

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÊNFASE EM GESTÃO AMBIENTAL MARINHA E COSTEIRA

JULIANO DE OLIVEIRA NUNES

**PROPRIEDADES ANTIBACTERIANAS DE EXTRATOS DE
MACROALGAS MARINHAS**

IMBÉ
2017

JULIANO DE OLIVEIRA NUNES

**PROPRIEDADES ANTIBACTERIANAS DE EXTRATOS DE
MACROALGAS MARINHAS**

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas, com ênfase em Gestão Ambiental Marinha e Costeira, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul em parceria com a Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^a. Dra. Gertrudes Corção

Co-orientador: Prof. Dr. João Fernando Prado

IMBÉ
2017

Aos examinadores,

Este trabalho está formatado segundo as normas de Silva *et al.* Manual de trabalhos acadêmicos e científicos da UERGS: orientações práticas à comunidade universitária da UERGS. Porto Alegre: UERGS, 2013. 150p. O qual segue as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT.

Nunes, Juliano de Oliveira

Propriedades antibacterianas de extratos de macroalgas marinhas/Juliano de Oliveira Nunes, 2017.
36 f.

Orientador: Gertrudes Corção
Coorientador: João Fernando Prado

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Estadual do Rio Grande do Sul em parceria com Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Curso de Ciências Biológicas: Gestão Ambiental Marinha e Costeira , Osório/Imbé, BR – RS, 2017.

1. Macroalgas. 2. Bactérias. 3. Antibacteriana. I. Corção, Gertrudes, orient. II. Prado, João Fernando, coorient. III. Título.

Adaptado do Sistema de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFRGS com dados fornecidos pela autora.

JULIANO DE OLIVEIRA NUNES

**PROPRIEDADES ANTIBACTERIANAS DE EXTRATOS DE
MACROALGAS MARINHAS**

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas, com ênfase em Gestão Ambiental Marinha e Costeira, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul em parceria com a Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^a. Dra. Gertrudes Corção

Co-orientador: Prof. Dr. João Fernando Prado

Aprovado em: / /

BANCA EXAMINADORA

MsC. Karine Lena Meneghetti

MsC. Letícia Muner Otton

Prof. Dr. Ênio Lupchinski Junior
(Coordenador da atividade de Trabalho Conclusão II – CBM)

IMBÉ
2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à energia chamada Deus que incide nos meus desejos oriundos do coração e logo em seguida, aos meus guias maiores neste plano terrestre, meu pai, Sr. Erotilde da Rosa Nunes, e minha mãe, Sra. Sônia Maria Soares de Oliveira, bem como, toda a família, pois cada um teve sua parcela de contribuição inestimável para com a realização deste trabalho.

Aos meus orientadores por me permitir a conclusão deste projeto, professora Dra. Gertrudes Corção, renomada pesquisadora na área de Microbiologia Ambiental, no Brasil, qual pude conhecer e trabalhar a onze anos atrás, e ao meu amigo e professor Dr. João Fernando Prado, exímio taxonomista de macroalgas marinhas e um dos únicos do Estado do Rio Grande do Sul.

A minha amiga, companheira e namorada Bruna Medeiros, que muito me apoiou para que eu conseguisse concluir este trabalho, neste período, diante dos novos resultados obtidos.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Molecular e Ambiental do Instituto de Ciências Básicas da UFRGS, mais conhecido como o “166”, por terem sido zelosos e prestativos com a minha pessoa.

Aos amigos, colegas, chefias e Presidência da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, que me incentivaram à conclusão do experimento e por me permitir o desenvolvimento do mesmo nas dependências do Laboratório desta instituição, após meu expediente. Em especial, ao colega Manoel Nunes, pela ajuda constante nos preparos de meios cultura e autoclavagem do material, a chefe da Seção de Botânica de Criptógamas Dra. Vera Regina Werner, por me incentivar a conclusão deste trabalho e a Diretora Mariana Silveira Jacques, por me permitir o uso do Laboratório de Química.

E por fim, a todos meus colegas e amigos que fiz durante o curso ao longo destes quase sete anos, onde tive a oportunidade de continuamente aprender, discutir e refletir sobre um Litoral Norte melhor, um Estado maior, um País mais justo e um planeta minimamente sustentável para todas as criaturas.

A todos meu muito obrigado!!!

O lema revisado é “darwinismo, não; evolução, sim; Deus, sim”. Até o darwinismo deve receber o que lhe é devido. Ele continua a ser uma teoria aceitável para períodos contínuos de evolução; só não é uma teoria completa da evolução.

GOSWAMI (2009, P. 27)

RESUMO

As macroalgas marinhas se constituem como um grupo taxonômico de diferentes origens evolutivas, formando uma grande diversidade de espécies, que habitam variados ambientes. O presente trabalho objetivou avaliar as propriedades antibacterianas *in vitro* dos extratos brutos das algas *Ulva fasciata* Delillee, *Ulva linza* Linnaeus, *Chaetomorpha media* (C.Agardh) Kützing e *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux, nas linhagens bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC4163, *Escherichia coli* ATCC35218, *Salmonella enterica* e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. Os extratos foram produzidos com a solução de metanol: tolueno (3:1), preparados na proporção 4:1, e as algas coletadas no Litoral do município de Torres, Rio Grande do Sul, Brasil. O perfil de resistência das cepas bacterianas foi realizado com antimicrobianos de amplo espectro (ampicilina 10µg, cefalexina 30µg, vancomicina 30µg, gentamicina 10µg, ácido nalidíxico 30µg, ciprofloxacina 5µg e cloranfenicol 30µg). Os testes de susceptibilidade bacteriana foram realizados através do método de difusão em disco. *P. aeruginosa* foi a única linhagem bacteriana que apresentou perfil de multirresistência, só sendo sensível a ciprofloxacina, um potente antimicrobiano. Os extratos brutos de *U. fasciata*, *C. media* e *H. musciformis* mostraram atividade inibitória sobre *P. aeruginosa*, sendo que a média dos resultados obtidos das triplicatas de *C. media* e *H. musciformis* foram significativamente diferenciadas das de *U. fasciata*, demonstrado pelo Teste ANOVA para um critério de classificação e o Teste de Tukey ($\alpha \leq 0,05$). Em *U. fasciata*, o uso do diluente DMSO disponibilizou melhor a molécula, obtendo a maior inibição da bactéria. O estudo, realizado com espécies de algas do Litoral do Rio Grande do Sul é inédito, e além disso, mostrou importante atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa*, bactéria patogênica oportunista, principalmente em ambientes hospitalares e que se caracteriza por rápida disseminação de linhagens multirresistentes.

Palavras-chave: Macroalgas marinhas. Torres. Extratos brutos. Antibacteriano.

ABSTRACT

The marine macroalgae constitute as a taxonomic group of different evolutionary origins, forming a great diversity of species, that inhabit diverse environments. The present work aimed to evaluate the in vitro antibacterial properties of the raw extracts of the algae *Ulva fasciata* Delile, *Ulva linza* Linnaeus, *Chaetomorpha media* (C.Agardh) Kützing and *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux, in the bacterial strains of *Staphylococcus aureus* ATCC4163, *Escherichia coli* ATCC35218, *Salmonella enterica* and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. The extracts were produced with the methanol: toluene solution (3: 1), prepared in the ratio of 4: 1, and the algae collected on the coast of the municipality of Torres, Rio Grande do Sul, Brazil. The resistance profile of the bacterial strains was performed with broad spectrum antibiotics (ampicillin 10µg, cephalixin 30µg, vancomycin 30µg, gentamicin 10µg, nalidixic acid 30µg, ciprofloxacin 5µg and chloramphenicol 30µg). The bacterial susceptibility tests were performed using the *P. aeruginosa* was the only bacterial strain that obtained a multiresistance profile, only being sensitive to ciprofloxacin, a potent antimicrobial. The crude extracts of *U. fasciata*, *C. media* and *H. musciformis* showed inhibitory activity to *P. aeruginosa*. That the average of the results of the triplicates of *C. media* and *H. musciformis* were significantly different from those of *U. fasciata*, demonstrated by the ANOVA test for a classification criterion and the Tukey test ($\alpha \leq 0.05$). Also, in *U. fasciata*, the use of the DMSO diluent provided better the molecule, obtaining the greater inhibition of the bacteria. The experiment, carried out with algae species of the Coast of Rio Grande do Sul is unpublished, and in addition, it shows important antibacterial activity against *P. Aeruginosa*, an opportunistic pathogenic bacterium, mainly in hospital environments and characterized by rapid dissemination of multiresistant strains.

