carum copticum* tiveram sinergia com ciprofloxacina contra *E. coli* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), (FICI 0,093–0,25) (Maheshwari *et al.*, 2019). Ainda que pouco explorada, a sinergia entre a ciprofloxacina e extratos vegetais frente a *S. typhimurium* foi descrita por Mark *et al.* (2011) com *Levisticum officinale* (FICI = 0,46). No entanto, nosso resultado (FICI = 0,25) a sinergia teve uma maior redução CIM da ciprofloxacina, o que sugere um potencial maior de modulação da atividade antimicrobiana contra essa espécie. Para *E. faecalis*, extratos metanólicos de *Acacia mearnsii* combinados com amoxicilina apresentaram FICI de 0,0703 a 0,3125, e extratos de *Azela africana* com ampicilina reduziram $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL, tendo nosso FICI de 0,38 sido consistentemente sinérgico (Aiyegoro *et al.*, 2011; Olajuyigbe *et al.*, 2012).

A literatura atribui esse sinergismo a múltiplos mecanismos como exemplo compostos polares presentes nos extratos podem inibir bombas de efluxo, perturbar a membrana externa em bactérias Gram-negativas, além de interferir na atividade de enzimas bacterianas, como β -lactamases, facilitando a ação de β -lactâmicos (Maia *et al.*, 2018; Basavegowda *et al.*, 2022).

Já os extratos apolares, ricos em lipídios e terpenos, promovem aumento da fluidez ou porosidade da membrana, que acaba potencializando a penetração dos fármacos (Basavegowda *et al.*, 2022). Estes resultados no nosso estudo reforçam que combinações de extratos de *Porphyridium* sp. com antibióticos podem ser uma alternativa para o combate à resistência antimicrobiana e uma alternativa para adjuvantes em terapias antimicrobianas (Guglielmi *et al.*, 2020). No entanto, são necessárias mais investigações para compreender os mecanismos de ação envolvidos na sinergia, considerando a complexidade estrutural dos extratos e a diversidade dos alvos bacterianos. Da mesma forma, os efeitos observados na MIC de *Lactobacillus rhamnosus* também exigem estudos mais aprofundados, a fim de compreender melhor a influência dos compostos bioativos sobre bactérias benéficas.

3.4 Atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante em *Porphyridium* sp. é abordada por diferentes métodos na literatura, como DPPH (Liberti *et al.*, 2023), ABTS (Li *et al.*, 2021) e FRAP (Liberti *et al.*, 2023). Em nosso estudo optamos por utilizar o método do DCFH/ABAP, devido a sua

capacidade de gerar radicais livres em ambiente controlado a temperaturas fisiológicas (Kin *et al.*, 2020). Os resultados obtidos demonstram que a atividade antioxidante dos extratos de *P. purpureum* é dose-dependente, com aumento na capacidade antioxidante conforme a concentração dos extratos aumenta (Li *et al.*, 2023). Entre os trabalhos que avaliaram os extratos de *Porphyridium*, apenas o trabalho de Casas-Arrojo *et al.* (2021) investigou o extrato aquoso de *P. cruentum*, reportando uma inibição de 29,33% no ensaio ABTS com na concentração de 200 µg/mL do extrato. Embora os métodos experimentais sejam diferentes do nosso, esse estudo é uma das poucas referências disponíveis utilizando essa espécie.

A tendência de aumento da atividade com a concentração é similar a estudos anteriores que associam o potencial antioxidante dos exopolissacarídeos (EPS) ao seu peso molecular e à composição química. Por exemplo, Sun *et al.* (2009) observaram maior atividade antioxidante em fragmentos menores de EPS (6,5 kDa), enquanto fragmentos maiores (60,6 e 256 kDa) apresentaram menor atividade. No presente estudo, embora o peso molecular dos EPS não tenha sido determinado, a análise por CG-EM não indicou a presença de exopolissacarídeos nos extratos obtidos, o que sugere que a atividade antioxidante observada pode estar relacionada a outros metabólitos bioativos, diferentes dos EPS, com maior solubilidade nos solventes utilizados. Já Tannin-Spitz *et al.* (2005) destacam a importância do teor de sulfato e presença de glicoproteínas na atividade antioxidante dos EPS de *Porphyridium*. Considerando que o extrato metanólico tende a extrair compostos mais polares como polissacarídeos sulfatados e compostos fenólicos (Harb *et al.*, 2021). Por outro lado, o extrato hexânico, também apresentou atividade antioxidante, sugerindo a presença de compostos lipofílicos bioativos, como carotenoides e ácidos graxos com potencial antioxidante (Zhou *et al.*, 2022).

A presença de compostos com atividades antioxidante e antimicrobiana é importante, visto que o estresse oxidativo está frequentemente associado à resistência bacteriana (Hervet-Hernández e Goñi, 2011). Dessa forma, compostos antioxidantes podem atuar como adjuvantes, modulando a resposta bacteriana ao estresse e potencializando a eficácia de antibióticos (Riaz *et al.*, 2021; Shandilya *et al.*, 2022). Esses achados reforçam o potencial dos extratos de *Porphyridium sp.* como candidatos multifuncionais em terapias antimicrobianas combinadas.

3.5 Caracterização dos compostos bioativos presentes em *P. Purpureum*

3.5.1 Caracterização grupos funcionais exopolissacarídeo *P. purpureum*

Os resultados obtidos neste estudo estão em concordância com os dados apresentados em diversos artigos que caracterizam os polissacarídeos de *Porphyridium* pelo método FTIR. As bandas localizadas entre 3545–3200 cm^{-1} são atribuídas à presença de grupos hidroxila (-OH) dos polissacarídeos, como relatado por Karbowiak *et al.* (2011), e foram observadas no nosso trabalho por meio da banda larga em 3341 cm^{-1} . Cristofoli *et al.* (2023) também associam essa faixa à solubilidade em água dos EPS e à presença de açúcares com grupos hidroxila livres. A banda em 1640 cm^{-1} é compatível com absorções típicas de grupos carbonila (C=O), localizadas entre 1500–1710 cm^{-1} , sendo atribuídas à presença de ácidos urônicos ou ligações amida, conforme discutido por Fernando *et al.* (2017).

O pico em 1108 cm^{-1} está dentro da região característica de polissacarídeos sulfatados de microalgas e está associado às ligações glicosídicas C–O–C presentes nas unidades estruturais dos polissacarídeos, segundo Ziadi *et al.* (2018) e Cristofoli *et al.* (2023). Além disso, Mandal *et al.* (2011) relacionam essa faixa à presença de grupos sulfato, que conferem carga negativa aos EPS. Por fim, a absorção em 680 cm^{-1} pode estar relacionada a modos vibracionais da cadeia principal dos carboidratos ou à presença de ligações C–H, conforme sugerido por Jayaraman *et al.* (2016).

3.5.2 Caracterização química dos extratos de *P. purpureum*

A análise cromatográfica dos extratos metanólico e hexânico de *P. purpureum* demonstrou predominância de lipídios como ácido araquidônico (27,55% no metanol; 21,43% no hexano), ácido linoleico (21,32% no metanol; 17,14% no hexano), ácido palmítico (20,11% no metanol; 14,64% no hexano) e ácido palmitoleico (3,84% no metanol). Embora esses ácidos graxos sejam descritos por apresentarem atividades antimicrobianas (Petropoulos *et al.*, 2021; Saif *et al.*, 2025) e antioxidantes (Casas-Arrojo *et al.*, 2021; Anacleto-Santos *et al.*, 2025), em nosso estudo os extratos de *P. purpureum* não demonstraram atividade inibitória, sugerindo concentrações insuficientes dentro do extrato para atingir a CIM nas cepas bacterianas testadas. Como exemplo, no estudo de Shen *et al.*, (2025) a concentração necessária para o ácido araquidônico inibir o crescimento de *E. faecalis* é de >304 $\mu\text{g/mL}$, e em outro estudo é necessário 500 $\mu\text{g/mL}$ de ácido eicosapentaenoico para inibir a *E. coli* (Devi *et al.*, 2024).