Key-words: Marine macroalgae. Torres. Crude extracts. Antibacterial.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 PAREDE CELULAR BACTERIANA	11
2.1.1 Estrutura básica da parede celular bacteriana	11
2.1.2 Importância na seletividade de antimicrobianos	11
2.2 DROGAS ANTIMICROBIANAS.....	12
2.2.1 Descoberta e principais grupos de drogas antimicrobianas	12
2.2.2 Resistência bacteriana a antimicrobianos	12
2.2.3 Ambientes propícios ao surgimento de resistência bacteriana.....	14
2.2.4 A crise na descoberta de novos fármacos antimicrobianos	15
2.3 MACROALGAS MARINHAS DO RS.....	16
2.4 BIOPROSPECÇÃO DE MACROALGAS MARINHAS	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 MACROALGAS MARINHAS: LOCAL E TIPO DE COLETA.....	18
3.1.1 Análise e identificação das espécies de macroalgas.....	19
3.1.2 Limpeza e armazenamento das macroalgas	19
3.1.3 Preparo dos extratos de macroalgas.....	19
3.1.4 Pesagem dos extratos	20
3.2 LINHAGENS BACTERIANAS E PERFIL DE RESISTÊNCIA.....	20
3.3 MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO COM OS EXTRATOS	21
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS EXTRATOS INIBITÓRIOS.....	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 PESO DOS EXTRATOS	23
4.2 DISCO DE DIFUSÃO (ANTIBIOGRAMA)	23
4.2.1 Disco de difusão em ágar com antimicrobianos de amplo espectro.....	23
4.2.2 Disco de difusão em ágar com os extratos de macroalgas.....	24
4.3 EXTRATOS INIBITÓRIOS DE <i>P. aeruginosa</i>	28
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

Com exceção das Cianobactérias ou algas azuis e plantas, o termo alga compreende basicamente todos os organismos eucarióticos, com capacidade de realizar fotossíntese, ou seja, que possuem clorofila e outros pigmentos fotossintetizantes. As algas podem ser unicelulares ou multicelulares e, neste caso, os organismos podem apresentar formas complexas e dimensões macroscópicas. Na costa do estado do Rio Grande do Sul, as formas macroscópicas são encontradas nos representantes de Chlorophyta, (algas verdes), Rhodophyta (algas vermelhas) e Phaeophyceae (algas pardas) (Heterokontophyta). Como constituem um grupo bastante heterogêneo e possuem a capacidade de fotossíntese, as algas podem ocupar todos os meios que lhes ofereçam luz, nutrientes e umidade suficientes, sendo estas temporárias ou permanentes. Encontram-se fixadas no fundo de águas costeiras relativamente rasas, mas podem crescer em zonas marítimas de até 180 metros de profundidade, como também em estuários e substratos sólidos presentes na zona intertidal, a exemplo de rochas, corais mortos, seixos, conchas e também sobre outros vegetais (Adaikalaraj *et al.* 2012).

Por toda sua biodiversidade, constituída de distintas histórias evolutivas, as macroalgas marinhas apresentam uma gama de metabólitos secundários, alguns com grande potencial farmacodinâmico. Em 1989, Pereira *et al.*, abordaram a existência de compostos fenólicos, florataninos e terpenoídicos em algas pardas, como prováveis marcadores taxonômicos e filogenéticos para Phaeophyceae. Abdussalam (1990) cita diversos estudos com macroalgas marinhas, já relacionados com a identificação, caracterização e extração de substâncias com potencial antibacteriano, antifúngico, inseticida e alelopático. Gupta & Abu-Ghannam (2011^a) descreveram uma série de compostos com potencial bioativo em algas pardas, como por exemplo, os fucanos sulfatados, ácidos algínicos, laminarinas, florotatinos, diterpenos e demais compostos halogenados, como os bromofenóis.

A busca por novos fármacos que possam combater a crescente resistência bacteriana, sem que haja rapidamente a sua disseminação, tem ganhado cada vez mais espaço nas pesquisas em nível mundial, contudo, no Brasil, apesar da macroflora de algas marinhas ser vasta, os estudos na direção

de uso para bioprospecção ainda se encontram incipientes. Cabral *et al.*(2011) citam que os compostos metabólicos celulares podem sofrer influências pelas variáveis abióticas, como temperatura da água de cultivo, salinidade, luz e nutrientes. Portanto, cabe salientar que, em ambiente natural, os metabólitos secundários da flora marinha macroscópica também podem sofrer influências de parâmetros abióticos ao longo de seu ciclo de vida e região geográfica.

Justifica-se tal propósito, não somente pela inexistência de trabalhos acadêmicos locais, mas também pela região apresentar condições climáticas e correntes marinhas diferenciadas se comparado com o resto do Brasil, pois a região Sul do país é a única a apresentar condições climáticas do tipo subtropical úmido com verões quentes (*Cfa*), de acordo com o sistema de Classificação Climática de *Köppen*, além do Litoral do Rio Grande do Sul possuir condições marítimas distintas de outras regiões da costa brasileira, por estar sob grande influência da Corrente das Malvinas. E, ainda, o ambiente intertidal onde as macroalgas marinhas se encontram na costa litorânea deste Estado são escassos, tornando-se vulneráveis localmente e deste modo, sua prioridade na demonstração como organismos de grande importância nos três eixos principais da gestão: ambiental, econômico e social, faz-se necessário.

O presente trabalho objetivou estudar as propriedades antibacterianas de quatro espécies de macroalgas marinhas, coletadas no litoral de Torres, contra bactérias oportunistas e patogênicas para o ser humano e animais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PAREDE CELULAR BACTERIANA

É muito importante levar em consideração a parede celular, uma vez que ela torna-se a primeira via de entrada para um antimicrobiano, e juntamente da membrana plasmática, diferenciam as eubactérias em dois grandes grupos (Gram-positivas e Gram-negativas), fazendo com que também, os fármacos quando pesquisados tenham como importante critério a ser levado em conta, que além do sítio de ação, todos necessariamente terão que possuir mecanismos para sobrepujar tal barreira e/ou afetá-la, para que leve prejuízos à célula bacteriana.

2.1.1 Estrutura básica da parede celular bacteriana

Dentre os principais métodos de classificação bacteriana, está a Coloração de Gram. Todas as bactérias, com exceção dos micoplasmas, possuem parede celular, tendo como principal componente estrutural, o peptidoglicano (mureína), um polímero misto de açúcares hexoses, sendo que nas Gram-positivas, torna-se uma estrutura mais externa e espessa que protege a membrana plasmática (Barros *et al.* 2001). Já, nas Gram-negativas, diferencia-se basicamente por possuir uma camada mais fina de peptidoglicano e uma membrana externa consubstanciada por lipoproteínas (LPS) e fosfolipídios. Entre a sua parede celular e a membrana plasmática, há um espaço denominado periplásmico onde contém uma série de enzimas e proteínas de transporte (Tortora *et al.* 2000).

2.1.2 Importância na seletividade de antimicrobianos

Um dos mecanismos que influencia na ação dos antimicrobianos é o modelo de absorção desta classe de drogas, e nisto, o tipo de parede celular é de fundamental influência em seu espectro de atividade. Nas bactérias Gram-negativas, eles penetram na célula por proteínas denominadas porinas, presentes na membrana externa. Mutações que diminuam a quantidade ou

formato estrutural destas, também contribuem para redução da permeabilidade celular (Barros *et al.* 2001). A membrana externa é seletiva, impedindo a passagem das moléculas relativamente grandes (Jawetz *et al.* 2009), se configurando verdadeiramente por uma segunda bicamada lipídica, como em *Escherichia coli*, onde somente cerca de 10% da parede celular é composta por peptidoglicano. Já em Gram-positivas, este percentual sobe para cerca de 90% (Madigan *et al.* 2010).

2.2 DROGAS ANTIMICROBIANAS

2.2.1 Descoberta e principais grupos de drogas antimicrobianas

O primeiro antibiótico descoberto, em 1929, pelo escocês Alexander Fleming (1881-1955) denominado pelo mesmo de *Penicilina* propiciou o início de uma revolução na medicina. No entanto, outros dois pesquisadores, Howard Walter Florey (1898-1968), austríaco e Professor de Patologia, na Universidade de Oxford e Ernst Boris Chain (1906-1979) alemão, Bioquímico desta mesma Universidade, de fato foram os cientistas que fizeram os primeiros isolados da molécula em 1945 e, já em 1943, com uma preparação ainda impura, usaram com sucesso durante a Segunda Grande Guerra, em soldados que estavam na Tunísia e nos que participaram da invasão da Sicília (Raw e Sant'anna 2002).

Os antibacterianos são classificados de acordo com sua estrutura química e formas de ação, tendo como principais grupos, os beta-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), aminoglicosídeos e aminociclítóis, tetraciclina, cloranfenicol, macrolídeos, lincosamidas e diterpenos, polipeptídicos (polimixinas), rifampicinas, sulfonamidas, nitrofuranos, quinolonas e quinoxalinas. Eles ainda podem ser classificados como bactericidas ou bacteriostáticos, sobre os grupos de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e micoplasmas (Oliveira 2000 e 2012).

2.2.2 Resistência bacteriana a antimicrobianos

Os microorganismos patogênicos estão cada vez mais resistentes aos tratamentos com drogas convencionais, tornando-se um sério problema de

saúde pública, por causa da rápida ascensão e disseminação de linhagens mutantes não suscetíveis ao tratamento médico (Manikandan *et al.* 2011).

Genericamente, os principais mecanismos de resistência podem ser classificados em três tipos principais: pelo tipo de alvo e processo de absorção do antimicrobiano alterados, como também pela desativação da droga antimicrobiana (tabela 1). Conquanto que, para antimicrobianos cuja resistência bacteriana possa ser expressa por diferentes mecanismos de resistência, os medicamentos variam com relação àquele mais frequentemente encontrado, (Goering *et al.* 2014). Dentre as origens genéticas de resistência aos fármacos, podem ser caracterizadas como cromossômica, extracromossômica ou plasmidial e cruzada (Jawetz *et al.* 2009). Dos três modelos de expressão da resistência genética microbiana, a plasmidial é a principal, pela disseminação horizontal de genes de resistência (Sadava *et al.* 2009).

Tabela 1: Classificação dos tipos de resistência de antibacterianos

Antibacteriano	Mecanismo de resistência		
	Alvo alterado	Absorção alterada	Desativação da droga
Betalactâmicos	+	+	+
Glicopeptídeos	+		
Aminoglicosídeos	+	+	+
Tetraciclina	+	+	
Cloranfenicol		+	+
Macrolídeos/cetolídeos	+	+	+
Lincosamídeos	+		
Streptograminas	+		
Oxazolidinonas	+		
Ácido fusídico	+		
Sulfonamidas/Trimetoprima	+	+	
Quinolonas	+	+	
Rifampicina	+		
Lipopeptídeo cíclico	+		

Fonte: Goering *et al.* (2014)

Segundo Madigan *et al.* (2010), a resistência aos fármacos antimicrobianos conhecidos ocorrerá de acordo com o tipo de exposição e tempo suficiente, tendo necessidade, portanto, a longo prazo, do desenvolvimento de novos antibióticos, visando substituí-los. Nos países em desenvolvimento, as

bactérias de interesse médico têm tido um considerável aumento de resistência com o uso de quase todos antimicrobianos, tendo este contexto piorado, pela dificuldade de acesso aos que ainda são eficazes, mas em sua maioria injetáveis e, portanto muito caros (Guardabassi 2010). Como um dos últimos recursos contra o tratamento de infecções por bactérias Gram-negativas multirresistentes, a colistina, tem demonstrado o surgimento de linhagens colistina-resistentes, como de *Pseudomonas aeruginosa* (Lee *et al.* 2016), *Klebsiella pneumoniae* (Kocsis *et al.* 2016), *E. coli* (Payne 2016) e *Acinetobacter baumannii* (Veeraraghavan 2016).

2.2.3 Ambientes propícios à seleção de resistência bacteriana

Em se tratando de ambiente hospitalar, mesmo quando os agentes microbianos, não sejam considerados normalmente patogênicos, são capazes rapidamente de superar o sistema imunológico num paciente imunodeprimido e causar doenças infecciosas (Santos 2004). Os ambientes fechados e o uso exacerbado de antimicrobianos nos hospitais, favorecem o aumento da resistência de bactérias entéricas Gram-negativas, pela supressão da microbiota normal do intestino e o consequente favorecimento de bactérias portadoras de plasmídios de resistência, como *Enterobacter* sp, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Serratia* sp. (Jawetz *et al.* 2009).

Além de o ambiente hospitalar ser um grande propositor de resistência bacteriana, a outra principal relação da seleção de linhagens resistentes está relacionada ao uso excessivo de antimicrobianos em animais domésticos e de produção. Uma série de patógenos aos humanos pode ter como origem e foco de contaminação os animais, seja de forma direta ou indireta, pelo contato com o animal ou pelo uso de alimentos ou ambiente contaminados (Guardabassi 2010).

O Brasil é o maior produtor de carne bovina e de frango no mundo (Brasil 2009), porém, os sistemas de criação intensiva e semi-intensiva de carne e também do leite requerem o uso contínuo de antimicrobianos para evitar disseminação de patógenos, posterior contaminação do plantel e também do produto, incorrendo em perdas econômicas. Além disso, pode haver contaminação cruzada, ou seja, quando o ser humano e/outro animal ingere o alimento com resquícios de antimicrobianos, a citar como exemplo, na produção

de ração para animais domésticos e de produção. Feijó (2012) no Subprograma de Controle de Resíduos e Contaminantes no Leite – PNCRC, no período de janeiro de 2008 a maio de 2012, detectou a presença 18 resquícios de antimicrobianos, acima do permitido pela Legislação vigente. Korb *et al.* (2011) inferem que há no mínimo dois fatores responsáveis pelo surgimento de resistência cruzada, primeiro são os interesses econômicos que sobrepujam a questão da saúde humana e animal e, segundo, há o desconhecimento do produtor e do consumidor em relação aos efeitos nocivos dos fármacos à saúde humana quando mal utilizados, por exemplo em situações de reações alérgicas e de óbitos decorrentes de infecções incontroláveis.

Neste sentido, os ambientes hospitalares e a cadeia produtiva de carne e leite principalmente de países em desenvolvimento, são os principais responsáveis pelo aumento na incidência de resistência bacteriana, prioritariamente pelo uso exacerbado de antibacterianos.

2.2.4 A crise na descoberta de novos fármacos antimicrobianos

O período pós-Segunda Guerra Mundial se tornou a “Era do Ouro” com relação à descoberta de antibióticos, com um fluxo constante de novos produtos ao mercado, dentre o período de 1940 até o início de 1970. Entretanto, esta taxa caiu dramaticamente desde os anos 1980 (O’Neill 2016). Após sucessivas descobertas de antimicrobianos, parecia que o homem estava livre de infecções, entretanto, logo ficou claro, que efetuavam uma pressão seletiva sobre as bactérias, eliminando as sensíveis e, portanto, selecionando positivamente as linhagens resistentes (Raw e Sant’anna 2002).

O’Neill (2016) ainda destaca que em 2050, poderemos chegar ao nível de dez milhões de mortes por ano devido a microorganismos multirresistentes, ultrapassando o câncer, com 8,2 milhões, majoritariamente no continente Africano e Asiático, tendo estipulado um custo acumulado na produção econômica global na faixa de 100 trilhões de dólares.

Há cada vez mais esforços na busca de tratamentos eficazes, prioritariamente contra patógenos multirresistentes de importância médica, contudo, ainda iniciais, sem o devido fomento pela indústria farmacêutica, bem como a falta de políticas públicas que visem incentivar sua pesquisa.

Recentemente, o Painel de Gastos do Senado Americano aprovou para o ano de 2017, um aumento de \$2 bilhões para o National Institute of Health (NIH), um acréscimo de 6,2%, subindo para \$34,1 bilhões, e deste, o projeto inclui \$50 milhões em novos gastos para iniciativa federal combater a resistência antimicrobiana (Kaiser 2016).

2.3 MACROALGAS MARINHAS DO RS

No litoral do Rio Grande do Sul, as macroalgas marinhas podem ser encontradas em substratos artificiais como molhes e plataformas de pesca. Porém, é na costa de Torres, no Litoral Norte do Estado, que se localiza o único conjunto de rochedos naturais em contato com o mar, e que abriga a flora mais rica do Estado.

Das espécies escolhidas para realização deste trabalho, devido à sua abundância e características de talo propício para obtenção de extratos, ou seja, passível de ser macerado, utilizaram-se três espécies de Chlorophyta [*Chaetomorpha media* (C.Agardh) Kützing, *Ulva fasciata* Delilee *Ulva linza* Linnaeus]; e uma de Rhodophyta [(*Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux)].

2.4 BIOPROSPECÇÃO DE MACROALGAS MARINHAS

Atualmente está cada vez mais em voga a pesquisa de produtos naturais¹, principalmente com relação à descoberta de substâncias químicas para uso medicinal. Como consequência da procura crescente por novos medicamentos terapêuticos de origem natural, há uma pesquisa mais intensa com os organismos marinhos (Shanmughapriya *et al.* 2008).

Uma grande variedade de espécies de algas encontra uso bastante diversificado, em vários países. A partir da extração de ágar, alginatos e carragenas, seu emprego vai da indústria alimentícia à de medicamentos, da cosmética à agricultura (Smith 1979). Além das linhas mais usuais de usos em bioprospecção, gradativamente se intensificam as pesquisas com enfoque na descoberta de novas moléculas presentes no tecido algal, e sua purificação.

¹ Produtos naturais: Conforme Pedrini *et al.*(2010) são substâncias químicas provenientes do metabolismo secundário como alcaloides, carotenoides, terpenos, polifenóis entre outras.

Romeiro (2005) comenta sobre a importância do mecanismo coevolutivo entre bactérias fitopatogênicas e plantas, na produção de moléculas inibidoras de infecção, e ainda ressalta que, como tal, pressupõe a existência de uma grande diversidade de fitoalexinas, produzidas através do reconhecimento molecular do patógeno (bactéria incompatível), que na maioria das vezes antecipa o ataque bacteriano. Numa relação incompatível entre planta e patógeno, a combinação de barreiras químicas e estruturais, pré e pós formadas, impede o sucesso do patógeno (Moraes, 1998).

As macroalgas marinhas produzem uma série de metabólitos primários e secundários, estes últimos, envolvidos principalmente em funções ecológicas, diferentes processos e dinâmicas funcionais que podem acarretar na conquista e adaptação a novos ambientes (Pedrini *et al.* 2010). Destes, há uma série de compostos químicos, como defesas químicas para impedir a colonização de sua superfície (Rhimou *et al.* 2010), ou metabólitos bioativos, que respondem às pressões ecológicas de competição, predação, dissuasão e reprodução (Villarreal-Gómez *et al.* 2010).