Entretanto, o potencial bioativo dos extratos foi observado no sinergismo com antibióticos. A sinergia entre o extrato metanólico e a vancomicina contra *S. aureus*, pode ser atribuído à presença do ácido palmitoleico, capaz de permeabilizar a membrana de bactérias

Gram-positivas, induzindo aumento da permeabilidade e facilitando a ação de antibióticos (Shen *et al.*, 2025). Já o extrato hexânico contendo ácido eicosapentaenoico, apresentou sinergismo com ciprofloxacino contra *E. coli*, uma bactéria Gram-negativa. O ácido eicosapentaenoico, um ácido graxo poli-insaturado, também contribui para a permeabilização da membrana externa de bactérias Gram-negativas como *E. coli* e *P. aeruginosa*, aumentando a eficácia para a entrada do ciprofloxacino (Devi *et al.*, 2024). O fato de ambos os extratos compartilharem ácido araquidônico, ácido linoleico e ácido palmítico reforça a hipótese de que a presença de lipídios pode ser um adjuvante para facilitar o aumento da permeabilidade de membrana das bactérias (Das *et al.*, 2018; Upender *et al.*, 2023; Ham *et al.*, 2025).

Quanto à atividade antioxidante, estudos prévios corroboram o potencial antioxidante dos ácidos graxos presentes em *P. purpureum*. Por exemplo, uma fração sulfo glicolípídica (contendo 26,1% de ácido palmítico, 36,8% de ácido araquidônico e 16,6% de ácido eicosapentaenoico) isolada de *P. cruentum* apresentou atividade antioxidante, inibindo a geração do ânion superóxido *in vitro*, indicando que a presença de ácidos graxos auxilia na neutralização de espécies reativas de oxigênio (Bergé *et al.*, 2002). Além disso, em outro estudo, lipídios de *P. purpureum* que continham ácidos graxos polinsaturados como ácido araquidônico e ácido eicosapentaenoico, também demonstraram atividade antioxidante (Li *et al.*, 2021).

Em relação ao potencial antioxidante individual, o ácido palmítico demonstrou atividade antioxidante de 13,33% pelo método ORAC a 15,4 mg/mL (Anacleto-Santos *et al.*, 2025), sendo comumente listado em extratos vegetais com propriedade antioxidante (Agoramoorthy *et al.*, 2007; Yenigün *et al.*, 2024). Já ácido linoleico tem estudos que relatam baixa atividade frente ao radical DPPH (Fagali *et al.*, 2008), enquanto outros estudos destacam sua presença em óleos essenciais com atividade antioxidante (Fagali *et al.*, 2008; Yenigün *et al.*, 2024). Já os ácido araquidônico e ácido eicosapentaenoico foram identificados como antioxidantes em extratos aquosos de *P. cruentum* utilizados em cremes antioxidantes (Augustina *et al.*, 2020).

De forma geral, estudos demonstram que o ácido palmítico é um dos principais ácidos graxos saturados presentes em *P. purpureum* ou *P. cruentum*, com concentrações variando de 25% a 30,6% (Asgharpour *et al.*, 2015). No caso do ácido araquidônico, é relatado em *P. purpureum*, com concentrações variando amplamente de 1,3% a 36,8%, dependendo da fração lipídica e das condições de cultivo (Bauy *et al.*, 2019; Augustina *et al.*, 2020). O ácido linoleico é reportado em *P. cruentum* (Augustina *et al.*, 2020). As concentrações podem variar, por exemplo, 0,4% (Augustina *et al.*, 2020) ou entre 12,4% e 27,6% (Asgharpour *et al.*, 2015) do total de ácidos graxos.

Portanto, mesmo sem efeito antimicrobiano direto, os extratos de *P. purpureum* demonstram potencial biológico, especialmente como antioxidantes e adjuvantes antimicrobianos potencializando a ação dos antibióticos testados diminuindo a CIM. Esse potencial pode estar relacionado à diversidade de ácidos graxos caracterizados pelo CG-EM, que já são relatados por possuírem propriedades biológicas como ação anti-inflamatória (Banaszak *et al.*, 2024), hidratante (Joshi *et al.*, 2018) e imunomoduladora (Shanab *et al.*, 2028).

3.6 Determinação da citotoxicidade

A maioria dos estudos que avaliaram a citotoxicidade de *Porphyridium* sp. utilizaram os exopolissacarídeos (Huheihel *et al.*, 2002; Gardeva *et al.*, 2014; Risjani *et al.*, 2021) ou o pigmento ficoeritrina (Silva-Núñez *et al.*, 2023; Ji *et al.*, 2025;) isoladamente frente a diferentes linhagens celulares. Nosso estudo, até o momento, é o único que avalia a citotoxicidade dos extratos onde não foi observado a citotoxicidade do extrato metanólico ($IC_{50} = >1600 \mu\text{g/mL}$) e no hexânico apresentou IC_{50} de $131,54 \mu\text{g/mL}$. Nossos resultados corroboram com Huheihel *et al.* (2002), que também avaliaram os exopolissacarídeos frente a linhagem celular Vero, e não foi tóxico até $500 \mu\text{g/mL}$ mas demonstraram ser tóxicos a partir de 3 dias de crescimento celular na concentração de $1000 \mu\text{g/mL}$. Entretanto, em nosso estudo avaliamos apenas o crescimento celular após 24 horas de exposição aos extratos.

Além disso, a maioria dos estudos com *P. purpureum* concentra-se em avaliar a citotoxicidade em linhagens celulares tumorais (Gardeva *et al.*, 2014; Juin *et al.*, 2018; Nikolova *et al.*, 2019; Silva-Núñez *et al.*, 2023), sem considerar o efeito em células normais.

Há também escassez de estudos que avaliem o índice de seletividade (IS) de *Porphyridium* sp., uma vez que a maioria dos trabalhos foca na atividade antitumoral. Assim, nosso estudo contribui com a avaliação do IS, permitindo verificar se a concentração eficaz contra microrganismos apresenta baixa toxicidade para células normais de mamíferos, o que é importante no desenvolvimento de compostos bioativos com potencial antimicrobiano e antioxidante.

4. Experimental

4.1 Cultivo de *P. purpureum*

O cultivo e o preparo da biomassa de *P. purpureum* foi realizado em parceria com o spin-

off AlgaSul® Biotecnologia de Microalgas, localizada na cidade de Rio Grande - RS. Para o cultivo foi utilizado um fotobiorreator de 15 L instalado em estufa agrícola. O cultivo ocorreu em água salgada natural (32 g/L), previamente tratada e enriquecida com meio F/2, seguindo um sistema de batelada (Guillard, 1975). Durante o experimento, que teve duração de aproximadamente nove dias, a cultura foi submetida a um fotoperíodo de 12h/12h sob irradiação de luz a 570 nm.

A densidade óptica (DO) foi monitorada ao longo dos dias para avaliar a taxa de crescimento, enquanto o pH e a temperatura foram controlados, mantendo-se valores médios de 9 e 25 °C, respectivamente. Ao final do cultivo, a biomassa foi coletada por batelada e submetida a um processo de preparação que se iniciou com a floculação, utilizando Flopam a 3,3% (FO 4800 SH, SNF Floerger, Brasil, SP). A solução foi agitada a 100 rpm por 15 minutos para favorecer a aglutinação, seguida por um período de 10 minutos para sedimentação da biomassa, após o qual o sobrenadante foi removido por sifonagem. Após, a biomassa úmida foi submetida à secagem em liofilizador (-40° graus).