Cada vez mais surgem trabalhos que descrevem a caracterização de moléculas (Pereira e Teixeira 1999; Mayer *et al.* 2011; Gupta e Abu-Ghannam 2011^a, Eom *et al.* 2012), visando os diferentes usos potenciais destes organismos marinhos como bioindicadores da toxicidade de metais pesados (Andrade, *et al.* 2010), antioxidante (Gupta e Abu-Ghannam 2011^b e Devi *et al.* 2011), anticâncer (Villarreal-Gómez *et al.* 2010), larvicida no combate ao mosquito *Aedes aegypti* L., 1762 (Bianco *et al.* 2013). Mas é, principalmente, pelas suas propriedades antimicrobianas, que produtos de macroalgas vêm sendo bastante estudados e, ainda, prioritariamente com linhagens bacterianas oportunistas e estritamente patogênicas.

No Brasil, já foram realizados vários estudos relacionados, dentre eles podemos citar com relação ao potencial antifúngico, antioxidante, antibacteriano e antiviral (Paulert 2005; Lang 2006; Abreu *et al.* 2008; Silva 2009; Vieira *et al.* 2011; Cabral *et al.* 2011; Cabral 2012). Contudo, há poucos trabalhos publicados de grupos de pesquisa no estado do Rio Grande do Sul sobre este tema. Souza (2014) analisou propriedades antitumorais e Martins (2014) o potencial antimicrobiano e citotóxico de macroalgas marinhas da Antártica, entretanto, não existem estudos publicados utilizando de espécimes da região propriamente dita.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MACROALGAS MARINHAS: LOCAL E TIPO DE COLETA

O material foi coletado no dia 13 de março de 2016 na costa do município de Torres, tendo como limite norte os rochedos que dividem a Praia Grande da Prainha ou Praia do Meio ($29^{\circ}20'25.90''\text{S}$ e $49^{\circ}43'23.30''\text{O}$) até o limite sul da Praia da Cal ($29^{\circ}21'4.70''\text{S}$ e $49^{\circ}43'51.80''\text{O}$), compreendendo um transecto de 1419 metros (Figura 1). Também foi obtida coordenada geográfica de um ponto central, ($29^{\circ}20'46.00''\text{S}$ e $49^{\circ}43'40.30''\text{O}$) que divide as duas praias.

Figura 1: Trecho de coleta do material ficológico



Fonte: Setor de Geoprocessamento da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 2015.

Com auxílio de uma espátula, os indivíduos foram retirados inteiros do substrato. O material obtido foi separado por espécie, armazenado em sacos plásticos e acondicionado em isopor com gelo, para transporte ao Laboratório de

Ficologia e Briologia, do Departamento de Botânica, do Instituto de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), foi mantido sob refrigeração, à temperatura de 8°C.

3.1.1 Análise e identificação das espécies de macroalgas

As quatro espécies de macroalgas coletadas (Tabela 2) foram analisadas com auxílio de microscopia e identificadas com base no trabalho de Baptista (1977). Os nomes específicos foram atualizados a partir do sítio AlgaeBase (2016) e com o auxílio da seguinte bibliografia: Coto e Pupo (2009) e Neto e Fuji (2016).

Tabela 2: Espécies de macroalgas marinhas utilizadas no estudo

Ordem	Espécie	Local de coleta
Chlorophyta	<i>Ulva fasciata</i>	Praia do Meio/Praia da Cal
	<i>Ulva linza</i> Linnaeus	Praia do Meio
	<i>Chaetomorpha media</i> (C.Agardh) Kützing	Praia do Meio
Rhodophyta	<i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen) Lamouroux	Praia da Cal

Fonte: O autor (2016)

3.1.2 Limpeza e armazenamento das macroalgas

Para retirada macroscópica dos *debris*, epibiontes e epífitas, o material foi lavado e triado em água destilada a temperatura ambiente, com o intuito de que pudesse ser facilitada a visualização e remoção do material aderido ao talo. Após a limpeza, o material foi conservado em potes plásticos com tampa com água destilada, a – 20°C, no freezer.

3.1.3 Preparo dos extratos de macroalgas

Para extração dos compostos bioativos das macroalgas, adotou-se o protocolo de Manikandan *et al.* (2011) modificado. Após descongelamento, o material foi colocado para secagem sobre papel, de uma a duas horas, sem luz solar. Logo depois, foram pesados 25 gramas do material em balança de precisão e liquidificado em 100 ml da solução de solventes, metanol e tolueno na

proporção de 3:1. Por fim a solução obtida foi armazenada em recipiente de vidro, com tampa de lacre, e acondicionada em geladeira, a – 4 °C.

Como passo seguinte, o extrato foi filtrado em papel filtro qualitativo de 80 gramas/m² em funil de Büchner, sob sucção por uma bomba com pressão reduzida, acoplado em frasco Kitassato. O extrato filtrado foi acondicionado em tubos de ensaio e congelado a – 20°C. Em seguida a essa etapa, as soluções foram processadas no rotavapor, com 100 RPM, a 30°C, por duas a quatro horas, para a total evaporação dos solventes e obtenção do extrato bruto purificado.

3.1.4 Pesagem dos extratos

Para avaliar o peso seco (miligramas) do material resultante, optou-se por realizar três amostragens com 10 µL de cada extrato bruto em eppendorf's (1,5 mL) separados. Os tubos foram tarados e pesados com o material pipetado, e logo após, colocados para secagem, em estufa a 35-37°C, para pesagem do peso seco.

3.2 LINHAGENS BACTERIANAS E PERFIL DE RESISTÊNCIA

Foram utilizadas quatro linhagens bacterianas de importância médica, sendo duas espécies Gram-negativa (*P. aeruginosa* ATCC27853 e *E. coli* ATCC35218) e uma Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC4163) da coleção de microorganismos Norte Americana ATCC (American Type Culture Collection) e uma cepa de *Salmonella enterica*, espécie Gram-negativa, obtida de isolados laboratoriais. Correspondem a três famílias bacterianas: duas pertencentes à Enterobacteriaceae (*S. enterica* e *E. coli*), uma a Pseudomonadaceae (*P. aeruginosa*) e a família Staphylococcaceae (*S. aureus*).

Para obtenção do perfil de resistência das cepas, foi realizado o método de difusão em disco, com antimicrobianos bacteriostáticos e bactericidas de amplo espectro (ampicilina 10µg, cefalexina 30µg, vancomicina 30 µg, gentamicina 10µg, ácido nalidíxico 30µg, ciprofloxacina 5µg e cloranfenicol 30µg) em triplicata no meio Agar Mueller-Hinton, para que se tivesse um

parâmetro de relação com os resultados obtidos dos extratos algais. As médias dos resultados obtidos nas triplicatas estão apresentadas na tabela 3.

3.3 MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO COM OS EXTRATOS

Este teste foi empregado no presente trabalho, e é utilizado para avaliar atividades antimicrobianas. A técnica seguiu as definições estabelecidas pelo National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS 2003^b) modificada para utilização nos discos com os extratos brutos de algas. Para impregnação de alíquotas com 10 μ L dos extratos concentrados e diluídos com DMSO, discos estéreis de papel filtro (Whatman – tipo 3) de 6,0mm de diâmetro foram inseridos no meio ágar Mueller-Hinton (Modificado de Santos *et al.* 2007), após a semeadura com suabe estéril da linhagem bacteriana na concentração 0,5 da Escala Macfarland.

Optou-se pela diluição dos extratos brutos em Dimetilsulfóxido (DMSO), um composto muito usado como solvente aprótico e polar, em discos triplicados nas seguintes proporções do extrato bruto e o diluente (DMSO): Disco 1 (DM1) - 1:3, Disco 2 (DM2) - 2:2 e Disco 3 (DM3) - 3:1. Além dos extratos diluídos no solvente, também foram inseridas triplicatas contendo 10 μ L dos extratos brutos (concentrados). Para o teste controle negativo utilizaram-se os discos contendo alíquota de 10 μ L da solução de DMSO, e como controle positivo o disco de cloranfenicol (30 μ g). As propriedades físicas dos agentes emulsificadores, como o DMSO, são importantes para dispor a substância no meio de cultura, no entanto, se está sujeito a possíveis alterações nas interações moleculares (Nascimento *et al.* 2007).

Seguindo o protocolo adaptado de Rhimou *et al.* (2010) o diâmetro da atividade de inibição antibacteriana foi medido em milímetros com o auxílio de uma régua e um paquímetro, seguindo três padrões básicos: inibição fraca (Resistente - R) \leq 10mm, inibição moderada (Intermediário - I) entre 10 – 15mm e inibição forte (Sensível - S) $>$ 15mm.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS EXTRATOS INIBITÓRIOS

Os extratos de macroalgas com resultado inibitório sobre alguma espécie bacteriana tiveram suas médias das triplicatas testadas pelo Teste ANOVA para um critério de classificação e o Teste de Tukey que visa identificar se as médias dos grupos diferem entre si, com um nível de significância $\alpha \leq 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PESO DOS EXTRATOS

Com relação ao peso seco amostrado dos espécimes coletados, em 10 µL, foi possível estimar a seguinte média: Para *U. linza* e *U. fasciata* obteve-se 0,0017 gramas, correspondente a 1,7 miligramas. Contudo, para *Chaetormopha media*, o resultado foi de 0,00063 gramas, o equivalente a 0,63 miligramas. Mas a espécie que menos teve peso seco foi *H. musciformis*, apenas 0,0001 gramas, ou seja, 0,1 miligramas.

Acredita-se que o maior peso das duas espécies de *Ulva* tenha sido devido a sua composição tecidual que, com seu talo parenquimatoso, teve maior facilidade de maceração na liquidificação, resultando em menores partículas que atravessaram mais facilmente o filtro. Mesmo também sendo o talo de *C. media* de fácil maceração, seu peso foi três vezes menor do que das espécies de *Ulva*, possivelmente pela sua composição tecidual ser rica em gotículas oleosas, observadas visualmente. Em relação a *H. musciformis*, o baixo peso seco está relacionado à constituição tecidual do talo de difícil maceração, ficando grande parte retida pelo papel filtro.

4.2 DISCO DE DIFUSÃO (ANTIBIOGRAMA)

4.2.1 Disco de difusão em ágar com antimicrobianos de amplo espectro

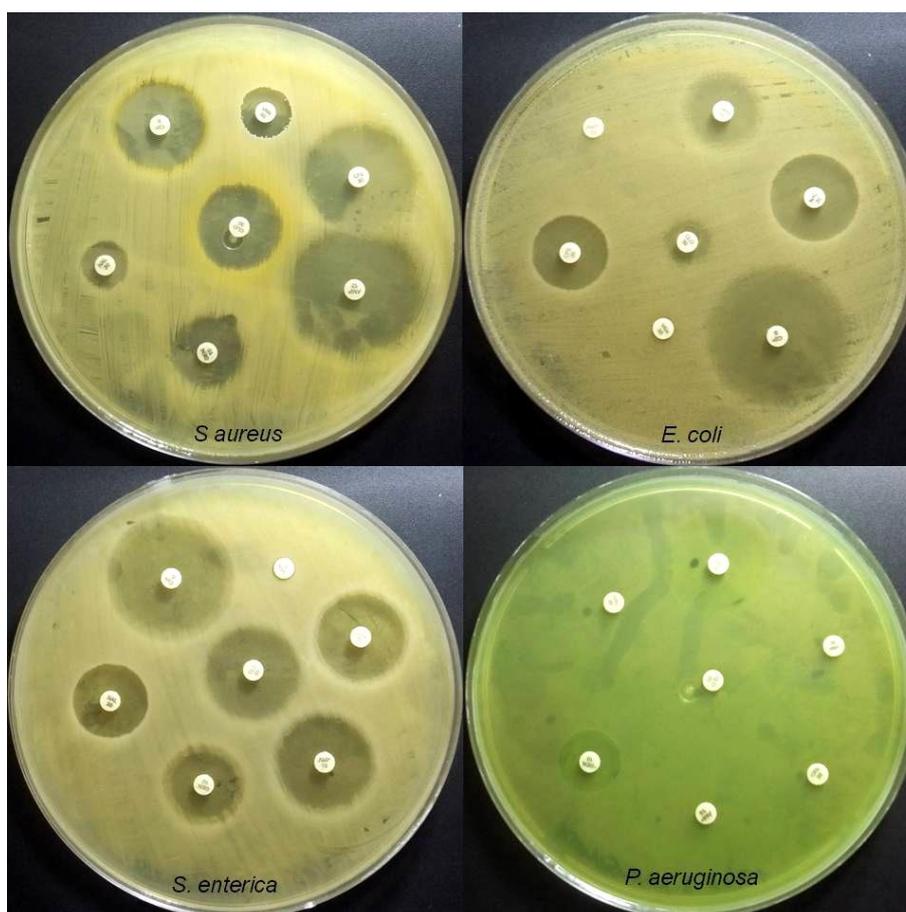
Dos antimicrobianos de uso comercial, utilizados para a análise de sensibilidade das linhagens bacterianas (tabela 3 e figura 2), ciprofloxacina (CIP) mostrou-se o mais eficiente dentre todos. A ciprofloxacina é a quinolona com maior atividade *in vitro*, contra bacilos gram-negativos aeróbios (Barros *et al.* 2001). Já em contrapartida, vancomicina (VAN) foi o menos efetivo, só inibindo a bactéria Gram-positiva *S. aureus*. A vancomicina é um glicopeptídeo, atua inibindo a síntese da parede celular (Luna *et al.* 2010) e justamente devido a esta característica, lhe confere poder de ação contra bactérias Gram-positiva por possuírem uma camada mais espessa de peptídeoglicano.

Tabela 3: Média (mm) de halos de inibição bacteriana dos antibióticos testados

Bactéria	AMP	L	GENT	L	CFE	L	CLO	L	NAL	L	VAN	L	CIP	L
<i>S. aureus</i>	38	S	21	S	33	S	26	S	14		16	S	28	S
<i>E. coli</i>	0	R	21	S	23	S	12	R	22	S	0	R	39	S
<i>S. enterica</i>	28	S	20	S	27	S	27	S	23	S	0	R	34	S
<i>P. aeruginosa</i>	0	R	14	I	0	R	0	R	7	R	0	R	26	S

Legenda: AMP – ampicilina, GENT – Gentamicina, CFE – Cefalexina; CLO – Cloranfenicol, NAL – Ácido Nalidíxico, VAN – Vancomicina; CIP – Ciprofloxacina; L – Leitura; S – Sensível; I – Intermediário; R – Resistente (Pontos de corte preconizados pelo CLSI, 2015 e CLSI, 2005).

Figura 2: Disco de difusão com os antibacterianos testados



Fonte: O Autor, 2016

4.2.2 Disco de difusão em ágar com os extratos de macroalgas

A tabela 4 mostra os resultados obtidos com o método de difusão em disco no ágar Mueller Hinton. Das quatro espécies de algas utilizadas, *U. fasciata*, *C. media* e *H. musciformis* apresentaram resultados de inibição, somente para *P. aeruginosa*.

Del Val *et al.* (2001) utilizando o extrato metanólico de *Ulva rigida* em *P. aeruginosa* (MB 979) não obtiveram efeito inibitório, porém em *S. aureus* (MB 5393) houve um efeito razoável de inibição bacteriana, possivelmente pela influência de terem usado como método de diluição, 0,5 mL de metanol 50%. Shanmughapriya *et al.* (2008) comentam em seu estudo, um limitado espectro de atividade antimicrobiana do extrato produzido com metanol:tolueno (3:1) de *U. fasciata* contra bactérias Gram-positivas, mas não tendo havido inibição para *S. aureus*. Osman *et al.* (2010) aferem terem observado melhores resultados de inibição bacteriana com os extratos de *U. fasciata* em relação aos de *U. linza*, produzidos com etanol, metanol e acetona 70%. Contudo, o método utilizado por eles pode ter influenciado nos resultados, devido a dissolução nos solventes, até atingir uma concentração de 100 mg/mL, após terem sido evaporados no rotavapor.

Tabela 4: Média (mm) dos halos de inibição bacteriana dos extratos testados

Extrato	Bactéria	DM1	L	DM2	L	DM3	L	Pm	L	DMc	Clo
<i>Ulva fasciata</i>	<i>S. aureus</i>	0	R	0	R	0	R	0	R	0	30
	<i>E. coli</i>	0	R	0	R	0	R	0	R	0	11
	<i>S. enterica</i>	0	R	0	R	0	R	0	R	0	30
	<i>P. aeruginosa</i>	10,3	I	9,3	R	8	R	8	R	0	8
<i>Ulva linza</i>	<i>S. aureus</i>	0	R	0	R	0	R	0	R	0	24
	<i>E. coli</i>	0	R	0	R	0	R	0	R	0	10
	<i>S. enterica</i>	0	R	0	R	0	R	0	R	0	26
	<i>P. aeruginosa</i>	0	R	0	R	0	R	0	R	0	0
<i>Chaetomorpha media</i>	<i>S. aureus</i>	0	R	0	R	0	R	0	R	0	28
	<i>E. coli</i>	0	R	0	R	0	R	0	R	0	7,5
	<i>S. enterica</i>	0	R	0	R	0	R	0	R	0	24,5
	<i>P. aeruginosa</i>	10,7	I	10,5	I	10,8	I	10,6	I	0	9
<i>Hypnea musciformis</i>	<i>S. aureus</i>	0	R	0	R	0	R	0	R	0	30
	<i>E. coli</i>	0	R	0	R	0	R	0	R	0	8,8
	<i>S. enterica</i>	0	R	0	R	0	R	0	R	0	27
	<i>P. aeruginosa</i>	10,1	I	10,3	I	10	R	10,2	I	0	9,2

Legenda: DM1 – 75% DMSO e 25% extrato, DM2 – 50%DMSO e 50% extrato, DM3 – 25% DMSO e 75% extrato, Pm – Média dos extratos concentrados, DMc – 100% DMSO, Clo – Cloranfenicol; L – Leitura; Inibição fraca (Resistente - R) \leq 10mm, inibição moderada (Intermediário - I) entre 10 – 15mm e inibição forte (Sensível - S) $>$ 15mm. Fonte: O Autor, 2016

No presente estudo, os resultados obtidos com as duas espécies de *Ulva* não permitem afirmar que ambas possuem os mesmos princípios ativos ou que suas quantidades sejam semelhantes, tendo em vista que *U. fasciata* se diferenciou de *U. linza* (figura 3) por apresentar inibição bacteriana a *P.*

aeruginosa. Além disso, parece ter aumentada a disponibilidade da molécula antibacteriana de *U. fasciata* a *P. aeruginosa*, quando em maior presença do solvente (DM1). Salvador *et al.* (2007) sugerem que a bioatividade de um mesmo táxon pode variar de acordo com a zona de amostragem geográfica. Já, Romeiro (2005) destaca uma possibilidade adicional da interação entre bactérias e plantas, que seria hipotetizar a produção de fitoalexinas como um atributo inerente à planta. Deste modo, a planta responderia à infecção sintetizando estes compostos, independentemente de ser o patógeno compatível ou incompatível. E ainda, que o patógeno compatível seria capaz de metabolizar a fitoalexina produzida, transformando-a num composto atóxico. Na relação planta e patógeno compatível, alguma etapa do processo de combate a este tipo de hospedeiro falha, seja pela falta de produção e desativação dos compostos de defesa, ou também, pela impossibilidade de reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro (Moraes, 1998).