4.2 Preparação do extrato

Foram utilizados solventes de diferentes polaridades para a obtenção dos extratos: metanol (polar) e hexano (apolar). O preparo dos extratos seguiu uma proporção de 1:6 (biomassa (g)/solvente (mL)) e foi conduzido pelo método de esgotamento por percolação, realizado em três ciclos de 20 minutos em agitador magnético, protocolo adaptado de D'Oca *et al.* (2011).

Ao término do terceiro ciclo de extração, a solução extrativa foi filtrada em papel filtro e submetida à evaporação dos solventes por rotaevaporação, utilizando pressão atmosférica de 122 para o metanol e 156 para o hexano, com temperatura controlada entre 40 e 45 °C.

Os extratos secos foram então ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO) a 50%, alcançando uma concentração final de 40 mg/mL, destinada aos ensaios de atividade antimicrobiana e antioxidante. O extrato foi mantido sob refrigeração a 10 °C, em ambiente protegido da luz. Além disso, foi avaliado o rendimento do processo, comparando a massa obtida antes e após a rotaevaporação (p/p) (Figura 7).

$$\frac{\text{Valor inicial da biomassa (mg)} - 100\%}{\text{Valor solução extrativa (mg)} - \text{Rendimento (p/p)}}$$

Figura 7: Fórmula do rendimento dos extratos de *P. purpureum*.

4.2 Extração exopolissacarídeos

A extração dos exopolissacarídeos (EPS) foi realizada com base na metodologia de Cristofoli *et al.* (2023). Para isso, foram utilizados 1 mL do cultivo de *P. purpureum*, ao qual foram adicionados 2 mL de etanol absoluto frio (1:2), seguido de banho ultrassônico por 20 min a 20 °C. Após, foi feito o armazenamento em refrigerador durante a noite para reduzir a solubilidade do EPS, seguido pela filtração do precipitado. O precipitado foi então lavado duas vezes com água Milli-Q e recuperado por centrifugação a 1000 rpm por 20 minutos. Após o segundo ciclo, o sobrenadante foi descartado, deixando apenas o pellet, que foi seco em um dessecador com sílica. Por fim, o rendimento da extração foi calculado (Figura 8), e o material armazenado em água Milli-Q atingindo a concentração final de 40 mg/mL e mantido sob refrigeração a 10 °C, em ambiente protegido da luz para posteriores análises.

$$\text{Rendimento (mg/L)} = \frac{\text{Biomassa seca EPS (g)}}{\text{Volume cultivo (L)}} \times 1000$$

Figura 8: Fórmula do rendimento dos exopolissacarídeos (EPS) de *P. purpureum*.

4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana

4.3.1 Preparo do inóculo bacteriano

As bactérias utilizadas na avaliação antimicrobiana foram obtidas do banco de cepas do Núcleo de Desenvolvimento de Novos Fármacos (NUDEFA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). As espécies testadas incluíram patobiontes da microbiota intestinal *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), potenciais patógenos intestinais *Salmonella enterica* Typhimurium (ATCC 14028) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 12598) e um benéfico para a microbiota intestinal, *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 7469). As cepas foram cultivadas em ágar Mueller-Hinton (MH), exceto *Lactobacillus rhamnosus*, que foi cultivada em ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS), conforme descrito por Aroutcheva *et al.* (2001). Após o preparo das placas, as bactérias foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

As suspensões bacterianas foram preparadas em tubos de ensaio, nos quais a bactéria foi inoculada em solução salina a 0,85% com o auxílio de uma alça de platina. O inóculo bacteriano foi ajustado à densidade óptica (DO₆₀₀) correspondente à escala 0,5 de McFarland (entre 0,080 e 0,100, equivalente aproximadamente 1×10⁸ células/mL). Por fim, foi realizada a diluição da

suspensão bacteriana nos meios MH e MRS na proporção de 1:100 (aproximadamente 5×10^5 células/mL), garantindo a padronização da concentração celular para os ensaios subsequentes (Aroutcheva *et al.*, 2001; CLSI, 2020).

4.3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, conforme as diretrizes do Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2020), utilizando microplacas de 96 poços. No momento da execução do ensaio, os extratos (40 mg/mL) foram diluídos em água destilada até atingirem a concentração de 800 µg/mL.

Cada poço da microplaca recebeu 50 µL de meio Mueller-Hinton (MH), seguido pela adição de 50 µL do extrato/EPS de *P. purpureum* no primeiro poço de cada coluna, no qual foi realizada uma microdiluição seriada (800 – 6,25 µg/mL). Em seguida, 50 µL do inóculo bacteriano de cada espécie testada foi adicionado aos respectivos poços. Foram incluídos controles para garantir a validade do experimento, tais como: controle de crescimento bacteriano (meio + inóculo), controle de esterilidade (apenas meio) e controle utilizando antibiótico de referência (avaliação da atividade do antibiótico Ciprofloxacino).

As microplacas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 horas, e posteriormente adicionou-se 30 µL de resazurina a 0,02%, utilizada como indicador de atividade celular. Após duas horas, a mudança de coloração nos poços revelou os resultados: a cor rosa indicou crescimento bacteriano, enquanto a cor azul indicou inibição do crescimento. A concentração inibitória mínima foi definida como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano. O experimento foi realizado em triplicata para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

4.3.3 Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI)

O Índice de Concentração Inibitória Fracionária (CIF) foi determinado utilizando microplacas de 96 poços (Bellio *et al.*, 2021). Cada poço da microplaca recebeu 50 µL de meio Mueller-Hinton (MH), seguido da adição de 50 µL do antibiótico utilizado na clínica, de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020), no primeiro poço de cada coluna. Para *Staphylococcus aureus*, utilizou-se Vancomicina, enquanto *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* Typhimurium foram testadas com Ciprofloxacino. Já

Enterococcus faecalis à Ampicilina. Os antibióticos foram preparados com concentração inicial de 32 µg/mL e submetidos a microdiluição seriada até 0,25 µg/mL.

Os extratos *P. purpureum* foram previamente diluídos em eppendorf com concentrações variando de 800 a 6,25 µg/mL em água destilada. Em seguida, 50 µL desses extratos foram adicionados aos poços das colunas 1 a 8 da microplaca, onde cada coluna representa uma concentração diferente. Por fim, 100 µL do inóculo bacteriano (v/v) correspondente a cada espécie testada foi adicionado aos respectivos poços.

Na mesma microplaca, foram avaliadas tanto a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato isolado quanto a do antibiótico. Também foram incluídos controles de validação experimental. As microplacas foram incubadas a 35±2 °C por 24 horas e, posteriormente, adicionou-se 30 µL de resazurina a 0,02%, utilizada como indicador de atividade celular. O experimento foi realizado em triplicata.

Por fim, foi calculado o Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI) (Figura 9) para avaliar a interação entre os extratos e os antibióticos. Valores de FIC ≤0,5 indicam sinergia, ou seja, a combinação dos compostos aumenta a atividade inibitória, enquanto que valores entre 0,5 - 4 indicam um efeito aditivo ou indiferente, sem aumento significativo da atividade inibitória ou apenas um ligeiro aumento. Já valores >4 indicam antagonismo, significando que a combinação dos compostos reduz a atividade inibitória.

$$FICI = \frac{Mic\ extrato\ combinado}{Mic\ extrato\ sozinho} + \frac{Mic\ antibiótico\ combinado}{Mic\ antibiótico\ sozinho}$$

Figura 9: Fórmula Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI).