Figura 3: Disco de difusão com o extrato bruto de *U. linza*

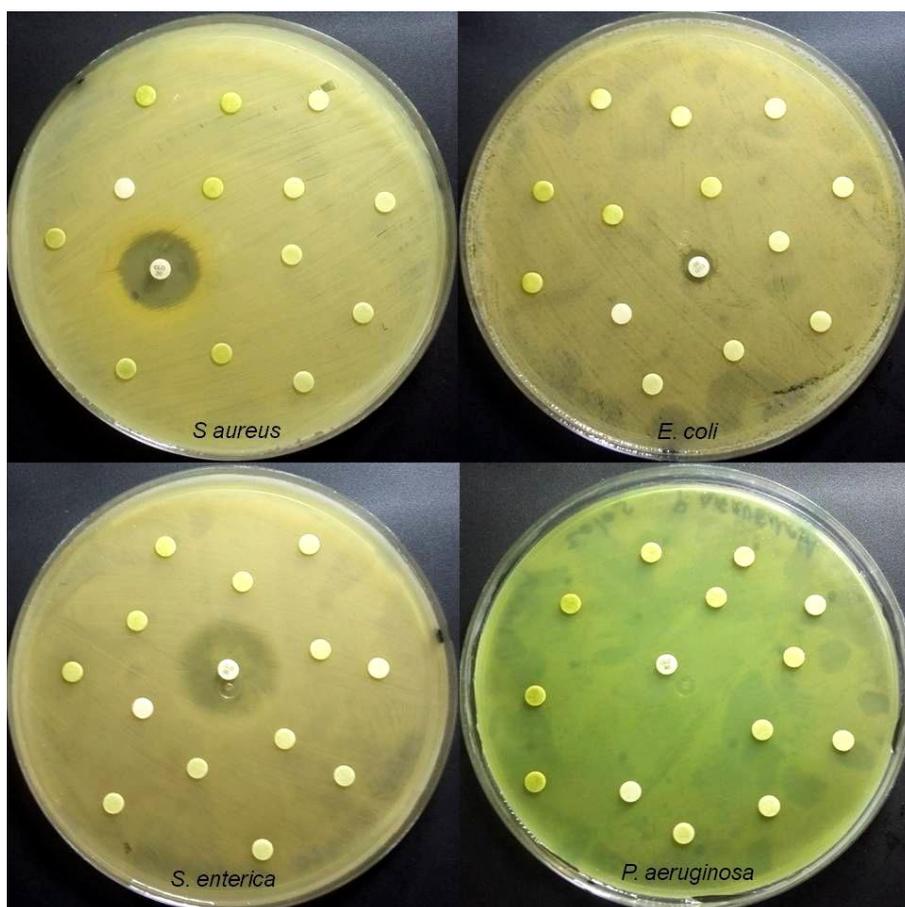


Foto: O Autor, 2016

C. media e *H. musciformis* apresentaram as maiores médias de inibição nos discos triplicados, mesmo que com ambas as espécies, os extratos tenham tido menor peso seco, se comparado aos obtidos nas duas espécies de *Ulva*. Tanto no extrato bruto puro, quanto nos extratos solúveis em diluente DMSO, a atividade antibacteriana em *P. aeruginosa* (*C. media* na figura 4) foi semelhante. Rosaline *et al.* (2012) usando o extrato de *Chaetomorpha linum* produzido com hexano, em disco de difusão sobre *P. aeruginosa*, também tiveram resultados positivos, inibindo-a em até 9,67 mm (+0,58 mm de diâmetro), porém, o metanólico não apresentou inibição. Manikandan *et al.* (2011) utilizando o extrato metanólico obtido de *Chaetomorpha antennina* fresca sobre isolados resistentes de *P. aeruginosa* obtiveram fraca atividade inibitória em disco de difusão (de 1 a 5 mm de halo), mas ainda, na mesma espécie, porém de linhagem multirresistente isolada de Unidades de Terapia Intensiva (UTI's) de Hospitais, não mostrou-se ativa. Já Shanmughapriya *et al.* (2008), utilizando o extrato fresco de *C. antennina* produzido com solução de metanol:tolueno (3:1), não apresentaram resultados inibitórios, mas em contraste, neste mesmo estudo, *Hypnea pannosa* demonstrou maior atividade, contra bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*. Também, Rhimou *et al.* (2010) relataram ter o extrato metanólico de *H. musciformis* grande atividade inibitória para diferentes bactérias Gram-negativas como *E. coli* e também sobre *S. aureus*. Entretanto, Adaikalaraj *et al.* (2012) relataram baixa atividade antibacteriana dos extratos metanólicos de *H. musciformis* em *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus*, 7mm de diâmetro inibitório apenas.

Shanmughapriya *et al.* (2008), pelos resultados obtidos com 7 espécies de macroalgas marinhas sugerem, preliminarmente, que os extratos produzidos com a composição de solventes metanol:tolueno (3:1), favoreçam uma melhor dissolução dos compostos lipofílicos. Ademais, trata-se de uma ciência que está recém ganhando campo metodológico, carecendo, portanto, ainda, de procedimentos analíticos que visem caracterizar as substâncias envolvidas na inibição bacteriana, e principalmente os métodos que irão melhor concentrá-las para análises do seu comportamento bioquímico frente às linhagens bacterianas.

Figura 4: Disco de difusão do extrato de *C. medía* em *P. aeruginosa*

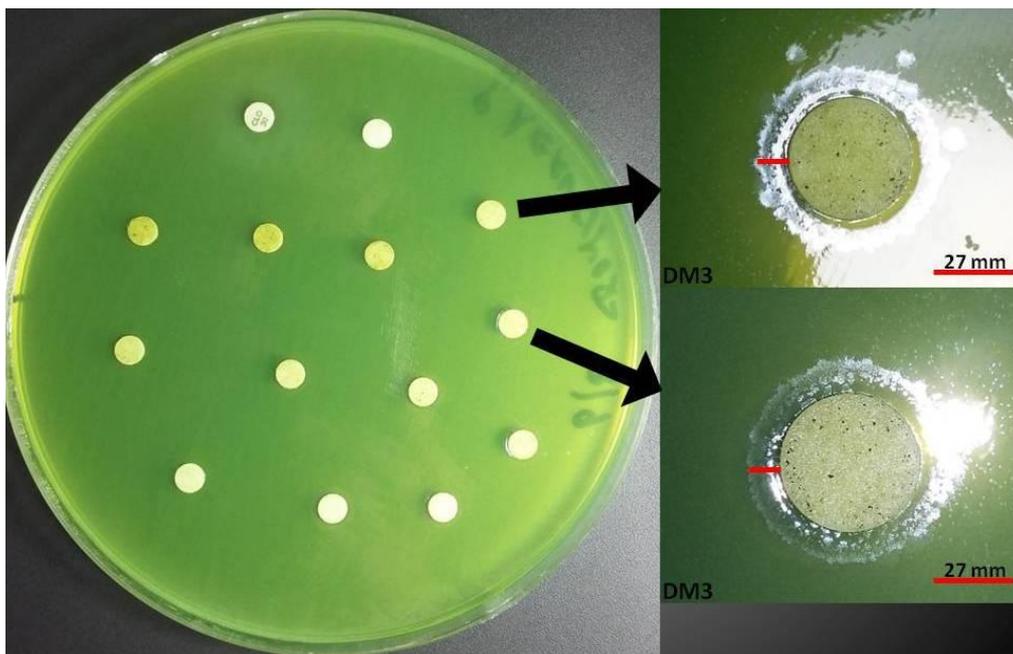
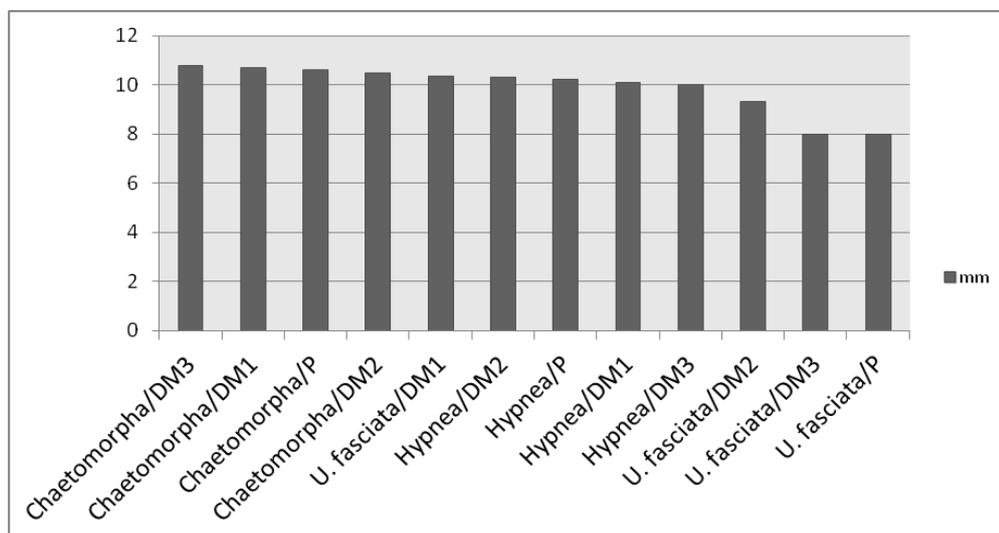


Foto: O Autor, 2016

4.3 EXTRATOS INIBITÓRIOS DE *P. aeruginosa*

Apenas *P. aeruginosa* foi inibida por extratos produzidos (figura 5), mas também foi a única com perfil de multirresistência somente apresentando sensibilidade a ciprofloxacina, e por isso, apesar de inicial o resultado mostra-se interessante. Barros *et al.* (2001) afirmam que ciprofloxacina é ativo contra *P. aeruginosa*, mas outras *Pseudomonas* são menos sensíveis.

Figura 5: Diâmetro de inibição da bactéria *P. aeruginosa*



Fonte: O Autor, 2016

Trata-se de um microrganismo de importante interesse médico, comum em infecções hospitalares, diante da sua patogenicidade em pacientes imunodeprimidos, e também por apresentar frequentes linhagens multirresistentes. Neves *et al.* (2011) documentam uma série de relatos mundiais e inclusive no Brasil, envolvendo a problemática da endemicidade com isolados clínicos de *P. aeruginosa* multirresistentes (MDR) que estão relacionados a elevados índices de morbidade e mortalidade ocasionadas por infecção.

O Teste ANOVA com um critério de classificação demonstrou haver diferença estatística significativa entre as médias das triplicatas dos três grupos tratados dos extratos brutos das macroalgas que obtiveram resultado inibitório para *P. aeruginosa*, *C. media*, *H. musciformis* e *U. fasciata* (Tabela 5). O F. calculado foi igual a 17,97 e o F. crítico igual a 3,28 para um $\alpha \leq 0,05$.

E precisamente, analisando as médias dos grupos pelo Teste de Tukey ($\alpha \leq 0,05$), corroborou-se estatisticamente, que as médias de atividades inibitórias entre os extratos brutos das macroalgas *C. media* e *H. musciformis* não diferiram entre si (Q. calculado= 2,3 e Q. crítico= 3,47), diferentemente da média de *U. fasciata* que foi significativamente diferente da de *C. media* (Q. calculado=8,23 e Q. crítico=3,47) e de *H. musciformis* (Q. calculado=5,93 e Q. crítico=3,47). O Teste de Tukey é um complemento à ANOVA e visa a identificar quais as médias que, tomadas duas a duas, diferem significativamente entre si (Callegari-Jacques, 2003).

Tabela 5: Diâmetro inibitório (mm) à *P. aeruginosa* dos extratos brutos

Disco	<i>U. fasciata</i>	<i>C. media</i>	<i>H. musciformis</i>
DM1	10	10,1	10,1
DM1	11	11	10,1
DM1	10	10,9	10,1
DM2	10	11	10,5
DM2	9	10	10,5
DM2	9	10,5	9,9
DM3	9	10,6	10
DM3	8	11	10
DM3	7	10,8	10
P	8	11,1	10,7
P	8	10,2	10
P	8	10,4	10

Legenda: DM1 – 75% DMSO e 25% extrato, DM2 – 50%DMSO e 50% extrato, DM3 – 25% DMSO e 75% extrato, P – Extratos concentrados. Fonte: O Autor, 2016

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Publicam-se os primeiros resultados abordando experimentos com atividade antibacteriana de macroalgas marinhas coletadas no Estado do Rio Grande do Sul.

Demonstrou-se a importante atividade inibitória de macroalgas que estão sendo estudadas ao redor do mundo, e neste trabalho, dos extratos brutos de *U. fasciata*, *C. media* e *H. musciformis* diante de *P. aeruginosa*, uma importante bactéria de interesse médico, majoritariamente de infecção hospitalar.

C. media e *H. musciformis*, mesmo em baixas concentrações tiveram as médias de suas triplicatas significativamente diferentes das de *U. fasciata*, evidenciado pelo Teste ANOVA para um critério de classificação e o Teste de Tukey ($\alpha \leq 0,05$), mostrando serem espécies com grande potencial antibacteriano.

Trata-se do primeiro resultado obtido na literatura de inibição bacteriana com a espécie *C. media*. Também se pode inferir que *U. fasciata* teve maior atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa*, quando, com o extrato bruto mais solúvel no solvente DMSO, diferentemente de *C. media* e *H. musciformis*, não tendo sido observadas diferenças da atividade antibacteriana diante da dissolução dos respectivos extratos no diluente.

Necessitam-se de maiores estudos, tendo como experiência, a dificuldade na busca duma padronização de métodos para melhor extração, concentração e solubilização dos compostos químicos de interesse antibacteriano.

REFERÊNCIAS

ABDUSSALAN, S. Drugs from Seaweeds. **Medical Hypotheses**. Vol. 32, p. 33-35, 1990.

ABREU, G.F.de; TALAMINI, V. e STADNIK, M.J. Bioprospecção de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para o controle da antracnose do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, Vol.34, n.1, p.78-82, 2008.

ADAIKALARAJ, G.; PATRIC RAJA, D.; JOHNSON, M.; JANAKIRAMAN, N. e BABU, A. Antibacterial potential of selected red seaweeds from Manapad coastal areas, Thoothukudi, Tamil Nadu, India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 1077-1080, 2012.

ALGAEBASE. Disponível em: <<http://www.algaebase.org/>>. Acesso em: 10 nov. 2016.

ANDRADE, L.R.; LEAL, R.N.; NOSEDA, M.; DUARTE, M.E.R.; PEREIRA, M.S.; MOURÃO, P.A.S.; FARINA, M. e AMADO FILHO, G.M. Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity. **Marine Pollution Bulletin**. Vol. 60, p.1482-1488, 2010.

BAPTISTA, L.R.M. **Flora marinha de Torres: (Chlorophyta, Xantophyta, Phaeophyta, Rhodophyta)**. Porto Alegre: Ministério da Educação e Cultura, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1977.

BARROS, E.; BITTENCOURT, H.; CARAMORI, M.L. e MACHADO, A. Antimicrobianos: consulta rápida. 3ª Edição – Porto Alegre: **Artmed Editora**, 2001.

BIANCO, E.M.; PIRES, L.; SANTOS, G.K.N.; DUTRA, K.A.; REIS, T.N.V.; VASCONCELOS, E.R.T.P.P.; COCENTINO, A.L.M. e NAVARRO, D.M.A.F. Larvicidal activity of seaweeds from northeastern Brazil and of a halogenated sesquiterpene against the dengue mosquito (*Aedes aegypti*). **Industrial Crops and Products**. Vol.43, p.270-275, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano nacional de controle de resíduos e contaminantes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009.

CABRAL, I.S.R. **Extratos de algas marinhas como agentes antioxidantes e antimicrobianos e seus efeitos na qualidade de *Minced* de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. Tese (Doutorado). Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Universidade de São Paulo, 2012.

CABRAL, I.S.R.; SHIRAHIGUE, L.D.; ARRUDA, L.F. de; CARPES, S.T. e OETTERER, M. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante e antimicrobiano. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Vol. 29, nº 2, p. 181-192, jul./dez., 2011.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. Bioestatística: princípios e aplicações Porto Alegre: **Artmed Editora**, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25 (ISBN 1-56238-989-0 [Print]; ISBN 1-56238-990-4 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE/NCCLS. **Performance Standards for Susceptibility Testing**; Fifteenth Informational Supplement CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, 2005.

COTO, A. C S e PUPO D. Flora Ficológica do Estado de São Paulo. Vol. 3 Ulvophyceae. São Paulo: Editora RIMA, 2009.

DEL VAL, A.G.; PLATAS, G.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; SUAY, J.G.I.; VICENTE, F.; DEL RIO, E.P.M.J. e PELÁEZ, G.G.R.F. Screening of antimicrobial activities in red, Green and Brown macroalgae from Gran Canaria (Canaria Islands, Spain). **International Microbiology**, Vol. 4, p.: 35-40, 2001.

DEVI, G.K. MANIVANNAN, K. THIRUMARAN, G. RAJATHI, F.A.A. e ANANTHARAMAN, P. *In vitro* antioxidant activities of selected seaweeds from Southeast coast of India. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. P.205-211, 2011.

EOM, S-H; KIM, Y-M e KIM, S-K. Antimicrobial effect of phlorotannins from marine Brown algae. **Food and Chemical Toxicology**. Vol.50, p.3251-3255, 2012.

FEIJÓ, L.D. **Identification and assessment of emerging issues associated with residues and chemical contaminants in dairy products – Brazil experience**. In: World Dairy Summit, 2012, Cape Town. Presentations New Perspectives on Dietary Protein Quality by Prof. Paul Moughan, Food Safety – Conference 4. Disponível em: <http://www.fil-idf.org/idfsummit2012/IDFSummit2012_PRIVATE/Presentations/Conference_04/Feijo,Leandro.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2016.