4.4 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada adaptando o método descrito por Amado *et al.* (2009), utilizando o sistema ABAP/DCFH. O composto ABAP (2,2'-Azobis(2-amidinopropano) dihidroclorato) gera radicais livres, responsáveis por oxidar o DCFH (dicloro-hidrofluoresceína), convertendo-o no composto fluorescente DCF (dicloro-fluoresceína). Na presença dos extratos de *P. purpureum* o objetivo é que os compostos antioxidantes presentes nos extratos sejam capazes de neutralizar os radicais livres antes que estes possam oxidar o DCFH.

Dessa forma, a intensidade da fluorescência foi medida a 37 °C, com excitação em 485 nm e emissão em 520 nm, refletindo o nível de estresse oxidativo, em um leitor Plate reader Infinite® 200 PRO (Tecan). A atividade antioxidante dos extratos foi determinada com base na

sua capacidade de reduzir essa fluorescência, ou seja, quanto menor a fluorescência detectada pelo DCF, maior o potencial antioxidante do extrato.

O experimento foi realizado em triplicata, com leitura após uma hora de reação para cada concentração testada de extrato: 800 µg/mL, 400 µg/mL e 200 µg/mL. Como controle negativo, utilizou-se DMSO, veículo empregado na dissolução de compostos orgânicos.

Para análise dos resultados, calculou-se a fluorescência líquido (NF) pela diferença entre as leituras obtidas com e sem DCF, em seguida calculou-se a fluorescência na presença de ABAP e a fluorescência na ausência de ABAP, que serviu como controle basal para cada amostra. Por fim, foi medida a capacidade antioxidante pela seguinte fórmula na Figura 10, sendo que quanto maior o valor percentual obtido, mais eficaz é a capacidade do extrato em neutralizar os radicais livres. Esta abordagem permite uma avaliação quantitativa e comparativa do potencial antioxidante dos extratos testados.

$$Acap(\%) = \frac{\Delta Branco - \Delta Amostra}{\Delta Branco} \times 100$$

Figura 10: Fórmula para avaliação da atividade antioxidante.

Legenda: ΔBranco representa a diferença fluorescência líquida entre: controle positivo com ABAP - controle negativo sem ABAP; ΔAmostra representa a diferença de fluorescência líquida entre: amostra com ABAP - amostra sem ABAP.

4.5 Identificação de compostos bioativos do extrato de *P. purpureum*

4.5.1 Análise de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) do EPS de *P. purpureum*

Os exopolissacarídeos de *P. purpureum* foram analisados por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), no modo de transmitância, utilizando a técnica de Reflexão Total Atenuada (ATR) com cristal de diamante negro. As amostras foram escaneadas em uma faixa espectral de 400 a 4000 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹, conforme descrito por Cristofoli *et al.* (2023).

4.5.2 Análise em Cromatografia Gasosa acoplado a Espectrometria de massas (CG-EM) dos extratos de *P. purpureum*

Os extratos foram preparados a partir de 0,5 g de biomassa seca, distribuídos em tubos de ensaio (duas réplicas) contendo 3 mL de diferentes solventes hexano e metanol na proporção de 1:6 (biomassa (g)/solvente (mL)). O processo de extração seguiu o método de esgotamento por percolação, realizado em três ciclos de 20 minutos sob agitação magnética. Ao final do terceiro ciclo, a solução extrativa foi filtrada em papel filtro e concentrada por rotaevaporação.

Em seguida, 3 mL de trifluoreto de boro a 14% foram adicionados ao balão contendo a amostra, que foi transferida para um tubo de ensaio e aquecida em banho-maria a 70 °C por 20 minutos. Após o aquecimento, a solução foi lavada em um funil de separação com 15 mL de hexano e 20 mL de água destilada, separando-se as fases orgânica e aquosa. A fase orgânica foi novamente seca em rotaevaporador, e os resíduos foram ressuspensos com éter absoluto. Posteriormente, o éter foi evaporado, e a amostra foi solubilizada em hexano para análise no cromatógrafo gasoso (Metcalf e Schmitz, 1961).

O perfil dos extratos de *P. purpureum* foi caracterizado por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas. As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo gasoso Shimadzu modelo GC-2010 Plus – QP2010 SE, equipado com um injetor *split/splitless* acoplado a um detector de massa. A temperatura da interface do detector foi ajustada para 280 °C, enquanto a fonte operou a 230 °C. A detecção foi realizada em modo de varredura completa, com intervalo de m/z 30 a m/z 500 e tempo de varredura de 0,20 segundos. A ionização foi feita por impacto de elétrons a 70 eV.

O protocolo a seguir foi realizado conforme proposto por Borges *et al.* (2016). O injetor foi mantido a 250 °C, e a coluna seguiu um programa de temperatura iniciado em 80 °C, com um tempo inicial de estabilização de zero minutos, seguido por um gradiente de aquecimento de 10 °C por minuto até atingir 180 °C e, posteriormente, 7 °C por minuto até a temperatura final de 330 °C. O fluxo do gás de arraste, hélio analítico com pureza de 99,999%, foi de 1,3 mL por minuto, com pressão de 88,5 kPa e velocidade linear média de 42 cm por segundo. O volume de injeção foi de 1 µL, com razão de divisão (*split ratio*) de 1:100. A separação dos compostos foi realizada utilizando uma coluna capilar composta por 5% dimetil polisiloxano e 95% difenil.

Os componentes químicos presentes nos extratos de *P. purpureum* foram identificados utilizando a biblioteca NIST Mass Spectral Database 20 (2020), comparando a similaridade dos tempos de retenção dos compostos com os dados da biblioteca.

4.6 Atividade de citotoxicidade

Será avaliada a citotoxicidade do extrato de *P. purpureum* frente à linhagem celular Vero (ATCC 0245), conforme Pavan *et al.* (2010). As células serão cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), com 200 µL da suspensão celular (1×10^5 células/mL) adicionadas em uma placa de 96 poços. Após 24 horas de incubação a 37°C, as células serão expostas às concentrações dos extratos (1600 µg/mL - 200 µg/mL) por mais 24 horas. Após a exposição, 30 µL de resazurina (0,02%) diluída em DMEM serão adicionados, e a fluorescência será medida a 620 nm após 6 horas. Para avaliar a concentração inibitória (CI₅₀) dos extratos para reduzir em 50% a viabilidade celular foi realizada a seguinte fórmula da figura 11. Após, foi calculado o índice de seletividade (IS) através da razão entre a CI₅₀ e a concentração mínima inibitória (CMI) obtida nos ensaios antimicrobianos, conforme figura 12. Através desse cálculo é possível verificar que quanto maior o índice de seletividade, menor a toxicidade do extrato nas células.

$$IC_{50} = 1 - \frac{OD_{exposta}}{OD_{não\ exposta}} \times 100\%$$

Figura 11: Fórmula avaliação da concentração inibitória (CI₅₀) dos extratos.

$$SI = \frac{IC_{50}}{MIC}$$

Figura 12: Fórmula avaliação do índice de seletividade (IS).

4.7 Análises estatísticas

A análise estatística será realizada utilizando a análise de variância de duas vias (ANOVA) com nível de significância de $p < 0,05$. Caso as amostras apresentem diferenças significativas, será aplicado o Teste de Tukey como uma análise *post hoc* para comparar a atividade antioxidante dos extratos em diferentes concentrações (800 µg/mL, 400 µg/mL e 200 µg/mL) e entre os solventes.

5. Conclusão

Este foi o primeiro estudo a investigar o potencial biológico dos extratos metanólico e hexânico de *P. purpureum* em sinergismo com antimicrobianos e com foco em atividade antioxidante. Os resultados demonstraram que, embora os extratos isoladamente não tenham apresentado atividade antimicrobiana frente às cepas patogênicas testadas (*S. aureus*, *S. typhimurium*, *E. faecalis* e *E. coli*), evidenciaram atividade sinérgica com antibióticos como

vancomicina, ciprofloxacina e ampicilina. Destaca-se, a capacidade do extrato metanólico, em associação com ciprofloxacina, de reverter o perfil de resistência (R) para sensibilidade (S) em *E. coli*. Adicionalmente, ambos os extratos apresentaram atividade antioxidante. A caracterização química revelou a presença de ácidos graxos como os ácidos araquidônico, linoleico e palmítico, sugerindo possível atuação como adjuvantes na permeabilização de membranas bacterianas e na neutralização de espécies reativas de oxigênio. Além disso, nas concentrações testadas os extratos de *P. purpureum* demonstraram não serem tóxicos para a linhagem celular Vero. Assim, os achados relatados reforçam o potencial de *P. purpureum* como fonte promissora de compostos naturais bioativos, com aplicabilidade no desenvolvimento de novos agentes adjuvantes antimicrobianos e antioxidantes.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). D. F. Ramos é bolsista de produtividade em pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processo número PQ 306806/2022-3). Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo apoio financeiro à INOVA CLUSTERS TECNOLÓGICOS (22/2551-0000840-2). Agradecemos também à AlgaSul Biotecnologia de Microalgas pela colaboração e apoio ao longo desta pesquisa.

SUPORTE FINANCEIRO

Não se aplica.

REFERÊNCIAS

1. Fuentes-Grünwald C, Bayliss C, Zanain M, Pooley C, Scolamacchia M, Silkina A. Evaluation of batch and semi-continuous culture of *Porphyridium purpureum* in a photobioreactor in high latitudes using Fourier Transform Infrared spectroscopy for monitoring biomass composition and metabolites production. *Bioresour Technol.* 2015;189:357-363. doi:10.1016/j.biortech.2015.04.042
2. Coward T, Fuentes-Grünwald C, Silkina A, Oatley-Radcliffe DL, Llewellyn G, Lovitt

RW. Utilising light-emitting diodes of specific narrow wavelengths for the optimization and co-production of multiple high-value compounds in *Porphyridium purpureum*. *Bioresour Technol*. 2016;221:607-615. doi:10.1016/j.biortech.2016.09.093

3. Borovkov AB, Gudvilovich IN, Maltseva IA, Rylkova OA, Maltsev YI. Growth and B-phycoerythrin production of red microalga *Porphyridium purpureum* (porphyridiales, Rhodophyta) under different carbon supply. *Microorganisms*. 2022;10(11):2124. doi:10.3390/microorganisms10112124

4. Luo HP, Dahhan MH. Airlift column photobioreactors for *Porphyridium* sp. culturing: Part I. effects of hydrodynamics and reactor geometry. *Biotech Bioeng*. 2012;109:932-941.

5. Li T, Xu J, Wang W, *et al*. A novel three-step extraction strategy for high-value products from red algae *Porphyridium purpureum*. *Foods*. 2021;10(9):2164. doi:10.3390/foods10092164

6. Risjani Y, Mutmainnah N, Manurung P, Wulan SN, Yunianta. Exopolysaccharide from *Porphyridium cruentum* (purpureum) is Not Toxic and Stimulates Immune Response against Vibriosis: The Assessment Using Zebrafish and White Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Mar Drugs*. 2021;19(3):133. doi:10.3390/md19030133

7. Huang Z, Zhong C, Dai J, *et al*. Simultaneous enhancement on renewable bioactive compounds from *Porphyridium cruentum* via a novel two-stage cultivation. *Algal Res*. 2021;55(102270):102270. doi:10.1016/j.algal.2021.102270

8. Benavides J, Rito-Palomares M. Bioprocess intensification: a potential aqueous two-phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004;807(1):33-38. doi:10.1016/j.jchromb.2004.01.028

9. Raposo MF de J, de Moraes AMMB, de Moraes RMSC. Influence of sulphate on the composition and antibacterial and antiviral properties of the exopolysaccharide from *Porphyridium cruentum*. *Life Sci*. 2014;101(1-2):56-63. doi:10.1016/j.lfs.2014.02.013

10. García A, Longo E, Murillo M, Bermejo R. Using a B-phycoerythrin extract as a natural colorant: Application in milk-based products. *Molecules*. 2021;26(2):297. doi:10.3390/molecules26020297
11. Gairola K, Gururani S, Kumar R, Prakash O, Agrawal S, Dubey SK. Composition, Antioxidant and Anti-inflammatory activities of Hexane and Methanol extracts of *Acmella uliginosa* from Terai region of Uttarakhand. *Braz J Pharm Sci*. 2022;58. doi:10.1590/s2175-97902022e20353
12. Otero P, Carpena M, Garcia-Oliveira P, *et al*. Seaweed polysaccharides: Emerging extraction technologies, chemical modifications and bioactive properties. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2023;63(13):1901-1929. doi:10.1080/10408398.2021.1969534
13. Zarrinmehr MJ, Daneshvar E, Nigam S, *et al*. The effect of solvents polarity and extraction conditions on the microalgal lipids yield, fatty acids profile, and biodiesel properties. *Bioresour Technol*. 2022;344(Pt B):126303. doi:10.1016/j.biortech.2021.126303
14. Medina-Cabrera EV, Rühmann B, Schmid J, Sieber V. Characterization and comparison of *Porphyridium sordidum* and *Porphyridium purpureum* concerning growth characteristics and polysaccharide production. *Algal Res*. 2020;49(101931):101931. doi:10.1016/j.algal.2020.101931
15. Netanel Liberman G, Ochbaum G, Mejubovsky-Mikhelis M, Bitton R, Malis Arad S. Physico-chemical characteristics of the sulfated polysaccharides of the red microalgae *Dixoniella grisea* and *Porphyridium aerugineum*. *Int J Biol Macromol*. 2020;145:1171-1179. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.205
16. Gargouch N, Elleuch F, Karkouch I, *et al*. Potential of exopolysaccharide from *Porphyridium marinum* to contend with bacterial proliferation, biofilm formation, and breast cancer. *Mar Drugs*. 2021;19(2):66. doi:10.3390/md19020066
17. Najdenski HM, Gigova LG, Iliev II, *et al*. Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. *Int J Food Sci Technol*. 2013;48(7):1533-1540.

doi:10.1111/ijfs.12122

18. Capurso L. Thirty Years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: A Review: A Review. *J Clin Gastroenterol*. 2019;53 Suppl 1(Supplement 1):S1-S41. doi:10.1097/MCG.0000000000001170
19. Matzaras R, Nikopoulou A, Protonotariou E, Christaki E. Gut Microbiota modulation and prevention of dysbiosis as an alternative approach to antimicrobial resistance: A narrative review. *Yale J Biol Med*. 2022;95(4):479-494.
20. Netanel Liberman G, Ochbaum G, Malis Arad S, Bitton R. The sulfated polysaccharide from a marine red microalga as a platform for the incorporation of zinc ions. *Carbohydr Polym*. 2016;152:658-664. doi:10.1016/j.carbpol.2016.07.025
21. Mark I, Garvey M, Mukhlesur Rahman Simon, Gibbons Laura JV. Medicinal plant extracts with efflux inhibitory activity against Gram-negative bacteria. 2011;37:145-151. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.10
22. Maheshwari M, Safar Althubiani A, Hasan Abulreesh H, Abul Qais F, Shavez Khan M, Ahmad I. Bioactive extracts of *Carum copticum* L. enhances efficacy of ciprofloxacin against MDR enteric bacteria. *Saudi J Biol Sci*. 2019;26(7):1848-1855. doi:10.1016/j.sjbs.2017.12.008
23. Guleria A, Fatima N, Shukla A, *et al*. Synergistic potential of curcumin–vancomycin therapy in combating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: Exploring a novel approach to address antibiotic resistance and toxicity. *Microb Drug Resist*. 2025;31(3):65-74. doi:10.1089/mdr.2024.0231
24. He Q, Meneely J, Grant IR, Chin J, Fanning S, Situ C. Phytotherapeutic potential against MRSA: mechanisms, synergy, and therapeutic prospects. *Chin Med*. 2024;19(1). doi:10.1186/s13020-024-00960-8
25. Sanhueza L, Melo R, Montero R, Maisey K, Mendoza L, Wilkens M. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PLoS One*.