GOERING, R.V.; CHIODINI, P.L.; DOCKRELL, H.D.; ROITT, I.M. e ZUCKERMAN, M. Microbiologia Médica de Mims. 5ª Ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2014.

GOSWAMI, A. Evolução criativa das espécies: uma resposta da nova ciência para as limitações da teoria de Darwin. São Paulo: **Aleph**, 2009.

GUARDABASSI, L. Guia de antimicrobianos em veterinária. 1ª Edição – Porto Alegre: **Artmed Editora**, 2010.

GUPTA, S. e ABU-GHANNAM, N. Bioactive potential and possible health effects of edible Brown seaweeds. **Trends in Food Science & Technology**. Vol.22, p.315-326, 2011^a.

GUPTA, S. e ABU-GHANNAM, N. Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. Vol. 12, p.600-609, 2011^b.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.L. e ADELBERG, E. Microbiologia médica: um livro médico Lange. 24^a Edição – Rio de Janeiro: **McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda**, 2009.

KAISER, J. **NIH gets \$2 billion boost in senate spending bill**. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/news/2016/06/nih-gets-2-billion-boost-senate-spending-bill>>. Acesso em: 30 ago.2016.

KOCSIS, B.; KÁDAR, B.; TÓTH, Á.; FULLÁR, A. e SZABÓ, D. MgrB variants in colistin-susceptible and colistina-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, may, 2016.

KORB, A.; BRAMBILLA, D.K.; TEIXEIRA, D.C. e RODRIGUES, R.M. Riscos para a saúde humana do uso de antibióticos na cadeia produtiva leiteira. **Revista de Saúde Pública**, Vol.4, nº1, jul./dez., 2011.

LANG, K.L. **Investigação Química e Biológica da Alga Vermelha *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgesen**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências da Saúde, 2006.

LEE, J.Y.; PARK, Y.K.; CHUNG, E.S.; NA, I.Y. e KO, K.S. Evolved resistance to colistin and its loss due to genetic reversion in *Pseudomonas aeruginosa*. **Scientific Reports**, may, 2016.

LUNA, C.M.; RODRIGUEZ-NORIEGA, E.; BAVESTRELLO, L. E GOTUZZO, E. Tratamento de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. Vol. 14, supl. 2, Salvador, Dez., 2010.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V. e CLARK, D.P. Microbiologia de Brock. 12^a Edição – Porto Alegre: **Artmed Editora**, 2010.

MANIKANDAN, S.; GANESAPANDIAN, S.; MANOJ SINGH; SANGEETHA, N. e KUMARAGURU, A.K. Antimicrobial Activity of Seaweeds Against Multi Drug Resistant Strains. **International Journal of Pharmacology**, Vol. 7(4), p.: 522-526, 2011.

MARTINS, R.M. **Atividades Antimicrobiana e Citotóxica de Extratos de Macroalgas da Antártica**. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação

em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, 2014.

MAYER, A.M.S.; RODRÍGUEZ, A.D.; BERLINCK, R.G.S. e FUSETANI, N. Marine pharmacology in 2007-8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. **Comparative biochemistry and Physiology, Part C**. Vol. 153, p.191-222, 2011.

MORAES, M.G. Mecanismos da resistência sistêmica adquirida em plantas. In: Luz, W.C., Fernandes, J.M., Prestes, A.M., Picinini, E.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, Embrapa Trigo 6:261-284, 1998.

NASCIMENTO, P.F.C.; NASCIMENTO, A.C.; RODRIGUES, C.S.; ANTONIOLLI, Â.R.; SANTOS, P.; JÚNIOR, A.M.B. e TRINDADE, R.C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Vol. 17, nº1, p. 108-113, jan./mar., 2007.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition**. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003^b.

NETO, J.A e FUJI, M.T. Algas Marinhas Bentônicas do Estado de São Paulo – Guia Ilustrado para Identificação e Utilização. São Paulo: **Editora Rima**, 2016.

NEVES, P.R.; MAMIZUKA, E.M.; LEVY, C.E. e LINCOPAN, N. Pseudomonas aeruginosa multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Vol.47, n.4, p.409-420, 2011.

O'NEILL, J. **Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations – the review on antimicrobial resistance**. London: AMR-review.org, 2016.

OLIVEIRA, S.J. de. Guia bacteriológico prático: microbiologia veterinária. 2^a Edição – Canoas: **Editora ULBRA**, 2000.

OLIVEIRA, S.J. de. Guia bacteriológica prático: microbiologia veterinária. 3^a Edição – Canoas: **Editora ULBRA**, 2012.

OSMAN, M.E.H.; ABUSHADY, A.M. e ELSHOBARY, M.E. In vitro screening of antimicrobial activity of extracts of some macroalgae collected from Abu-Qir bay Alexandria, Egypt. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 9(12), p.: 7203-7208, 22 march, 2010.

PAULERT, R. **Atividade antimicrobiana e controle da antracnose do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando polissacarídeo e extratos da macroalga marinha *Ulva fasciata***. Dissertação (Mestrado).

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

PAYNE, M.; CROXEN, M.A.; LEE, T.D.; MAYSON, B.; CHAMPAGNE, S.; LEUNG, V.; BARISO, S.; HOANG, L. e LOWE, C. *Mcr-1* – positive colistina-resistant *Escherichia coli* in traveler returning to Canada from China. **Emerging Infectious Diseases**, Vol. 22, nº9, set, 2016.

PEDRINI, A. de G. (Org.). Macroalgas: uma introdução à taxonomia. 1ª Edição – Rio de Janeiro: **Technical Books**, 2010.

PEREIRA, R.C. e TEIXEIRA, V.L. Sesquiterpenos das algas marinhas *Laurencia LAMOUROUX* (Cerámiales, Rhodophyta) 1: Significado ecológico. **Química Nova**, São Paulo, v.22, n.3, junho, 1999.

PEREIRA, R.C.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y.; TEIXEIRA, V.L. e KELECOM, A. Os florotaninos e fenóis de algas pardas (Phaeophyceae). **Revista Ínsula**, n.19, supl. 349 a 374, Florianópolis, 1989.

RAW, I. e SANT'ANNA, O.A. Aventuras da microbiologia. 1ª Edição - São Paulo: **Hacker Editores e Editora Narrativa Um**, 2002.

RHIMOU, B.; HASSANE, R.; JOSÉ, M. e BOURGOUGNON, N. The antibacterial potential of the seaweeds (Rhodophyceae) of the Strait of Gibraltar and the Mediterranean Coast of Morocco. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 9(38), p. 6365-6372, 20 de setembro, 2010.

ROMEIRO, R.S. Bactérias fitopatogênicas. 2ª Edição atual. e ampl. – Viçosa: **Editora UFV**, 2005.

SADAVA, D.; HELLER, H.C.; ORIAN, G.H.; PURVES, W.K. e HILLIS, D.M. Vida: A Ciência da Biologia. Volume III: Plantas e Animais. Porto Alegre: **Artmed Editora**, 2009.

SALVADOR, N.; GARRETA, A.G.; LAVELLI, L. e RIBERA, M.A. Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. **Scientia Marina**, Vol. 71(1), p.:101-113, march, 2007.

SANTOS, N. de Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto e Contexto Enfermagem**, Vol. 13, nº esp., p. 64-70, 2004.

SANTOS, S.C.; FERREIRA, F.S.; ROSSI-ALVA, J.C. e FERNANDEZ, L.G. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol.17(2): p. 215-219, Abr/Jun., 2007.

SHANMUGHAPRIYA, S.; MANILAL, A.; SUJITH, S.; SELVIN, J.; SEGHAL KIRAN, G. e NATARAJASEENIVASAN, K. Antimicrobial activity of seaweeds

extracts against multiresistant pathogens. **Annals of Microbiology**, vol. 58 (3), p.535-541, 2008.

SILVA, P.M. da. **Atividades biológicas de extratos de algas marinhas brasileiras**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Universidade de São Paulo. Instituto de Química, 2009.

SMITH, G. M. **Botânica Criptogâmica: algas e fungos**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1979.

SOUZA, P.O. de. **Macroalgas da Antártica: propriedades químicas e avaliação biológica**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, 2014.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R. e CASE, C.L. Microbiologia. 6ª Edição – Porto Alegre: **Artmed Editora**, 2000.

VEERARAGHAVAN, B.; ANANDAN, S.; RAGUPATHI, N.K.D.; VIJAYAKUMAR, S.; SETHUVEL, D.P.M. e BISWAS, I. Draft genome sequence of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* strain VB22595 isolated from a central line-associated bloodstream infection. **Genome Announcements**, Vol. 4, jul./ago., 2016.

VIEIRA, A.F. CABRAL, I.S.R.; PORTO, E. e OETTERER, M. **Atividade antimicrobiana e composição fenólica de algas marinhas**. *In*: 19º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2011, Piracicaba. Anais do 19º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2011.

VILLARREAL-GÓMEZ, L.J.; SORIA-MERCADO, I.E.; GUERRA-RIVAS, G. e AYALA-SÁNCHEZ, N.E. Antibacterial and anticancer activity of seaweeds and bacteria associated with their surface. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, Vol. 45, nº2, p.: 267-275, agosto, 2010.