2017;12(2):e0172273. doi:10.1371/journal.pone.0172273

26. Banaszak M, Dobrzyńska M, Kawka A, *et al.* Role of Omega-3 fatty acids eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) as modulatory and anti-inflammatory agents in noncommunicable diet-related diseases - Reports from the last 10 years. Clin Nutr ESPEN. 2024;63:240-258. doi:10.1016/j.clnesp.2024.06.053

27. Joshi S, Kumari R, Upasani VN. Applications of algae in cosmetics: an overview. Int J Innov Res Sci Eng Technol. 2018;7:1269-1278. doi:10.15680/IJIRSET.2018.0702038

28. Shanab SMM, Hafez RM, Fouad AS. A review on algae and plants as potential source of arachidonic acid. J Adv Res. 2018;11:3-13. doi:10.1016/j.jare.2018.03.004

29. Bergé JP, Debiton E, Dumay J, Durand P, Barthomeuf C. In vitro anti-inflammatory and anti-proliferative activity of sulfolipids from the red alga *Porphyridium cruentum*. J Agric Food Chem. 2002;50(21):6227-6232. doi:10.1021/jf020290y

30. Aiyegoro O, Adewusi A, Oyedemi S, Akinpelu D, Okoh A. Interactions of antibiotics and methanolic crude extracts of *Azelaia Africana* (smith.) against drug resistance bacterial isolates. Int J Mol Sci. 2011;12(7):4477-4487. doi:10.3390/ijms12074477

31. Olajuyigbe OO, Afolayan AJ. Synergistic interactions of methanolic extract of *Acacia mearnsii* DE wild. With antibiotics against bacteria of clinical relevance. Int J Mol Sci. 2012;13(7):8915-8932. doi:10.3390/ijms13078915

32. Mark I, Garvey M, Mukhlesur Rahman Simon, Gibbons Laura JV. Medicinal plant extracts with efflux inhibitory activity against Gram-negative bacteria. 2011;37:145-151. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.1

33. Basavegowda N, Baek KH. Combination strategies of different antimicrobials: An efficient and alternative tool for pathogen inactivation. Biomedicines. 2022;10(9):2219. doi:10.3390/biomedicines10092219

34. Maia NL, de Barros M, de Oliveira LL, *et al.* Synergism of plant compound with traditional antimicrobials against *Streptococcus* spp. Isolated from bovine mastitis. *Front Microbiol.* 2018;9:1203. doi:10.3389/fmicb.2018.01203

35. Liberti D, Imbimbo P, Giustino E, Elia L, Silva M, Barreira L. Monti, D.M. Shedding Light on the Hidden Benefit of *Porphyridium Cruentum* Culture. *Antioxidants*

36. Li Q, Chen Y, Liu X, *et al.* Effect of salinity on the biochemical characteristics and antioxidant activity of exopolysaccharide of *Porphyridium purpureum* FACHB 806. *Front Mar Sci.* 2023;9. doi:10.3389/fmars.2022.1097200

37. Casas-Arrojo V, Decara J, de Los Ángeles Arrojo-Agudo M, Pérez-Manríquez C, Abdala-Díaz RT. Immunomodulatory, antioxidant activity and cytotoxic effect of sulfated polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. (S.f.gray) *nägeli*. *Biomolecules.* 2021;11(4):488. doi:10.3390/biom11040488

38. Tannin-Spitz T, Bergman M, van-Moppes D, Grossman S, Arad S (malis). Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *J Appl Phycol.* 2005;17(3):215-222. doi:10.1007/s10811-005-0679-7

39. Sun L, Ma CWQSC. Preparation of different molecular weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum* and their antioxidant activities. 2009;45:0-47. doi:10.1016/j.ijbiomac.2009.03.01

40. Kim H, Xue X. Detection of total reactive oxygen species in adherent cells by 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate staining. *J Vis Exp.* 2020;(160). doi:10.3791/60682

41. Harb TB, Pereira MS, Cavalcanti MILG, Fujii MT, Chow F. Antioxidant activity and related chemical composition of extracts from Brazilian beach-cast marine algae: opportunities of turning a waste into a resource. *J Appl Phycol.* 2021;33(5):3383-3395. doi:10.1007/s10811-021-02446-8

42. Zhou J, Wang M, Saraiva JA, *et al.* Extraction of lipids from microalgae using classical

and innovative approaches. Food Chem. 2022;384(132236):132236. doi:10.1016/j.foodchem.2022.132236

43. Saif AQ, Quradha MM, Khan R, Rauf A. GC-MS analysis, antioxidant and antibacterial activities of fixed oil from *Cyphostemma digitatum* leaves. Int J Food Prop. 2025;28(1). doi:10.1080/10942912.2025.2484253

44. Petropoulos SA, Fernandes Â, Calhelha RC, *et al.* Antimicrobial properties, cytotoxic effects, and fatty acids composition of vegetable oils from purslane, linseed, Luffa, and pumpkin seeds. Appl Sci (Basel). 2021;11(12):5738. doi:10.3390/app11125738

45. Anacleto-Santos J, Mondragón-Flores R, López-Camacho PY, *et al.* Anti-Toxoplasma and antioxidant activity of a terpene and methyl-ester-rich subfraction from *Pleopeltis crassinervata*. Antioxidants (Basel). 2025;14(3). doi:10.3390/antiox14030342

46. Li T, Shen H, Wang P, *et al.* Antibiofilm activity of arachidonic acid against linezolid-resistant *Enterococcus faecalis*: A potential strategy for combating biofilm-related infections. Microb Pathog. 2025;205(107629):107629. doi:10.1016/j.micpath.2025.107629

47. Devi NR, Khandelwal S, Subramaniyan M, Pappu S. Extraction, characterization, and therapeutic potential of Omega-3 fatty acids from *Belone belone* skin. 3 Biotech. 2024;14(2). doi:10.1007/s13205-023-03885-5

48. Ham S, Kim HS, Jo MJ, *et al.* Synergistic treatment of linoleic acid and cefazolin on *Staphylococcus aureus* biofilm-related catheter infections. Appl Environ Microbiol. Published online 2025:e0077025. doi:10.1128/aem.00770-25

49. Das UN. Arachidonic acid and other unsaturated fatty acids and some of their metabolites function as endogenous antimicrobial molecules: A review. J Adv Res. 2018;11:57-66. doi:10.1016/j.jare.2018.01.001

50. Upender I, Yoshida O, Schrecengost A, *et al.* A marine-derived fatty acid targets the cell membrane of Gram-positive bacteria. J Bacteriol. 2023;205(11):e0031023.

doi:10.1128/jb.00310-23

51. Yenigün S, Başar Y, Yılmaz S, Demirtas İ, Ozen T. Phytochemical contents and antioxidant activity *Paliurus spina-christi* Miller leaf and seed extracts: PASS predictions, in silico studies on xanthine oxidase and cytochrome P450 1A1. *Current Perspectives on Medicinal and Aromatic Plants (CUPMAP)*. Published online 2024. doi:10.38093/cupmap.1516991
52. Agoramoorthy G, Chandrasekaran M, Venkatesalu V, Hsu MJ. Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. *Braz J Microbiol.* 2007;38(4):739-742. doi:10.1590/s1517-83822007000400028
53. Fagali N, Catalá A. Antioxidant activity of conjugated linoleic acid isomers, linoleic acid and its methyl ester determined by photoemission and DPPH techniques. *Biophys Chem.* 2008;137(1):56-62. doi:10.1016/j.bpc.2008.07.001
54. Agustina S, Aidha NN, Oktarina E, Setiawati I. Antioxidant activity of *Porphyridium cruentum* water extracts for cosmetic cream. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng.* 2020;980(1):012042. doi:10.1088/1757-899x/980/1/012042
55. Asgharpour M, Rodgers B, Hestekin J. Eicosapentaenoic acid from *Porphyridium cruentum*: Increasing growth and productivity of microalgae for pharmaceutical products. *Energies.* 2015;8(9):10487-10503. doi:10.3390/en80910487
56. Halicki PCB. Antibiofilm Potential of Arenecarbaldehyde 2- Pyridinyldrazone Derivatives Against *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Drug Resistance.* 2020;26(12):1429-1436.
57. Borges L, Caldas S, Montes D'Oca MG, Abreu PC. Effect of harvesting processes on the lipid yield and fatty acid profile of the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. *Aquac Rep.* 2016;4:164-168. doi:10.1016/j.aqrep.2016.10.004
58. Amado LL, Garcia ML, Ramos PB, *et al.* A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Sci*

Total Environ. 2009;407(6):2115-2123. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.11.038

59. Bellio P, Fagnani L, Nazzicone L, Celenza G. New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. *MethodsX*. 2021;8(101543):101543. doi:10.1016/j.mex.2021.101543

60. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th Ed. CLSI Supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

61. Aroutcheva A, Simoes JA, Shott S, Faro S. The inhibitory effect of clindamycin on *Lactobacillus* in vitro. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2001;9(4):239-244. doi:10.1155/S1064744901000394

62. D'Oca MGM, Viêgas CV, Lemões JS, *et al*. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. *Biomass Bioenergy*. 2011;35(4):1533-1538. doi:10.1016/j.biombioe.2010.12.047

63. Guillard RRL. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. *Em Culture of Marine Invertebrate Animals*. Springer US; 1975.

64. Bayu A, Noerdjito DR, Rahmawati SI, Putra MY, Karnjanakom S. Biological and technical aspects on valorization of red microalgae genera *Porphyridium*. *Biomass Convers Biorefin*. 2023;13(14):12395-12411. doi:10.1007/s13399-021-02167-5

65. Gagnard C, Gargouch N, Dubessay P, *et al*. New horizons in culture and valorization of red microalgae. *Biotechnol Adv*. 2019;37(1):193-222. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.014

66. Li Y, Wu S, Chen H, *et al*. Inorganic salt starvation improves the polysaccharide production and CO₂ fixation by *Porphyridium purpureum*. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2024;47(7):1017-1026. doi:10.1007/s00449-024-03017-0

67. Zhang H, Jiang F, Zhang J, Wang W, Li L, Yan J. Modulatory effects of polysaccharides from plants, marine algae and edible mushrooms on gut microbiota and related health benefits:

A review. *Int J Biol Macromol*. 2022;204:169-192. doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.01.166

68. Shandilya S, Kumar S, Kumar Jha N, Kumar Kesari K, Ruokolainen J. Interplay of gut microbiota and oxidative stress: Perspective on neurodegeneration and neuroprotection. *J Adv Res*. 2022;38:223-244. doi:10.1016/j.jare.2021.09.005

69. Stirk WA, van Staden J. Bioprospecting for bioactive compounds in microalgae: Antimicrobial compounds. *Biotechnol Adv*. 2022;59(107977):107977. doi:10.1016/j.biotechadv.2022.107977

70. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):603-661. doi:10.1128/CMR.00134-14

71. Khan MI, Shin JH, Kim JD. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb Cell Fact*. 2018;17(1):36. doi:10.1186/s12934-018-0879-x

72. Alm RA, Lahiri SD. Narrow-Spectrum Antibacterial Agents-Benefits and Challenges. *Antibiotics*. 9. (Alm RA, Lahiri SD, eds.); 2020.

73. Chandra H, Sharma KK, Tuovinen OH, Sun X, Shukla P. Pathobionts: mechanisms of survival, expansion, and interaction with host with a focus on *Clostridioides difficile*. *Gut Microbes*. 2021;13(1):1979882. doi:10.1080/19490976.2021.1979882

74. Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*. 2008;453(7195):620-625. doi:10.1038/nature07008

75. Chou S, Zhang S, Guo H, Chang YF, Zhao W, Mou X. Targeted antimicrobial agents as potential tools for modulating the gut microbiome. *Front Microbiol*. 2022;13:879207. doi:10.3389/fmicb.2022.879207

76. Jochum L, Stecher B. Label or concept - what is a pathobiont? *Trends Microbiol*.

2020;28(10):789-792. doi:10.1016/j.tim.2020.04.011

77. Buttó LF, Schaubeck M, Haller D. Mechanisms of microbe-host interaction in crohn's disease: Dysbiosis vs. Pathobiont selection. *Front Immunol.* 2015;6:555. doi:10.3389/fimmu.2015.00555

78. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, *et al.* What is the healthy gut Microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms.* 2019;7(1):14. doi:10.3390/microorganisms7010014

79. Becattini S, Taur Y, Pamer EG. Antibiotic-induced changes in the intestinal Microbiota and disease. *Trends Mol Med.* 2016;22(6):458-478. doi:10.1016/j.molmed.2016.04.003

80. Gigante V, Alm RA, Melchiorri D, *et al.* Multi-year analysis of the global preclinical antibacterial pipeline: trends and gaps. *Antimicrob Agents Chemother.* 2024;68(8):e0053524. doi:10.1128/aac.00535-24

81. WHO 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization. In: WHO Bacterial Priority Pathogens List. ; 2024.

82. WHO (2019) Ten Threats to Global Health in 2019. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>.

83. Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet.* 2022;399:629-655.

84. Li T, Li C, Wang W, *et al.* Reconstruction of long-chain polyunsaturated acid synthesis pathways in marine red microalga *Porphyridium cruentum* using lipidomics and transcriptomics. *Mar Drugs.* 2024;22(2):82. doi:10.3390/md22020082

85. Guihéneuf F, Stengel DB. Towards the biorefinery concept: Interaction of light, temperature and nitrogen for optimizing the co-production of high-value compounds in

Porphyridium purpureum. Algal Res. 2015;10:152-163. doi:10.1016/j.algal.2015.04.025

86. Metcalfe LD, Schmitz AA, Pelka JR. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. Anal Chem. 1966;38(3):514-515. doi:10.1021/ac60235a044

87. Nguyen AQ, Mohammadi M, Alian M, Muralitharan G, Chauhan VS, Balan V. Exploring the versatility of *Porphyridium* sp.: A comprehensive review of cultivation, bio-product extraction, purification, and characterization techniques. Biotechnol Adv. 2024;77(108471):108471. doi:10.1016/j.biotechadv.2024.108471

88. Huheihel M, Ishanu V, Tal J, Arad SM. Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. J Biochem Biophys Methods. 2002;50(2-3):189-200. doi:10.1016/s0165-022x(01)00186-5

89. Gardeva E, Toshkova R, Minkova K, Gigova L. Cancer protective action of polysaccharide, derived from red Microalga *Porphyridium cruentum*—A biological background. Biotechnol Biotechnol Equip. 2009;23(sup1):783-787. doi:10.1080/13102818.2009.10818540

90. Ji L, Zhao C, He Y, *et al.* Exploring *Porphyridium purpureum* and *Porphyridium aerugineum* as alternative resources for phycobiliprotein production. Bioresour Technol. 2025;416(131800):131800. doi:10.1016/j.biortech.2024.131800

91. Silva-Núñez A, Donoso-Quezada J, González-Valdez J. Phycoerythrin from *Porphyridium purpureum*: Highly efficient extraction, purification, and microencapsulation for food applications. In: ECM 2023. MDPI; 2023.

92. Juin C, Oliveira Junior RG de, Fleury A, *et al.* Zeaxanthin from *Porphyridium purpureum* induces apoptosis in human melanoma cells expressing the oncogenic BRAF V600E mutation and sensitizes them to the BRAF inhibitor vemurafenib. Rev Bras Farmacogn. 2018;28(4):457-467. doi:10.1016/j.bjp.2018.05.009

93. Nikolova B, Semkova S, Tsoneva I, *et al.* Characterization and potential antitumor effect of a heteropolysaccharide produced by the red alga *Porphyridium sordidum*. Eng Life Sci.

2019;19(12):978-985. doi:10.1002/elsc.201900019

94. GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990-2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *Lancet*. 2024;404(10459):1199-1226. doi:10.1016/S0140-6736(24)01867-1

95. Mourenza Á, Gil JA, Mateos LM, Letek M. Novel treatments and preventative strategies against food-poisoning caused by staphylococcal species. *Pathogens*. 2021;10(2):91. doi:10.3390/pathogens10020091

96. Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(4):815-836. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x

97. WHO Antibacterial Agents in Clinical and Preclinical Development: An Overview and Analysis. Geneva: World Health Organization.; 2023.

98. Netanel Liberman G, Ochbaum G, Mejubovsky-Mikhelis M, Bitton R, Malis Arad S. Physico-chemical characteristics of the sulfated polysaccharides of the red microalgae *Dixoniella grisea* and *Porphyridium aerugineum*. *Int J Biol Macromol*. 2020;145:1171-1179. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.205

99. Cristofoli NL, Lima AR, Rosa da Costa AM, *et al*. Structural characterization of exopolysaccharides obtained from *Porphyridium cruentum* exhausted culture medium. *Food Bioprod Process*. 2023;138:162-171. doi:10.1016/j.fbp.2023.02.001

100. Pavan FR, da S Maia PI, Leite SRA, *et al*. Thiosemicarbazones, semicarbazones, dithiocarbazates and hydrazide/hydrazones: anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and cytotoxicity. *Eur J Med Chem*. 2010;45(5):1898-1905. doi:10.1016/j.ejmech.2010.01.028

101. Karbowiak T, Ferret E, Debeaufort F, Voilley A, Cayot P. Investigation of water transfer across thin layer biopolymer films by infrared spectroscopy. *J Memb Sci*. 2011;370(1-2):82-90. doi:10.1016/j.memsci.2010.12.037

102. Delattre C, Pierre G, Laroche C, Michaud P. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnol Adv.* 2016;34(7):1159-1179. doi:10.1016/j.biotechadv.2016.08.001

103. Ziadi M, Bouzaïene T, M'Hir S, *et al.* Evaluation of the efficiency of ethanol precipitation and ultrafiltration on the purification and characteristics of exopolysaccharides produced by three Lactic Acid Bacteria. *Biomed Res Int.* 2018;2018:1896240. doi:10.1155/2018/1896240

104. Jayaraman J, Sigamani S, Venkatachalam H, Ramamurthy D. Extraction and purification of sulfated polysaccharide from brown algae and its efficacy in preventing blood clotting. *Asian J Biol Life Sci.* 2016;5:237-244.

105. Li S, Ji L, Shi Q, Wu H, Fan J. Advances in the production of bioactive substances from marine unicellular microalgae *Porphyridium* spp. *Bioresour Technol.* 2019;292(122048):122048. doi:10.1016/j.biortech.2019.122048

106. Guglielmi P, Pontecorvi V, Rotondi G. Natural compounds and extracts as novel antimicrobial agents. *Expert Opin Ther Pat.* 2020;30(12):949-962. doi:10.1080/13543776.2020.1853101

107. Riaz Rajoka MS, Thirumdas R, Mehwish HM, *et al.* Role of food antioxidants in modulating gut microbial communities: Novel understandings in intestinal oxidative stress damage and their impact on host health. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(10):1563. doi:10.3390/antiox10101563

108. Hervet-Hernández D, Goñi I. Dietary polyphenols and human gut Microbiota: A review. *Food Rev Int.* 2011;27(2):154-169. doi:10.1080/87559129.2010.535233

109. Fernando IPS, Sanjeeva KKA, Samarakoon KW, *et al.* FTIR characterization and antioxidant activity of water soluble crude polysaccharides of Sri Lankan marine algae. *Algae.* 2017;32(1):75-86. doi:10.4490/algae.2017.32.12.1

110. Mandal SK, Singh RP, Patel V. Isolation and characterization of exopolysaccharide secreted by a toxic dinoflagellate, *Amphidinium carterae* Hulburt 1957 and its probable role in harmful algal blooms (HABs). *Microb Ecol.* 2011;62(3):518-527. doi:10.1007/s00248-011-9852-5

CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados nesta dissertação, foi possível identificar o potencial da microalga *P. purpureum* como fonte alternativa de compostos antioxidantes e adjuvantes de antibióticos no combate a infecções causadas por bactérias patogênicas da microbiota intestinal.

Discutimos, por meio de uma revisão, a importância dos exopolissacarídeos sulfatados para diversas atividades biológicas, incluindo seu potencial antimicrobiano, além de destacá-los como fontes naturais de antioxidantes. Também caracterizamos os ácidos graxos presentes nos extratos de *Porphyridium* sp., apresentando sua possível relação com atividades antimicrobianas e antioxidantes. Embora a maior parte dos estudos se concentre na produção e aplicação dos exopolissacarídeos, nosso trabalho destaca a importância de explorar outros compostos bioativos e o extrato bruto da microalga, que ainda é pouco explorado. Apesar de não termos observado atividade antimicrobiana da CIM dos extratos, possivelmente devido à baixa concentração de compostos ativos, conseguimos demonstrar seu potencial sinérgico com antibióticos.

Também trouxemos um método diferente para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos de *Porphyridium* sp., com o ABAP/DCF que permite analisar o ensaio em uma temperatura fisiológica de 37°C. É importante ressaltar que a caracterização dos exopolissacarídeos ainda é incipiente, com predominância de métodos simples, como espectroscopia de infravermelho, em detrimento de técnicas como a cromatografia.

Assim, espera-se que esta dissertação contribua para o avanço do conhecimento sobre os compostos bioativos de *P. purpureum*, especialmente sobre o uso dos exopolissacarídeos e ácidos graxos, reforçando seu potencial como fonte de antioxidantes naturais e adjuvantes frente a bactérias patogênicas intestinais.